



**HAL**  
open science

# Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, une nouvelle cible pour le traitement des douleurs neuropathiques

Pierre-Yves Martin

► **To cite this version:**

Pierre-Yves Martin. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, une nouvelle cible pour le traitement des douleurs neuropathiques. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS023 . tel-03189535

**HAL Id: tel-03189535**

**<https://theses.hal.science/tel-03189535>**

Submitted on 4 Apr 2021

**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.

**ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT**

*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université (Décret du 5 Juillet 1984)

**Spécialité Neuropharmacologie**

Soutenue le 26 Octobre 2018

**Pierre-Yves MARTIN**

---

**Le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>6</sub> : une nouvelle cible pour le traitement  
des douleurs neuropathiques.**

---

Membres :	Pr. Christine COURTEIX	Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd
	Pr. Alain ESCHALIER	Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd
	Dr. Stéphane DOLY	Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd
	Dr. Philippe MARIN	Université de Montpellier, Montpellier
	Dr. Mathieu CHARVERIAT	Theranexus, Lyon
Rapporteurs :	Dr. Patricia GASPARD	Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
	Dr. Ipek YALCIN	Université de Strasbourg, Strasbourg
	Dr. Bruno GUIARD	Université de Paris-Sud, Paris XI

Neuro-Dol UMR 1107 INSERM/UCA

Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur

Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand



## Remerciements

### **A Monsieur le Professeur Alain Eschaliér,**

Je tiens tout d'abord à vous remercier pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Neuro-Dol et de me faire l'honneur de votre présence dans le jury de ma thèse.

### **A Mesdames et Monsieur les Docteurs Ipek Yalcin, Patricia Gaspard et Bruno Guiard,**

Je souhaite vous remercier de me faire l'honneur de juger mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs.

### **A Monsieur le Docteur Mathieu Charvériat,**

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté sans hésitation d'évaluer ces travaux. Ayant déjà eu l'occasion de travailler ensemble, ta présence en tant que membre du jury me touche particulièrement.

### **A Madame le Docteur Sophie Pezet,**

Je vous remercie d'avoir accepté de me suivre durant ces 3 années lors des différents comités de thèse et ainsi, de m'avoir donné votre avis éclairé sur l'évolution de mon travail.

### **A Monsieur le Docteur Philippe Marin,**

Un grand merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour avoir assisté à mes comités de thèse, pour votre aide et votre collaboration active à la réalisation de ces travaux. C'est un grand honneur pour moi que vous siégiez dans ce jury.

### **A Madame le Professeur Christine Courteix,**

Je souhaite vous exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude. Merci de m'avoir accordé votre confiance dans la réalisation de ces travaux, merci de m'avoir accompagné avec bienveillance, merci de votre disponibilité à mon égard. Vous m'avez montré l'importance de la rectitude et de la perfection scientifique tant en terme d'expérimentation que de communications orale et écrite. C'est avec plaisir et respect que j'ai travaillé à vos côtés au long de ces 3 années et c'est avec une certaine nostalgie que je quitterai bientôt le laboratoire. J'espère très sincèrement avoir répondu à vos attentes. La confiance que vous m'avez accordée m'a permis d'obtenir davantage que de simples aptitudes professionnelles.

**A Monsieur le Docteur Stéphane Doly,**

Je souhaite te remercier chaleureusement pour les grandes avancées, notamment *in vitro*, que tu as permis lors de ton arrivée au laboratoire. J'ai particulièrement apprécié collaborer avec toi, même si ta façon de travailler fut quelquefois un peu différente de la mienne (c'est peut-être d'ailleurs cette complémentarité qui fait l'efficacité d'une équipe). J'ai pu bénéficier de ton expertise tant technique que théorique et pour cela je t'en suis sincèrement reconnaissant. Merci pour ton humour, qui durant les périodes de doutes et de questionnements, fut toujours bienvenu. Merci également d'avoir partagé avec moi ton expérience et tes avis sur la recherche scientifique et sur ma poursuite professionnelle.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui ont collaboré à la réalisation de cette thèse, notamment :

**A l'INSERM**, pour avoir financé ces travaux de thèse.

**A Messieurs les Docteurs Pawel Zajdel et Fabrice Anizon,**

Je vous remercie pour ces fructueuses collaborations m'ayant permis d'obtenir les outils pharmacologiques précis et innovants nécessaires.

**A Mesdames Anne-Marie Privat, Amélie Cohadon, Lamyae Ikan, Laetitia Pouchol et Ophélie Lahaie,**

Avec qui j'ai apprécié de travailler, et dont la rigueur n'a jamais fait défaut.

**A Monsieur Éric Chapuy,**

Ayant activement participé à la réalisation de ces travaux, je souhaite te remercier. Un grand merci pour ton aide technique, ta bonne humeur communicative et nos discussions sur bon nombre de sujets. Puisses-tu continuer à travailler les abdos avec autant d'entrain !

**A l'équipe NeuroDol,**

Je tiens à tous vous remercier chaleureusement, notamment les doctorant(e)s, compagnons avec lesquels nous avons affronté cette tâche, tantôt stimulante et marquante, tantôt rude, que représente la réalisation d'une thèse. Je pense notamment à Amandine, Amélie, Elodie(s), Geoffroy, Guillaume, Laurianne, Manon, Melissa, Sylvain et également aux post-doc Madhi et

Roberto, à qui je souhaite succès et réussite dans la poursuite de leurs carrières. Je remercie également tous les titulaires m'ayant permis au gré d'échanges, de mener ces travaux de façon la plus pertinente possible.

Mes remerciements vont enfin à ma famille et mes amis,

Je tiens évidemment à témoigner ma gratitude envers **toute ma famille** pour votre soutien indéfectible. Merci à mes **parents**, mon **frère** et ma **sœur** pour m'avoir aidé à être ce que je suis aujourd'hui. Le fait que vous veniez tous assister à ma thèse me touche profondément et pour cela, je vous en remercie.

A toi **Lucie**, merci de m'avoir soutenu et épaulé de façon inconditionnelle durant cette thèse (pendant les bons moments comme ceux délicats). T'avoir à mes côtés est une véritable chance.

Mes amis proches par le cœur mais dont la distance nous sépare désormais : **Alex, Lolo, Flo Guigui** et **Ben**. Les instants passés ensemble sont rares mais ô combien inestimables et pour cela je vous en remercie. Mes amis « Clermontois » : **Alex, Flo, David, Clement(s), Cindy...** avec qui j'aurais passé durant ces années d'études de très bons moments, notamment à la salle de sport (mais pas uniquement !).

Mes plus chaleureux remerciements vont enfin à mes amis et plus ... notamment Jean dont la discrétion a toujours été une vertu silencieuse ...





## Résumé

### **Le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>6</sub> : une nouvelle cible pour le traitement des douleurs neuropathiques.**

En France, la prévalence des douleurs neuropathiques est estimée à 6,9% de la population adulte. Ces douleurs ont un impact important sur la qualité de vie du patient et sont souvent associées à des comorbidités dépressives, anxieuses, cognitives et des troubles du sommeil. La prise en charge thérapeutique des douleurs neuropathiques demeure un défi médical majeur, l'efficacité des traitements de référence (antidépresseurs (tricycliques et inhibiteurs de la recapture de la sérotonine-noradrénaline) et anti-épileptiques (gabapentine / prégabaline)) étant peu satisfaisante.

Malgré le rôle majeur de la sérotonine dans la modulation de la douleur, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont peu efficaces alors qu'ils exposent à moins d'effets indésirables que les antidépresseurs tricycliques. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, connu pour ses effets dans les fonctions cognitives, a récemment émergé comme un nouvel acteur de la modulation sérotoninergique de la douleur. Outre son couplage à la protéine Gs, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est physiquement associé à des partenaires protéiques intracellulaires dont mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), également impliquée dans la douleur neuropathique et la régulation des fonctions cognitives.

Les travaux présentés ont permis de caractériser la localisation sub-cellulaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub> au niveau du cil primaire de neurones présents dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière suggérant l'implication de cette structure dans la modulation de la douleur. L'administration d'agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>6</sub> exerce un effet antiallodynique et prévient les déficits cognitifs associés chez le rat SNL, alors que des antagonistes neutres sont dépourvus d'effets, suggérant une activité constitutive du récepteur et son implication dans l'hypersensibilité douloureuse dans ce modèle de neuropathie. De même, l'administration de rapamycine, un inhibiteur de mTOR, réduit l'allodynie tactile et les déficits cognitifs associés chez les rats SNL.

Ils ont également permis de démontrer le couplage entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et mTOR *in vitro* et *in vivo* chez le rat douloureux. Ainsi, à l'aide d'un peptide interférant s'opposant à l'interaction physique du récepteur avec mTOR, injecté par voie intrathécale, une diminution des signes douloureux et des troubles cognitifs a été observée confirmant le rôle délétère de l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> spinal et mTOR en condition de douleur neuropathique.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux permet une meilleure compréhension du rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de son partenaire mTOR dans la douleur chronique et ouvre de nouvelles perspectives dans sa prise en charge avec, notamment, le développement de nouveaux agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.



## Abstract

### **The serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor: a new target for the treatment of neuropathic pain.**

Neuropathic pain affects 6.9% of the French adult population. They have a significant impact on the quality of life of the patient, and often coexist with depression, anxiety, sleep disturbances and cognitive dysfunction. Chronic neuropathic pain and these co-morbidities are poorly controlled and represent a public health problem. First-line treatments (antidepressants (tricyclic and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors) and anti-epileptic drugs (gabapentin / pregabalin)) are unsatisfactory due to a lack of efficiency.

Despite the major role of serotonin in pain modulation, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are poorly effective while they exhibit fewer adverse effects than tricyclic antidepressants. The 5-HT<sub>6</sub> receptor, known for its effects on cognitive functions, has recently emerged as a new target for serotonergic modulation of pain. In addition to its coupling to the Gs protein, the 5-HT<sub>6</sub> receptor is physically associated with intracellular protein partners including mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), also involved in neuropathic pain and in regulation of cognitive functions.

In the present work, we characterize the sub-cellular localization of the 5-HT<sub>6</sub> receptor in primary cilium of neurons in dorsal horn spinal cord, suggesting the involvement of primary cilia in pain modulation. The administration of 5-HT<sub>6</sub> receptor inverse agonists exerts an anti-allodynic effect and abolishes co-morbid cognitive deficits in SNL rats, whereas neutral antagonists are devoid of effects, suggesting a constitutive activity of the receptor involved in pain hypersensitivity. Similarly, administration of rapamycin, an mTOR inhibitor, reduces tactile allodynia and co-morbid cognitive deficits in SNL rats.

We also demonstrate the interaction between the 5-HT<sub>6</sub> receptor and mTOR *in vitro* and *in vivo* in painful rats. Thus, thanks to an interfering peptide inhibiting the physical interaction between 5-HT<sub>6</sub> receptor and mTOR (intrathecally injected), we improve mechanical and thermal allodynia confirming the deleterious role of the spinal 5-HT<sub>6</sub> receptor-mTOR interaction under neuropathic pain condition.

Taken together, these results contribute to a better understanding of the role of the 5-HT<sub>6</sub> receptor and its mTOR partner in chronic pain and opens new ways in its management with, in particular, the development of new 5-HT<sub>6</sub> receptor inverse agonists.



## Contribution scientifiques

### **Publications :**

**5-HT<sub>2A</sub> receptors and Pain.** *In: The Receptors. 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the Central Nervous System.* 2018. Ed Bruno P. Guiard & G. Di Giovanni, 339-352. Springer International Publishing. (ISBN: 978-3-319-70472-2).

Christine Courteix, Amandine Dupuis, Pierre-Yves Martin, Benoit Sion.

**Disrupting 5-HT<sub>6</sub> receptor-operated mTOR signaling alleviates neuropathic pain and rescues cognitive dysfunction in SNL rats.**

Pierre-Yves Martin, Stéphane Doly, Madhi Hamieh, Eric Chapuy, Denis Ardid, Pawel Zajdel, Alain Eschalier, Philippe Marin, Christine Courteix (*en cours de rédaction*).

**5-HT<sub>6</sub> receptor inverse agonists increase the analgesic and procognitive effects of fluoxetine in neuropathic rats.**

Pierre-Yves Martin, Stéphane Doly, Denis Ardid, Alain Eschalier, Christine Courteix (*en cours de rédaction*).

### **Communications :**

**Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, une nouvelle cible pour le traitement des douleurs neuropathiques ?**

Pierre-Yves Martin, Madhi Hamieh, Anne-Marie Privat, Frederic Libert, Fabien Marchand, Alain Eschalier, Philippe Marin, Christine Courteix.

*15<sup>ème</sup> congrès annuel de la SFETD, Nantes, 12-14 novembre 2015.*

**Une nouvelle cible pour le traitement des douleurs neuropathiques : le récepteur 5-HT<sub>6</sub>.**

Pierre-Yves Martin

*Les Doctoriales, (vulgarisation scientifique), Montricher-Albanne, 27 mars - 3 avril 2017*

**5-HT<sub>6</sub> receptor/mTOR signaling pathway, a new target for the management of neuropathic pain.**

Pierre-Yves Martin, Madhi Hamieh, Stéphane Doly, Pawel Zajdel, Philippe Marin, Alain Eschalier, Christine Courteix.

*6<sup>th</sup> international congress on Neuropathic Pain, NeuPSIG, Göteborg, Suède, 15-18 juin 2017.*

**Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine : une nouvelle cible pour le traitement de la douleur neuropathique ?**

Pierre-Yves Martin, Madhi Hamieh, Anne-Marie Privat, Frederic Libert, Fabien Marchand, Alain Eschalier, Philippe Marin, Christine Courteix.

*Journées de l'École Doctorale, Clermont-Ferrand, 14-15 juin 2018*

## Principales abréviations

**4EBP1** : *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*

**5,7-DHT** : 5,7-di-hydroxytryptamine

**5-HIAA** : acide 5-hydroxyindole acétique

**5-HIAC** : 5-hydroxyindole acétaldéhyde

**5-HT** : 5-hydroxytryptamine

**5-HTTP** : 5-hydroxytryptophane

**6-OH-DA** : 6-hydroxydopamine

**AC** : adénylate cyclase

**Ach** : acétylcholine

**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique

**APP/PS1** : *amyloid precursor protein/presenilin 1*

**ATC** : antidépresseur tricyclique

**BDNF** : *brain-derived neurotrophic factor*

**CCA** : cortex cingulaire antérieure

**CCI** : *chronic constriction injury*, ligature du nerf sciatique

**Cdk5** : *cyclin dependent kinase 5*

**CFA** : adjuvant complet de Freund

**Co-IP** : co-immunoprécipitation

**DA** : dopamine

**DAG** : diacylglycérol

**DN4** : douleur neuropathique 4

**eIF** : facteur d'initiation de la traduction eucaryote

**ERK** : *extracellular signal-regulated kinases*

**FAP** : fibres afférentes primaires

**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**GAP** : protéine activatrices de GTPases

**GFAP** : protéine acide fibrillaire gliale

**GFP** : protéine fluorescente verte

**Glu** : glutamate

**GRD** : ganglions rachidiens dorsaux

**GTP** : guanosine triphosphate

**i.c.v.** : intracérébroventriculaire

**i.p.** : intrapéritonéale

**i.t.** : intrathécale

**IASP** : *international association for the study of pain*

**IoN-CCI** : *infraorbital nerve-chronic constriction injury*, modèle de ligature du nerf infra-orbitaire

**IP<sub>3</sub>** : inositol triphosphate

**ISRS** : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine

**Jab-1** : *jun binding domain protein-1*

**KI** : *knock-in*

**KO** : *knock-out*

**LANSS** : *leeds assessment of neuropathic symptoms and signs*

**LC** : locus cœruleus

**LTD** : dépression à long terme

**LTP** : potentialisation à long terme

**L-trp** : L-tryptophane

**MA** : maladie d'Alzheimer

**MAO** : monoamine oxydase

**mLST8** : *mammalian lethal with SEC13 protein 8*

**mTOR** : *mammalian/mechanistic target of rapamycin*

**mTORC** : *mammalian target of rapamycin complex*

**NA** : noradrénaline

**NAc** : noyau accumbens

**NeuPSIG** : *neuropathic pain special interest group*

**Nf1** : neurofibromine

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**OXA** : oxaliplatine

**p70S6K** : *ribosomal protein S6 kinase*

**PCP** : phéncyclidine

**PI3K** : phosphoinositide 3-kinase

**PIP<sub>2</sub>** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PKA/C** : protéine kinase A/C

**PLC** : phospholipase C

**PSNL** : *partial sciatic nerve ligation*, modèle de ligature partielle du nerf sciatique

**PTX** : paclitaxel

**RCPG** : récepteur couplé aux protéines G

**Rheb** : Ras homolog enriched in brain

**RMg** : noyau raphe magnus

**RT-PCR** : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

**RVM** : région rostroventromédiane du bulbe

**s.c.** : sous cutanée

**SCI** : *spinal cord injury*, lésion traumatique de la moelle épinière

**SEP** : sclérose en plaques

**SERT** : transporteur de la sérotonine

**SGPA** : substance grise périaqueducule

**SNC** : système nerveux central

**SNI** : *spared nerve injury*, ligature de la racine tibial et péronéal du nerf spinal

**SNL** : *spinal nerve ligation*, ligature de la racine du nerf spinal

**STZ** : streptozotocine

**TM** : transmembranaire

**TPH** : tryptophane hydroxylase

**TSC1/2** : *tuberous sclerosis protein 1 et 2*

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

**VIN** : vincristine

**VMAT** : transporteur vésiculaire des monoamines

## Sommaire

INTRODUCTION GENERALE .....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....	7
Chapitre 1. La douleur neuropathique.....	9
1. Généralités .....	9
2. Etiologie et épidémiologie des douleurs neuropathiques.....	11
2.1 Les douleurs neuropathiques périphériques.....	11
2.2 Les douleurs neuropathiques centrales .....	15
3. Les symptômes des douleurs neuropathiques .....	16
4. Diagnostic des douleurs neuropathiques.....	18
5. Co-morbidités associées aux douleurs neuropathiques.....	18
Chapitre 2. Le système sérotoninergique .....	21
1. Généralités .....	21
1.1 Biosynthèse de la 5-HT.....	21
1.2 Recapture et catabolisme .....	23
2. Implications physiologiques de la 5-HT .....	26
3. Rôle de la 5-HT dans la modulation de la douleur neuropathique .....	28
3.1 Les récepteurs sérotoninergiques .....	28
3.2 Voies sérotoninergiques bulbo-spinales .....	42
Chapitre 3. Le récepteur 5-HT <sub>6</sub> et la voie de signalisation mTOR .....	49
1. Structure du récepteur .....	49
2. Localisation.....	51
2.1 Localisation supraspinale.....	51
2.2 Localisation spinale .....	56
2.3 Localisation périphérique.....	56
3. Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....	57
3.1 La voie de l'adénylate cyclase .....	58
3.2 La voie mTOR .....	59
3.3 La voie Cdk5.....	67
3.4 Autres voies de signalisation associées au récepteur 5-HT <sub>6</sub> (Fyn, Jab).....	68
4. Rôles physiologiques et pathologiques du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....	69

4.1	Fonctions physiologiques.....	70
4.2	Rôles physiopathologiques du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....	75
5.	Implication du récepteur 5-HT <sub>6</sub> et des voies de signalisation associées dans la douleur neuropathique.....	84
5.1	Récepteur 5-HT <sub>6</sub> et douleurs neuropathiques .....	84
5.2	Voie mTOR et douleurs neuropathiques.....	86
5.3	Cdk5 et douleurs neuropathiques.....	89
6.	Activité constitutive du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....	91
6.1	1. Notions pharmacologiques.....	91
6.2	Mise en évidence de l'activité constitutive du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....	93
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....	95
	MATERIELS ET METHODES.....	99
	Animaux et conditions expérimentales.....	101
	Modélisation de la douleur chez le rat.....	102
	1. Modèle de douleur neuropathique traumatique : SNL, ligature de la racine du nerf spinal L5 (Kim and Chung, 1992) .....	102
	2. Modèle de douleur neuropathique chimio-induit : administration aiguë d'oxaliplatine .....	103
	3. Modèle de douleur inflammatoire arthritique : administration intra-articulaire de CFA.....	104
	Mesure de la sensibilité douloureuse.....	105
	1. Evaluation de la sensibilité tactile : test des filaments de Von Frey.....	105
	2. Evaluation de la sensibilité thermique au froid : test d'immersion de la patte ..	106
	3. Evaluation de la nociception mécanique : test de Randall Selitto .....	106
	Mesure des comorbidités associées à la douleur .....	107
	1. Troubles cognitifs .....	107
	1.1 Test de reconnaissance sociale.....	107
	1.2 Test de reconnaissance d'un nouvel objet .....	108
	2. Troubles anxieux.....	109
	2.1 Test du labyrinthe en croix surélevé (EPM, <i>Elevated Plus Maze</i> ) .....	109
	2.2 Test de l'arène ouverte ou « Open Field » .....	110
	2.3 Test d'hyponéophagie (NSF, <i>Novelty-Suppressed Feeding</i> ).....	111

Substances et modalités d'administration .....	112
1. Substances administrées.....	112
2. Voies d'administrations .....	113
Dosage plasmatique de fluoxétine.....	114
Etudes biochimiques.....	115
1. Prélèvements de tissus .....	115
1.1 Prélèvement de tissu frais .....	115
1.2 Prélèvement de tissu fixé .....	115
2. Immuno-histo-chimie.....	116
3. Western-Blot .....	117
Etudes cellulaires.....	117
Méthodologie et statistiques .....	118
RESULTATS .....	121
Chapitre 1. Localisation du récepteur 5-HT <sub>6</sub> dans le SNC de souris 5-HT <sub>6</sub> -GFP .....	122
Chapitre 2. Implication du couplage de la voie mTOR avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> dans la douleur neuropathique .....	129
Chapitre 3. Potentialisation de l'activité de la fluoxétine .....	163
Chapitre 4. Recherche d'une activité constitutive du récepteur 5-HT <sub>6</sub> dans la douleur par excès de nociception chronique et de l'implication d'un autre partenaire du récepteur dans la douleur neuropathique : Quelles perspectives ?.....	171
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	193



# **INTRODUCTION GENERALE**



Les douleurs neuropathiques sont des douleurs induites par la lésion ou par une maladie affectant le système somatosensoriel (nerf, racine ou plexus nerveux) (Treede *et al.*, 2008). Elles touchent entre 6,8 et 10 % de la population générale (Bouhassira *et al.*, 2008; Van Hecke *et al.*, 2014) et, en raison de leur sévérité et de leur chronicité, sont souvent associées à des troubles du sommeil, des troubles anxieux, dépressifs et/ou cognitifs (Beaupré *et al.*, 2012; Jank *et al.*, 2017). Leur prise en charge thérapeutique est complexe et insatisfaisante dans la mesure où elles sont insensibles aux antalgiques classiques (AINS, paracétamol) et où les traitements de première intention ont une efficacité inconstante comme l'atteste leur NNT (*Number needed to treat*) élevé. En France, les traitements de 1<sup>ère</sup> intention recommandés et ayant spécifiquement l'AMM dans cette indication sont les antidépresseurs tricycliques (NNT = 3,6), les gabapentinoïdes (ligands de la sous-unité  $\alpha_2$ -delta des canaux calciques voltage-dépendants, NNT = 7,7-7,2), et la duloxétine (antidépresseur inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN), NNT=6,4) (Finnerup *et al.*, 2015).

A côté de leur retentissement physique, psychologique et social, les douleurs neuropathiques ont un coût financier et un impact sociétal importants : en 2012 en France, les coûts annuels de la douleur neuropathique étaient estimés à 10 313 €/patient (Liedgens *et al.*, 2016). Actuellement, 4 millions de français souffrent de douleur neuropathique et cette proportion s'accroît du fait de l'augmentation de la prévalence du diabète de type 2, pathologie fortement pourvoyeuse de neuropathie métabolique, et en raison de l'augmentation du nombre de cancers et de traitements par chimiothérapies anti-cancéreuses à l'origine de neuropathies iatrogènes. Le besoin d'innovation thérapeutique est bien réel.

Malgré de nombreux travaux consacrés aux mécanismes de contrôle de la douleur dès le premier relai spinal, soulignant le rôle clé de la sérotonine (5-HT) dans la modulation de la transmission douloureuse, il apparaît que son implication est loin d'être univoque, constat illustré par l'efficacité limitée des antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (ISRS) (Finnerup *et al.*, 2015). En fait, l'existence de différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques, leur localisation ubiquitaire dans le SNC (pré- ou postsynaptique, en regard ou sur les fibres afférentes primaires, les neurones de projection, les interneurons excitateurs ou inhibiteurs spinaux), leurs différents modes d'activation et de signalisation, leur différence de sensibilité en condition pathologique, rendent compte des effets paradoxaux voire de l'absence d'effet de la 5-HT sur la transmission douloureuse.

Parmi les récepteurs 5-HT, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est récemment apparu comme une cible intéressante : d'abord décrit comme jouant un rôle dans le développement neuronal (Duhr *et al.*, 2014; Jacobshagen *et al.*, 2014; Dayer *et al.*, 2015), c'est l'effet d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> sur les processus cognitifs (Loiseau *et al.*, 2008; Meffre *et al.*, 2012) et l'identification de l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec mTOR (Meffre *et al.*, 2012), une protéine intracellulaire impliquée dans les processus neuropathiques douloureux (Geranton *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013), qui ont attisé notre curiosité. La littérature scientifique rapporte quelques articles démontrant clairement le rôle bénéfique du blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur la douleur :

- chez le rat, le blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, diminue la douleur inflammatoire induite par l'injection de formol dans la patte (Castañeda-Corral *et al.*, 2009),
- dans le modèle de neuropathie traumatique douloureuse induite par ligature du(es) nerf(s) spinal(aux) L5(L6) (modèle SNL, *spinal nerve ligation*) chez le rat, l'administration d'antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> améliore voire supprime l'allodynie tactile (Jayarajan *et al.*, 2015; Pineda-Farias *et al.*, 2017) et thermique (Devegowda *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2017) et potentialise l'activité antalgique des gabapentinoïdes (Jayarajan *et al.*, 2015).

Au-delà de ces arguments comportementaux en lien direct avec notre problématique, d'autres travaux et le développement de nouveaux ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont conduit à décrire une activité constitutive du récepteur, indépendante de la sérotonine endogène, dans des conditions physiologiques et/ou pathologiques (Duhr *et al.*, 2014; Deraredj Nadim *et al.*, 2016; Grychowska *et al.*, 2016; Zajdel *et al.*, 2016; Vanda *et al.*, 2018).

De ces constats est née l'hypothèse d'une activité anormale du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de la voie de signalisation mTOR dépendante de ce récepteur dans l'étiopathogénie de la douleur neuropathique. Nous avons donc entrepris dans ce travail de thèse, de clarifier le rôle joué par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> spinal et de la voie de signalisation de mTOR dans un modèle de neuropathie traumatique douloureuse.

Le **premier objectif** de notre travail de thèse a été de déterminer si 1) le blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par des approches pharmacologiques « classiques » basées sur l'emploi de ligands 5-HT<sub>6</sub> (dont certains nouvellement synthétisés), et si 2) le blocage de la voie mTOR, réduisent les symptômes d'allodynie et les déficits cognitifs associés aux douleurs neuropathiques;

Une fois caractérisés l'activité constitutive du récepteur et le rôle délétère de l'activation de mTOR, nous avons pour **deuxième objectif** d'établir le lien de cause à effet entre l'activation agoniste-indépendante de mTOR par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et l'allodynie observée chez le rat SNL, grâce à une approche originale basée sur un peptide interférant bloquant l'interaction physique entre le récepteur et mTOR et, de ce fait, l'activation pathologique de cette kinase dans le modèle de neuropathie. Afin de conforter ces résultats, des approches moléculaires et biochimiques explorant l'activité de mTOR dans la moelle spinale dans les différentes conditions pathologiques et pharmacologiques, ont été menées.

Enfin, dans la problématique de la résistance des douleurs neuropathiques aux ISRS illustrée en clinique par un NNT élevé (6,8) les classant parmi les traitements aux recommandations « non concluantes » (Finnerup *et al.*, 2015), explorée depuis plusieurs années par l'équipe, nous avons pour **troisième objectif** de rechercher si le blocage de l'activité constitutive du récepteur pouvait renforcer l'efficacité des ISRS.

Après des rappels bibliographiques centrés sur douleurs neuropathiques, 5-HT, et récepteur 5-HT<sub>6</sub>/voies de signalisation, nous présenterons et discuterons les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.



# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**



## **Chapitre 1. La douleur neuropathique**

### **1. Généralités**

La nociception regroupe l'ensemble des processus neuraux de codage des stimuli nociceptifs (transduction, transmission et intégration) provoquant de la douleur ; la douleur est une expérience sensorielle complexe ayant un rôle de protection et de défense vis-à-vis d'une agression. Ainsi, lorsque le système nerveux intègre une information sensorielle comme douloureuse, une réaction va être générée afin de soustraire l'organisme à la cause de la douleur.

L'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (*International Association for the Study of Pain – IASP*) définit la douleur comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable en réponse à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en termes de telles lésions ». Cette définition évoque l'aspect multidimensionnel de la douleur, c'est-à-dire ses composantes sensorielles, émotionnelles, cognitives et comportementales. Cette définition s'applique à toutes les étiologies et durées d'évolution de la douleur.

La dimension **sensori-discriminative** informe l'individu sur la nature (pression, chaud, froid...), l'intensité, la localisation, l'étendue et la durée du stimulus.

La douleur s'accompagne invariablement d'une émotion plus ou moins désagréable (pénible, insupportable, ...) qui renforce la motivation de l'action qui vise à la soulager. Cette composante constitue la dimension **affective et émotionnelle** de la douleur.

La dimension **cognitive** correspond à la signification qu'est accordée à la douleur par le patient. Elle dépend de facteurs environnementaux, éducatifs, socio-culturels, l'histoire personnelle du patient.

La composante **comportementale** s'exprime par des manifestations conscientes ou non : des réactions de défense ou de fuite immédiate (réflexes somato-moteurs) ; des réactions neurovégétatives (hausse/baisse de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle) et neuroendocriniennes ; des manifestations verbales (cris, pleurs) et non verbales (attitudes, mimiques).

La douleur aiguë est une sensation normale qui alerte le corps d'un dommage potentiel. Elle est immédiate, de courte durée (de quelques heures à quelques jours), et peut être illustrée par la douleur perçue en raison d'une blessure (coup, fracture, infection,...) ou d'une chirurgie. Une fois la cause traitée, la douleur disparaît.

La douleur peut cependant devenir chronique, lorsque la sensation douloureuse excède trois à six mois d'évolution malgré un traitement adéquat. Sa physiopathologie est nettement plus complexe que celle de la douleur aiguë avec des atteintes du système nerveux central et périphérique. Sa prévalence en Europe est de 19 % de la population adulte (Breivik *et al.*, 2006), ce qui en fait un problème de santé publique majeur. Elle touche davantage les femmes que les hommes (Fillingim, 2000) et le sujet âgé (Rustøen *et al.*, 2005); des facteurs environnementaux et génétiques contribuent à un risque plus élevé de douleur chronique (McIntosh *et al.*, 2016).

Selon les mécanismes physiopathologiques générateurs de la douleur, on distingue :

- La **douleur nociceptive** (ou par excès de nociception) : elle est définie par l'IASP comme « résultant d'une lésion réelle ou potentielle des tissus non neuronaux et due à l'activation des nocicepteurs ». Elle peut être causée par des pathologies bénignes entraînant une lésion tissulaire : traumatisme, chirurgie, inflammation (arthrite, polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, arthrite juvénile, ostéoarthrite), arthrose, contusion, brûlure, fracture. D'origine cancéreuse, elle est due à la libération de substances algogènes par la tumeur, à une sensibilisation des fibres afférentes primaires ou à la distension d'organes creux.
- La **douleur neuropathique** : elle est définie comme résultant d'une lésion ou d'une maladie affectant le système somato-sensoriel (Treede *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2011). Les douleurs neuropathiques peuvent être classées en fonction de critères anatomiques et/ou étiologiques. Les étiologies sont, là aussi, variées : traumatisme, diabète, infection ou maladie auto-immune, tumeur cancéreuse (compression nerveuse).
- La **douleur nociplastique** : autrefois appelée douleur dysfonctionnelle, elle est définie par l'IASP comme « résultant d'une nociception altérée, malgré l'absence de signes évidents de dommages tissulaires réels ou potentiels, provoquant l'activation de nocicepteurs périphériques, ou provoquant des signes de maladie ou de lésion du

système somato-sensoriel causant la douleur » (Aydede and Shriver, 2018). Elle sert principalement à expliquer les phénomènes douloureux où aucune lésion (neuronale ou non-neuronale) n'est identifiée, par exemple, la fibromyalgie, la céphalée de tension, le syndrome de l'intestin irritable et la cystite interstitielle (ou syndrome de la vessie douloureuse).

## **2. Etiologie et épidémiologie des douleurs neuropathiques**

### **2.1 Les douleurs neuropathiques périphériques.**

Parmi les plus fréquentes figurent les **douleurs post-traumatiques (Tableau 1)**. Elles résultent en général de blessures causées par des accidents de la route, du travail, par des objets coupants et pénétrants, et des fractures. L'incidence des lésions nerveuses périphériques traumatiques varie de 2,8 % à 5 % de la population générale (Eser *et al.*, 2009; Davis and Curtin, 2016).

La **douleur neuropathique postopératoire** correspond à la persistance d'une douleur au niveau de la chirurgie au-delà de deux mois après celle-ci, sans autre cause identifiée et sans lien avec une douleur préopératoire ou une complication de la chirurgie. Les actes chirurgicaux où la douleur neuropathique postopératoire à une incidence élevée sont la chirurgie du sein, la chirurgie de hernie inguinale, la chirurgie thoracique, la chirurgie d'amputation, le greffon iliaque (Fletcher *et al.*, 2015). Son incidence est comprise entre 6 % et 68 % et varie en fonction du type de chirurgie et de la technique chirurgicale (Haroutiunian *et al.*, 2013).

Les *douleurs du membre fantôme*, consécutives à une amputation, ont une incidence comprise entre 45 et 85 % (Kuffler, 2018).

Les **neuropathies métaboliques** (diabète de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2), carences nutritionnelles) sont l'une des causes de polyneuropathie les plus fréquentes en Europe et dans le monde (Feldman *et al.*, 2017). La prévalence des neuropathies diabétiques est de 8 % à 54 % pour le DT1, et de 13 % à 46 % pour le DT2 (Sommer, Geber, *et al.*, 2018). Parmi les patients atteints de neuropathies diabétiques, 26,4 % souffrent de douleurs neuropathiques (Van Hecke *et al.*, 2014). Les mécanismes responsables de douleurs neuropathiques chez ces patients ne

sont pas encore entièrement compris bien que l'effet neurotoxique de l'hyperglycémie représente un facteur important pour leur développement (Schreiber, 2015). D'autres troubles métaboliques peuvent être en cause, tels que les stades avancés de l'insuffisance rénale (prévalence 60-70 %), les carences nutritionnelles en vitamine (B<sub>1/6/12</sub>, E) et la porphyrie (Hammond *et al.*, 2013; Staff and Windebank, 2014; Pham *et al.*, 2017; Giat and Yom-Tov, 2018).

D'origine **toxique**, la plus fréquente est la neuropathie alcoolique induite par la consommation excessive et chronique d'alcool. Des douleurs et des dysesthésies, principalement dans les membres inférieurs représentent les symptômes initiaux et majeurs des patients souffrant de neuropathies alcooliques (Chopra and Tiwari, 2012). Une des caractéristiques principales de cette pathologie est la dégénérescence axonale des fibres myélinisées et non myélinisées. Différents mécanismes physiopathologiques seraient mis en jeu avec un effet neurotoxique direct de l'alcool et de ses métabolites et un effet indirect lié à des carences nutritionnelles (Chopra and Tiwari, 2012). La prévalence des neuropathies alcooliques est de 22 % à 66 % des patients alcooliques chroniques (Sommer, Geber, *et al.*, 2018). La durée de l'abus d'alcool et la quantité d'alcool consommée représentent les deux facteurs les plus importants, les femmes étant plus touchées que les hommes par les neuropathies alcooliques (Chopra and Tiwari, 2012).

D'autres agents dits « environnementaux » peuvent être responsables de polyneuropathies toxiques tels que les métaux lourds (plomb, arsenic, mercure, thallium) et les agents toxiques industriels (Karam and Dyck, 2015) (**Figure 1**).

Les **neuropathies iatrogènes** sont le plus souvent induites par des agents anticancéreux. C'est l'effet indésirable neurologique le plus fréquent de la thérapie anti-tumorale avec des médicaments cytostatiques, tels que les sels de platine, les vinca-alcaloïdes, les taxanes, les inhibiteurs du protéasome, ainsi que l'immunothérapie. En raison de l'augmentation du nombre de cancer et de l'amélioration de la survie à long terme, l'incidence des douleurs neuropathiques iatrogènes augmente. Elles débutent généralement avec des symptômes de déficit sensoriel et de douleur au cours des deux premiers mois de traitement et peuvent se stabiliser ou disparaître une fois le traitement interrompu (Staff *et al.*, 2017). Les sels de platine, tels que le carboplatine et le cisplatine, entraînent principalement des lésions des nerfs périphériques et des ganglions rachidiens dorsaux (GRD), via l'accumulation progressive d'adduits à l'ADN et l'inhibition des voies de sa réparation. L'oxaliplatine peut également altérer la conduction électrique impliquant

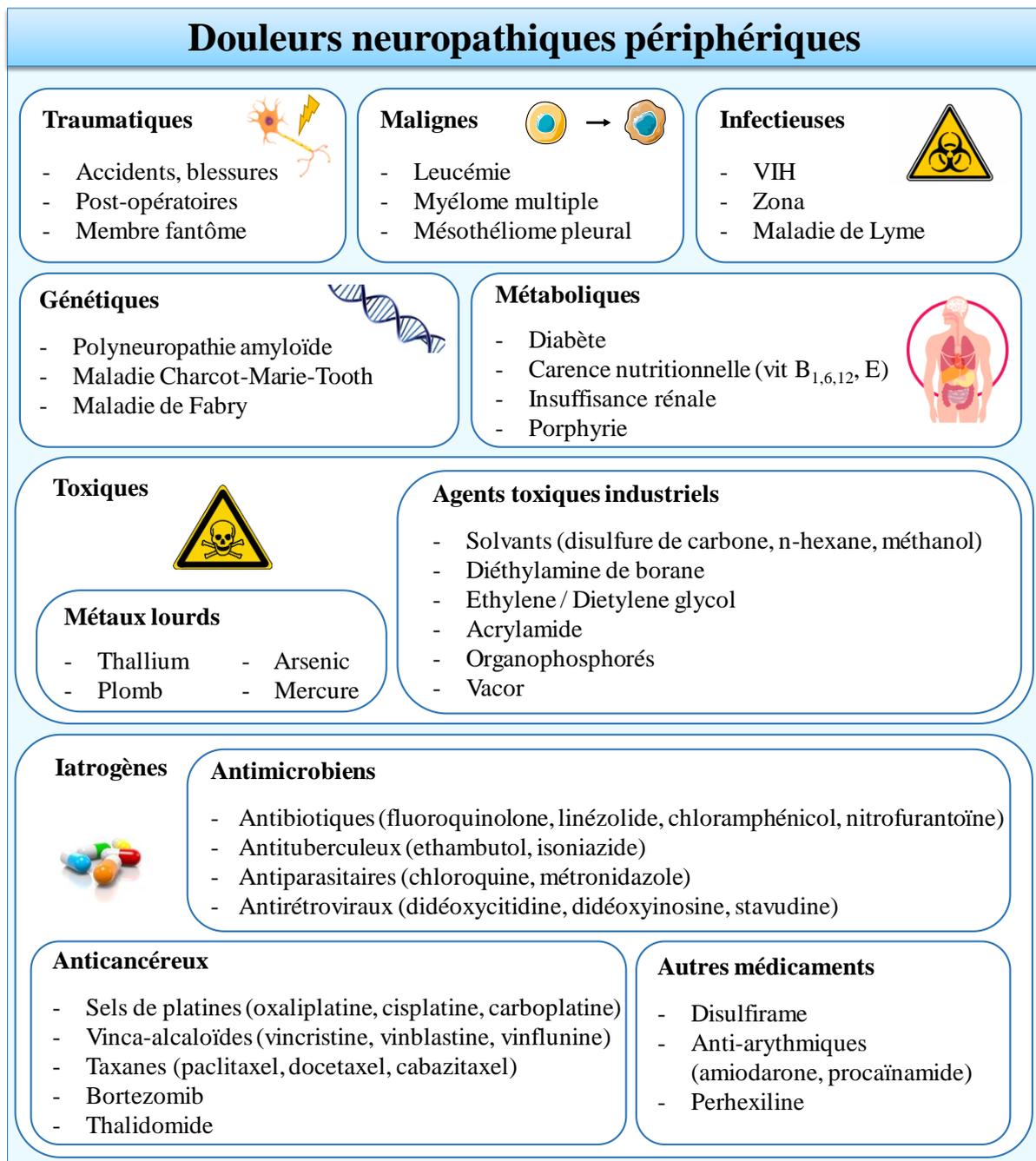
les canaux calciques voltage-dépendants par une séquestration des ions  $Ca^{2+}$  par son résidu oxalate (chélateur) et ainsi provoquer une toxicité aiguë (Avan *et al.*, 2015). L'oxaliplatine peut entraîner des neuropathies aiguës et chroniques respectivement chez 85 % et 73 % des patients traités (Argyriou *et al.*, 2013). Les vinca-alcaloïdes et les taxanes empêchent la tubuline de former les microtubules, inhibant ainsi la division cellulaire. En interférant avec le système microtubulaire, ils perturbent le transport axonal antérograde et rétrograde de neurofilaments, d'organelles et d'endosomes, participant à l'apparition de polyneuropathies (Avan *et al.*, 2015). Parmi les patients recevant des taxanes, une douleur neuropathique est présente chez 64 % d'entre eux et disparaît quelques mois après la fin du traitement chez seulement 14 % des patients (Miltenburg and Boogerd, 2014). Ces douleurs peuvent également être induites par d'autres agents pharmacologiques tel que les antimicrobiens (Karam and Dyck, 2015).

Parmi les **neuropathies héréditaires**, la polyneuropathie amyloïde familiale qui touche 5 000 à 10 000 individus dans le monde (Plante-Bordeneuve, 2014), caractérisée par le dépôt anormal de fibrilles amyloïdes (Shin and Robinson-Papp, 2012) est responsable de douleur neuropathique chez 20 % des patients (Maurer *et al.*, 2016).

La maladie de Charcot-Marie-Tooth, dont la prévalence de 1/2500 en fait une des maladies neuromusculaires héréditaires la plus fréquente dans le monde (Emery, 1991), est responsable de douleur neuropathique chez environ 30 % des patients (Ribiere *et al.*, 2012).

La maladie de Fabry, où la douleur est un des premiers symptômes (Germain, 2010), est caractérisée par des manifestations neurologiques périphériques débutant dans l'enfance et dominées par des crises douloureuses aiguës et des paresthésies chroniques touchant 60 % à 80 % des garçons et des filles (Hopkin *et al.*, 2008).

Les **douleurs neuropathiques liées au cancer**, où la tumeur peut léser localement (par compression) ou à distance (métastases) le tissu nerveux. C'est le cas de la leucémie et le myélome multiple, où les douleurs peuvent être d'origine osseuse (ostéolyse, fracture de compression) ou dues à une compression directe nerveuse ou médullaire (Niscola *et al.*, 2010). Les patients atteints de mésothéliome pleural peuvent également souffrir de douleurs neuropathiques qui peuvent être, dans ce cas, dues à une infiltration tumorale de la paroi thoracique, des côtes, des racines nerveuses, et des nerfs intercostaux avec une prévalence de 40 % (MacLeod *et al.*, 2016). La prévalence des douleurs neuropathiques varie entre 61 % et 77 % des patients souffrant de myélome multiple, et atteint presque 100 % pour les formes avancées (Niscola *et al.*, 2010).



**Figure 1 :** Les différentes étiologies des douleurs neuropathiques périphériques.

D'origine infectieuse les douleurs neuropathiques sont rapportées chez 40 % à 90 % des patients et principalement décrites comme des « brûlures » (Dorfman *et al.*, 2013). La neuropathie touche entre 30 % et 60% des patients séropositifs au VIH, et on estime que 10,5 à 21 millions de personnes souffrent de neuropathie et sont à haut risque de souffrir de douleurs (Dorfman *et al.*, 2013). L'utilisation fréquente d'antirétroviraux neurotoxiques tend à augmenter la prévalence des neuropathies sensitives chez ces patients, avec un facteur de risque de 1,6 (Ellis *et al.*, 2010).

Une autre origine infectieuse est le zona, complication due à la réactivation du virus de la varicelle-zona (VZV, *varicella-zoster virus*) plusieurs années après l'infection par le virus (à l'état dormant au niveau des corps cellulaires des fibres nerveuses périphériques et centrales) et entraînant une douleur cutanée lancinante, de type brûlure (Gruver and Guthmiller, 2018). Il a été récemment rapporté que 13 % des patients âgés de 50 ans et plus, ayant souffert de zona, développent des douleurs neuropathiques (Gruver and Guthmiller, 2018).

La borréliose (ou maladie de Lyme) causée par des bactéries du genre spirochète (*Borrelia*) et transmise à l'homme par les tiques et les poux, et dont l'incidence n'a cessé d'augmenter au cours des 15 dernières années (Steere *et al.*, 2016), est à l'origine de douleurs chroniques inflammatoires (arthralgies) et neuropathiques (paresthésies, sensations de brûlures) (Zimering *et al.*, 2014). Trois à 5 ans après l'infection, 29 % des patients se plaignent de symptômes neurologiques résiduels, dont 16 % de douleur chronique et 18 % de céphalée (Zimering *et al.*, 2014).

## 2.2 Les douleurs neuropathiques centrales

Les étiologies sont aussi variées que les lésions vasculaires ou traumatiques cérébrales (séquelle d'un accident vasculaire cérébral) ou les lésions ischémiques médullaires.

Les syndromes centraux de douleur neuropathique peuvent être difficiles à reconnaître étant donné le délai (de plusieurs semaines à années) entre la lésion initiale du SNC et l'apparition de symptômes (Watson and Sandroni, 2016).

Les douleurs neuropathiques peuvent être d'origine neurodégénérative, notamment dans la maladie de Parkinson où ces douleurs sont présentes chez 22 % des patients (Valkovic *et al.*, 2015). La physiopathologie n'est, dans ce cas, pas entièrement comprise mais serait probablement liée à une altération du fonctionnement de l'axe cortex - ganglions de la base - thalamus, impliqué dans la modulation de la douleur (Ha and Jankovic, 2012).

Elles peuvent également trouver leur origine dans des processus inflammatoires et auto-immuns comme dans la sclérose en plaque (SEP). La douleur résulte ici de lésions démyélinisantes de zones impliqués dans la perception de la douleur notamment des lésions du tractus spino-thalamo-cortical, conduisant à une hyperexcitabilité centrale, mais peut également résulter de la genèse de courants électriques ectopiques due à des lésions axonales dans le cerveau et la moelle épinière expliquant à la fois la présence de symptômes d'hypersensibilité, de paresthésie et de douleurs paroxystiques (Truini *et al.*, 2013; Broila *et al.*, 2014). La

prévalence des douleurs neuropathiques chez les patients souffrant de SEP varie considérablement, entre 29 % et 86 % selon les protocoles d'évaluation utilisés, la définition de la douleur appliquée et les différents stades de progression de la SEP (O'Connor *et al.*, 2008; Solaro and Messmer Uccelli, 2011).

Les facteurs de risque les plus courants concernant la douleur neuropathique sont le sexe féminin (avec une prévalence de 8 % contre 5,7 % chez l'homme), l'âge avancé (8,9 % chez les patients > 50 ans contre 5,6 % chez ceux < 49 ans), ainsi qu'un faible niveau d'éducation (Colloca *et al.*, 2017). La douleur neuropathique est en général associée à une moins bonne santé physique et mentale (Bouhassira *et al.*, 2008; Attal *et al.*, 2011).

### **3. Les symptômes des douleurs neuropathiques**

A l'instar de la grande diversité étiologique, les symptômes rencontrés dans les douleurs neuropathiques sont très variés (**Tableau 1**). On distingue :

- les **déficits sensitifs**, caractérisés par une baisse de la sensibilité en réponse à un stimulus nociceptif ou non nociceptif (hypoalgie, hypoesthésie). Les conséquences sont principalement une diminution de la perception sensorielle et un engourdissement du membre ou de la zone atteinte. Un stimulus normalement douloureux n'est donc plus détecté et perçu, il peut alors passer inaperçu et avoir des conséquences néfastes pour l'intégrité physique du patient.

- les **douleurs spontanées**, continues ou intermittentes qui se manifestent par des paresthésies (sensations non douloureuses mais désagréables tel que des fourmillements, des picotements), des douleurs paroxystiques (décharges électriques), ou par des douleurs superficielles, apparentées à des brûlures.

- les **douleurs évoquées**, caractérisées par une sensation douloureuse lors de l'application d'un stimulus non douloureux, signant une **allodynie**, ou par une sensation douloureuse exacerbée en réponse à un stimulus normalement douloureux, signant alors une **hyperalgie**. Les stimuli responsables de telles douleurs peuvent être de nature thermique (chaud ou froid) ou de nature mécanique (dynamique ou statique).

**Tableau 1** : Caractéristiques et évaluation des symptômes et signes cliniques des patients atteints de douleur neuropathique. D'après Baron *et al.*, 2010.

Caractéristique		Evaluation clinique	Réponse pathologique
<b>Déficits sensitifs</b>			
• Hypoesthésie	Sensibilité diminuée à des stimuli non douloureux	Effleurage de la peau (pinceau, coton ou gaze)	Sensibilité réduite, engourdissement
• Hypoalgie	Sensibilité diminuée à des stimuli douloureux	Piqûre de la peau avec une tête d'épingle	Détection et perception réduites, engourdissement
<b>Douleurs spontanées</b>			
• Paresthésie	Fourmillement (désagréable mais non douloureux)	Evaluation de l'intensité de 1 à 10, de la surface de la zone (cm <sup>2</sup> )	/
• Douleur paroxystique	Décharges électriques (plusieurs secondes)	Evaluation de l'intensité de 1 à 10, du nombre en fonction du temps	/
• Douleur superficielle	Douleur continue	Intensité de 1 à 10	/
<b>Douleurs évoquées</b>			
• Allodynie dynamique	tactile Douleur ressentie après un stimulus léger (frottement sur la peau), normalement non douloureux	Effleurage de la peau (pinceau, coton ou gaze)	Douleur intense (type brûlure), présente au niveau de la zone affectée (zone primaire) et autour (zone secondaire)
• Allodynie statique	tactile Douleur ressentie après un stimulus de pression statique, normalement non douloureux	Toucher de la peau (extrémité d'un filament de nylon)	Douleur sourde, présente au niveau de la zone innervée par les nerfs affectés par la lésion (zone primaire)
• Allodynie au froid	Douleur ressentie après un stimulus thermique frais ou froid, normalement non douloureux	Mise en contact de la peau avec des objets à environ 20 °C (règle en métal, acétone, verre d'eau)	Douleur (souvent de type brûlure), présente au niveau de la zone primaire et de la zone secondaire
• Allodynie au chaud	Douleur ressentie après un stimulus thermique tiède ou chaud, normalement non douloureux	Mise en contact de la peau avec des objets à environ 40°C	Douleur (type brûlure), présente au niveau de la zone primaire
• Hyperalgie mécanique statique	Exagération de la douleur ressentie après un stimulus de pression statique, normalement douloureux	Application d'une pression mécanique sur la peau	Douleur sourde, présente au niveau de la zone primaire

Les patients peuvent donc présenter des symptômes sensitifs paradoxaux avec une douleur comme symptôme dominant, combinée à une sensibilité réduite induite par la lésion. La connaissance des anomalies sensorielles est essentielle pour le diagnostic de la douleur neuropathique. Les principaux défis dans le développement d'une approche globale de la douleur neuropathique résident donc dans le diagnostic de la douleur, l'identification de son étiologie et la connaissance de son évolution (Baron *et al.*, 2010).

#### **4. Diagnostic des douleurs neuropathiques**

Le diagnostic est avant tout clinique et repose sur l'utilisation d'outils sous forme de questionnaires associés ou non à un examen clinique.

Les questionnaires permettent ainsi de classer la douleur sur la base de descriptions verbales faites par le patient. Cinq questionnaires, traduits en plusieurs langues, sont à l'heure actuelle recommandés par le Groupe d'Intérêt Spécial pour la Douleur Neuropathique (NeuPSIG) de l'IASP : le Douleur Neuropathique 4 (DN4), le *ID Pain*, le *Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs* (LANSS), le *PainDETECT* et le *Neuropathic Pain Questionnaire* (Mathieson *et al.*, 2015).

Ces outils de dépistage peuvent être utilisés par des médecins non-spécialistes de la douleur. Leur facilité d'utilisation par les cliniciens rend ces outils de dépistage attrayants dans la mesure où ils permettent une acquisition immédiate, donc rapide de l'information (Baron *et al.*, 2010). Néanmoins, une fois la douleur neuropathique diagnostiquée, une évaluation clinique, permettant de confirmer le diagnostic et d'orienter la décision de traitement, est indispensable. Parmi ces 5 questionnaires, le DN4 et le *NP Questionnaire* semblent être les plus sensibles et les plus spécifiques (Mathieson *et al.*, 2015). En utilisant le LANSS, une étude britannique rapporte une prévalence des douleurs neuropathiques de 8,2 % sur une cohorte de 6000 individus (Torrance *et al.*, 2006). En France, la prévalence des douleurs neuropathiques dans la population générale est estimée à 6,9 % sur la base du questionnaire DN4 (Bouhassira *et al.*, 2008).

#### **5. Co-morbidités associées aux douleurs neuropathiques**

La douleur neuropathique, par sa chronicité et sa sévérité, peut détourner les ressources attentionnelles et cognitives, devenir dès lors prioritaire sur toute activité physique ou mentale en cours. Ainsi, il n'est pas rare d'observer des troubles associés. Les pathologies psychiatriques les plus souvent rencontrées chez les patients souffrant de douleur neuropathique sont la dépression, avec une prévalence de 16,5 %, l'anxiété généralisée, avec une prévalence de 12,1 %, et enfin, de façon plus générale, les troubles de l'humeur chez 29,7 % des patients (Radat *et al.*, 2013). Les troubles du sommeil dès l'apparition des symptômes douloureux sont rapportés chez 88 % des patients souffrant de douleurs chroniques (Smith *et al.*, 2000) et 81,3 % de patients neuropathiques diabétiques douloureux (Dermanovic Dobrota *et al.*, 2014). Des

troubles cognitifs caractérisés par un QI plus faible que les témoins, des déficits de la mémoire spatiale, verbale, de la vitesse de traitement des informations et des fonctions exécutives (adaptation du comportement en fonction des informations traitées et des objectifs) (Nadar *et al.*, 2016; Moriarty *et al.*, 2017) sont également présents chez les patients douloureux chroniques avec une prévalence de 11,4 % (Povedano *et al.*, 2007). Un suivi de ces comorbidités sous traitement peut donc être réalisé à titre de critère d'efficacité secondaire dans les essais thérapeutiques (Attal *et al.*, 2010).



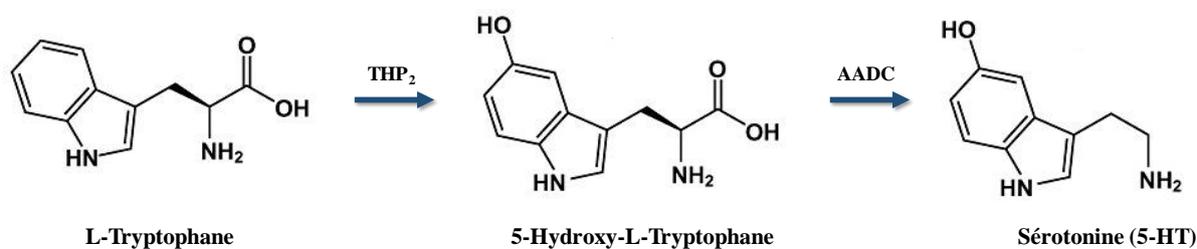
## Chapitre 2. Le système sérotoninergique

### 1. Généralités

La sérotonine (ou 5-hydroxytryptamine, 5-HT) a été découverte il y a maintenant 70 ans en tant que substance vasoconstrictrice libérée par les plaquettes au cours du processus de coagulation (Rapport *et al.*, 1948). On la retrouve dans le système nerveux central (SNC) et à la périphérie (90-95 %) où elle est synthétisée en majorité par les cellules entéro-chromaffines du tractus gastro-intestinal et stockée dans les plaquettes sanguines (Berger *et al.*, 2009). Elle va donc être capable de moduler une large gamme de processus physiologiques, allant de la fonction gastro-intestinale, l'agrégation plaquettaire, l'immunité, à l'humeur, l'appétit, le sommeil, l'activité sexuelle, la température du corps, les fonctions cognitives (mémoire et apprentissage) et la douleur.

#### 1.1 Biosynthèse de la 5-HT

La synthèse et le métabolisme de la 5-HT sont étroitement régulés, 99 % de celle-ci étant stockée de façon intracellulaire (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Elle agit comme un neurotransmetteur, une hormone et un facteur de croissance (Gershon, 2013; Shajib and Khan, 2015). Sa biosynthèse est réalisée à partir du L-tryptophane (L-trp), acide aminé essentiel dont la source est nutritionnelle. Elle se produit en deux étapes enzymatiques ; dans la première, le L-trp est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase (TPH de type 2 dans le SNC, de type 1 à la périphérie et dans le SNC) pour produire du 5-hydroxytryptophane (5-HTP) ; dans la seconde étape, le 5-HTP est décarboxylé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) donnant la 5-HT (**Figure 2**) (Walther & Bader 2003).



**Figure 2** : Synthèse de la sérotonine

Bien que les deux enzymes soient nécessaires à la synthèse de la 5-HT, seule la TPH est l'enzyme limitante. La déplétion ou l'inhibition de la TPH entraîne une réduction des taux de 5-HT, qui n'est pas retrouvée avec l'inhibition de l'AADC (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Les 2 isoformes TPH<sub>1</sub> et TPH<sub>2</sub> sont exprimées dans plusieurs régions du cerveau, y compris l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale et le cortex frontal. La forme TPH<sub>2</sub> est absente des tissus périphériques contrairement à la TPH<sub>1</sub> qui contrôle donc la synthèse de la majeure partie de la 5-HT en périphérie (Walther and Bader, 2003; Zill *et al.*, 2007). L'activité enzymatique de la TPH<sub>2</sub> est dépendante d'un cofacteur, le phosphate pyridoxal, dérivé de la vitamine B<sub>6</sub>, dont la source est également nutritionnelle (Shabbir *et al.*, 2013). Cibler cette enzyme est une stratégie fréquemment utilisée dans l'étude du système sérotoninergique. Son blocage par la para-chlorophénylalanine (pCPA) (inhibiteur irréversible) est utilisé en pharmacologie expérimentale chez le rat et la souris pour réduire les taux de 5-HT dans le SNC (Eide *et al.*, 1988; Pozzi *et al.*, 1999; Koed and Linnet, 2000; Jensen *et al.*, 2014; Yoshimura *et al.*, 2014; Weng *et al.*, 2015; Pałucha-Poniewiera *et al.*, 2017). L'inhibition de cette enzyme peut également être réalisée par stratégie sh/siARN (McCarthy *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2010; Gautier *et al.*, 2017) ou par invalidation génique chez la souris (TPH<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) (Fernandez and Gaspar, 2012; Beis *et al.*, 2015). Elle peut également servir de cible en immunohistochimie, dans la mesure où elle est exprimée exclusivement dans les neurones sérotoninergiques ; l'utilisation d'anticorps dirigés contre celle-ci permet de localiser les neurones sérotoninergiques, par exemple dans les noyaux du raphé et le mésencéphale chez le rongeur (Rahim *et al.*, 2014; Gasull-Camós *et al.*, 2018; Ikoma *et al.*, 2018; Payet *et al.*, 2018).

Une fois synthétisée, la 5-HT est importée dans des vésicules des terminaisons présynaptiques des neurones sérotoninergiques par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT, *vesicular monoamine transporter*). Ces transporteurs ne sont pas spécifiques de la 5-HT et sont également responsables du stockage d'autres monoamines telles que la dopamine (DA), la noradrénaline (NA).

VMAT est un antiport (également appelé contre-transporteur), échangeant deux ions H<sup>+</sup> intra-vésiculaires, contre une monoamine extra-vésiculaire (Knoth *et al.*, 1981) grâce à la présence sur la membrane de la vésicule d'une H<sup>+</sup>/ATPase permettant un gradient électrochimique de H<sup>+</sup> (Marshall *et al.*, 2014). La stœchiométrie globale de l'échange H<sup>+</sup>/monoamine est 2:1 (Knoth *et al.*, 1981). Il existe 2 isoformes du VMAT, VMAT<sub>1</sub> et VMAT<sub>2</sub>. L'isoforme VMAT<sub>2</sub> est exprimée de façon prédominante dans le tissu nerveux et dans

les cellules neuroendocrines de l'estomac. VMAT<sub>1</sub> est exprimé dans les cellules neuroendocrines de l'intestin grêle et dans les cellules épithéliales mammaires. Les deux isoformes sont co-exprimées dans la médullosurrénale (Marshall *et al.*, 2014). Elles sont similaires en terme de spécificité de substrat, en particulier celles du transport de la 5-HT et de la DA. VMAT<sub>1</sub> est en revanche capable de transporter la NA et l'histamine plus efficacement (respectivement 4 et 33 fois plus) (Erickson *et al.*, 1996).

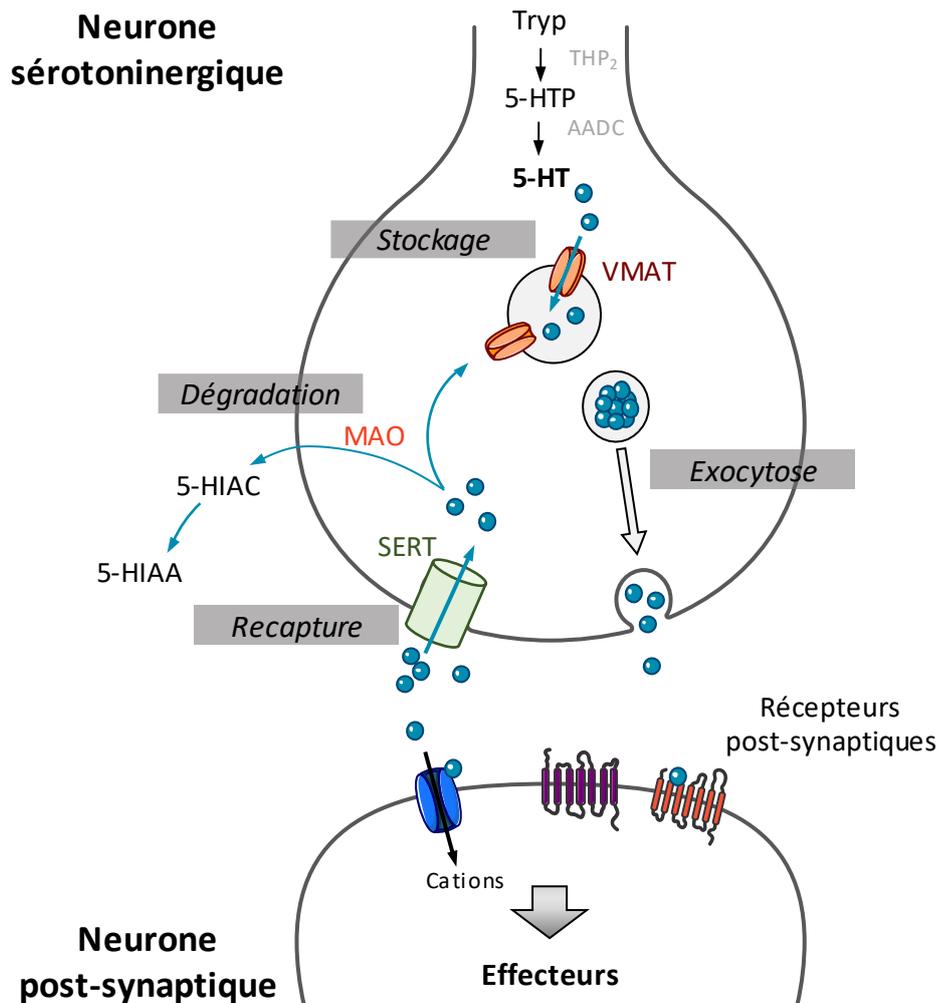
Une fois la 5-HT stockée dans les vésicules, elle est associée à une protéine de liaison spécifique (SBP, *Serotonin Binding Protein*) (Gershon *et al.*, 1983). Lors de la stimulation du neurone, l'influx de Ca<sup>2+</sup> entraîne la libération par exocytose du complexe 5-HT-SBP dans la fente synaptique

A la périphérie, la 5-HT est synthétisée par les cellules entéro-chromaffines. La 5-HT libérée dans la circulation sanguine est captée par un mécanisme de transport actif dans les plaquettes sanguines, principal lieu de stockage. Le turn-over de la 5-HT diffère selon sa localisation, sa demi-vie (T<sub>1/2</sub>) allant de quelques minutes dans le cerveau à plusieurs heures au niveau intestinal et plusieurs jours au niveau plaquettaire.

## 1.2 Recapture et catabolisme

La 5-HT, une fois libérée dans l'espace synaptique va se fixer sur des récepteurs présynaptiques ou postsynaptiques, afin d'exercer ses effets. Afin de réguler avec précision les concentrations extracellulaires de 5-HT, elle peut aussi être recaptée par son transporteur SERT, stockée ou dégradée par les monoamines oxydases (MAO) (**Figure 3**).

Le transporteur SERT, comme tous les transporteurs de monoamine, est une protéine à 12 hélices  $\alpha$  transmembranaires Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dépendante située dans la membrane plasmique de la cellule et exprimée dans le SNC, le tractus gastro-intestinal, les plaquettes, et au niveau du système vasculaire pulmonaire et périphérique (Rudnick, 2006).



**Figure 3** : Mécanisme de recapture et catabolisme de la 5-HT.

Le transporteur SERT nécessite de l'énergie obtenue en couplant l'influx de monoamines à celui du  $\text{Na}^+$ . Grâce à la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dont l'expression est ubiquitaire, un gradient électrochimique de  $\text{Na}^+$  est généré permettant le transport de la 5-HT. L'ion  $\text{K}^+$  se lie alors au transporteur et est excrété hors de la cellule, lui permettant de retourner dans sa conformation originale. La stœchiométrie globale est un échange électro-neutre d'un rapport 1:1:1:1 de  $\text{K}^+$  avec  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et 5-HT (Gu *et al.*, 1997).

Il y a deux conséquences à l'activation du SERT: (1) la fin de la signalisation sérotoninergique en retirant la 5-HT de l'espace synaptique, (2) la régulation de la recapture ou le stockage de la 5-HT dans les cellules. La recapture de la 5-HT se produit dans différents types cellulaires : les cellules entérochromaffines et les neurones (ayant la capacité de la synthétiser) et les plaquettes qui la capturent et la stockent. Les transporteurs de dopamine (DAT), de cations organiques (OCT), de noradrénaline (NAT) et le transporteur de monoamine

périphérique (PMAT) ont cette même capacité, bien qu'à une plus faible affinité (Baganz and Blakely, 2013).

Chez l'homme, plusieurs variants génétiques du SERT ont été identifiés. La majorité des allèles est constituée de 14 ou 16 éléments répétitifs correspondant aux variants courts et longs (S et L). Des variants avec des répétitions de 15, 18-20 ou 22 éléments, ou d'autres changements de séquence, ont été décrits mais ils sont rares. Les allèles et les distributions génotypiques varient considérablement entre différentes populations (Lesch and Gutknecht, 2005). Une étude sur des cellules homozygotes pour le variant long (L/L) a révélé des concentrations plus élevées d'ARNm du SERT que dans les cellules avec une ou deux copies du variant court (L/S et S/S). Les cellules L/L présentent également des niveaux plus élevés d'absorption de la 5-HT que les cellules S/S ou L/S (Lesch *et al.*, 1996). De plus, chez l'homme, une diminution de l'expression du transporteur dans le cerveau post-mortem serait associée à l'allèle court (Lesch *et al.*, 1996; Lesch and Gutknecht, 2005).

Le blocage de ce transporteur par les antidépresseurs ISRS (fluoxétine) est à l'origine de l'augmentation du taux extracellulaire de 5-HT. Après traitement chronique avec la fluoxétine, il est même observé une internalisation et une dégradation du SERT (Descarries and Riad, 2012). L'utilisation d'une neurotoxine, la 5,7-di-hydroxytryptamine (5,7-DHT) qui emprunte ce transporteur, est mise à profit expérimentalement pour détruire les neurones sérotoninergiques par auto-oxydation et formation de quinones et de radicaux libres (Baumgarten and Lachenmayer, 2004).

Comme beaucoup d'autres amines biogènes, la 5-HT est principalement métabolisée par la monoamine oxydase (MAO) (Molinoff and Axelrod, 1971). La MAO via la désamination oxydative, métabolise la 5-HT conduisant à la formation de 5-hydroxyindole acétaldéhyde (5-HIAC), lui-même oxydé par une aldéhyde déshydrogénase en acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA), produit final qui est excrété principalement dans par voie urinaire (Jonnakuty and Gagnoli, 2008).

La monoamine oxydase est une flavoenzyme présente sur la membrane externe des mitochondries dont l'expression est ubiquitaire. Elle existe sous deux isoformes (MAO-A et MAO-B), possédant chacune un cofacteur FAD (flavine adénine dinucléotide). Ces isoformes partagent environ 70 % d'homologie de séquence, cependant elles ont des spécificités de substrat radicalement différentes. La MAO-A dégrade la NA, la DA et est la seule MAO capable

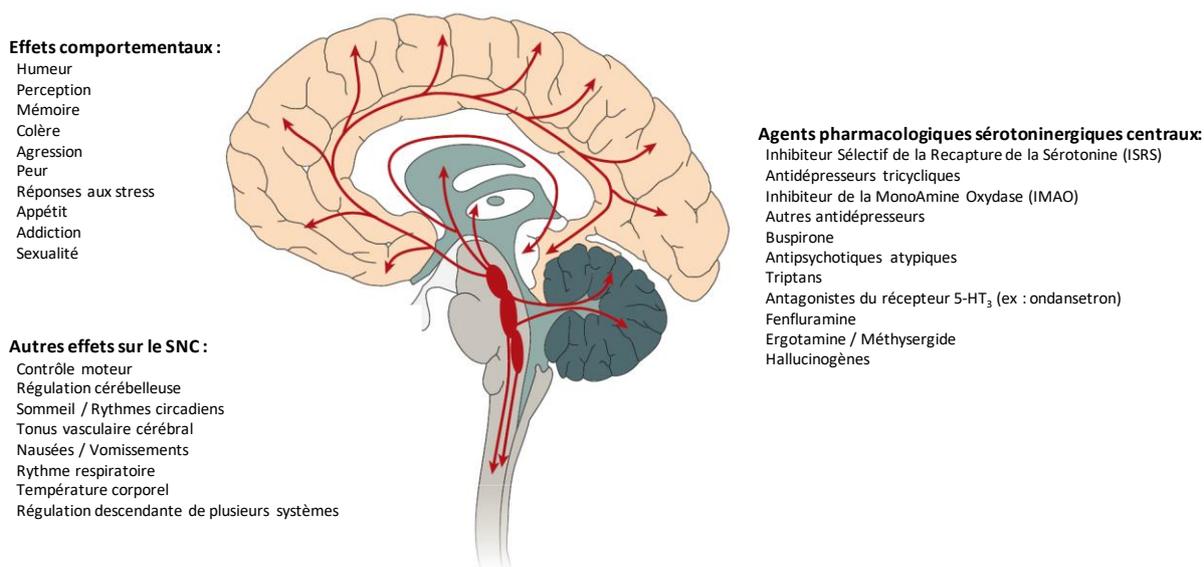
de dégrader la 5-HT (Johnston, 1968). La MAO-B dégrade la phényléthylamine et la benzylamine et est également capable de dégrader la DA, mais avec une efficacité inférieure à celle de la MAO-A (Knoll and Magyar, 1972; Fornai *et al.*, 1999).

La MAO peut donc servir de cible génétique pour l'étude des systèmes monoaminergiques. Les souris KO MAO-A<sup>-/-</sup> ont des taux cérébraux plus élevés de 5-HT, de DA et de NA que des souris WT (Cases *et al.*, 1995). C'est également la cible pharmacologique des inhibiteurs mixtes de MAO (IMAO) tel que l'iproniazide ou sélectif de la MAO-A avec le moclobémide ou la tolaxone, et de la MAO-B avec la sélégiline et rasagiline. Ces traitements, en inhibant la dégradation des monoamines vont permettre une augmentation des concentrations de ces neurotransmetteurs et seront donc utilisés dans le traitement de la dépression concernant les IMAO-A et de la maladie de Parkinson concernant les IMAO-B.

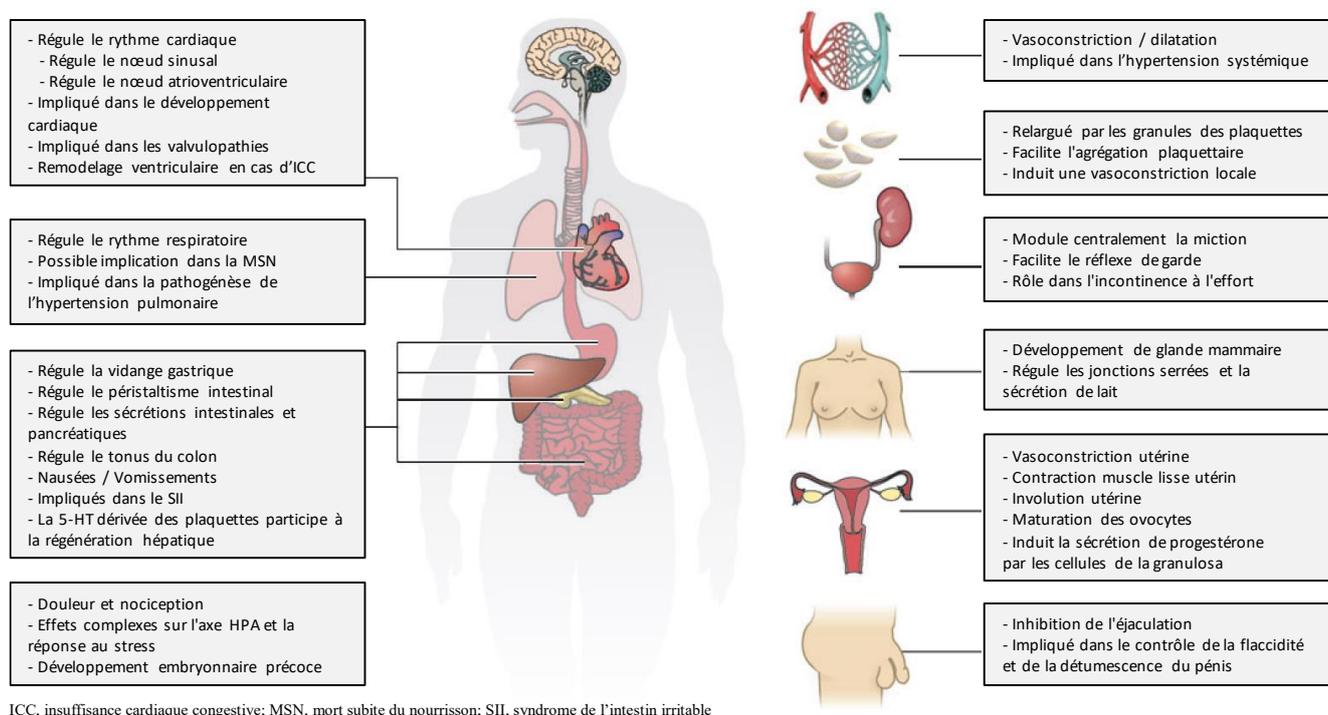
## **2. Implications physiologiques de la 5-HT**

La sérotonine module pratiquement tous les processus comportementaux humains. Ce phénomène peut sembler surprenant étant donné que moins d'un neurone sur un million du SNC est sérotoninergique et que la majorité de la 5-HT se trouve à l'extérieur du SNC. Cependant, les neurones sérotoninergiques du tronc cérébral envoient des projections ascendantes se terminant d'une manière définie et organisée dans les régions corticales, limbiques, ainsi que dans le mésencéphale et la partie postérieure du cerveau (**Figure 4**). Dans le SNC, la 5-HT est presque exclusivement produite dans les neurones provenant des noyaux du raphé situés dans la ligne médiane du tronc cérébral. Ces neurones sérotoninergiques forment le système efférent le plus grand et le plus complexe du cerveau humain. Les neurones du raphé caudal innervent la moelle épinière, tandis que ceux du raphé rostral, du raphé dorsal et médial innervent une grande partie du reste du SNC par des projections diffuses. Compte-tenu de ces nombreuses projections sérotoninergiques, il n'est pas surprenant que les récepteurs et les transporteurs de la sérotonine constituent des cibles majeures pour le développement de médicaments du SNC. Au-delà de son rôle central, la 5-HT module également de nombreux processus physiologiques résumés **Figure 5**.

La 5-HT participe à la modulation de la perception et de la transmission de la douleur à plusieurs étages du système nerveux central et au niveau du système nerveux périphérique.



**Figure 4 :** Voies sérotoninergiques centrales, leurs effets et les médicaments les ciblant. D'après Berger *et al.*, 2009.



**Figure 5 :** Nombreux effets de la sérotonine hors du système nerveux central. D'après Berger *et al.*, 2009.

### **3. Rôle de la 5-HT dans la modulation de la douleur neuropathique**

#### **3.1 Les récepteurs sérotoninergiques**

##### *3.1.1. Classification des récepteurs*

Comme vu précédemment, la 5-HT produit une myriade d'effets physiologiques chez l'homme. Ces effets sont médiés par 15 sous-types de récepteurs, répartis en 7 familles, 6 familles de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et 1 famille de récepteurs couplés à un canal ionique (Hoyer *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 2009). Les progrès scientifiques en rapport avec le système sérotoninergique ont été obtenus par identification pharmacologique des différents récepteurs grâce à l'utilisation d'outils pharmacologiques adaptés. Les premiers résultats suggérant l'existence de sous-types de récepteurs sérotoninergiques datent de 1957 grâce à des études *in vitro* sur organes isolés mesurant l'intensité de contraction de l'iléon de Cobaye en réponse à l'administration de 5-HT (Ginzel, 1957), et son blocage partiel par la morphine (nommé récepteur de type M) ou par la dibenzylamine (nommé récepteur de type D) (Gaddum and Picarelli, 1957).

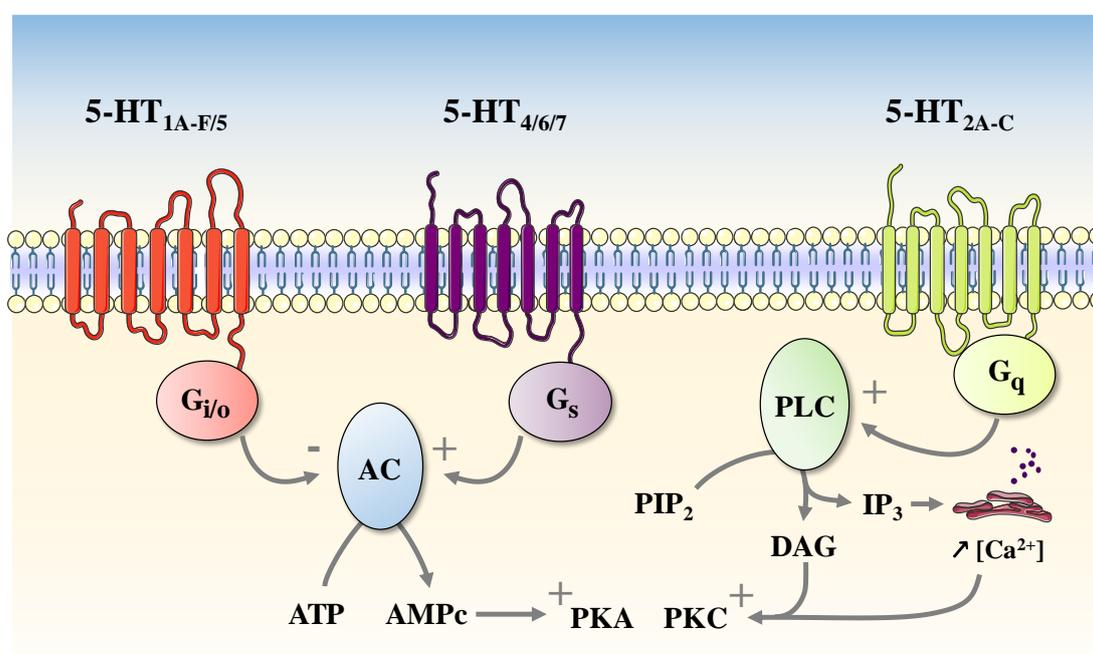
Dans les années 1970, le développement de radioligands spécifiques permettant de marquer les récepteurs dans le tissu animal, le [<sup>3</sup>H]-LSD et la [<sup>3</sup>H]-5-HT (Peroutka *et al.*, 1979), ont permis la mise en évidence de deux populations distinctes de récepteurs : une présentant une affinité forte pour la [<sup>3</sup>H]-5-HT, appelée 5-HT<sub>1</sub>, et une autre présentant une affinité forte pour la [<sup>3</sup>H]-spiperone, nommée 5-HT<sub>2</sub>. De plus, les auteurs remarquèrent que l'affinité de la 5-HT pour ces récepteurs était sensible à la présence d'un nucléotide, la guanine (Peroutka *et al.*, 1979), suggérant ainsi le couplage probable de ces récepteurs avec une protéine G. Sept ans plus tard, la correspondance entre le récepteur 5-HT<sub>2</sub> et le récepteur précédemment appelé récepteur de type D fut établie (Bradley *et al.*, 1986). Le type M s'est alors avéré être un nouveau type de récepteur de la 5-HT, un récepteur canal ionique ligand-dépendant perméable aux cations, le récepteur 5-HT<sub>3</sub> (Derkach *et al.*, 1989). Sur la base des affinités des agonistes / antagonistes sélectifs, et grâce à la caractérisation par homologie de séquence – qui vivait un véritable essor à cette période –, les récepteurs de la 5-HT ont été reclassés en sept types : 5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>, comprenant 15 sous-types (Hoyer *et al.*, 1994).

Avec ce nouveau système de classification, la recherche sur les récepteurs sérotoninergiques a largement prospéré au cours des 25 dernières années, permettant de faire le lien entre leur distribution et leurs rôles physiologiques (Berger *et al.*, 2009).

### 3.1.2. Transduction du signal des RCPG sérotoninergiques

#### a. Voies canoniques associées aux protéines G

Les RCPG sérotoninergiques sont couplés aux trois voies de signalisation canoniques des protéines  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_s$  (**Figure 6**), permettant à cette famille de récepteurs de moduler plusieurs voies de signalisation, et dont les conséquences physiologiques sont nombreuses.



**Figure 6** : Voies de signalisation impliquées dans l'activation des RCPG.

Les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>5</sub> sont couplés à  $G\alpha_i$ . La sous-famille 5-HT<sub>1</sub>, composée des sous-types 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> et 5-HT<sub>1F</sub>, se couple à  $G\alpha_i$  conduisant à l'inhibition de l'adénylate cyclase et à une diminution d'AMPc intracellulaire (Bockaert *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 2002). On ne sait que peu de choses de la famille des récepteurs 5-HT<sub>5</sub>, comprenant les sous-types 5-HT<sub>5A</sub> et 5-HT<sub>5B</sub>. Seul le 5-HT<sub>5A</sub> a été identifié dans le cortex et le cervelet humain (Pasqualetti *et al.*, 1998). Le couplage de ce récepteur à  $G\alpha_i$  a été mis en évidence dans les cellules HEK (Hurley *et al.*, 1998).

Les récepteurs sérotoninergiques couplés à  $G\alpha_{q/11}$  comprennent les sous-types de récepteurs 5-HT<sub>2</sub> : 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>. Ces récepteurs ont traditionnellement été liés aux voies de signalisations dépendantes de Gq, avec l'activation de la phospholipase C entraînant la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) conduisant *in fine* à une augmentation des taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Roth *et al.*, 1984, 1998). Il existe cependant des preuves *in vitro* d'un lien entre les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> et la protéine  $G\alpha_i$ . Il a été mis en évidence que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> inhibait l'accumulation d'AMPc via l'activation possible de  $G\alpha_i$  (Garnovskaya *et al.*, 1995) de même que le récepteur 5-HT<sub>2C</sub> lorsque sa densité est élevée (Lucaites *et al.*, 1996).

Les récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub> sont couplés à  $G\alpha_s$ . Le couplage entre le récepteur 5-HT<sub>4</sub> et l'adénylate cyclase entraîne une augmentation des taux d'AMPc dans l'hippocampe chez le cobaye (Bockaert *et al.*, 1990). Il pourrait également entraîner une augmentation du courant calcique, au moins dans les myocytes auriculaires humains (Ouadid *et al.*, 1992) suggérant ainsi un mécanisme de couplage à  $G\alpha_{q/11}$ , hypothèse démontrée dans un système recombinant (Ponimaskin *et al.*, 2002).

#### b. Signalisation non-canonique et sélectivité fonctionnelle

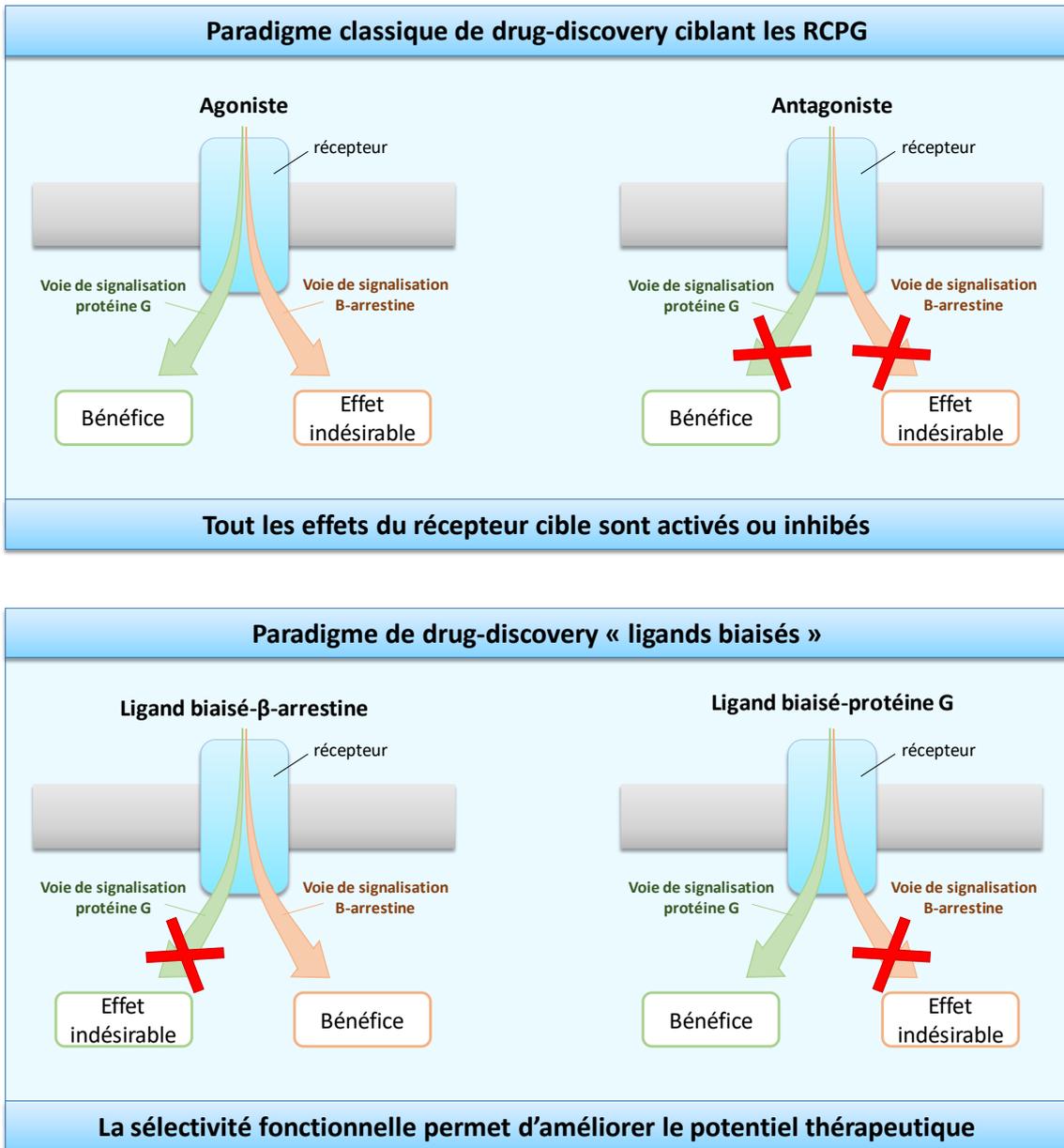
En plus de la transduction classique du signal, les RCPG sont impliqués dans la signalisation non canonique via le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Ce mécanisme est impliqué dans la désensibilisation des RCPG (Freedman and Lefkowitz, 1996) avec une importance clinique, en particulier concernant l'utilisation thérapeutique et la tolérance de médicaments (Violin *et al.*, 2014). La désensibilisation des RCPG se fait par le recrutement d'une kinase : GRK (*G protein-coupled receptor kinase*) et la phosphorylation du récepteur. Cette dernière entraîne le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 1 et de la  $\beta$ -arrestine 2 et leur liaison au récepteur entraîne une modification stérique, prévenant son couplage avec la protéine G, phénomène menant ainsi à sa désensibilisation (Krupnick and Benovic, 1998). Le complexe RCPG- $\beta$ -arrestine peut alors entraîner la formation de puits recouverts de clathrine (Krupnick *et al.*, 1997), conduisant finalement à l'internalisation du récepteur (Ferguson *et al.*, 1996). Cette internalisation permet de contrôler à la fois la durée de la réponse et la signalisation du complexe récepteur-ligand. En plus de la diminution de la signalisation cellulaire, les  $\beta$ -arrestines peuvent simultanément déclencher des signaux indépendants de la protéine G

(Lefkowitz and Shenoy, 2005). Il était admis auparavant que les complexes agoniste-récepteur stimulaient toutes les voies de signalisation disponibles dans la même proportion. Ces découvertes sur la signalisation non canonique dépendante de l'arrestine, semblent introduire une notion plus complexe.

Les phénomènes de sélectivité fonctionnelle et de désensibilisation ont été mis en évidence pour plusieurs récepteurs sérotoninergiques notamment le 5-HT<sub>1A</sub>, le 5-HT<sub>2A/B/C</sub> (Hanley and Hensler, 2002; Wacker *et al.*, 2013; Stroth *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016).

L'utilisation de systèmes cellulaires recombinants pour mesurer les réponses fonctionnelles spécifiques des récepteurs a introduit un nouveau concept en pharmacologie. La sélectivité fonctionnelle, parfois appelée « agonisme biaisé », a été proposée pour tenir compte des différences entre deux réponses fonctionnelles ou plus, résultant de l'activation du récepteur par un agoniste (Urban *et al.*, 2006). Le premier cadre conceptuel caractérisant la sélectivité fonctionnelle a été proposé par Roth and Chuang (1987) pour expliquer le phénomène par lequel un ou plusieurs mécanismes de transduction distincts peuvent être activés par un seul RCPG. Ils émirent également l'hypothèse que ce phénomène pourrait conduire au développement d'agonistes sélectifs pour un effecteur particulier.

Il a donc été établi que la sélectivité fonctionnelle reflète la capacité d'un ligand à sélectionner différentes conformations du récepteur, conduisant à une réponse fonctionnelle spécifique (Kenakin, 2011). La sélection de différentes conformations du récepteur peut être la clé de la conception de nouveaux agonistes ou antagonistes sélectifs fonctionnels avec un potentiel thérapeutique supérieur à celui des médicaments actuellement disponibles (**Figure 7**). Les mécanismes moléculaires menant à cette sélectivité fonctionnelle ne sont cependant aujourd'hui pas encore entièrement compris.

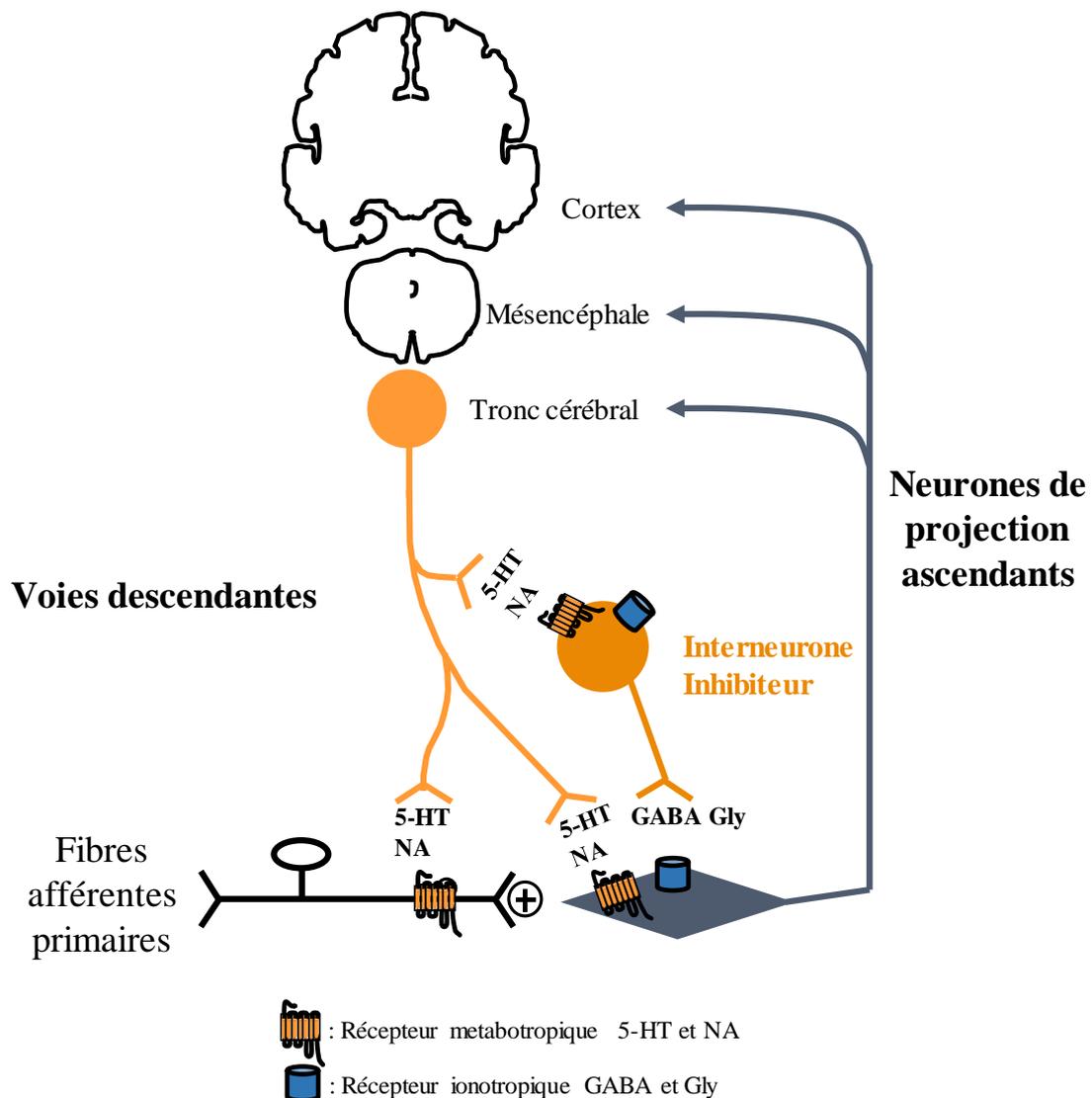


**Figure 7** : Mécanismes d'action des ligands biaisés et leur pertinence clinique.

### *3.1.3. Implications des différents récepteurs sérotoninergiques dans la douleur neuropathique*

Si le rôle pronociceptif de la 5-HT en périphérie est bien établi, en revanche, son action au niveaux spinal et supraspinal semble paradoxale avec des effets pro- et antinociceptifs (Millan, 2002; Bardin, 2011; Kayser *et al.*, 2011; Avila-Rojas *et al.*, 2015; Godínez-Chaparro *et al.*, 2016).

Nous allons à présent nous intéresser plus en détails à l'implication des récepteurs sérotoninergiques dans la douleur neuropathique puis nous aborderons brièvement le rôle et l'organisation des voies sérotoninergiques bulbo-spinales. Ces voies, issues du tronc cérébral, sont 1) descendantes et projettent sur la moelle épinière, modulant ainsi l'information nociceptive entrante, et 2) ascendantes et projettent sur les régions corticales et limbiques modulant ainsi la perception de la douleur (**Figure 8**) (Ossipov, 2012).



**Figure 8** : Organisation schématique de voies sérotoninergiques bulbo-spinales.

#### a. Les récepteurs 5-HT<sub>1A/B/D/E/F</sub>

Dans le SNC, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>1B</sub> ont une densité élevée aux niveaux des noyaux du raphé, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du septum latéral et du cortex (Azmitia *et al.*, 1996; Riad *et al.*, 2000; Mengod *et al.*, 2015) où ils présentent une localisation neuronale à la fois pré- et postsynaptique. La répartition des récepteurs 5-HT<sub>1D</sub>, est plus restreinte, principalement dans le tubercule olfactif, le cortex, le raphé dorsal et le cervelet (Bonaventure *et al.*, 1997, 1998). Les récepteurs 5-HT<sub>1E</sub> et 5-HT<sub>1F</sub> possèdent une forte homologie de séquence (McAllister *et al.*, 1992) et sont co-localisés dans le cerveau humain dans le cortex, le caudé-putamen, l'hippocampe et l'amygdale (Leonhardt *et al.*, 1989; Lowther *et al.*, 1992; Miller and Teitler, 1992). Les récepteurs 5-HT<sub>1A/B/D/F</sub> sont également retrouvés dans la moelle spinale, notamment dans les couches superficielles de la corne dorsale chez le rat, le chat et l'homme (Marlier *et al.*, 1991; Mills and Martin, 1995; Laporte *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1997) et, pour le récepteur 5-HT<sub>1A</sub>, au niveau des neurones de projection et des interneurones GABAergiques et enképhalinergiques (Millan, 2002). En périphérie, ces récepteurs sont présents dans les GRD chez le rat et l'homme (Pierce *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005; Classey *et al.*, 2010) ainsi que sur les fibres afférents primaires pour les récepteurs 5-HT<sub>1A/B</sub> (Daval *et al.*, 1987).

Dans un contexte de douleur neuropathique, le rôle du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> fait débat. Les effets de l'administration d'agonistes 5-HT<sub>1A</sub> (le F13640, le SR57746) ont été évalués à l'aide de différents modèles de douleur neuropathique. Dans le modèle de ligature du nerf infraorbitaire (IoN-CCI, *Infraorbital Nerve-Chronic Constriction Injury*), les rats présentent une diminution du seuil de retrait en réponse à la stimulation par un filament de von Frey appliqué au niveau de la base des vibrisses (territoire innervé par le nerf lésé) témoignant d'une hypersensibilité tactile. Chez ces animaux, l'administration aiguë par voie intrapéritonéale (i.p.) de l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub> diminue de façon dose-dépendante cette hypersensibilité jusqu'à restaurer totalement les seuils de sensibilité (Deseure *et al.*, 2002, 2007). Cet effet a été retrouvé dans d'autres modèles de douleur neuropathique traumatique notamment dans le modèle de lésion spinale par ischémie photochimique. L'administration chronique de F13640 réduit significativement l'hypersensibilité tactile de ces animaux (Wu *et al.*, 2003; Colpaert *et al.*, 2004). L'effet anti-allodynique de l'activation du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> est également mis en évidence dans un modèle de neuropathie diabétique douloureuse induite par la streptozotocine (STZ), et trois modèles de douleur neuropathique chimio-induite par l'oxaliplatine (OXA), le

paclitaxel (PTX) et la vincristine (VIN), agents neurotoxiques. Ces différents modèles sont caractérisés par une hypersensibilité tactile mesurée par le test de von Frey et, pour le modèle OXA une hypersensibilité thermique au froid, mesurée par le test de la plaque froide. L'administration i.p. aiguë de F13640 et *per os* (p.o.) de SR57746 restaure de façon dose-dépendante les seuils de sensibilité (Andoh *et al.*, 2013; Sałat *et al.*, 2017). En plus de son effet anti-allodymique, l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub> permet également de diminuer les décharges neuronales du nerf tibial induites par l'OXA et le PTX (Andoh *et al.*, 2013). L'électrophysiologie *in vivo* chez des rats ayant subi une hémisection de la moelle épinière, révèle une diminution de l'activité inhibitrice de la 5-HT et de l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub> sur l'hyperexcitabilité neuronale par la co-administration d'un antagoniste 5-HT<sub>1A</sub> (le WAY100635) (Hains *et al.*, 2003). Cette suppression de l'activité anti-allodymique de la 5-HT par l'antagoniste 5-HT<sub>1A</sub> est retrouvée dans le modèle de ligature de la racine du nerf spinal (SNL) (Avila-Rojas *et al.*, 2015).

A l'inverse, d'autres travaux rapportent un effet analgésique du blocage du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>. Dans le modèle SNL, l'administration intra-RVM ou sous cutanée (s.c.) d'un antagoniste 5-HT<sub>1A</sub> (le WAY100635) diminue les symptômes douloureux. Son administration intrathécale (i.t.) n'a en revanche pas d'effet suggérant le rôle crucial du récepteur au niveau des contrôles descendants de la douleur (RVM) mais pas au niveau de la zone relai FAP/neurones de second ordre de la corne dorsale spinale dans l'effet anti-allodymique de l'antagoniste (Wei and Pertovaara, 2006). Une autre étude évaluant l'effet du tramadol dans le modèle de ligature du nerf sciatique (CCI, *chronic constriction injury*) chez le rat a mis en évidence un effet anti-allodymique de la co-administration d'une dose inactive de tramadol et de l'antagoniste 5-HT<sub>1A</sub> tandis que la co-administration d'un agoniste 5-HT<sub>1A</sub> (la 8-OH-DPAT) inhibe les effets d'une dose active de tramadol (Berrocoso *et al.*, 2007). La combinaison de l'antagoniste avec la clomipramine (ATC), a révélé un effet anti-allodymique potentialisateur dans les modèles de douleur neuropathique traumatique CCI, et diabétique STZ (Ardid *et al.*, 2001). Ces résultats montrent l'intérêt thérapeutique du blocage du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>.

Les autres sous-types de récepteurs 5-HT<sub>1</sub> sont moins étudiés dans les modèles de neuropathie douloureuse. Les récepteurs 5-HT<sub>1D</sub> et 5-HT<sub>1B</sub> sont proches en termes de structure, de localisation (Bonaventure *et al.*, 1997, 1998). Ainsi, les effets des triptans, agonistes 5-HT<sub>1B/1D</sub>, indiqués dans le traitement aigu de la crise migraineuse, ont été évalués dans différents modèles de douleur neuropathique. Dans le modèle IoN-CCI, l'administration s.c. ou p.o. de deux triptans, le sumatriptan et zolmitriptan, diminue le comportement douloureux

(Kayser *et al.*, 2002). La co-administration avec un antagoniste 5-HT<sub>1B/1D</sub> (le GR127935) inhibe cet effet anti-allodynique ainsi que celui de l'administration i.t. de 5-HT dans le modèle SNL (Kayser *et al.*, 2002; Avila-Rojas *et al.*, 2015). Cependant, les deux triptans sont inefficaces dans les modèles CCI et SNI, quelles que soient leurs voies d'administrations (systémique ou spinale) suggérant l'implication de mécanismes antalgiques modèle-dépendants (Kayser *et al.*, 2002; Nikai *et al.*, 2008).

L'effet antalgique du sumatriptan a été confirmé en clinique chez des patients souffrant de névralgie trigéminal (Kanai, Saito, *et al.*, 2006; Kanai, Suzuki, *et al.*, 2006).

#### b. Les récepteurs 5-HT<sub>2A/B/C</sub>

L'expression des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> est retrouvée dans tout le SNC notamment dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, le cervelet et le tronc cérébral (Molineaux *et al.*, 1989; Mengod *et al.*, 1996, 2015; Willins *et al.*, 1997; Cornea-Hebert *et al.*, 1999; Kupers *et al.*, 2009). Les récepteurs 5-HT<sub>2A/B/C</sub> ont été identifiés dans la moelle épinière par techniques d'autoradiographie (Pazos *et al.*, 1985; Marlier *et al.*, 1991; Pranzatelli *et al.*, 1992), d'immunohistochimie (Ridet *et al.*, 1994; Maeshima *et al.*, 1998; Cornea-Hebert *et al.*, 1999; Doly, Madeira, *et al.*, 2004) et par hybridation *in situ* (Molineaux *et al.*, 1989; Helton *et al.*, 1994; Pompeiano *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 2001). En ce qui concerne l'hybridation *in situ*, ces récepteurs ont été trouvés dans la moelle épinière de rat, de singe et de l'homme mais seuls les 5-HT<sub>2A/B</sub> sont observés chez le chat (Helton *et al.*, 1994). Chez le rat, une forte densité des récepteurs 5-HT<sub>2A/C</sub> a été observée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Pranzatelli *et al.*, 1992; Pompeiano *et al.*, 1994) notamment dans les couche V et VII, concernant le 5-HT<sub>2C</sub> (Molineaux *et al.*, 1989).

En périphérie, ces 3 récepteurs sont présents dans les GRD chez le rat et l'homme (Pierce *et al.*, 1997; Maeshima *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Van Steenwinckel *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011; Urtikova *et al.*, 2012; Cervantes-Durán *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont pu mettre en évidence le rôle antalgique de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> dans la douleur neuropathique. L'administration systémique ou spinale d'agonistes 5-HT<sub>2A</sub> ( $\alpha$ -méthyl-5-HT et TCB-2), réduit l'hypersensibilité tactile et thermique dans les modèles SNL, CCI, diabétique (STZ), SCI (*spinal cord injury*, hémisection de la

moelle épinière) (Sasaki *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Pichon *et al.*, 2010; Sánchez-Brualla *et al.*, 2017). Ces mêmes effets sont retrouvés avec l'administration i.t. d'un agoniste 5-HT<sub>2B</sub> (le BW723C86) dans le modèle CCI (Urtikova *et al.*, 2012) et l'administration i.t. d'agonistes 5-HT<sub>2C</sub> (le MK212, le RO 60-0175 et le WAY-161503, la m-chlorophénylpiperazine (mCPP)) dans les modèles SNL, IoN-CCI et celui induit par section nerveuse (Sanchez *et al.*, 1995; Obata *et al.*, 2004, 2007; Nakai *et al.*, 2010).

Les effets anti-allodyniques de ces agonistes sont bloqués par la co-administration de leurs antagonistes respectifs, la kétansérine pour le 5-HT<sub>2A</sub>, le RS127445 pour le 5-HT<sub>2B</sub>, et le RS102221 pour le 5-HT<sub>2C</sub> (Sasaki *et al.*, 2003; Obata *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2010; Urtikova *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces résultats révèle un effet thérapeutique de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2A/B/C</sub> dans la douleur neuropathique. *A contrario* un nombre non négligeable d'études indique un effet pronociceptif de leur activation. L'administration spinale ou systémique d'antagoniste 5-HT<sub>2A</sub> (MDL11939, kétansérine, sarpogrélate) diminue les comportements douloureux dans des modèles de douleur neuropathique toxique (induits par la VIN et par la 2'3'didéoxycytidine (ddC)), métabolique (modèle STZ) et traumatique (modèle CCI) (Nitanda *et al.*, 2005; Thibault *et al.*, 2008; Van Steenwinckel *et al.*, 2008; Mixcoatl-Zecuatl and Jolival, 2011). L'effet antalgique des antagonistes 5-HT<sub>2A</sub> a été confirmé par administration chronique p.o. de sarpogrélate dans un modèle de hernie discale lombaire à l'origine d'une douleur neuropathique chez le rat (Hashizume *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2015) ainsi qu'en clinique chez des patients souffrant de cette pathologie (Kanayama *et al.*, 2005). Ce même effet antalgique a pu être retrouvé avec des antagonistes 5-HT<sub>2B</sub> (le RS-127445 et le LY-266097) administrés par voie i.t. dans le modèle SNL (Pineda-Farias *et al.*, 2015).

De façon intéressante, il a été rapporté une *up-regulation* des récepteurs 5-HT<sub>2A/B/C</sub> dans les couches superficielles de corne dorsale de la moelle épinière et les GRD dans les modèles toxiques VIN et ddC, dans le modèle de hernie discale pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, dans le modèle SNL pour les récepteurs 5-HT<sub>2A/2B</sub> et dans les modèles OXA, SCI et IoN-CCI pour le récepteur 5-HT<sub>2C</sub> (Kato *et al.*, 2008; Nakae *et al.*, 2008; Thibault *et al.*, 2008; Van Steenwinckel *et al.*, 2009; Aira *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013; Baptista-De-Souza *et al.*, 2014; Pineda-Farias *et al.*, 2015).

### c. Les récepteurs 5-HT<sub>3A/B</sub>

Le récepteur 5-HT<sub>3</sub> est le seul récepteur ionotrope de la famille des récepteurs sérotoninergiques. Il est constitué de cinq unités transmembranaires formant un canal sélectif des cations. Son activation conduit à un influx de Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> et un efflux K<sup>+</sup> permettant *in fine* d'accroître l'excitation neuronale (Walstab *et al.*, 2010). D'abord clonée en 1991, la sous-unité 5-HT<sub>3A</sub> s'est avérée former des homopentamères fonctionnels (Maricq *et al.*, 1991). Par la suite, la sous-unité 5-HT<sub>3B</sub> a été identifiée et bien qu'elle soit incapable de former des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> fonctionnels, la combinaison des unités 5-HT<sub>3A</sub> et 5-HT<sub>3B</sub> forme des canaux avec des propriétés très similaires à celles de certains récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Davies *et al.*, 1999). De plus, au cours des dernières années, trois autres sous-unités 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> et 5-HT<sub>3E</sub> ont été identifiées. Comme avec les sous-unités 5-HT<sub>3B</sub>, aucune de celles-ci ne forme d'homopentamères fonctionnels, mais elles affectent les propriétés biophysiques et les réponses pharmacologiques lorsqu'elles sont co-exprimées avec la sous-unité du récepteur 5-HT<sub>3A</sub> (Walstab *et al.*, 2010).

Des études utilisant des ligands radiomarqués ont montré que dans le SNC, le récepteur 5-HT<sub>3</sub> est fortement concentré dans le complexe vagal dorsal, y compris le noyau du tractus solitaire, l'area postrema et le noyau moteur dorsal du nerf vagal. Ces zones sont impliquées dans le réflexe de vomissement et leur blocage est à l'origine des effets anti-émétiques des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, les sétrons, indiqués dans le traitement des nausées/vomissements post-opératoires, chimio et radio-induits. Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> sont également situés dans les régions striatales et limbiques du cerveau humain notamment l'hippocampe et l'amygdale, ainsi que dans le noyau accumbens (Abi-Dargham *et al.*, 1993). Au niveau spinal, des études d'immunohistochimie ont permis de localiser ce récepteur dans les couches les plus superficielles de la corne dorsale chez le rat et l'homme (Radja *et al.*, 1991; Laporte *et al.*, 1992, 1995, 1996) ainsi que sur des neurones spinaux, certains étant enképhalinergiques (Tsuchiya *et al.*, 1999) et d'autres GABAergiques (Morales *et al.*, 1998). En périphérie, il est retrouvé dans les GRD de rat (Pierce *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2001).

Le récepteur 5-HT<sub>3</sub> semble être impliqué dans la facilitation de la douleur neuropathique. L'administration spinale (i.t.) ou systémique (s.c.) d'antagonistes 5-HT<sub>3</sub> (l'ondansétron, le tropisétron et le palonosétron) diminue les symptômes douloureux dans les modèles SCI et SNL chez le rat et la souris (Oatway *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009; Dogrul *et*

*al.*, 2009; Chang *et al.*, 2013; Greenwood-Van Meerveld *et al.*, 2014; Nasirinezhad *et al.*, 2016). De plus la co-administration i.t. d'ondansétron avec de la morphine i.p. augmente l'effet antalgique de cette dernière dans le modèle SNL (Kimura *et al.*, 2014). En clinique, les antagonistes 5-HT<sub>3</sub> ont révélé leur efficacité chez les patients souffrant de fibromyalgie (Farber *et al.*, 2000; Haus *et al.*, 2000; Vergne-Salle *et al.*, 2011) ainsi que chez de patients souffrant de douleur neuropathique d'étiologies variées (McCleane *et al.*, 2003).

Le rôle pronociceptif de ce récepteur est néanmoins sujet à controverse, car d'autres travaux aboutissent à des conclusions opposées. Dans les modèles SCI et SNL, l'administration i.t. d'agonistes 5-HT<sub>3</sub>, le 2-Me-5HT et le mCPBG, réduit le comportement douloureux (Horiuchi *et al.*, 2003; Hayashida *et al.*, 2012). De plus l'administration i.t. d'un antagoniste 5-HT<sub>3</sub>, le MDL72222, à des animaux sains, induit la même hypersensibilité que celle retrouvée chez les animaux SCI (Horiuchi *et al.*, 2003). La co-administration i.t. d'ondansétron avec 2 IMAO-A par vois s.c., le moclobémide et le 2-DMPI, inhibe les effets antalgiques de ces derniers dans le modèle CCI chez la souris (Villarinho *et al.*, 2013). De plus, une étude électrophysiologique a montré que, chez le rat présentant une hémisection de la moelle épinière, l'administration spinale de 5-HT comme celle de l'agoniste (2-Me-5HT) diminue l'hyperexcitabilité neuronale induite par la lésion et que cette diminution de l'excitabilité est inhibée par la co-administration d'un antagoniste, le MDL72222 (Hains *et al.*, 2003).

#### d. Le récepteur 5-HT<sub>4</sub>

Couplé positivement à l'adénylate cyclase, ce récepteur a un effet exciteur sur les neurones (Barnes and Sharp, 1999). Aucune différence pharmacologique significative entre les variants du récepteur 5-HT<sub>4</sub> n'a été rapportée bien que des variations dans l'efficacité avec laquelle ces variants se couplent à leur système de transduction aient été observés *in vitro* (Bockaert *et al.*, 2008). Le récepteur 5-HT<sub>4</sub> est retrouvé dans le cortex, le bulbe olfactif, l'hippocampe, le tronc cérébral (Vilaró *et al.*, 1996; Suwa *et al.*, 2014), la moelle épinière (Suwa *et al.*, 2014; Pineda-Farias *et al.*, 2017) et dans les GRD (Cardenas *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 2003).

Les études portant sur l'implication du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sont assez peu nombreuses. Certaines ont pu mettre en évidence le rôle bénéfique de l'activation du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sur la

douleur neuropathique. L'injection i.t. de l'agoniste ML10302, réduit de façon dose-dépendante le comportement douloureux dans le modèle IoN-CCI (Nakai *et al.*, 2014). De plus, la microinjection de l'antagoniste GR113808, au niveau du cortex ventrolatéral orbital supprime l'effet anti-allodymique de la 5-HT dans le modèle SNI (Xu *et al.*, 2013). De la même façon, l'administration i.t. du SDZ 205-557 (antagoniste), supprime l'effet anti-allodymique de la stimulation électrique de la moelle épinière dans le modèle de ligature partielle du nerf sciatique (PSNL, *Partial Sciatic Nerve Injury*) (Song *et al.*, 2011).

Par contre, une étude a mis en évidence un effet anti-allodymique dose-dépendant du blocage des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> spinaux par injection i.t. de GR113808 dans le modèle SNL (Pineda-Farias *et al.*, 2017).

#### e. Les récepteurs 5-HT<sub>5</sub>

Les récepteurs 5-HT<sub>5</sub> sont probablement les moins bien connus de tous les récepteurs sérotoninergiques. Ils sont couplés à la protéine G $\alpha_i$  conduisant à l'inhibition de l'adénylate cyclase et à une diminution d'AMPc intracellulaire (Francken, 1998). Son activation est donc inhibitrice sur les neurones. Le récepteur 5-HT<sub>5A</sub> est présent au niveau du cerveau murin et humain (Erlander *et al.*, 1993; Pasqualetti *et al.*, 1998), des GRD (Liu *et al.*, 2005; Muñoz-Islas *et al.*, 2014) et au niveau des couches superficielles I et II de la corne dorsale spinale (il est également présent de façon beaucoup plus dispersée au niveau des couches III et IV) (Doly, Fischer, *et al.*, 2004). Le récepteur 5-HT<sub>5B</sub> est également présent chez la souris (Matthes *et al.*, 1993) mais n'est à priori pas exprimé dans les tissus humains en raison de la présence d'un codon stop dans le gène du récepteur 5-HT<sub>5B</sub> humain, empêchant l'expression d'une protéine fonctionnelle, résultat de l'évolution et de la divergence entre les rongeurs et les primates (Rees *et al.*, 1994; Grailhe *et al.*, 2001).

Tout comme le récepteur 5-HT<sub>4</sub>, les recherches menées sur le récepteur 5-HT<sub>5</sub> dans la douleur neuropathique sont peu nombreuses, les outils pharmacologiques ne permettant pas de caractériser pleinement son rôle. Néanmoins, la microinjection d'un antagoniste 5-HT<sub>5A</sub>, le SB699551, au niveau du cortex ventrolatéral orbital supprime l'effet antiallodymique de la 5-HT dans le modèle SNI (Xu *et al.*, 2013). De plus, co-administré par voie i.t., il réduit l'effet anti-allodymique de la 5-HT dans le modèle SNL (Avila-Rojas *et al.*, 2015) mettant ainsi en évidence le rôle antalgique de son activation dans la douleur neuropathique.

f. Le récepteur 5-HT<sub>7</sub>

Le récepteur 5-HT<sub>7</sub> a été cloné indépendamment en 1993 par des chercheurs de trois laboratoires, respectivement chez la souris, le rat et l'homme (Bard *et al.*, 1993; Lovenberg *et al.*, 1993; Plassat *et al.*, 1993). Il est largement exprimé dans le SNC incluant le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'amygdale où il est exprimé dans les neurones et les cellules gliales (Hedlund and Sutcliffe, 2004; Thomas and Hagan, 2004; Russo *et al.*, 2005) mais également dans la moelle épinière notamment dans les couches superficielles de la corne dorsale et localisé de façon pré- et postsynaptique (Meuser *et al.*, 2002; Doly *et al.*, 2005; Dogrul and Seyrek, 2006). L'ARNm du récepteur 5-HT<sub>7</sub> est présent dans les GRD de rat et humains (Pierce *et al.*, 1996, 1997), et la présence ganglionnaire du récepteur a été confirmée par marquage immunohistochimique (Meuser *et al.*, 2002). Ce récepteur est couplé à G $\alpha_s$ , entraînant une augmentation de l'AMPC via l'activation de l'adénylate cyclase (Bard *et al.*, 1993), ce qui suggère une influence facilitatrice sur l'activité neuronale.

Concernant la douleur neuropathique, il semblerait que l'activation du récepteur 5-HT<sub>7</sub> soit bénéfique. L'administration systémique et spinale d'agonistes 5-HT<sub>7</sub> (le AS-19, le E-57431, le MSD-5a et le E-55888) réduit le comportement douloureux dans les modèles PSNL, SNI, CCI, IoN-CCI et STZ (Brenchat *et al.*, 2010, 2012; Ulugol *et al.*, 2012; Viguiet *et al.*, 2012; Nakai *et al.*, 2014). La micro-injection intra-SGPA d'AS-19 permet également de réduire l'hypersensibilité dans le modèle CCI (S.-F. Li *et al.*, 2014). L'effet antalgique de l'administration i.p. et intra-RVM de l'agoniste AS-19 est inhibé par la co-administration de l'antagoniste SB258719 (Brenchat *et al.*, 2010; Ulugol *et al.*, 2012; S.-F. Li *et al.*, 2014). De la même façon, cet antagoniste bloque les effets antalgiques de l'administration i.t. de néfopam et de tianeptine chez le rat SNL (Dam *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). Ces données, impliquant le récepteur 5-HT<sub>7</sub> dans l'effet analgésique de molécules à mécanisme d'action central (nefopam, tianeptine), confirment le rôle inhibiteur de ce récepteur sur la transmission de l'information douloureuse.

De façon intéressante l'hypersensibilité des rats PSNL est exacerbée par l'administration systémique de SB258719 (Brenchat *et al.*, 2010), mais n'est pas retrouvée lorsque l'antagoniste est administré par voie i.t. dans les modèles SNL et IoN-CCI (Dogrul *et al.*, 2009; Nakai *et al.*, 2014) suggérant un rôle pro-nociceptif du blocage des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> périphériques mais pas des récepteurs spinaux en contexte de douleur neuropathique.

*A contrario* une étude a mis en évidence une diminution du comportement douloureux chez le rat SNL suite à l'administration spinale et systémique de SB269970, un antagoniste 5-HT<sub>7</sub> (Amaya-Castellanos *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données illustre la complexité du système sérotoninergique dans le contrôle de la douleur neuropathique, complexité liée à l'existence de multiples récepteurs de la 5-HT associés à différentes modalités de signalisation, exprimés à la fois en périphérie et dans le SNC, en position pré- et post-synaptique, sur des neurones facilitant ou inhibant la transmission de l'information douloureuse.

Cette action dichotomique des différents ligands des récepteurs sérotoninergiques, souligne à la fois la complexité des mécanismes neurobiologiques de la douleur mais également le probable manque de caractérisation pharmacologique de ces outils. Certains de ces ligands ont peut-être été considérés à tort comme des agonistes ou antagonistes alors qu'il pourrait s'agir d'agonistes inverses ou d'agonistes/antagonistes biaisés.

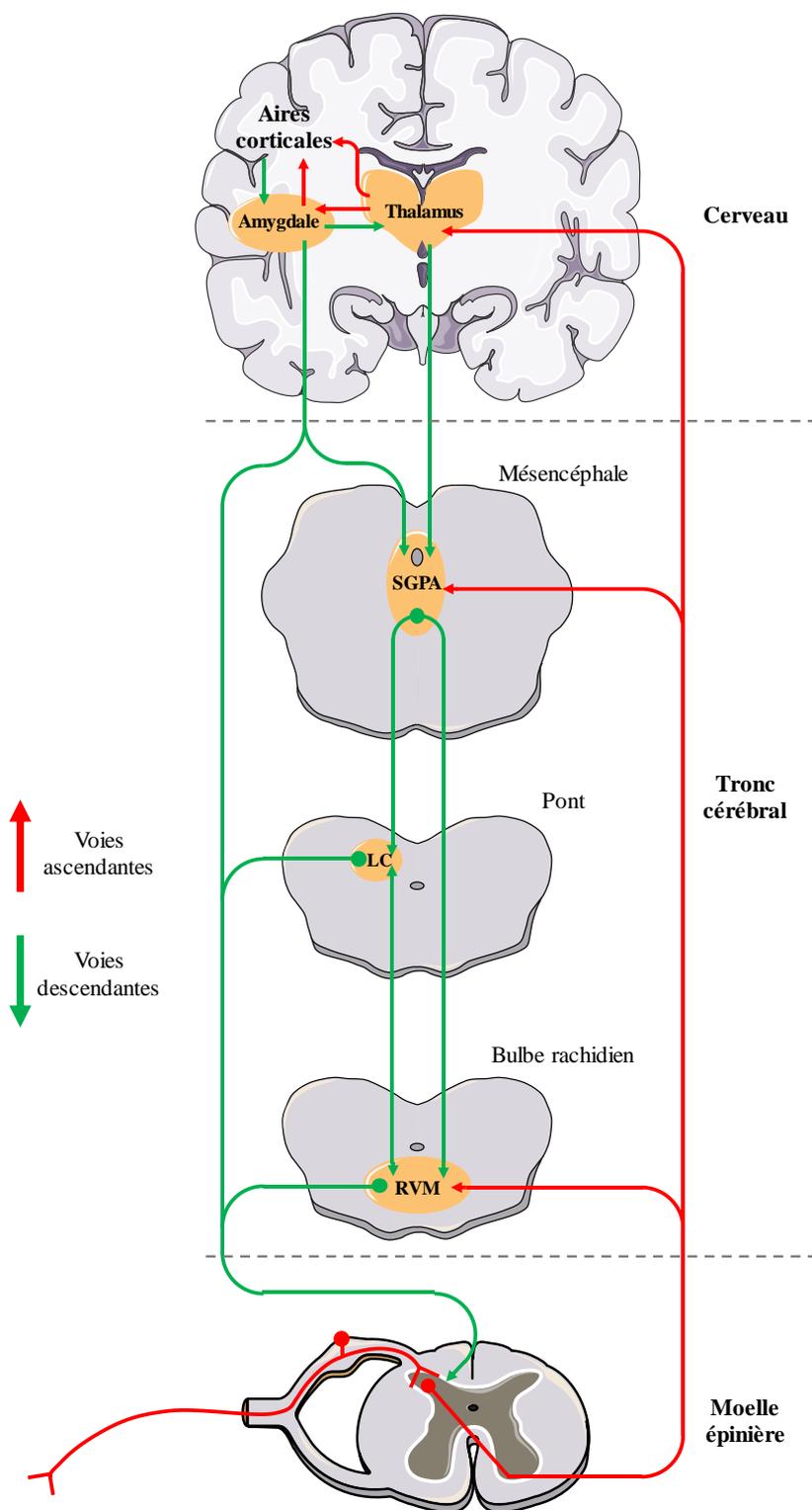
### 3.2 Voies sérotoninergiques bulbo-spinales

Les premières preuves de mécanismes modulateurs de la douleur proviennent des observations de Beecher, médecin qui servit dans l'armée américaine pendant la Seconde Guerre mondiale. Il remarqua une atténuation significative de la douleur ressentie par les soldats dans des situations de combat (Beecher, 1946). Il observa également que pas moins des trois quarts des soldats grièvement blessés déclaraient ne pas souffrir de douleur (ou seulement de douleur modérée) et ne voulaient pas de médicaments antalgiques, permettant ainsi de conclure que les «fortes émotions» pouvaient moduler la douleur (Beecher, 1946).

Cette modulation de l'information douloureuse implique un **système de contrôle descendant de la douleur** mettant en jeu le CPF, le thalamus, l'amygdale, le CCA, le cortex insulaire projetant sur la **substance grise périaqueducale** (SGPA) du mésencéphale.

**La région rostroventromédiane** du bulbe (RVM) reçoit des afférences en provenance de la SGPA, du thalamus et du complexe parabrachial. Les neurones sérotoninergiques du noyau raphe magnus (RMg) et des noyaux paragigantocellulaire et gigantocellulaire de la RVM projettent sur les couches I, II et V de la moelle spinale où les fibres afférentes primaires font

un premier relai avec les neurones de second ordre (ou neurones de projection) (Ossipov, 2012; Viguier *et al.*, 2013). Cet axe SGPA-RVM-corne dorsale de la moelle épinière met en jeu non seulement la 5-HT mais aussi d'autres neurotransmetteurs dont la NA et les opioïdes endogènes (Figure 9).

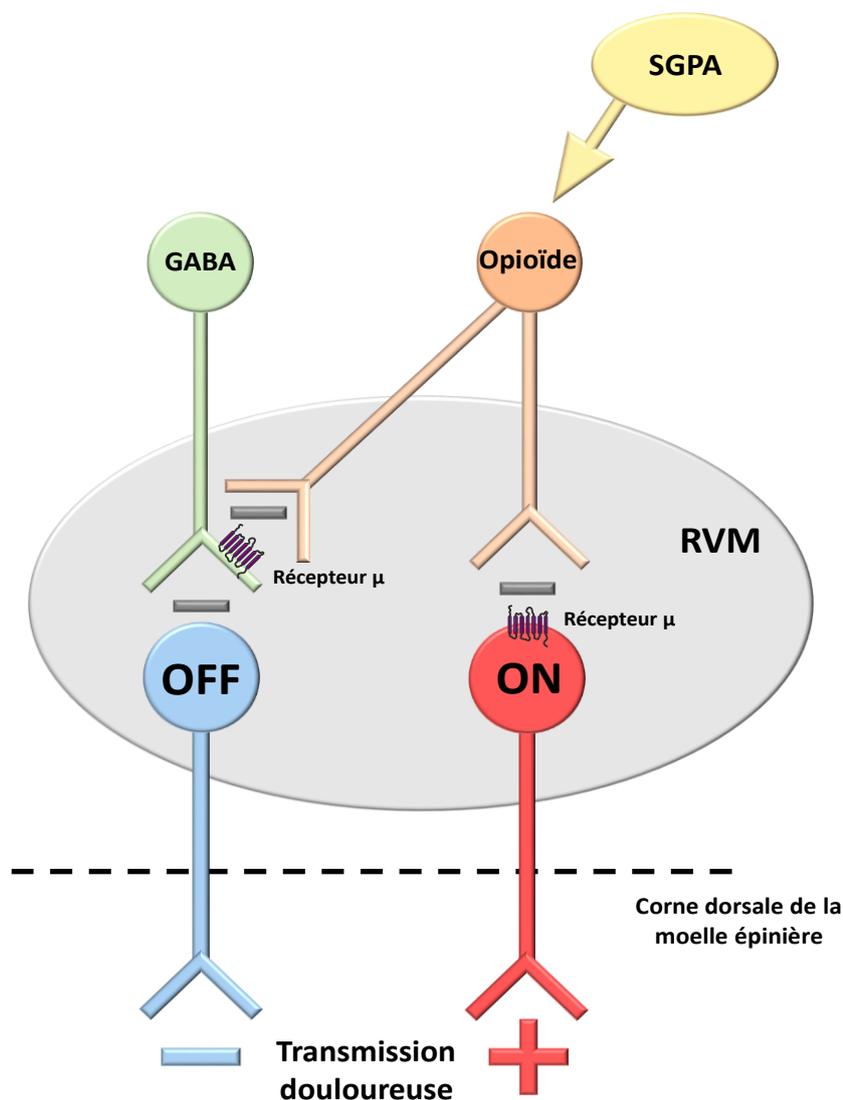


**Figure 9** : Représentation des voies descendantes sérotoninergiques. SGPA : substance grise périaqueducale, RVM : région rostroventromédiane du bulbe, 5-HT : sérotonine. D'après Ossipov, 2012.

La SGPA est la première région du cerveau dont le rôle a été décrit dans l'inhibition de la douleur. La microinjection d'opioïdes ou la stimulation électrique de cette région chez l'animal et chez l'homme révèle un puissant effet antinociceptif (Tsou and Jang, 1964; Reynolds, 1969; Hosobuchi *et al.*, 1977; Richardson and Akil, 1977). La SGPA reçoit des afférences descendantes provenant de sites corticaux et de l'amygdale (Helmstetter *et al.*, 1998; Gauriau and Bernard, 2002), et ascendantes provenant des cornes dorsales de la moelle épinière par l'intermédiaire du noyau parabrachial (Gauriau and Bernard, 2002). Des études d'imagerie par PET-Scan et IRMf chez des volontaires sains ont montré que le CCA induit probablement l'analgésie placebo via l'activation de la SGPA (Petrovic *et al.*, 2002; Eippert *et al.*, 2009). Elle module principalement les contrôles descendants de la douleur par ses connexions réciproques avec la RVM (Fields *et al.*, 2005). La stimulation des neurones de la SGPA, par micro-injection de glutamate, entraîne d'ailleurs l'excitation des neurones de la RVM et est associée à l'inhibition des réflexes nociceptifs chez le rat (Behbehani and Fields, 1979). La RVM est particulièrement riche en 5-HT puisque la moitié de la 5-HT cérébrale y est contenue (Kwiat and Basbaum, 1992).

A côté des projections sérotoninergiques bulbospinales, d'autres projections, *a priori* non sérotoninergiques issues de la RVM et participant aux contrôles descendants facilitateurs et inhibiteurs de la transmission nociceptive au niveau spinal ont été décrites. La RVM exerce des effets bidirectionnels sur la modulation de la douleur, inhibant et facilitant la douleur. Des études menées par l'équipe de Fields, ont permis d'identifier une population de neurones de la RVM dont l'activité augmente juste avant la réponse réflexe suite à une stimulation nociceptive (cellules ON) et une autre dont l'activité diminue (cellules OFF) (Heinricher *et al.*, 1989; Morgan and Heinricher, 1992). L'activité d'autres cellules dites "neutres" ne corrèle pas avec les stimuli nociceptifs. Ces 2 populations de neurones, ON et OFF, envoient des projections dans la corne dorsale de la moelle épinière, indiquant leur possible influence modulatrice sur les signaux nociceptifs entrants (Vanegas *et al.*, 1984; Fields *et al.*, 1995) (**Figure 10**). Un des mécanismes d'action de l'effet analgésique des opioïdes passe justement par ce système en inhibant les cellules ON menant à une activation des cellules OFF (Heinricher *et al.*, 2009), notamment après leur administration systémique ou intra-SGPA (Cheng *et al.*, 1986), indiquant l'expression des récepteurs  $\mu$ -opioïdes dans ces cellules (Heinricher *et al.*, 1992). L'existence de ces cellules ON et OFF au niveau des projections descendantes de la moelle épinière met en évidence une modulation positive et négative de la douleur par le système SGPA-RVM, l'activation des cellules OFF étant associée à un effet antinociceptif, alors que l'activation des cellules ON a une facilitation de la nociception (Salas *et al.*, 2016).

Il semble d'ailleurs probable qu'un déséquilibre entre les systèmes de modulation inhibiteur et facilitateur de la douleur soit à l'origine d'états pathologiques douloureux (Heinricher *et al.*, 2009; Denk *et al.*, 2014). Plusieurs études réalisées sur des modèles animaux de douleur neuropathique corroborent ce point de vue. Une augmentation de l'activité des cellules ON de la RVM est retrouvée dans ces modèles, et le blocage pharmacologique, neurochimique ou physique de la facilitation descendante de la douleur provenant de la RVM supprime l'hypersensibilité (Burgess *et al.*, 2002; Gardell *et al.*, 2003; Bee and Dickenson, 2007, 2008; Zhang *et al.*, 2009).



**Figure 10** : Représentation schématique de l'organisation des cellules ON et OFF de la RVM.

De nombreuses observations issues d'études *in vivo* et *in vitro* sont en faveur d'un effet inhibiteur de la 5-HT sur la transmission douloureuse. Ainsi, la stimulation électrique directe de la RVM induit à la fois la libération de 5-HT au niveau spinal et des effets anti-nociceptifs résultant de la mise en jeu des voies bulbospinales (inhibition des neurones nociceptifs médullaires) (Rivot *et al.*, 1982; Cui *et al.*, 1999; Hentall *et al.*, 2006). La lésion sélective des neurones sérotoninergiques par l'administration intra-RVM de 5,7-DHT (Wei *et al.*, 1999) ou l'absence de ces neurones provoquée par knock-out conditionnel du facteur de transcription *Lmx1b*, gène codant la 5-HT dans le SNC (Zhao *et al.*, 2007) exacerbent la douleur, confirmant le rôle des neurones sérotoninergiques de la RVM dans le contrôle inhibiteur de la douleur.

Plusieurs neuropeptides (substance P, somatostatine, enképhalines) ainsi que des neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA) et excitateurs (glutamate) sont co-localisés dans différentes sous-populations de neurones sérotoninergiques bulbaires projetant sur la moelle épinière (Minson *et al.*, 1991; Stornetta and Guyenet, 1999; Finnegan, 2004; Nakamura *et al.*, 2004). Ainsi, la co-libération d'un neuropeptide ou d'un neurotransmetteur pourrait entraîner une modulation de l'effet de la 5-HT contribuant à l'amélioration ou à la réduction de son action antinociceptive.

Par suppression sélective de l'expression de TPH<sub>2</sub> dans la RVM, en utilisant une approche sh-ARN (Tph-2-shRNA), une déplétion de la 5-HT endogène au niveau des somas neuronaux de la RVM et des terminaisons de leurs projections dans la moelle épinière est observée. Cette diminution des taux de 5-HT atténuant la neurotransmission sérotoninergique réduit significativement l'hypersensibilité dans les modèles de douleur neuropathique SNL et CCI chez le rat (Wei *et al.*, 2010; Gautier *et al.*, 2017). La déplétion spinale de 5-HT, obtenue par administration i.t. de 5,7-DHT permet également de diminuer le comportement douloureux des rats SNL (Rahman *et al.*, 2006). L'approche Tph-2-shRNA est intéressante dans la mesure où, contrairement à la 5,7-DHT, elle n'implique pas la perte de neurones sérotoninergiques, et donc l'élimination non seulement de la 5-HT mais aussi d'autres molécules neuroactives produites et libérées par ces neurones.

De plus, l'inhibition des afférences descendantes par lésion du faisceau dorso-latéral permet de diminuer significativement le comportement douloureux des rats SNL (Wang *et al.*, 2013). La stimulation des neurones sérotoninergiques de la RVM par technique d'optogénétique chez des souris transgéniques (TPH<sub>2</sub>-ChR2), entraîne une hypersensibilité tactile et thermique intensité-dépendante (Cai *et al.*, 2014). Ces résultats mettent en évidence le rôle facilitateur des voies sérotoninergiques descendantes issues de la RVM.

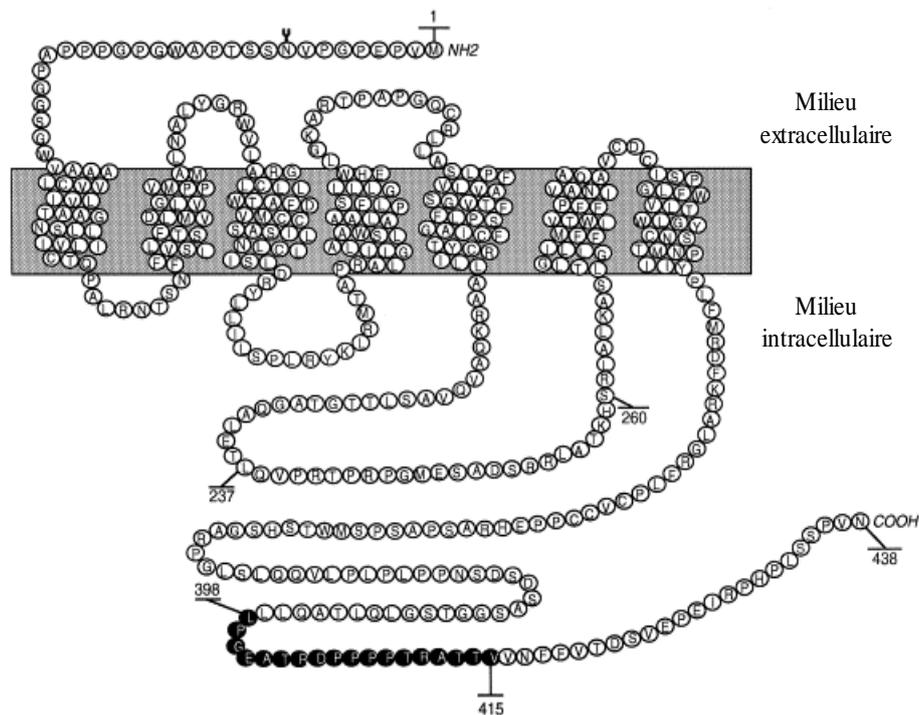
Dans le modèle de douleur neuropathique SNL, une diminution de concentrations de 5-HT dans les cornes dorsales de la moelle épinière ainsi que dans le thalamus a pu être observée (Goettl *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010; Dam *et al.*, 2014). Dans un autre modèle de douleur associée à la maladie de Parkinson, induit par administration dans la pars compacta de la substance noire, de 6-OH-DA, une diminution des taux de 5-HT ainsi qu'une réduction du nombre de neurones sérotoninergiques dans la RVM et dans la moelle spinale ont été mis en évidence (Wang *et al.*, 2017). Ainsi, la douleur neuropathique pourrait résulter d'un déséquilibre conduisant à une activité accrue du système sérotoninergique facilitateur et à une perte ou une activité réduite du système sérotoninergique inhibiteur.



## Chapitre 3. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la voie de signalisation mTOR

### 1. Structure du récepteur

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fut identifié et séquencé par trois équipes différentes en 1993 (Monsma *et al.*, 1993; Plassat *et al.*, 1993; Ruat *et al.*, 1993). Ce récepteur - membre la de famille des RCPG - est une protéine composée de sept domaines transmembranaires (TM), trois boucles intracellulaires (i) et trois boucles extracellulaires (e) (Kohen *et al.*, 1996). Chez l'homme, il est constitué de 440 acides aminés et est codé par le gène *htr6* situé sur le chromosome 1 (Monsma *et al.*, 1993; Ruat *et al.*, 1993), tandis que chez le rat et la souris, il compte respectivement 438 et 440 acides aminés et son gène est situé le chromosome 5 pour le rat et sur le chromosome 4 pour la souris (**Figure 11**) (Woolley *et al.*, 2004).



**Figure 11** : Représentation schématique de la séquence d'acides aminés du récepteur 5-HT<sub>6</sub> de rat. Les acides aminés en noir correspondent à la séquence Leu<sup>398</sup>-Val<sup>415</sup> permettant la détection du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par technique d'IHC. D'après Ruat *et al.*, 1993.

Au niveau de sa structure, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de rat présente des homologies de séquence avec d'autres récepteurs sérotoninergiques couplés à la protéine Gs, notamment la présence d'un résidu aspartate en position 106 (Asp<sup>106</sup>) indispensable (avec d'autres résidus, cf ci-dessous) à la liaison de la 5-HT sur le récepteur (Ruat *et al.*, 1993) ainsi qu'une boucle

intracellulaire i3 courte, et un domaine C-terminal (ter) de grande taille. Au niveau N-ter, un résidu asparagine en position 9 (Asp<sup>9</sup>) est impliqué dans la glycosylation du récepteur, et deux résidus cystéines en positions 99 et 180 (Cys<sup>99</sup> et Cys<sup>180</sup>) sont vraisemblablement impliqués dans la formation d'un pont disulfure entre les boucles extracellulaires e2 et e3 (Ruat *et al.*, 1993).

Le site de liaison de la 5-HT sur le récepteur 5-HT<sub>6</sub> se situe au niveau d'une poche formée par les domaines TM III, V et VI. Une étude réalisée par mutagenèse dirigée sur le récepteur a permis d'identifier des résidus cruciaux pour la liaison du ligand. Ainsi la mutation du résidu Asp<sup>106</sup> réduit drastiquement (de 3600 fois) la stimulation de l'adénylate cyclase induite par la fixation de 5-HT sur le récepteur ; la mutation du résidu Trp<sup>102</sup> réduit l'affinité de ligands pour le récepteur, tandis que la double mutation Ala<sup>287</sup> et Asn<sup>288</sup> augmente leur efficacité et leur affinité. Il semblerait donc que ces quatre acides aminés soient particulièrement importants pour la liaison de la 5-HT sur le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Boess *et al.*, 1998). Ces différents acides aminés sont d'ailleurs conservés chez l'homme. Ainsi, une étude de modélisation graphique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> humain a permis de confirmer le rôle des domaines TM III, V et VI dans la fixation de la 5-HT sur le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (**Figure 12**) (Pullagurla *et al.*, 2004).



**Figure 12** : Représentation graphique 3D du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de la liaison de la 5-HT. D'après Pullagurla *et al.*, 2004.

Des différences inter-espèces ont été observées dans les profils pharmacologiques des ligands 5-HT<sub>6</sub>, notamment entre le rat et la souris (Hirst *et al.*, 2003). En effet, une série d'antagonistes a montré des affinités différentes entre les récepteurs de rat et de souris pouvant être expliquées par des changements dans quatre acides aminés critiques appartenant à la poche de liaison du récepteur (un sur la boucle e2, un sur le domaine TM V, et deux sur le domaine TM VI). Ces différences, ainsi que la plus faible densité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le SNC de souris (notion sur laquelle nous reviendrons dans la partie suivante), doivent être prises en compte lors de l'analyse des résultats obtenus à partir de modèles murins.

Chez l'homme, un polymorphisme a été mis en évidence sur le gène *htr6* (C<sup>267</sup>T) donnant lieu à la variation d'une seule paire de bases du génome (SNP, *single nucleotide polymorphism*) entraînant la modification synonyme d'un acide aminé. Bien que de nombreuses études aient tenté de faire le lien entre ce polymorphisme et la susceptibilité à développer des pathologies neurodégénératives ou psychiatriques comme la maladie d'Alzheimer (Tsai *et al.*, 1999; Thome *et al.*, 2001), la maladie de Parkinson (Messina *et al.*, 2002) ou la schizophrénie (Tsai *et al.*, 1999; Kishi *et al.*, 2012) et les troubles de l'humeur (Fukuo *et al.*, 2010), aucun consensus n'a pu être dégagé de par l'hétérogénéité et le caractère population-dépendant des résultats. Aucun lien clair n'a donc été établi entre ce polymorphisme et la survenue de maladies neurodégénératives ou psychiatriques (Woolley *et al.*, 2004).

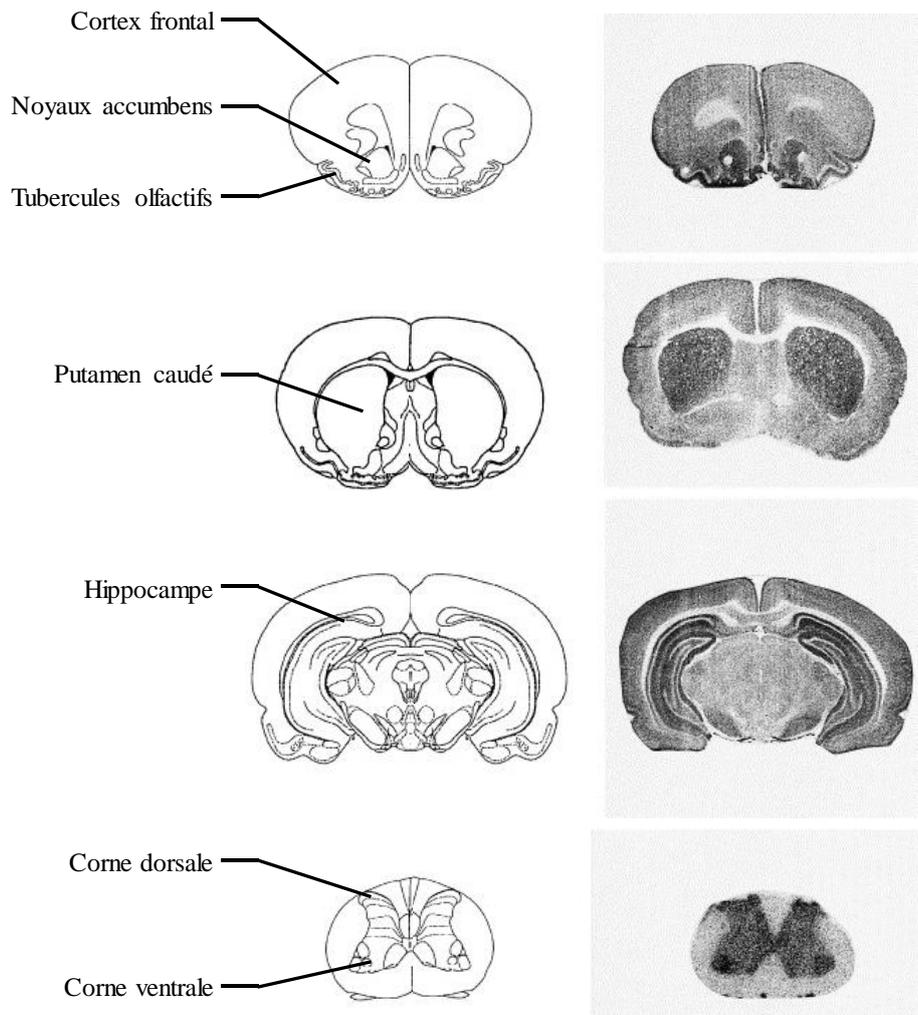
## **2. Localisation**

Différents travaux ont été menés pour localiser le récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez le rat, la souris et l'homme. Il se trouve principalement dans le SNC, notamment dans le striatum, l'amygdale, le noyau accumbens (NAc), l'hippocampe, le cortex et le tubercule olfactif, avec une localisation principalement post-synaptique (Hannon and Hoyer, 2008).

### **2.1 Localisation supraspinale**

A l'aide de la technique d'hybridation *in situ*, l'étude de la répartition de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez le rat a révélé une expression majoritaire dans le striatum, le NAc et, de façon moins importante, dans le cortex et l'hippocampe (Ward *et al.*, 1995). L'utilisation d'un ligand radiomarqué (le [<sup>125</sup>I]SB258585) a également permis d'observer un niveau

d'expression important du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les noyaux caudé-putamen, le NAc et, dans une moindre mesure, le cortex et l'hippocampe chez le rat (East *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002). La technique d'immunohistochimie utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la séquence Leu<sup>398</sup>-Val<sup>415</sup> du domaine C-ter du récepteur (**Figure 11**) a permis de confirmer sa présence dans le cortex, le NAc, le noyau caudé-putamen, l'hippocampe et les tubercules olfactifs (**Figure 13**) (Gérard *et al.*, 1997).



**Figure 13** : Immuno-radiogrammes de coupes coronales de cerveau et de moelle épinière de rat exposées à des anticorps dirigés contre la séquence Leu<sup>398</sup>-Val<sup>415</sup> du domaine C-ter du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. D'après Ruat *et al.*, 1993.

A l'aide des outils précédents, la localisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez l'homme a été établie avec une expression importante dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et également dans les noyaux caudé-putamen et le NAc. De plus, un co-marquage par technique d'immunohistochimie sur le striatum a révélé une co-localisation du récepteur avec la parvalbumine (PV) et une absence de co-localisation avec la protéine acide fibrillaire gliale

(GFAP) indiquant ainsi la présence du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les neurones et son absence dans les astrocytes. Cependant, dans le cortex préfrontal, le récepteur est co-localisé avec NeuN (antigène neuronal nucléaire) et la GFAP révélant ici sa présence à la fois neuronale et astrocytaire. Enfin, dans l'hippocampe, il est présent de manière prédominante dans les neurones. Il semblerait donc que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> soit exprimé dans différents types cellulaires en fonction de la zone du cerveau étudiée (Marazziti *et al.*, 2012, 2013).

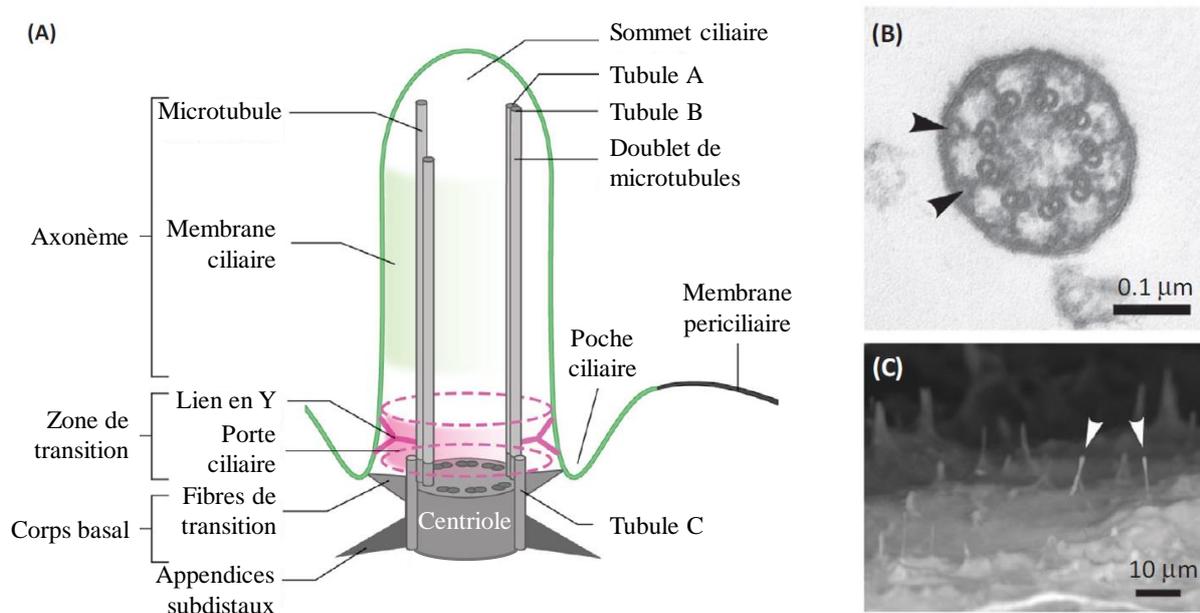
Chez la souris, la densité de récepteurs 5-HT<sub>6</sub> quantifiée par l'intensité de marquage au [<sup>125</sup>I]SB258585, et le niveau d'ARNm codant pour le récepteur dans le cerveau, est moins importante que chez l'homme et le rat (Hirst *et al.*, 2003). La distribution du récepteur chez la souris est se situe principalement aux niveaux du noyau caudé-putamen, du Nac et des tubercules olfactifs et, de façon plus modérée dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale, présentant ainsi une certaine cohérence avec ce qui a précédemment été mis en évidence chez le rat et l'homme. La génération de souris knock-in exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à une étiquette GFP (*green fluorescent protein*) (souris KI-5-HT<sub>6</sub>-GFP) a permis de confirmer la présence du récepteur dans le striatum et l'aire CA3 de l'hippocampe (Deraredj Nadim *et al.*, 2016). Le niveau d'expression général du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est moins important chez la souris que chez l'homme et le rat (Svenningsson *et al.*, 2007).

Ainsi, l'ensemble de ces approches met en évidence une expression préférentielle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les régions fortement impliquées dans les processus cognitifs (striatum, cortex préfrontal, hippocampe), dans le contrôle sérotoninergique de la fonction motrice (régions extrapyramidales) et de l'humeur (système limbique).

Comme vu précédemment chez l'homme, ce récepteur est exprimé dans les neurones du striatum et de l'hippocampe et dans les neurones et les astrocytes du cortex préfrontal mais, sur quel(s) type(s) de neurones?

Chez le rat, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> semble être exprimé dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du cortex (Hamon *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2004). L'étude de sa distribution par double hybridation *in situ* n'a pas révélé d'ARNm le codant dans les neurones sérotoninergiques, dopaminergiques ou cholinergiques (Gérard *et al.*, 1996). Sa présence est en revanche confirmée dans les neurones GABAergiques (du striatum) et glutamatergiques (de l'hippocampe et du cortex), suggérant un rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la régulation de la signalisation inhibitrice et excitatrice dans le cerveau (Helboe *et al.*, 2015).

Concernant sa localisation sub-cellulaire, l'analyse en microscopie électronique révèle la présence du récepteur 5-HT<sub>6</sub> préférentiellement au niveau dendritique, au niveau du cil primaire et faiblement sur les corps cellulaires (Hamon *et al.*, 1999). Les cils primaires sont des organites à base de microtubules formés à partir d'un ancrage centriolaire, appelé corps basal, et s'étendant depuis la surface apicale de la plupart des cellules de mammifères y compris les neurones, à un moment de leur cycle vie et impliquée dans la communication extra-synaptique. Une caractéristique intéressante du cil est sa capacité à modifier sa morphologie en réponse aux conditions environnementales. Son élongation pour améliorer sa capacité de détection du signal ou, inversement, sa résorption pour diminuer sa réactivité aux signaux, révélant un mécanisme intuitif d'adaptation aux signaux sensoriels (Malicki and Johnson, 2017). Alors que la membrane ciliaire est contiguë à la membrane plasmique, elle possède un ensemble unique de protéines permettant de répondre à ces signaux. Le cytoplasme des cils est isolé du reste de la cellule par une zone de transition à la base, qui agit comme un pore sélectif (**Figure 14**) (Reiter *et al.*, 2012; Malicki and Johnson, 2017).



**Figure 14 :** (A) Représentation schématique de l'ultrastructure du cil primaire. Pour des raisons de clarté, l'axonème ciliaire est représenté par deux doublets de microtubules (les tubules A et B en gris) mais il en possède 9, qui, au niveau du centriole forment des triplets (constituées de tubules A, B et C) indiqués par des ovales gris foncé. La zone de transition est caractérisée par des liens en forme de Y (rose) qui interviennent dans les interactions avec la membrane ciliaire. Les fibres de transition (gris clair) s'étendent à partir des appendices distaux du centriole. La barrière de perméabilité appelée « porte ciliaire » est indiquée en rose. (B) Micrographie électronique à transmission d'un cil, montrant neuf doublets de microtubules et des liens en Y (flèches). (C) Micrographie électronique à balayage de cils primaires embryonnaires (flèches) sur des cellules épendymaires du ventricule latéral de souris. D'après Malicki and Johnson, 2017.

La membrane du cil primaire concentre plusieurs RCPG et canaux ioniques modulant différentes voies de signalisation (Goetz and Anderson, 2010). Une caractéristique commune des RCPG occupant la membrane du cil primaire est la présence d'une séquence consensus de 5 acides aminés dans la 3<sup>ème</sup> boucle i3 (appelée « CTS ») que seul, parmi tous les récepteurs de la sérotonine, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> possède. La délétion de cette séquence CTS, ou l'échange de la boucle i3 contre une boucle i3 provenant d'un RCPG non localisé dans le cil primaire, réduit de façon importante sans l'abolir, le trafic du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les cils primaires (Brodsky *et al.*, 2017).

Le rôle fonctionnel du récepteur 5-HT<sub>6</sub> au sein des cils primaires a pu être abordé grâce à des outils pharmacologiques ou moléculaires. Ainsi, les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> réduisent de manière concentration-dépendante et temps-dépendante la longueur des cils primaires des neurones sans modifier la taille des dendrites alors que, dans la même étude, les ligands agonistes 5-HT<sub>6</sub> n'ont pas d'effet (Brodsky *et al.*, 2017). Dans la poursuite de ces travaux, la même équipe (Lesiak *et al.*, 2018) a récemment montré que le recouvrement de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à des niveaux physiologiques chez des souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est suffisant à augmenter la longueur des cils primaires et les ramifications dendritiques des neurones pour lesquels le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est localisé exclusivement dans le cil primaire. Ce serait l'activité constitutive (notion sur laquelle nous reviendrons) du récepteur 5-HT<sub>6</sub> qui soutendrait ces effets (Lesiak *et al.*, 2018). Par contre la surexpression intense du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est associée à une localisation extra-ciliaire et à des malformations ciliaires (Lesiak *et al.*, 2018). L'allongement du cil primaire des neurones de l'hippocampe et le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans cette élévation ont été rapportés dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer (MA), la souris APP/PS1 (*Amyloid Precursor Protein/PreSenilin 1*) (Hu *et al.*, 2017) confirmant ainsi les données de la littérature sur l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> du cil primaire dans cette pathologie neurodégénérative. Il semblerait également que les cils primaires jouent un rôle dans la réponse inflammatoire des neurones de l'hippocampe. Ainsi, la neuro-inflammation induite par l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) de lipopolysaccharides entraîne une diminution de la longueur du cil primaire des neurones pyramidaux de l'hippocampe et, une stratégie siARN ciblant Kif2a (*Kinesin-2 family protein A*), protéine nécessaire à la structuration et à la fonction du cil primaire, diminue l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (Baek *et al.*, 2017). De par son rôle dans l'inflammation neuronale, l'étude du cil primaire pourrait être envisagée dans la douleur neuropathique où il existe une composante neuro-inflammatoire (Sommer, Leinders, *et al.*, 2018).

## 2.2 Localisation spinale

La localisation spinale du récepteur 5-HT<sub>6</sub> n'est pas aussi renseignée que sa localisation supra-spinale. Sa présence dans la moelle épinière de rat a pu être mise en évidence par technique de RT-PCR ciblant les ARNm codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Gérard *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2016) et par approche immunohistochimique (Gérard *et al.*, 1997). Cette dernière a révélé la présence du récepteur au niveau de toutes les couches de la substance grise spinale avec un marquage plus dense dans les couches superficielles de la corne dorsale (couches I et II) et de la lamina IX (**Figure 13**). Plus récemment, à l'aide de souris KI-5-HT<sub>6</sub>-GFP le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été détecté sur des interneurons excitateurs situés dans une zone s'étendant de la couche Iii à IV externe, spécialisée dans le traitement et l'intégration de l'information mécanique apportée par les mécanorécepteurs de bas seuils (« *Low-Threshold Mechanoreceptor-Recipient Zone* » LTMR-RZ) (Abraira *et al.*, 2017).

Sa localisation spinale chez le rat a pu être confirmée par technique de Western-blot (Pineda-Farias *et al.*, 2017), là où les techniques d'hybridation *in situ* (Ward *et al.*, 1995) et de RT-PCR (Hirst *et al.*, 2003) ont failli.

Il n'y a, à ce jour, aucune donnée disponible quant à la distribution sub-cellulaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la moelle épinière.

## 2.3 Localisation périphérique

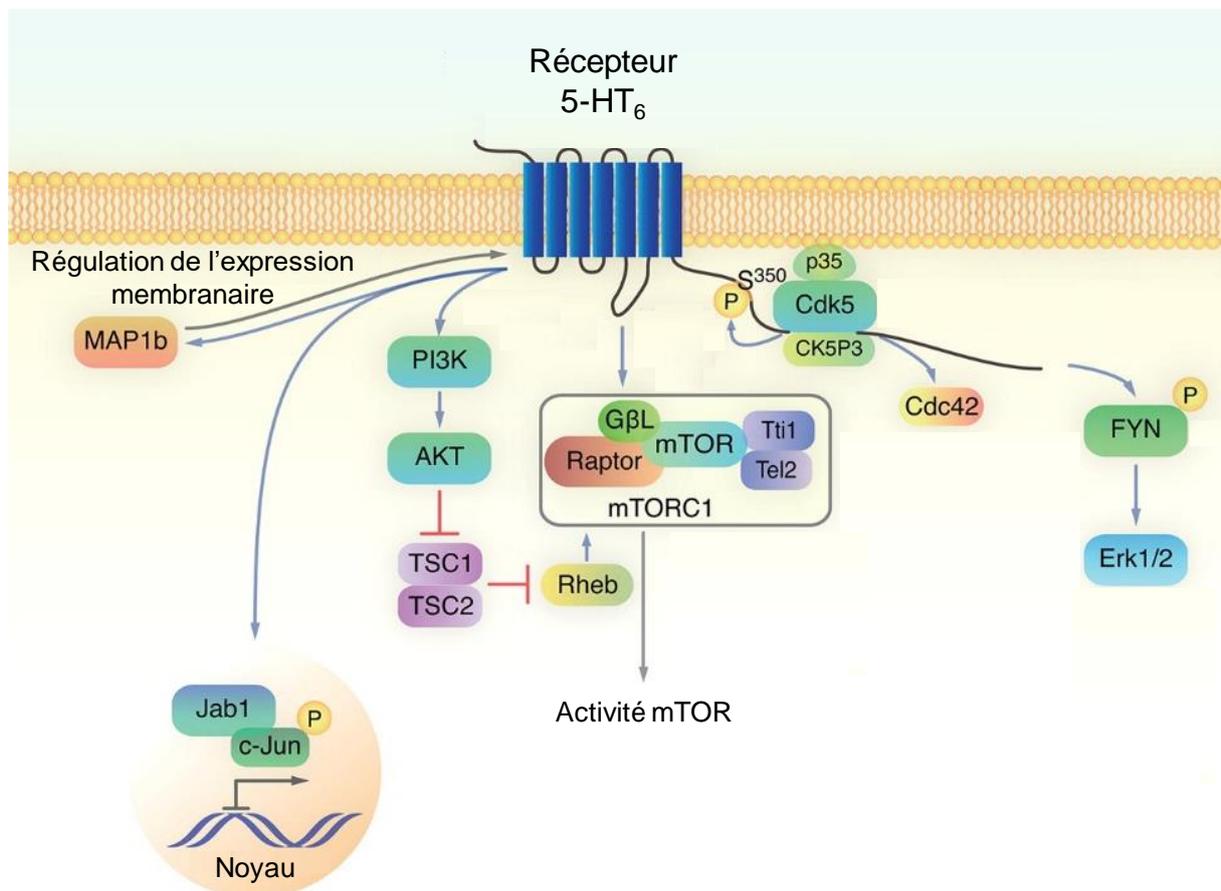
A l'instar de la localisation spinale du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, sa localisation périphérique fait débat. Plusieurs études ont mis en évidence par technique de RT-PCR la présence de ce récepteur dans les fibres afférents primaires notamment au niveau des GRD de rat (Gérard *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2016) tandis que d'autres, ne l'ont pas détecté à la fois par RT-PCR (Pierce *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2001; Hirst *et al.*, 2003) et par hybridation *in situ* (Nicholson *et al.*, 2003). L'analyse de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans des cultures de neurones sensitifs de rat n'a également pas permis de le détecter, révélant à nouveau son absence dans les GRD (Chen *et al.*, 1998).

Chez l'humain, la présence dans les GRD de ce récepteur n'a pas été évaluée mais l'absence de détection des ARNm codant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a permis d'exclure sa localisation dans les tissus périphériques suivants: cœur, foie, poumon, muscle squelettique, rein, pancréas, rate, intestin grêle, placenta, testicule, estomac, prostate et utérus (Hirst *et al.*, 2003).

La discordance des données concernant la localisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la moelle spinale et les GRD a motivé son étude en western-blot et immunohistochimie dans la moelle spinale lombaire de rats et de souris KI-5-HT<sub>6</sub>-GFP.

### 3. Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT<sub>6</sub>

Outre son couplage « classique » avec la protéine G<sub>S</sub> et la voie de signalisation canonique qui en découle, différentes études ont mis en évidence le couplage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec d'autres voies de signalisation (**Figure 15**). Parmi celles-ci nous présenterons en détail la voie de l'adénylate cyclase, celle de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin* ou *mechanistic Target Of Rapamycin*), et de Cdk5 (*Cyclin dependent kinase 5*) dont la mise en jeu dans le contexte de neuropathie douloureuse a fait l'objet de ce travail de thèse.



**Figure 15** : Représentation des voies de signalisation couplées au récepteur 5-HT<sub>6</sub>. D'après Dayer *et al.*, 2015.

### 3.1 La voie de l'adénylate cyclase

Couplé à la protéine G<sub>S</sub>, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> entraîne la formation d'AMPc lorsqu'il est activé par la 5-HT endogène ou par des ligands agonistes ou encore, lorsqu'il est animé d'une activité constitutive. Ces observations ont été réalisées à l'aide de systèmes cellulaires recombinants COS-7, JEG-3 et HEK-293 (Ruat *et al.*, 1993; Kohen *et al.*, 2001; Purohit *et al.*, 2003; Codony *et al.*, 2010), ou de systèmes natifs, telles que des cultures de neurones primaires striataux (Schoeffter and Waeber, 1994; Sebben *et al.*, 1994).

L'activation de la protéine G<sub>S</sub> par le récepteur entraîne la fixation de GTP à la place du GDP sur la sous-unité  $\alpha$  et induit la production d'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase. Une étude de Baker *et al.*, (1998) a permis de mettre en évidence, par la co-expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec différentes isoformes de l'adénylate cyclase (AC1, AC5 et AC8) dans des cultures de cellules HEK-293, que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> stimule le sous-type 5 de l'adénylate cyclase.

Classiquement, il existe quatre régions potentielles sur les RCPG pouvant interagir avec la protéine G : les boucles i1, i2 et i3 et le domaine C-ter du récepteur (Kang *et al.*, 2005). Concernant le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, une forte interaction avec la protéine G<sub>S</sub> par l'intermédiaire de la boucle i3 du récepteur a pu être mesurée tandis qu'aucune association n'était détectable avec la boucle i2 et le domaine C-ter. Ces résultats ont été obtenus par génération de plusieurs mutations, notamment celle du résidu 265 (K<sup>265</sup>A), qui inhibe complètement la production d'AMPc (Kang *et al.*, 2005). En bloquant l'interaction entre la boucle i3 du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la protéine G<sub>S</sub>, à l'aide d'un composé chimique (le KKJ00016), la production d'AMPc induite par la 5-HT a été abolie, confirmant le rôle majeur de la boucle i3 dans le couplage du récepteur à la protéine G<sub>S</sub> (Choi *et al.*, 2007).

L'importance de cette boucle i3 dans la signalisation des RCPG a également été observée pour les récepteurs adrénergiques  $\alpha_{1B}$  (Kjelsberg *et al.*, 1992) et sérotoninergiques 5-HT<sub>2A/2C/7</sub> (Herrick-Davis *et al.*, 1997; Obosi *et al.*, 1997; Egan *et al.*, 1998).

Une triple mutation des résidus 69, 70 et 72 (F<sup>69</sup>L/T<sup>70</sup>I/D<sup>72</sup>A) du domaine TM II, inhibe la production d'AMPc suite à la stimulation par la 5-HT donc empêche l'activation de la protéine G<sub>S</sub> (Zhang *et al.*, 2006) suggérant leur implication dans les changements conformationnels du récepteur, responsables de l'activation de la protéine G<sub>S</sub>.

Différentes approches protéomiques combinant la purification par affinité des protéines interagissant avec les récepteurs et leur identification par spectrométrie de masse, a permis d'identifier au moins 28 protéines partenaires du récepteur dont mTOR et Cdk5 (**Figure 15**) (Meffre *et al.*, 2012; Duhr *et al.*, 2014) constituant les maillons d'autres voies de signalisation sous la dépendance du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

### 3.2 La voie mTOR

#### 3.2.1. *Mise en évidence du couplage récepteur 5-HT<sub>6</sub>-mTOR*

Ces travaux, principalement menés par l'équipe du Dr P. Marin de l'IGF de Montpellier, ont permis de caractériser l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et l'impact fonctionnel des protéines identifiées (Meffre *et al.*, 2012; Marin *et al.*, 2013; Duhr *et al.*, 2014; Jacobshagen *et al.*, 2014).

Les protéines interagissant avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été identifiées en utilisant deux stratégies protéomiques complémentaires (Meffre *et al.*, 2012) :

- des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) utilisant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec un tag HA (hémagglutinine) exprimé dans des cellules HEK-293. La fonctionnalité de ce récepteur chimérique a été vérifiée par la capacité de la 5-HT et d'agonistes 5-HT<sub>6</sub> à stimuler la production d'AMPc ;
- des expériences de « *pull-down* » utilisant une forme recombinante du récepteur 5-HT<sub>6</sub> possédant à son extrémité C-ter une protéine de fusion, la GST (glutathion-S-transférase).

L'analyse des protéines purifiées par ces deux méthodes, en spectrométrie de masse, a permis de définir des partenaires potentiels, notamment plusieurs protéines de la voie mTOR comme **mTOR** elle-même et Raptor qui, avec GβL (aussi connue sous le nom mLST8), constituent le complexe mTOR1 (mTORC1) sensible à la rapamycine (Swiech *et al.*, 2008; Wang and Proud, 2011; Laplante and Sabatini, 2012). En revanche, aucune protéine spécifique du complexe mTOR2 (mTORC2) n'a été identifiée, suggérant l'interaction sélective du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec mTORC1. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> recrute également Tti1 et Tel2, protéines indispensables à l'assemblage et à la stabilité du complexe mTORC1 (Kaizuka *et al.*, 2010),

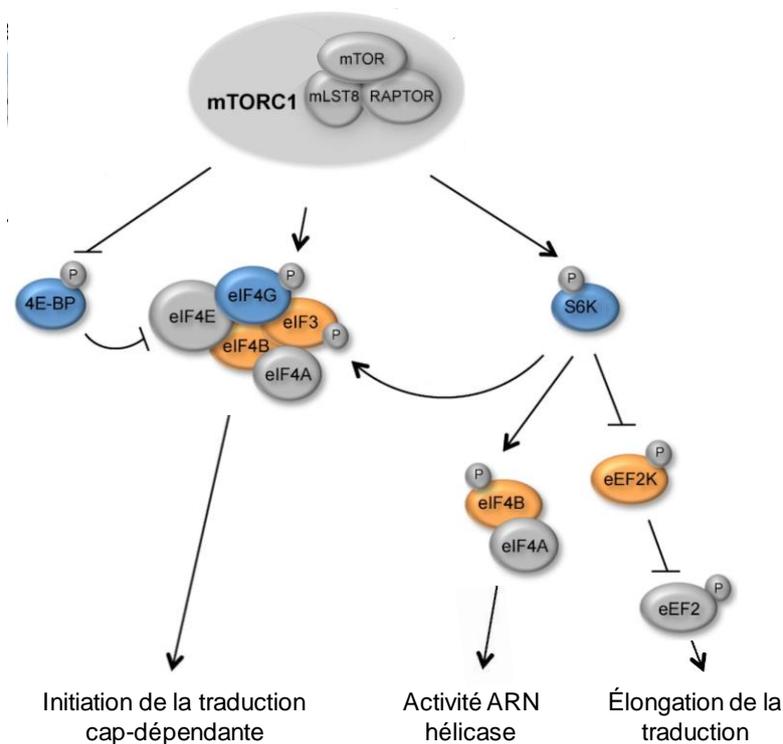
ainsi que les protéines G Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), et PI3K (*Phospho- Inositide-3 Kinase*) qui active directement mTOR (Swiech *et al.*, 2008; Zhou and Huang, 2010). La co-IP spécifique de mTOR et du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a également été mise en évidence dans le cerveau de souris révélant la formation du complexe protéique *in vivo* (Meffre *et al.*, 2012). L'interaction physique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec mTOR se fait avec son extrémité C-ter mais pas exclusivement (Meffre *et al.*, 2012).

L'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> stimule la voie mTOR non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo* ; chez la souris, l'administration systémique d'un agoniste 5-HT<sub>6</sub> se traduit par une augmentation de la phosphorylation du résidu Ser<sup>2448</sup> de mTOR dans le cortex préfrontal, ainsi qu'un de ses substrats p-S6(Ser<sup>240/244</sup>) (Meffre *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que S6 peut être phosphorylé par mTOR sur plusieurs résidus : p-S6(Ser<sup>235/236</sup>) et p-S6(Ser<sup>240/244</sup>) (Klingebiel *et al.*, 2017). L'étude de ces résidus phosphorylés va permettre d'apprécier l'activité fonctionnelle de mTOR. Cependant, seule la phosphorylation p-S6(Ser<sup>240/244</sup>) est spécifique de l'activité mTOR, le site p-S6(Ser<sup>235/236</sup>) étant aussi ciblé par d'autres cascades de signalisation notamment ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), kinases appartenant à la famille des MAP (*mitogen-activated protein kinases*) (Meyuhas, 2015).

L'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par la 5-HT, au-delà d'augmenter la phosphorylation de la voie mTOR, augmente parallèlement celle de Akt (autrement connue sous le nom de protéine kinase B) au niveau du résidu Ser<sup>473</sup>. L'activation de la voie mTOR est dépendante de la voie de signalisation PI3K/Akt. Ainsi, la phosphorylation de mTOR (Ser<sup>2448</sup>), de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) et de Akt (Ser<sup>473</sup>) est fortement réduite dans les cellules prétraitées avec des inhibiteurs de PI3K (wortmannin et LY294002). Une fois Akt activée, cette kinase va phosphoryler la tubérine (TSC2) (Manning *et al.*, 2002) qui, avec l'harmatine (TSC1) constituent le complexe tubéreux (TSC1/2) (Hoogeveen-Westerveld *et al.*, 2012). Ce complexe est une protéine GAP (GTPase-activating proteins) pour Rheb, c'est-à-dire qu'elle stimule l'activité GTPase de Rheb, acteur majeur en amont de mTORC1 (Garami *et al.*, 2003). Lorsque TSC2 est phosphorylée par Akt, l'activité GAP du complexe est inhibée, entraînant alors une augmentation des taux de Rheb-GTP qui, à leur tour, stimuleront mTOR (**Figure 15**) (Garami *et al.*, 2003).

En aval de mTOR, la protéine kinase ribosomique p70S6K et la protéine fixatrice du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E) appelée 4E-BP1 sont les substrats les

mieux caractérisés de mTORC1 dont les rôles vont être de réguler la traduction. La phosphorylation de 4E-BP1 permet de libérer le facteur eIF4E qui va pouvoir se lier à eIF4G et ainsi former, avec eIF4A ayant une activité ARN hélicase, le complexe. Le facteur eIF4E reconnaît la coiffe 5'-cap (7-méthylguanosine 5-triphosphate) et la protéine de liaison poly(A) (PABP) se lie à la queue poly(A) des ARNm de sorte que le complexe eIF4F permette une structure circulaire de l'ARNm. La phosphorylation de p70S6K par mTOR entraîne l'association de eIF3 avec eIF4G (Harris *et al.*, 2006). Ce processus est important pour recruter la sous-unité ribosomique 40S par le complexe ARNm-eIF4F. Par conséquent, mTOR régule la traduction à la fois aux étapes d'initiation et d'élongation (Fonseca *et al.*, 2014) (**Figure 16**). Le contrôle de la traduction médiée par mTOR est bien étudié dans l'aspect du développement neuronal et des maladies neuronales mais son rôle physiologique dans les fonctions neuronales n'est pas encore clairement établi (Takei and Nawa, 2014).



**Figure 16** : Régulation de la traduction par le complexe mTORC1. D'après Fonseca *et al.*, 2014.

### 3.2.2. Rôles physiopathologiques de la voie mTOR

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase qui, comme l'indique son nom, est la cible de la rapamycine, macrolide anti-fongique, synthétisé par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* et isolé initialement par une équipe canadienne dans un échantillon de sol provenant de l'île de Pâques (Vezina *et al.*, 1975). Cette molécule attira rapidement l'attention de par ses propriétés anti-prolifératives et immunosuppressives (inhibition de la prolifération des cellules T) (Dumont *et al.*, 1990) qui lui valent son indication thérapeutique (Sirolimus Rapamune®) dans la prévention du rejet d'organes chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une transplantation rénale (Moes *et al.*, 2015).

La voie mTOR intègre plusieurs signaux intracellulaires et extracellulaires. Les facteurs de croissance (IGF-1, IGF-2) et les acides aminés sont les stimuli extracellulaires les mieux caractérisés qui activent mTOR. Le statut énergétique cellulaire, l'oxygène/hypoxie et les facteurs de stress régulent également son activité. Dans le SNC, les neurotransmetteurs et les hormones viennent également moduler l'activité de mTOR (Hay and Sonenberg, 2004; Takei and Nawa, 2014). De par le rôle crucial de mTOR dans la prolifération et la migration cellulaire elle est considérée comme essentielle pour le développement d'un organisme. En effet, des souris mutantes dont les 6 derniers résidus du domaine C-ter de mTOR ont été délétés, ne sont pas viables en raison de l'altération de la prolifération des cellules embryonnaires (Murakami *et al.*, 2004).

Les paragraphes suivant ne se veulent pas exhaustifs mais donnent un bref aperçu de la diversité des implications physiopathologiques de la voie mTOR dans le SNC.

La voie mTOR joue un rôle essentiel dans le développement neuronal incluant la neurogenèse, la migration neuronale, l'élongation de l'axone, la formation et la maturation des dendrites (Takei and Nawa, 2014). Par stratégie de KO conditionnel, le rôle des complexes mTOR a été analysé dans le cerveau. L'élimination de la fonction de mTORC1 dans le cerveau a été obtenue en croisant des souris floxées pour la protéine Raptor et des souris Nestin-Cre (marqueurs des progéniteurs neuronaux) (Cloetta *et al.*, 2013). Bien que les souris Raptor-KO soient mortes peu de temps après la naissance, elles ont montré une microcéphalie liée à la réduction de la taille et du nombre des cellules.

Avec la même stratégie, la délétion conditionnelle de Rictor dans le cerveau permettant de bloquer la fonction de mTORC2, conduit à une diminution importante de la masse du cerveau associée à une atteinte de la taille et de la morphologie des neurones pyramidaux de l'hippocampe et des cellules de Purkinje du cervelet (Thomanetz *et al.*, 2013).

Les mécanismes précis de la régulation de la taille et de la morphologie des cellules par mTORC1 et mTORC2 ne sont toujours pas clairement identifiés. Par contre, au vu des effets de la voie mTOR sur le développement neuronal, toute dérégulation de la signalisation mTOR est susceptible de s'accompagner de troubles du développement neuronal.

Parmi eux, le plus connu, et directement lié à une altération de mTOR, est la **sclérose tubéreuse**. Les patients atteints présentent des mutations (faux-sens, non-sens, insertion, délétion) du gène codant TSC1 ou TSC2 (Takei and Nawa, 2014). Rappelons que le complexe TSC1/TSC2 est une protéine GAP pour Rheb, il inhibe donc mTORC1. La mutation d'une des protéines de ce complexe entraîne sa perte de fonction et donc l'activation constitutive de mTORC1. C'est ainsi que chez les patients atteints, une hyperphosphorylation de p70S6K, de S6 et de 4E-BP1 a pu être observée par approche immunohistochimique (Prabowo *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014).

La voie mTOR est également impliquée dans le **syndrome de l'X fragile**. Ce syndrome est provoqué par l'augmentation de la répétition du codon CGG situé dans la région 5'-UTR (région 5' non traduite) en amont du gène *FMRI* conduisant à son extinction (Verkerk *et al.*, 1991). Chez ces patients, une augmentation de la phosphorylation mTOR et de ses substrats p70S6K, S6 ainsi que Akt, régulateur de la voie mTOR, est observée dans les lymphocytes et le tissu cérébral (Hoeffler *et al.*, 2012). Cette pathologie est modélisée chez la souris par invalidation génique de *FMRI*. Ainsi chez la souris *Fmr1-KO* l'hyperphosphorylation de S6 est inhibée par l'administration de rapamycine mais le traitement n'a malheureusement pas de conséquences phénotypiques comportementales (Sare *et al.*, 2017).

Une autre pathologie neuro-développementale impliquant la voie mTOR est le **syndrome de Rett**, syndrome causé par mutations du gène *MECP2* (methyl-CpG binding-protein 2) entraînant un gain ou une perte de fonction. La protéine MeCP<sub>2</sub> est le principal membre de la famille des protéines de liaison à l'ADN méthylé et dont le rôle va être d'inhiber la transcription des cibles en aval (Chen *et al.*, 2014). Ainsi, dans des cellules souches

embryonnaires humaines modélisant le syndrome de Rett par mutation de *MeCP2*, une diminution de la transcription, une réduction des taux d'ARN total et une altération de la traduction sont observées. Ces changements semblent être liés à la voie Akt/mTOR car une diminution des niveaux phosphorylation de Akt et de S6 a été mise en évidence dans les cellules mutées (Li *et al.*, 2013). De façon similaire, dans un modèle murin du syndrome de Rett obtenu par invalidation génique de *MECP2*, la phosphorylation de S6 chez les souris *Mecp2*-KO est largement diminuée par rapport au animaux sauvages, et ce, sur ses 4 résidus p-S6(Ser<sup>240/244</sup>) (spécifique de la voie mTOR) et p-S6(Ser<sup>235/236</sup>) (mTOR et ERK). La voie mTOR semble donc être régulée à la baisse chez les souris *Mecp2*-KO (Ricciardi *et al.*, 2011).

Les quelques pathologies neuro-développementales citées ci-dessus ne sont pas les seules dans lesquelles la voie mTOR est impliquée, elles ont néanmoins des caractéristiques communes, notamment des anomalies de la migration, du positionnement et de la morphologie des neurones entraînant différents symptômes incluant déficience intellectuelle, autisme et épilepsie.

Au-delà des fonctions clairement établies de mTOR dans le développement neuronal, il semblerait qu'elle soit également impliquée dans la formation des synapses et la plasticité synaptique. Comme vu précédemment, l'activation de la voie mTOR entraîne de profondes modifications des processus de neurogénèse dont la formation des dendrites. La délétion de *PTEN* (*Phosphatase and TENsin Homolog*), gène codant une protéine phosphatase, dont l'action va s'opposer à la PI3K, va permettre une hausse de la signalisation de la voie mTOR et, *in fine*, une augmentation de l'arborisation dendritique des neurones du cortex (Nikolaeva *et al.*, 2017). De plus, une augmentation de l'activité du complexe mTORC1 via l'invalidation génique de *TSC1* chez la souris (Feliciano *et al.*, 2011), ou la sur-expression corticale de Rheb (Sokolov *et al.*, 2018), entraînent une forte augmentation de cette arborisation.

La plasticité synaptique, illustrée par la potentialisation à long terme (LTP, « *long term potentiation* ») et la dépression à long terme (LTD, « *long term depression* »), est indispensable à la fonction et à la survie des neurones. Ces phénomènes nécessitent l'expression de nouvelles protéines synthétisées à la fois au niveau du corps cellulaire et des dendrites (Licausi and Hartman, 2018). La signalisation glutamatergique médiée par les récepteurs métabotropes mGluR et ionotropes NMDA entraîne une activation de la voie mTOR suggérant son implication dans la plasticité synaptique (Hou, 2004). D'ailleurs, dans un modèle murin de

sclérose tubéreuse (par KO conditionnel Cre-Lox de TSC1), une augmentation de l'activité des synapses (LTP) liée à une dérégulation de la voie mTOR, ont été rapportées (Licausi and Hartman, 2018). De plus, l'épilepsie touchant 80% des patients atteints de sclérose tubéreuse, serait due à une perturbation de la plasticité synaptique induite par une dérégulation de la voie mTOR avec, pour conséquence, une hyper-connectivité des circuits neuronaux (Schubert-Bast *et al.*, 2018).

LTP et LTD sont à la base des processus de l'apprentissage et de la mémorisation et de nombreuses données de la littérature rapportent les effets bénéfiques d'inhibiteurs de mTOR (notamment la rapamycine), dans différents modèles animaux de déficits cognitifs induits ou associés à des maladies neurodégénératives.

Dans un modèle murin de maladie de Parkinson (MP), induit par administration intra-striatale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA), l'administration de rapamycine et de PF-4708671, un inhibiteur de p70S6K, restaure les troubles cognitifs présents chez ces souris tout en réduisant leurs comportements anxieux (Masini *et al.*, 2018).

La neurotoxicité induite par la mélamine (300 mg/kg/j, p.o., durant 4 semaines) chez le rat est associée à des troubles de la mémoire ainsi qu'à une altération de la plasticité synaptique hippocampique, (LTP et LTD évaluée en électrophysiologie *in vivo* sur des neurones pyramidaux). Chez ces rats, l'administration chronique de rapamycine réduit significativement les troubles cognitifs et améliore la plasticité synaptique (Fu *et al.*, 2017).

Dans un modèle d'athérosclérose induite par invalidation génique de *LDLR*, récepteur responsable de la dégradation du LDL (« *low density lipoprotein* », lipoprotéine de basse densité), la souris *LDLR*<sup>-/-</sup>, les troubles cognitifs associés ont été significativement réduits par l'administration chronique de rapamycine (Jahrling *et al.*, 2018).

Dans un modèle de chirurgie traumatique chez la souris tentant de reproduire les dysfonctions cognitives post-opératoires pouvant survenir chez le patient âgé (Sigaut *et al.*, 2015), l'administration de rapamycine a permis de rétablir les performances cognitives (Lu *et al.*, 2016).

Dans un modèle de traumatisme crânien murin réalisé par impact cortical, l'augmentation de l'activité de la voie P13k/Akt/mTOR2 est supprimée et les troubles cognitifs améliorés par l'administration aiguë de rapamycine, mettant à nouveau en évidence le rôle pro-cognitif du blocage de la voie mTOR (Nikolaeva *et al.*, 2016). De même, une augmentation génétique de l'activité de cette voie chez la souris transgénique *Tsc2<sup>+/-</sup>*, amplifie les troubles cognitifs induit par lésion cérébrale (Rozas *et al.*, 2015).

Les altérations cognitives associées à la sclérose tubéreuse ont également été étudiées chez des souris *Tsc2-hGFAP*. L'administration pré et post-natale chronique de rapamycine restaure les altérations morphologiques présentes au niveau du cortex et de l'hippocampe et améliore l'apprentissage et la mémoire de ces souris *Tsc2-hGFAP* (Way *et al.*, 2012). Chez le rats *Tsc2<sup>+/-</sup>*, un déficit de mémoire sociale est présent. L'administration chronique d'everolimus, restaure entièrement les performances cognitives sociales chez ces animaux (Schneider *et al.*, 2017).

Plusieurs études ont également étudié le rôle de mTOR dans les troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer (MA). La MA est une pathologie neurodégénérative irréversible qui touche en premier la région hippocampique puis qui s'étend au cortex temporal externe, au gyrus cingulaire postérieur, au cortex temporo-pariétal ; les premiers symptômes de la maladie sont les troubles de la mémoire épisodique portant sur les souvenirs les plus récents puis évoluent progressivement vers un déclin cognitif (Claeyssen *et al.*, 2015). La rapamycine diminue les phénomènes physiopathologiques responsables de la maladie d'Alzheimer, notamment l'accumulation du peptide A $\beta$  et de la protéine tau, et restaure la fonction cognitive (Caccamo *et al.*, 2010; Majumder *et al.*, 2012).

L'allèle de l'apolipoprotéine E *ApoE4* est le principal gène de prédisposition à la MA. Il code pour une classe d'apolipoprotéine indispensable au catabolisme des lipides. Chez les porteurs de cet allèle, des troubles vasculaires et métaboliques cérébraux peuvent survenir avant l'apparition des premiers symptômes de la MA. Chez des souris transgéniques exprimant cet allèle sous la dépendance de la GFAP, une altération de la barrière hémato-encéphalique, du débit sanguin cérébral et du métabolisme du glucose ont observés en neuro-imagerie. L'administration chronique de rapamycine corrige ces altérations et améliore les troubles cognitifs associés (Lin *et al.*, 2017).

Chez des souris TG2576 modélisant la MA par mutation du gène *APP* conduisant à une accumulation anormale du peptide amyloïde A $\beta$ , la suppression d'une copie du gène *mTOR* par

technique de croisement (mTOR<sup>fl/fl</sup> x Tg2576<sup>+/-</sup>, Cre<sup>+/-</sup>) s'accompagne d'une amélioration des performances cognitives, ainsi que d'une diminution des taux de peptide A $\beta$ , de protéine tau et de cytokines, mettant ainsi en évidence le rôle de la voie mTOR dans les troubles cognitifs liés à la MA ainsi que dans ses mécanismes étiopathogéniques (Caccamo *et al.*, 2018).

### 3.3 La voie Cdk5

Dans la même démarche d'identification de l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, l'équipe de P. Marin a mis en évidence l'association du récepteur avec la *cyclin-dependent kinase 5*, (Cdk5). Cette association, confirmée *in vitro* à l'aide d'une lignée cellulaire de neuroblastome (NG108-15) exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à un tag HA (Duhr *et al.*, 2014), se produit en l'absence d'agoniste et n'est pas renforcée par la stimulation du récepteur par son agoniste, mettant en évidence l'aspect dynamique de l'interaction 5-HT<sub>6</sub>-Cdk5, dépendante de l'état conformationnel du récepteur (Dayer *et al.*, 2015). Grâce à la technique de transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET), il a été montré que le traitement des cellules avec le SB258585, antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, inhibait fortement l'interaction de Cdk5 avec le récepteur.

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> active Cdk5 indépendamment de la présence d'agoniste, à la fois dans une lignée cellulaire de neuroblastome et dans des neurones embryonnaires primaires exprimant le récepteur natif (Duhr *et al.*, 2014). Pour que le récepteur active la signalisation de Cdk5, sa phosphorylation au niveau du résidu Ser<sup>350</sup> par la Cdk5 est nécessaire. Le traitement par la roscovitine, un inhibiteur (non sélectif) de Cdk5, réduit fortement cette phosphorylation. En accord avec sa capacité à perturber l'interaction 5-HT<sub>6</sub>-Cdk5, le SB258585 réduit également la phosphorylation du résidu Ser<sup>350</sup>.

Ces observations suggèrent une modulation réciproque de l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et Cdk5 médiée par l'association des deux protéines partenaires et révèlent un nouveau mécanisme sous-tendant l'activation agoniste-indépendante du récepteur, qui dépend alors de la phosphorylation du récepteur par une protéine kinase associée (Duhr *et al.*, 2014; Jacobshagen *et al.*, 2014; Seo and Tsai, 2014). La notion d'activité ligand-indépendante du récepteur est développée dans le chapitre suivant.

Cdk5 est une sérine/thréonine kinase activée par les protéines p35 et son isoforme p39 ou leurs fragments protéolytiques p25 et p29 (Shah and Lahiri, 2014). Malgré sa distribution ubiquitaire, son activité est principalement détectée dans le système nerveux (Tsai *et al.*, 1993). Concernant ses rôles physiopathologiques, elle est surtout connue pour son implication dans les processus et les fonctions post-mitotiques des neurones du système nerveux notamment la transmission et la plasticité synaptique et la migration neuronale via la phosphorylation des protéines nécessaires à l'organisation du cytosquelette, l'endocytose et l'apoptose (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008; Lalioti *et al.*, 2010). Ces 2 protéines, p35 et p39, en plus de contrôler l'activité de Cdk5, régulent également sa localisation subcellulaire : nucléaire, cytoplasmique ou membranaire (Asada *et al.*, 2008, 2012; Hagmann *et al.*, 2015).

### 3.4 Autres voies de signalisation associées au récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Fyn, Jab)

En plus des différentes protéines vues ci-dessus, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> interagit avec Fyn, une protéine membre de la famille Src à activité tyrosine kinase (**Figure 15**) (Yun *et al.*, 2007). L'association du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et Fyn a été confirmée par co-IP (GST *pull-down*) et co-localisation par immunohistochimie *in vitro* à l'aide de deux lignées cellulaires et *in vivo* dans le cerveau de rat adulte. Cette interaction a lieu grâce au domaine C-ter du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et au domaine SH3 de Fyn, ce dernier étant impliqué dans les interactions de type protéine-protéine (avec une séquence consensus riche en proline de type PXXP) (Resh, 1998).

La surexpression de Fyn dans un système d'expression hétérologue, augmente l'adressage membranaire et l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, alors qu'une activation du récepteur entraîne l'autophosphorylation de Fyn au niveau du résidu Tyr<sup>420</sup>, augmentant ainsi son activité kinase. Cette activation de Fyn dépendante du récepteur 5-HT<sub>6</sub> stimule l'activité de la voie ERK1/2 (Yun *et al.*, 2007; Riccioni *et al.*, 2011). Cependant, Fyn n'est pas le seul acteur de la signalisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à activer la voie ERK1/2. Le récepteur interagit avec la protéine MAP1b (*microtubule associated protein 1b*) (**Figure 15**) via son domaine C-ter. Cette dernière joue un rôle crucial dans le trafic du récepteur notamment en augmentant son expression membranaire et diminuant son internalisation. Cette interaction 5-HT<sub>6</sub>-MAP1b augmente la production d'AMPC et l'activation de la voie ERK1/2 (Kim *et al.*, 2014). Par les mêmes techniques, Yun *et al.*, (2010) ont mis en évidence le couplage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec une autre protéine, Jab-1 (*jun binding domain protein-1*) (**Figure 15**) notamment grâce à la boucle i3 ainsi que le domaine C-ter du récepteur. Il existe une action réciproque entre ces

protéines. L'expression de Jab-1 régule non seulement l'activité du récepteur mais également son adressage à la membrane, alors que l'activation du récepteur induit la translocation de Jab-1 dans le noyau, son association avec le facteur de transcription c-Jun et une augmentation de la phosphorylation de ce dernier. La voie 5-HT<sub>6</sub>-Jab-1 permettrait donc de réguler l'activité transcriptionnelle de c-Jun.

Dans le modèle SNL, une augmentation de la phosphorylation de Fyn sur son résidu Tyr<sup>420</sup> est retrouvée au niveau de la moelle spinale dorsale et l'injection i.t. de la protéine Fyn entraîne une hypersensibilité tactile similaire à celle des rats SNL (Song Li *et al.*, 2017). De plus, l'expression d'un mutant de Fyn lui permettant d'être constitutivement active [Fyn(Y<sup>258</sup>F)] dans la moelle épinière de souris saine, entraîne une hypersensibilité thermique et tactile persistante (Y. N. Liu *et al.*, 2014).

L'étude du couplage 5-HT<sub>6</sub>-Fyn dans la douleur neuropathique pourrait donc être une piste de recherche intéressante.

#### **4. Rôles physiologiques et pathologiques du récepteur 5-HT<sub>6</sub>**

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> module la libération de plusieurs neurotransmetteurs incluant l'acétylcholine (ACh), le glutamate (Glu), la DA, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), et la NA (Dawson, 2011). Il est impliqué (comme mTOR) dans diverses fonctions cérébrales supérieures telles que la mémoire et la cognition (Meneses, 2014) et est mis en cause dans certaines pathologies telles que l'anxiété, la dépression (Wesołowska, 2010), l'addiction, les troubles cognitifs (Lalut *et al.*, 2017), l'obésité (Heal *et al.*, 2011) et la douleur.

## 4.1 Fonctions physiologiques

### 4.1.1. *Modulation de la neurotransmission*

#### a. Neurotransmission cholinergique

Les premières données caractérisant l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la modulation cholinergique sont issues d'observations comportementales. L'administration orale d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub>, le Ro 04-6790, chez le rat, entraîne un syndrome comportemental consistant en l'étirement, le bâillement et la mastication de l'animal (Sleight *et al.*, 1998; Bentley *et al.*, 1999). Ce comportement est atténué par un pré-traitement avec des antagonistes muscariniques non-sélectifs, la scopolamine et l'atropine, suggérant une augmentation de la transmission cholinergique à l'origine des effets de l'antagoniste. Par technique de microdialyse *in vivo* une augmentation importante de la concentration extracellulaire d'Ach au niveau du CPF suite à l'administration d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> est observée (Riemer *et al.*, 2003). Les études menées avec d'autres antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (le SB271046, le SB399885 et le SB742457) corroborent les résultats précédents : l'administration systémique (p.o. ou s.c.) des antagonistes entraîne une augmentation significative de la concentration extracellulaire d'Ach dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian de rat (Chuang *et al.*, 2006; Hirst *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007) suggérant un rôle inhibiteur du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur la transmission cholinergique.

La libération d'Ach au niveau du cortex préfrontal induite par les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> est associée à une amélioration des performances cognitives (Riemer *et al.*, 2003) dans des paradigmes expérimentaux dans lesquels la neurotransmission cholinergique est altérée. Nous aborderons plus en détails par la suite le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la régulation des fonctions cognitives.

Comme vu précédemment, le récepteur n'est pas localisé directement sur les neurones cholinergiques mais sur les neurones GABAergiques et glutamatergiques (Gérard *et al.*, 1996; Woolley *et al.*, 2004; Helboe *et al.*, 2015) et module de façon tonique ces systèmes. Ainsi son blocage réduit la libération de GABA et par conséquent désinhibe la neurotransmission cholinergique.

b. Neurotransmission GABAergique

La localisation des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sur les neurones GABAergiques et leur co-localisation avec la glutamate décarboxylase (GAD, enzyme de synthèse du GABA) ont été démontrées (Gérard *et al.*, 1997; Woolley *et al.*, 2004). A l'aide de deux agonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (le WAY181187 et le WAY208466), Schechter *et al.*, (2008) a mis en évidence qu'une activation du récepteur induit une augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le cortex frontal, le striatum, l'hippocampe et l'amygdale de rat. Les mêmes effets ont été obtenus après une administration chronique (14 jours) suggérant l'absence de désensibilisation du récepteur. L'enregistrement électrophysiologique sur tranches d'hippocampe de rat a montré que l'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> augmente les courants inhibiteurs post-synaptiques et diminue la LTP (West *et al.*, 2009).

c. Neurotransmission glutamatergique

Par technique de microdialyse, l'administration systémique d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (le SB271046, le SB742457 et le Lu AE58054) a révélé une augmentation des concentrations extracellulaires de Glu dans le cortex frontal (Dawson *et al.*, 2000; Chuang *et al.*, 2006; Mork *et al.*, 2017) et l'hippocampe (Dawson *et al.*, 2001) suggérant l'existence d'une inhibition tonique, exercée par le récepteur, sur le système glutamatergique. Il serait aussi probable que cette augmentation de Glu induite par les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> soit lié au couplage du récepteur avec la protéine G inhibitrice G<sub>ai</sub>, mis en évidence par H. Y. Wang *et al.*, (2016).

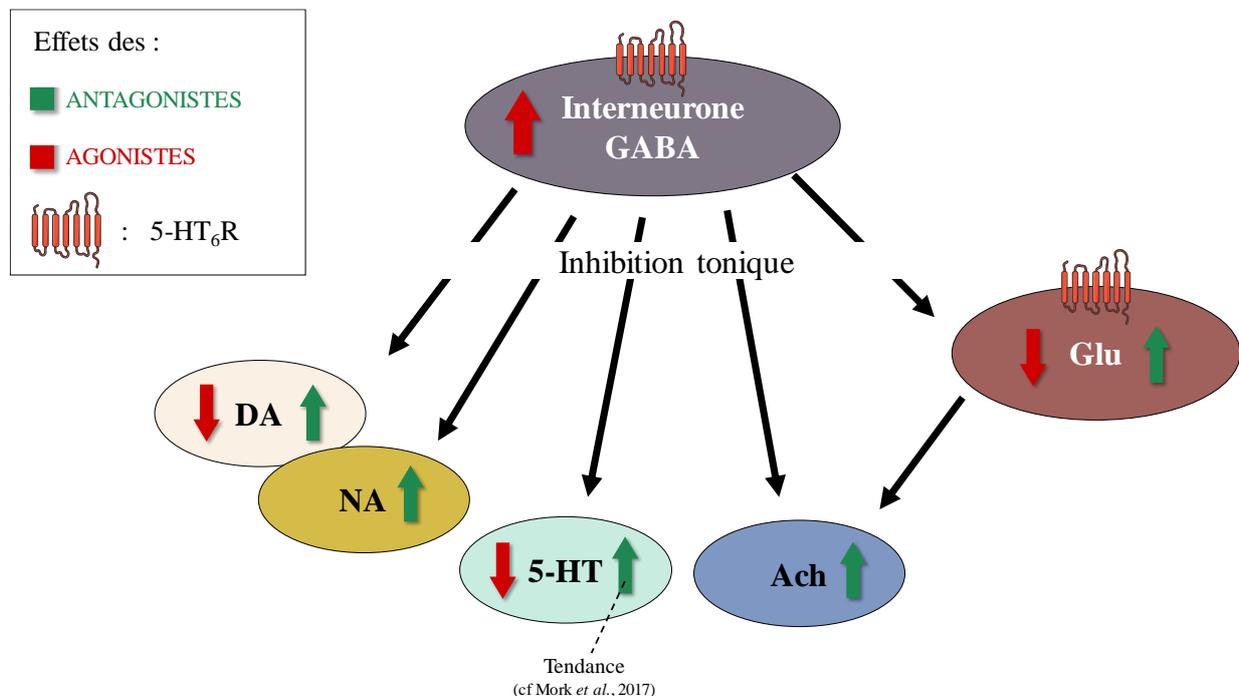
L'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par différents agonistes (le ST1936, le WAY181187 et le WAY208466), permet d'ailleurs de diminuer la libération de Glu induite par le NaN<sub>3</sub> et le KCl ou la 4-aminopyridine sur des coupes et des synaptosomes d'hippocampe *ex vivo* et de réduire les courants excitateurs postsynaptiques sur des coupes de striatum (Schechter *et al.*, 2008; Tassone *et al.*, 2011; H. Y. Wang *et al.*, 2016) confirmant l'effet inhibiteur du récepteur sur la transmission glutamatergique.

d. Neurotransmission monoaminergique

Les systèmes monoaminergiques sont au centre de nombreuses recherches en neuropsychiatrie. Certains antidépresseurs, les plus anciens (l'amoxapine, l'amitriptyline et la miansérine) et de nombreux antipsychotiques atypiques comme, par exemple, la clozapine et l'olanzapine présentent une affinité pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Roth *et al.*, 1994).

L'administration d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> n'a, dans un premier temps pas révélé de modifications des concentrations extracellulaires de 5-HT, de DA et de NA dans le cortex, le striatum, l'hippocampe et le NAc (Dawson *et al.*, 2000, 2001). Cependant, quelques années plus tard de nouveaux travaux ont mis en évidence une augmentation des concentrations extracellulaires de DA dans l'hippocampe, de DA et NA dans le cortex préfrontal suite à l'administration d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (Lacroix *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Mork *et al.*, 2017). En accord avec ces observations, une diminution des taux de DA et de 5-HT est observée dans le cortex frontal suite à l'administration d'un agoniste 5-HT<sub>6</sub> (Schechter *et al.*, 2008; Herrik *et al.*, 2016). Ces effets sur la libération de 5-HT et de DA sont inhibés par la co-administration d'un antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub> (la bicuculline) suggérant que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> exerce un contrôle inhibiteur indirect (empruntant le système GABAergique) sur la neurotransmission.

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> joue un rôle central dans la modulation de la neurotransmission cholinergique, glutamatergique, sérotoninergique et catécholaminergique (**Figure 17**). Sa présence sur les neurones GABAergiques d'une part, les effets pharmacologiques des ligands agonistes et antagonistes du récepteur et de stratégies modulant son expression d'autre part, confortent son rôle central dans le contrôle direct et indirect de neurotransmetteurs jouant un rôle clé dans les fonctions supérieures du système nerveux.



**Figure 17** : Modulation de la neurotransmission induite par les ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

#### 4.1.2. Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la cognition

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est l'un des récepteurs sérotoninergiques ayant le plus retenu l'attention quant à son implication dans les processus cognitifs. Les premières données évaluant le rôle du récepteur dans la cognition ont été obtenues par l'utilisation d'un oligonucléotide antisens (inhibant l'expression du récepteur) administré par voie i.c.v. et par approche pharmacologique avec l'administration systémique aiguë ou chronique d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (le Ro 04-6790, le SB271046, le SB357134 et le SB399885) révélant une amélioration des performances cognitives chez des rats sains soumis au test de la piscine de Morris (Woolley *et al.*, 2001), au test de reconnaissance du nouvel objet (NOR), ou au test de transfert de tâche attentionnel (Stean *et al.*, 2002; Hatcher *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2010; Quedeville *et al.*, 2015). Aucun effet indésirable central lié au traitement chronique n'a été observé soulignant la spécificité des effets pharmacodynamiques des antagonistes 5-HT<sub>6</sub>.

En accord avec l'effet pro-cognitif du blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, l'administration aiguë d'agonistes 5-HT<sub>6</sub> (WAY181187, EMD386088) chez l'animal sain, induit des troubles de la mémoire à court terme et à long terme (Loiseau *et al.*, 2008; Meneses *et al.*, 2008; Amodeo *et al.*, 2018). Ces troubles sont d'ailleurs corrigés par l'injection d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (Loiseau *et al.*, 2008).

#### 4.1.3. Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le développement neuronal

Outre les fonctions neuro-modulatrices du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, il tient un rôle important dans la genèse et l'organisation des circuits cérébraux au cours du développement (Dayer *et al.*, 2015). La 5-HT est présente dès le début de la formation embryonnaire de l'encéphale et une variété de récepteurs sérotoninergiques est exprimée dynamiquement dans le cortex en formation (Vitalis *et al.*, 2013).

La migration des neurones a été étudiée dans des tranches corticales d'embryons murins transgéniques GAD65-GFP. Ainsi, l'application de 5-HT entraîne une diminution de la vitesse de migration des interneurons GABAergiques et l'analyse de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>3</sub> par RT-PCR dans ce tissu, est positive. De plus, l'administration d'un agoniste 5-HT<sub>6</sub> diminue fortement la vitesse de migration de ces neurones, mimant ainsi les effets observés avec la 5-HT. Ces effets migratoires semblent être spécifiques de l'activation du

récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la mesure où l'application d'un agoniste 5-HT<sub>3</sub> n'a pas d'effet. Enfin, la co-administration de 5-HT avec un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> prévient la diminution de la migration induite par la 5-HT, confirmant le rôle spécifique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la migration des interneurons (Riccio *et al.*, 2009).

Des observations similaires ont été faites dans un modèle murin présentant une délétion génétique du transporteur de la 5-HT (SERT), et donc une augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans le cortex des embryons. Chez des animaux sains, l'administration d'un agoniste 5-HT<sub>6</sub> diminue également la migration de ces neurones d'une façon similaire à celle des animaux KO SERT (Riccio *et al.*, 2011). Il a également été démontré que la manipulation génétique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par électroporation *in utero* d'un shRNA ciblant le gène *Htr6*, induit une altération du positionnement et de la vitesse de migration des neurones pyramidaux dans le cortex (Jacobshagen *et al.*, 2014). Une autre étude s'est intéressée aux altérations neuro-développementales d'embryons murin induites par l'inhibition de l'expression de la monoamine oxydase A (MAO-A) par technique de siRNA. Parallèlement au développement d'altérations neuronales, une augmentation de la concentration embryonnaire en 5-HT est observée. L'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (antagoniste) ou de son expression (siRNA) diminue le phénotype pathologique du développement neuronal des embryons mettant en évidence le rôle clé du récepteur dans les altérations induites par un excès de 5-HT au cours du développement cérébral embryonnaire (C. C. Wang *et al.*, 2014). De plus, des résultats *in vitro* ont révélé que l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans des cultures de neuroblastome (NG108-15) induit la croissance de neurites et la différenciation des cellules neuronales et cela de manière autonome, indépendante de la fixation d'un agoniste suggérant l'implication d'une activité constitutive du récepteur dans cet effet. Dans des cultures primaires de neurones issus de striatum et d'hippocampe, la délétion du récepteur par siRNA ou son inhibition pharmacologique, entraînent une diminution de la longueur des neurites dans ces deux structures (Duhr *et al.*, 2014).

#### 4.1.4. Récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et contrôle de la prise alimentaire et de la satiété

Les premières observations ont été faites chez des souris mutantes générées par *knock-in* remplaçant le gène *htr6* par un triple mutant (F<sup>69</sup>L/T<sup>70</sup>I/D<sup>72</sup>A) dont l'affinité pour la 5-HT est réduite de moitié et dont l'activation de la protéine G<sub>s</sub> dépendante du ligand, est perdue. Lorsque ces souris transgéniques sont soumises à un régime riche en lipides, un ralentissement important de la croissance pondérale et une diminution modeste de la prise alimentaire sont observées comparativement à des souris sauvages (Frassetto *et al.*, 2008) suggérant une implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de la voie G<sub>s</sub> associée, dans le contrôle de la prise alimentaire et du stockage des lipides. De la même manière, l'administration i.c.v. d'un oligonucléotide antisens ou d'un antagoniste ciblant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> réduit à la fois la quantité de nourriture consommée, la masse corporelle (Woolley *et al.*, 2001) ou la consommation de glucose (Higgs *et al.*, 2016).

La régulation de la prise alimentaire par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> pourrait là-encore s'expliquer par l'effet modulateur du récepteur sur la neurotransmission GABAergique. Les neurones GABAergiques ont un effet inhibiteur sur l'activité des neurones proopiomélanocortine (POMC) dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Ces neurones POMC sont connus pour moduler l'appétit en l'inhibant lorsqu'ils sont activés. Il semblerait que les antagonistes du récepteurs 5-HT<sub>6</sub> bloquent l'activation des neurones GABAergiques, entraînant une désinhibition des neurones POMC favorisant alors la libération du peptide anorexigène  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) par ces derniers et diminuant la prise alimentaire (Voigt & Fink, 2015) (Sargent and Henderson, 2011)

## 4.2 Rôles physiopathologiques du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

Du fait de sa mise en jeu dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, il est aisé de prévoir l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans de nombreuses pathologies. Le développement de ligands du récepteur représente d'ailleurs une stratégie thérapeutique intéressante dans la prise en charge de ces troubles du SNC (Yun and Rhim, 2011; Karila *et al.*, 2015).

#### 4.2.1. Récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et troubles cognitifs

L'effet pro-cognitif du blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été étudié dans différents modèles animaux de déficits cognitifs. Dans trois **modèles de déficit cognitif** impactant soit i) la neurotransmission sérotoninergique par diminution de l'apport nutritionnel en tryptophane, soit ii) la neurotransmission cholinergique par administration d'un antagoniste muscarinique (la scopolamine), iii) soit la neurotransmission glutamatergique, par administration d'antagonistes du récepteur NMDA (phencyclidine (PCP), dizocilpine), le traitement par différents antagonistes 5-HT<sub>6</sub>, administrés par voie systémique, améliore voire supprime les troubles cognitifs.

De nombreuses données, résumées dans le **Tableau 2**, confirment les effets bénéfiques des antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur des paradigmes évaluant la mémoire de travail, la mémoire de reconnaissance sociale ou la mémoire à long terme : (Woolley *et al.*, 2003; Foley *et al.*, 2004; Perez-García and Meneses, 2005; Lieben *et al.*, 2005; Pitsikas *et al.*, 2008; Loiseau *et al.*, 2008; Marcos, Chuang, *et al.*, 2008; Arnt *et al.*, 2010; Idris *et al.*, 2010; Gravius *et al.*, 2011; Da Silva Costa-Aze *et al.*, 2012; Meffre *et al.*, 2012; Woods *et al.*, 2012; de Bruin, van Drimmelen, *et al.*, 2013; Zajdel *et al.*, 2016; Ivachtchenko *et al.*, 2016).

**Tableau 2** : Effets pro-cognitifs des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> dans plusieurs modèles de déficits.

Altération de la neurotransmission	Induction du déficit cognitif		Antagonistes 5-HT <sub>6</sub>	Dose Voie d'administration	Tests comportementaux	Références
Cholinergique	Scopolamine (0,17 à 3 mg/kg, i.p. ou s.c.)		Ro046790	10 mg/kg, i.p.	NOR	Woolley et al., 2003
			Ro4368554	3 et 10 mg/kg, i.p.	NOR	Lieben et al., 2005
			SB399885	10 mg/kg, p.o.	Test d'apprentissage conditionné	Perez-García and Meneses, 2005
			SB357134	3 et 10 mg/kg, p.o.		
			SB258585	30 mg/kg, i.p.	Test de la piscine de Morris	Gravius et al., 2011
				2,5 mg/kg, i.p.	Test de reconnaissance sociale	Loiseau et al., 2008
			SB271046	3 ; 10 et 20 mg/kg, i.p.	Test de reconnaissance sociale	
					Test d'évitement passif	
Test de réponse émotionnelle conditionnée	Woods et al., 2012					
Glutamatergique	PCP	Aiguë (1,5 à 5 mg/kg, i.p.)	AVN-492	0,05 et 0,5 mg/kg, i.p.	Test d'évitement passif	Ivachtchenko et al., 2016
			SB742457	0,3 et 1 mg/kg, i.p.	NOR	Zajdel et al., 2016
			Composé 23 et 25			
		Sub-chronique (2 mg/kg, i.p., 7j)	LuAE58054	5 et 10 mg/kg, p.o.	NOR	Arnt et al., 2010
			SB742457	0,63 ; 2,5 et 5 mg/kg, s.c.	NOR Test de la boîte de Skinner	Idris et al., 2010 de Bruin et al., 2013
		Neonatal (10 mg/kg, i.p., 3j)	SB258585	2,5 mg/kg, i.p.	Test de reconnaissance sociale	Meffre et al., 2012
	Dizocilpine (0,1 à 0,2 mg/kg, i.p.)	SB399885	10 mg/kg, p.o.	Test d'apprentissage conditionné	Perez-García and Meneses, 2005	
		SB357134	3 et 10 mg/kg, p.o.			
		AVN-492	0,05 et 0,5 mg/kg, i.p.	Test d'évitement passif	Ivachtchenko et al., 2016	
		SB271046	10 mg/kg, i.p.	Test de la piscine de Morris	Marcos et al., 2008	
				Test de réponse émotionnelle conditionnée	Woods et al., 2012	
		Ro04-6790	3 et 10 mg/kg, i.p.	NOR	Pitsikas et al., 2008	
Sérotoninergique	Tryptophane nourriture (-)	Ro4368554	3 et 10 mg/kg, i.p.	NOR	Lieben et al., 2005	

L'amélioration des performances cognitives induit par un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> dans les modèles de déficit cognitif impliquant la neurotransmission cholinergique (administration de scopolamine) et glutamatergique (administration de dizocilpine) est liée des modifications dynamiques, augmentation ou diminution, des niveaux d'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans des structures cérébrales impliquées dans la mémoire (striatum, NAc, amygdale, hippocampe et cortex) (Meneses *et al.*, 2007).

Dans un modèle de **sénescence**, le rat âgé, où est observée une altération de la cognition, l'administration p.o. aiguë et/ou chronique d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (SB399885, SB742457, SB271046) améliore les performances cognitives allant jusqu'à restaurer (pour le traitement chronique) les seuils de performances cognitives à des niveaux similaires à ceux de jeunes rats (Foley *et al.*, 2004; Hirst *et al.*, 2006; Callaghan *et al.*, 2012). Le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a

également été étudié dans un autre modèle de déficit cognitif induit par injection i.c.v. de STZ, modèle associant une altération du métabolisme énergétique cérébral, une diminution du flux sanguin et une altération du système cholinergique. Chez ces rats, l'administration chronique d'une antagoniste 5-HT<sub>6</sub> prévient l'apparition des troubles cognitifs (Bokare *et al.*, 2018; Hashemi-Firouzi *et al.*, 2018).

Une réduction significative de la densité en récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et des taux de 5-HT est trouvée dans les zones corticales du cerveau des patients atteints de la **Maladie d'Alzheimer** (Lorke *et al.*, 2006; Marcos, García-Alloza, *et al.*, 2008). Comme le blocage du récepteur induit une libération d'Ach, il est possible que la réduction de sa densité soit un mécanisme compensatoire pour restaurer les niveaux d'Ach dans un système cholinergique détérioré (Yun and Rhim, 2011). Comme abordé précédemment, les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> se sont révélés efficaces dans le traitement des déficits cognitifs induits par différentes approches. L'efficacité de ces molécules a également été évaluée dans différents modèles précliniques de MA. Dans un modèle induit par perfusion cérébrale (implantation de mini-pompe osmotique) de peptide amyloïde Aβ<sub>1-42</sub>, l'administration chronique d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> prévient l'apparition des troubles cognitifs et prévient l'augmentation de taux cérébraux de GABA et la diminution des taux de 5-HT (Yun *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent une régulation du système sérotoninergique par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> via le système GABAergique, notamment un effet désinhibant de l'antagoniste 5-HT<sub>6</sub>.

Dans le modèle murin transgénique APP/PS1, la restauration des performances cognitives par l'administration chronique d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> est confirmée (Hu *et al.*, 2017). L'électrophysiologie sur tranches d'hippocampe de rat et la microdialyse *in vivo* ont montré que le blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par un antagoniste potentialise les effets du donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (IACE), sur les oscillations neuronales et la concentration extracellulaire en Ach (Herrik *et al.*, 2016).

Ainsi, plusieurs antagonistes sont en phase III de développement clinique dans le traitement symptomatique de la MA, seuls, ou en association avec le donépézil ou un antagoniste du récepteur NMDA, la mémantine (Codony *et al.*, 2011). Cependant, malgré des données précliniques prometteuses et une étude de phase II avec l'idalopirdine (Lu AE58054) encourageante, 3 essais randomisés de phase III contrôlés contre placebo n'ont pas démontré d'effet positif sur la cognition lorsqu'ils sont utilisés comme traitement adjuvant des IACE (Atri

*et al.*, 2018). Plusieurs essais de phase II avec un autre antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, l'intepirdine (SB742457), ont donné des résultats contradictoires en ce qui concerne l'amélioration des performances cognitives chez les patients atteints de forme légère à modérée de la MA. Enfin, un autre antagoniste, le SUVN-502, est en cours d'étude dans un essai de phase IIa, en association avec le donépézil ou la mémantine (Khoury *et al.*, 2018).

Les échecs répétés des composés antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ne peuvent pas être expliqués par des biais méthodologiques des études cliniques mais probablement par des propriétés pharmacocinétiques espèce-dépendantes déjà illustrées avec le SB271046 ayant une plus faible pénétration de la barrière hémato-méningée chez l'homme que chez le rat, liée aux protéines d'efflux P-gp pour lesquelles le SB271046 était un bon substrat chez l'homme (Bromidge *et al.*, 1999). Le composé SUVN-502 présenterait un profil pharmacocinétique, toxicologique et de sécurité favorable lorsque administré une fois par jour (Nirogi *et al.*, 2009).

#### 4.2.2. Récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et troubles schizophréniques

La schizophrénie est un trouble psychotique chronique qui se caractérise par une perte de contact avec la réalité. Sa sémiologie comprend un syndrome positif (idées délirantes, hallucinations, discours et comportement désorganisés), un syndrome négatif, caractérisé par le retrait social, l'apathie, l'anhédonie et la diminution de prise d'initiative, un syndrome de désorganisation affectant les émotions, les comportements et les cognitions (cours de la pensée, système logique, langage) (Kahn *et al.*, 2015). Sa physiopathologie, assez complexe, repose principalement sur les théories d'excès ou de déficit en neurotransmetteurs (DA, 5-HT, Glu) (Patel *et al.*, 2014).

Cette pathologie est traitée par les antipsychotiques de deuxième génération ou « atypiques », comme l'olanzapine, la rispéridone, la clozapine en monothérapie pour la plupart des patients et certains en polythérapie (Farina *et al.*, 2015). Ces agents pharmacologiques ciblant les récepteurs sérotoninergiques (5-HT<sub>2</sub>), dopaminergiques (D<sub>2</sub>), muscariniques et histaminiques, possèdent également une affinité pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Roth *et al.*, 1994). Il semblerait donc que les propriétés pro-cognitives de certains de ces antipsychotiques puissent être, au moins en partie, dues au blocage central des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Hirano *et al.*, 2011). Ces éléments ont motivé l'étude préclinique d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> dans la schizophrénie.

Chez l'animal, l'isolement social post-sevrage produit des altérations morphologiques, neurochimiques et comportementales ressemblant à certaines caractéristiques de la schizophrénie à savoir, une diminution de la prolifération cellulaire dans le gyrus denté, une augmentation des niveaux de TNF $\alpha$  et de l'expression de Cdc42 dans l'hippocampe et une altération des performances cognitives. L'administration aiguë d'un antagoniste 5-HT $_6$  chez ces animaux restaure les performances cognitives ; l'administration chronique rétablit, en plus, les niveaux de prolifération cellulaire dans le gyrus denté (Meffre *et al.*, 2012; Shortall *et al.*, 2018).

Le modèle expérimental obtenu par l'administration répétée de PCP, induit des altérations neurochimiques et métaboliques dans le cortex préfrontal (réduction de l'expression de la GAD67 ; réduction de la protéine parvalbumine (protéine de liaison du calcium) dans les interneurons GABAergiques) à l'origine des déficits cognitifs (Nakazawa *et al.*, 2012) et permet de mettre en évidence les effets pro-cognitifs de stratégies bloquant le récepteur 5-HT $_6$  (cf **Tableau 2**).

Une étude clinique évaluant l'effet adjuvant d'un antagoniste 5-HT $_6$  (l'AVN-211) chez des patients schizophréniques stabilisés par un traitement antipsychotique, a mis en évidence une augmentation de l'effet antipsychotique et pro-cognitif de la co-administration de l'antipsychotique avec l'antagoniste 5-HT $_6$  (Morozova *et al.*, 2014).

*Il existe de nombreux arguments en faveur du rôle délétère de l'activité du récepteur 5-HT $_6$  sur les fonctions cognitives. L'efficacité des antagonistes du récepteur 5-HT $_6$  sur les troubles de la mémoire et de l'apprentissage est clairement établie dans différents modèles de troubles cognitifs dont ceux associés à la schizophrénie. Compte-tenu de la prévalence élevée (8,5 % à 14,3 %) des comorbidités cognitives associées aux douleurs chroniques (Povedano *et al.*, 2007), il semble intéressant d'évaluer l'impact de ligands 5-HT $_6$  sur celles-ci dans un modèle de neuropathie traumatique douloureuse.*

#### 4.2.3. Récepteurs 5-HT $_6$ et anxiété et dépression

Chez l'animal sain, plusieurs études ont pu mettre en évidence les propriétés antidépressives et anxiolytiques d'agonistes 5-HT $_6$  (injectés par voie systémique ou dans l'hippocampe) à l'aide de tests évaluant un comportement de désespoir (test de suspension par la queue, test de la nage forcée), ou anxieux (test du labyrinthe en croix surélevé (*elevated plus*

*maze*, EPM), test de Vogel, test d'enfouissement défensif conditionné, test d'hyponéophagie) (Svenningsson *et al.*, 2007; Carr *et al.*, 2011; Nikiforuk *et al.*, 2011; Jastrzębska-Więsek *et al.*, 2015, 2016; Liu *et al.*, 2015). La phosphorylation de DARPP32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein 32) et de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA, ainsi qu'une augmentation de l'ARNm codant pour le facteur de transcription c-Fos dans le cortex et le striatum sont observés après administration soit de l'agoniste 5-HT<sub>6</sub> soit de la fluoxétine. L'administration d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> inhibe les effets biochimiques et comportementaux de la fluoxétine et de l'agoniste 5-HT<sub>6</sub> suggérant l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les effets de l'ISRS (Svenningsson *et al.*, 2007). *A contrario*, l'administration systémique ou directe dans l'hippocampe d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> chez des rats sains présente également des propriétés antidépressives et anxiolytiques (Wesołowska and Nikiforuk, 2007; Wesołowska *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015; Zajdel *et al.*, 2016) et potentialise l'activité des ISRS (Asaoka *et al.*, 2015) soulignant, là encore, la complexité des effets médiés par le système sérotoninergique.

Dans un modèle de dépression induite par la 6-OHDA chez le rat, l'administration d'un agoniste 5-HT<sub>6</sub> (WAY208466) dans l'hippocampe dorsal améliore les symptômes « *depressive-like* » évalués par les tests de la nage forcée et de la consommation de sucrose (mesurant l'anhédonie) (Liu *et al.*, 2015). Dans le modèle de dépression induite par l'injection répétée de kétamine (bloquant les récepteurs NMDA des interneurons GABAergiques diminuant ainsi le tonus dopaminergique dans la voie méso-corticale (Stahl, 2007)), l'agoniste 5-HT<sub>6</sub>, le E-6837, tout comme l'antagoniste SB271046, améliorent les réponses « *depressive-like* » (Suárez-Santiago *et al.*, 2017). Antagonistes et agonistes 5-HT<sub>6</sub> augmentent les taux de DA et de NA dans le cortex préfrontal et le système limbique, augmentation corrélée à une diminution du phénotype dépressif (Jastrzębska-Więsek *et al.*, 2016; Y. M. Zhang *et al.*, 2016).

Il est paradoxal que les agonistes et antagonistes présentent des effets antidépresseurs similaires. Outre les modèles de dépression différents utilisés dans ces études, cette apparente contradiction pourrait être due aux propriétés pharmacologiques des agonistes (agoniste partiel, agoniste inverse) et antagonistes (antagoniste neutre, antagoniste biaisé) et à leur capacité de moduler différentes voies de signalisation intracellulaires. Nous reviendrons sur les propriétés pharmacologiques des ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

A côté du renforcement des voies monoaminergiques DA et NA, des effets neurotrophiques médiés par le BDNF ont été rapportés pour les agonistes 5-HT<sub>6</sub>. Dans des modèles animaux de dépression, de nombreux travaux montrent une diminution de la neurogenèse hippocampique et de l'ARNm codant pour le BDNF dans l'hippocampe (Kronenberg *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2012; Yutsudo *et al.*, 2013; Q. S. Wang *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015; Po *et al.*, 2015; K. Zhang *et al.*, 2016); d'autres montrent que les traitements antidépresseurs permettent d'augmenter l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur du BDNF (récepteur TrkB) et pour le BDNF ou d'augmenter l'expression de la protéine correspondante dans l'hippocampe, le gyrus denté ou le cortex frontal (Yohn *et al.*, 2017). De même, l'activation aiguë et sub-chronique (4 jours) du récepteur 5-HT<sub>6</sub> augmente significativement le niveau des ARNm codant pour le BDNF dans l'hippocampe (de Foubert *et al.*, 2007, 2013). Ces résultats suggèrent que l'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par la 5-HT endogène (suite à l'administration d'un antidépresseur) ou par un agoniste 5-HT<sub>6</sub>, conduit à l'augmentation d'AMPC qui activerait une protéine kinase A qui, après migration dans le noyau, phosphorylerait le facteur de transcription CREB permettant ainsi d'activer la transcription du gène du BDNF. L'effet bénéfique sur la dépression résulterait donc de l'augmentation de la neurogenèse.

#### 4.2.4. Récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et obésité

Depuis la découverte de la résistance à l'obésité de souris chez lesquelles le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été invalidé, quelques études sur l'effet de ligands 5-HT<sub>6</sub> sur l'obésité ont été menées. Dans deux modèles animaux d'obésité induits par un régime riche en lipides ou un régime hypercalorique, le traitement chronique avec un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> réduit la prise alimentaire et la croissance pondérale et s'accompagne d'une diminution de la quantité de graisse péritonéale et des taux plasmatiques de triglycérides, de cholestérol et de glucose (Dudek *et al.*, 2015; Kotańska *et al.*, 2018).

#### 4.2.5. Récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et addiction

L'addiction est un processus par lequel un comportement humain permet d'accéder au plaisir immédiat tout en réduisant une sensation de malaise interne. Il s'accompagne d'une impossibilité à contrôler ce comportement en dépit de la connaissance de ses conséquences négatives. L'addiction implique des altérations des processus neuronaux intervenant dans le

phénomène de récompense via les circuits neuronaux convergeant dans le striatum dorsal et ventral (Hyman *et al.*, 2006), en particulier, le NAc du striatum ventral (Stuber *et al.*, 2011). Le NAc est principalement composé de neurone GABAergiques qui se projettent à travers deux voies distinctes, la voie directe (nigrostriée) et indirecte (voie striato-pallidale) des neurones moyens épineux (dMSN et iMSN, *direct/indirect Medium Spiny Neuron*) (Surmeier *et al.*, 2007). La présence du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est abondante dans le striatum, où il est exprimé dans ces 2 voies (Hirst *et al.*, 2003; Tassone *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont mis en évidence que l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> module le phénomène d'addiction. L'auto-administration i.v. d'un agoniste (ST 1936) chez le rat crée un renforcement signifiant une propriété addictive de cette activation (Valentini *et al.*, 2013) associé à une augmentation de DA dans le NAc (Valentini *et al.*, 2011).

L'administration systémique d'antagonistes (le SB271046, le Ro046790 et le CMP 42) diminue l'augmentation de la concentration de DA induite par le ST1936 et la cocaïne dans le NAc (Valentini *et al.*, 2011, 2013), réduit l'auto-administration i.v. de cocaïne et de nicotine chez le rat (Fijał *et al.*, 2010; de Bruin, McCreary, *et al.*, 2013; Valentini *et al.*, 2013) et diminue de façon dose-dépendante la recherche de cocaïne, de nicotine et d'éthanol, chez des rats ayant des antécédents d'auto-administration (Fijał *et al.*, 2010; Van Gaalen *et al.*, 2010; de Bruin, McCreary, *et al.*, 2013).

Cependant, dans 2 études évaluant la surexpression du récepteur dans le NAc, une diminution de la préférence de place induite par la cocaïne et une diminution de son auto-administration ont été observées (Ferguson *et al.*, 2008; Brodsky *et al.*, 2016). Il semblerait d'ailleurs que le caractère addictif de la cocaïne soit lié à la présence du récepteur dans les iMSN dans la mesure ou sa surexpression (à l'aide d'un vecteur HSV exprimant le récepteur sous le promoteur de la dynorphine pour cibler les iMSN et de la pro-enképhaline pour les dMSN) est responsable de la réduction de l'auto-administration de cocaïne (Brodsky *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces résultats suggère la pertinence thérapeutique de cibler le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le traitement des addictions.

## **5. Implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et des voies de signalisation associées dans la douleur neuropathique**

### **5.1 Récepteur 5-HT<sub>6</sub> et douleurs neuropathiques**

La présence des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans la moelle spinale et le cerveau dans des structures impliquées dans la transmission et l'intégration (moelle spinale dorsale), les composantes émotionnelles et cognitives de la douleur (amygdale, cortex préfrontal), leur capacité de réguler des systèmes de signalisation cellulaire (mTOR, Cdk5) en absence de leur ligand agoniste et la démonstration que certains ligands puissent avoir une activité négative sur ce récepteur, suscitent un intérêt particulier vis-à-vis de leur rôle dans la modulation de la transmission douloureuse.

Les premiers travaux rapportant les effets de ligands 5-HT<sub>6</sub> sur la douleur datent de 2007 (Finn *et al.*, 2007). Il s'agit d'une étude réalisée à l'aide d'un modèle de douleur inflammatoire semi-chronique, induite par l'injection d'une solution de formol dans la patte postérieure du rat. La douleur ainsi induite évolue en deux phases distinctes qui permettent chacune d'apprécier les effets périphériques et/ou centraux des agents pharmacologiques testés. Dans cette étude, l'antagoniste 5-HT<sub>6</sub> (le S271046) administré par voie systémique diminue l'intensité de la deuxième phase du test uniquement, signant un effet central et excluant un effet périphérique, conformément aux connaissances sur la localisation centrale des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Deux années plus tard, l'équipe de Granados-Soto (Castañeda-Corral *et al.*, 2009) proposa un effet périphérique de l'antagoniste : l'administration de SB258585 dans la patte postérieure du rat réduit la 2<sup>ème</sup> phase du comportement douloureux induit par le formol. De plus, les effets pronociceptifs du formol ont pu être reproduits par l'administration intraplantaire d'un agoniste 5-HT<sub>6</sub>, et supprimés par l'antagoniste 5-HT<sub>6</sub> injecté dans la patte (Godínez-Chaparro *et al.*, 2011). Ces données suggèrent donc la présence de récepteurs 5-HT<sub>6</sub> périphériques. La même équipe proposa que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> localisés en regard des fibres 5-HT bulbospinales descendantes (i.e. sur les terminaisons centrales des FAP ou sur les neurones de projection ou sur les interneurons excitateurs) ou présynaptiques (sur les fibres 5-HT bulbospinales issues de la RVM), participent au développement et au maintien de l'allodynie secondaire et de l'hyperalgie induite par l'injection de formol (Godínez-Chaparro *et al.*, 2012). Alors que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été mis en évidence dans la corne dorsale de la moelle spinale (Gérard *et al.*,

1997; Pineda-Farias *et al.*, 2017), et en particulier sur des interneurons excitateurs (Abraira *et al.*, 2017) sa présence dans les FAP/GRD n'a pas été confirmée et aucune étude n'a encore montré sa présence au niveau pré-synaptique.

La douleur neuropathique, qu'elle soit modélisée par la ligature d'un nerf périphérique (SNL, CCI), par l'administration d'agents neurotoxiques (anti-cancéreux (OXA), ou anti-rétroviral (didéoxycytidine)), ou infectieux (virus du Zona) chez le rat ou la souris est peu, voire pas sensible aux antalgiques renforçant les systèmes de contrôles sérotoninergiques, observation en accord avec les critères GRADE (« *Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation* ») classant les ISRS parmi les traitements aux recommandations non concluantes (Finnerup *et al.*, 2015).

Cette apparente résistance aux effets antalgiques de la 5-HT d'une part (déjà explorée par des travaux antérieurs dans le laboratoire suggérant une atteinte fonctionnelle du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> spinal) et le rôle délétère du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans certaines pathologies du SNC d'autre part, justifient notre intérêt pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur neuropathique.

C'est sur le modèle de neuropathie traumatique SNL chez le rat que l'activité anti-allodynique vis-à-vis de stimulations tactiles et thermiques (froides) d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub>, un arylsulfonamide a été révélée (Devegowda *et al.*, 2013) puis confirmée (Hong *et al.*, 2017). L'administration des antagonistes SB742457 et SB258585 améliore l'hypersensibilité tactile dans les modèles PSNL (Jayarajan *et al.*, 2015) et SNL (Pineda-Farias *et al.*, 2017), sans modification de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> spinal dans cette condition pathologique (Pineda-Farias *et al.*, 2017). De plus, une potentialisation des effets analgésiques de la gabapentine et de la prégabaline, anti-épileptiques utilisés en 1<sup>ère</sup> intention dans la prise en charge des douleurs neuropathiques, a été observée lorsqu'ils sont co-administrés avec le SB742457 (Jayarajan *et al.*, 2015).

L'homogénéité dans l'efficacité analgésique des différents antagonistes 5-HT<sub>6</sub> dans des modèles animaux de douleur inflammatoire et de douleur neuropathique, l'existence d'une efficacité par voie orale, systémique et spinale, les propriétés potentialisatrices de certains d'entre eux, conduisent à rechercher des éléments de la littérature en faveur du rôle joué par les voies de signalisation dépendantes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (i.e. mTOR et Cdk5) dans la douleur.

## 5.2 Voie mTOR et douleurs neuropathiques

De nombreuses études suggèrent l'implication de la voie mTOR (et de ses effecteurs en aval) dans la modulation de la douleur neuropathique quelle que soit son étiologie. L'expression et l'activité de la voie mTOR ont été détectées dans des régions clés de la transmission douloureuse mais ne concordant pas toujours avec la localisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

Chez le rat et la souris, mTOR a été trouvée dans des cellules non neuronales entourant les axones périphériques dans le derme (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Obara *et al.*, 2011). L'utilisation des marqueurs spécifiques a révélé que les fibres mTOR-positives sont majoritairement des fibres A myélinisées et, pour moins de 5%, des fibres C peptidergiques, co-exprimant le CGRP.

Dans ces fibres, sont présentes les formes phosphorylées de mTOR, p-mTOR(Ser<sup>2448</sup>) et de ses cibles, 4E-BP1, S6K et S6 (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008) indiquant l'implication de la voie mTOR dans la régulation de la synthèse protéique contribuant ainsi à son rôle dans la nociception. De la même manière, l'activation de la voie mTOR a été détectée dans les GRD de rat (Geranton *et al.*, 2009; Obara *et al.*, 2011). L'administration intrathécale (i.t.) de rapamycine réduit la phosphorylation des cibles en aval de mTOR à la fois dans les fibres périphériques (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008) et dans les neurones de projection spinaux où p-mTOR, p-S6 et p-4E-BP1 sont fortement exprimées au niveau des couches I et III (Geranton *et al.*, 2009).

Une augmentation de l'activité de la voie mTOR a été retrouvée dans différents modèles expérimentaux de douleur neuropathique traumatique. Chez le rat SNL, une augmentation du niveau de p-mTOR a été mise en évidence dans les neurones sensoriels au niveau des GRD des nerfs lésés (Melemedjian *et al.*, 2011) ainsi que dans la moelle épinière (Liu *et al.*, 2017). Au niveau de la RVM, la forme phosphorylée de mTOR est principalement retrouvée dans les neurones de projection sérotoninergiques (mis en évidence par injection d'un marqueur rétrograde dans la corne dorsale de la moelle épinière) et une augmentation cette phosphorylation est présente dans les modèle SNI (Wang *et al.*, 2015). Dans le modèle de lésion de la moelle épinière SCI, une augmentation de la phosphorylation de mTOR, 4E-BP1 et p70S6K est observée au niveau des couches superficielles de la corne spinale dorsale (Wang *et al.*, 2016). Une activation accrue de la voie mTOR dans la moelle épinière a également été

trouvée dans le modèle CCI chez la souris (Zhang *et al.*, 2013) et le rat (Cui *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2017), activation sensible à l'administration i.t. de rapamycine entraînant une diminution du niveau de phosphorylation de p-mTOR, p-S6 et p-4E-BP1 (Zhang *et al.*, 2013). Il semblerait que le niveau d'expression de mTOR soit augmenté dans les neurones de la moelle spinale en contact avec le liquide céphalo-rachidien (Li *et al.*, 2015). Dans les modèles de douleur neuropathique chimio-induits par administration aiguë d'oxaliplatine (OXA) et chronique de bortezomib (BTZ) et le modèle diabétique induit par la STZ, les rats présentent une augmentation de la signalisation mTOR dans les GRD (He *et al.*, 2016; Duan, Li, *et al.*, 2018; Duan, Su, *et al.*, 2018).

Ces données issues de modèles de douleur neuropathique d'étiologies différentes indiquent une augmentation de l'activité de la voie mTOR dans les GRD/FAP et la moelle spinale dorsale, suggérant une implication de cette voie dans la douleur neuropathique indépendamment de l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à la périphérie (FAP/GRD), et impliquant ou non le récepteur 5-HT<sub>6</sub> au niveau central.

Des données électrophysiologiques, cohérentes avec ces observations biochimiques, confirment le rôle de la voie de signalisation mTOR dans la modulation de la douleur neuropathique (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Asante *et al.*, 2010). L'enregistrement extracellulaire unitaire *in vivo* de neurones de la moelle épinière de rats SNL montre les effets inhibiteurs du temsirolimus, un rapalogue, sur les réponses neuronales induites par des stimuli mécaniques de la patte de rats SNL (Asante *et al.*, 2010). En absence de lésion nerveuse, le temsirolimus n'a pas d'effet sur les réponses neuronales, suggérant que l'activation de la voie mTOR au niveau spinal est un mécanisme physiopathologique de la douleur chronique et que son implication dans la sensibilisation centrale contribue probablement à la persistance de la douleur.

Les effets analgésiques de la rapamycine et du temsirolimus, ont été évalués à l'aide de tests comportementaux réalisés dans plusieurs modèles expérimentaux de douleur neuropathique d'origine traumatique, cancéreuse, métabolique, immunitaire et iatrogène.

L'administration locale intra-plantaire ou i.t. de rapamycine diminue l'hypersensibilité mécanique chez le rat SNI (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Geranton *et al.*, 2009). Dans ce même modèle, une augmentation de la phosphorylation de la voie mTOR est présente dans les neurones de projection de la RVM et l'administration intra-RVM de rapamycine, réduit les l'hypersensibilité mécanique et thermique (Wang *et al.*, 2015). De même, chez la souris SNI,

l'injection intra-plantaire ou systémique (i.p.) de temsirolimus réduit l'allodynie mécanique. L'injection systémique et l'effet thérapeutique sont accompagnés d'une diminution la phosphorylation des cibles de mTOR (S6 et 4E-BP1) au niveau de la moelle épinière et des GRD (Obara *et al.*, 2011). De plus, en accord avec un rôle possible de mTORC2 dans la plasticité synaptique centrale, l'inhibiteur mixte de mTORC1 et mTORC 2, Torin 1, est plus efficace que la rapamycine dans ce modèle expérimental, qu'il soit administré de façon aiguë ou répétée (Obara *et al.*, 2011).

L'administration chronique de metformine (inhibiteur de mTOR via l'activation de l'AMPK) réduit l'allodynie mécanique chez la souris SNI (Melemedjian *et al.*, 2011). L'application intra-ganglionnaire (Guo *et al.*, 2015) ou i.t. de rapamycine et de temsirolimus améliorent le comportement douloureux de rats SNL (Asante *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2018). Dans les modèles SCI et CCI, l'administration i.t., i.c.v. ou systémique de rapamycine réduit le comportement douloureux chez le rat (Orhan *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2015; X. Wang *et al.*, 2016) et la souris (Zhang *et al.*, 2013; Marinelli *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) ; son injection dans le cortex insulaire a également révélé un effet anti-allodynique dans le modèle SNI (Kwon *et al.*, 2017).

Dans les modèles chimio-induits OXA et BTZ, l'injection i.p. de rapamycine diminue l'hypersensibilité mécanique et thermique (Duan, Li, *et al.*, 2018; Duan, Su, *et al.*, 2018).

Les cancers et métastases osseuses sont pourvoyeuses de douleurs présentant une composante inflammatoire et neuropathique. La prévalence des douleurs neuropathiques chez ces patients est estimée à 95% (Kerba *et al.*, 2010). Ces douleurs peuvent être modélisées par injection intra-tibiale de cellules issues d'une lignée cancéreuse (carcinosarcome Walker256) chez le rat (Jiang *et al.*, 2016) et de cellules de cancer prostatique (AT-3.1 PCC) chez la souris (Shih *et al.*, 2012). Dans ces 2 modèles, une hyperphosphorylation de la voie mTOR est observée dans la moelle spinale dorsale ainsi que dans les GRD pour le modèle murin. L'administration i.t. de rapamycine inhibe l'hyperphosphorylation de la voie mTOR et réduit les symptômes douloureux mécaniques et thermiques. Dans un autre modèle murin induit par injection intra-tibiale de cellules de carcinome mammaire (4T1), l'administration systémique chronique de rapamycine réduit l'hypersensibilité tactile et thermique (Abdelaziz *et al.*, 2014) confirmant ainsi l'intérêt thérapeutique du blocage de la voie mTOR dans ce type de douleur.

Dans un modèle de démyélinisation chronique, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris (Lisi *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2017), reproduisant certains symptômes de la SEP, la rapamycine améliore les symptômes douloureux et les signes cliniques et histologiques de la maladie. Cette amélioration est caractérisée par une remyélinisation du corps calleux des souris EAE (Lisi *et al.*, 2012) et une diminution de l'infiltration de cellules immunitaires dans la moelle épinière (Hou *et al.*, 2017). Le rôle myélinisant de la rapamycine a également pu être observé *in vitro* sur des cultures de cellules issues de GRD provenant d'une souche de souris transgénique C22 présentant une neuropathie liée à une altération de la synthèse de myéline (Rangaraju *et al.*, 2010).

Dans le modèle de neuropathie diabétique STZ-induit, l'administration i.t. chronique de rapamycine permet de réduire l'hyperphosphorylation de S6K au niveau des GRD et le comportement douloureux des rats (He *et al.*, 2016).

Ces nombreux résultats mettent en évidence le rôle de mTOR et de ses cibles en conditions neuropathiques dans le système nerveux périphérique et central. Dans la mesure où le récepteur 5-HT<sub>6</sub> interagit avec mTOR, il nous a paru intéressant d'étudier la mise en jeu de cette voie de signalisation sous la dépendance du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, afin de mieux comprendre la physiopathologie des douleurs neuropathiques et peut-être identifier de nouvelles cibles pharmacologiques pour leur traitement.

### 5.3 Cdk5 et douleurs neuropathiques

Par technique de Western blot et d'immunohistochimie, la présence de Cdk5 et de son activateur p35 a été mis en évidence dans les GRD (Terada *et al.*, 1998), le nerf sciatique (Terada *et al.*, 1998), et la corne dorsale de la moelle épinière de rat (Yang *et al.*, 2007; Utreras *et al.*, 2012; K. Li *et al.*, 2014; Xiaojie Liu *et al.*, 2014). L'association *in vivo* de Cdk5 et p35 a été confirmée dans les GRD et le nerf sciatique par co-IP (Terada *et al.*, 1998) et dans la moelle spinale dorsale par immuno-co-localisation (H. H. Zhang *et al.*, 2012). L'activité kinase de Cdk5 a été retrouvée dans les GRD (Terada *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent un rôle physiologique de Cdk5 dans le système nerveux périphérique et central.

Cdk5 est apparu progressivement comme un régulateur potentiel de multiples voies de signalisation de la douleur (Pareek and Kulkarni, 2006; Pareek, 2013). Une étude évaluant l'activité et le niveau d'expression de Cdk5 et de p35 chez le rat IoN-CCI le niveau d'expression de p35 et l'activité de Cdk5 augmentent fortement au niveau des couches superficielles du sous-noyau caudal du pont (Li *et al.*, 2010).

Les effets de l'inhibition de Cdk5 ont été évalués dans différents modèles de douleur neuropathique grâce à la roscovitine, un inhibiteur non sélectif de Cdk5 (Bach *et al.*, 2005; Demange *et al.*, 2013).

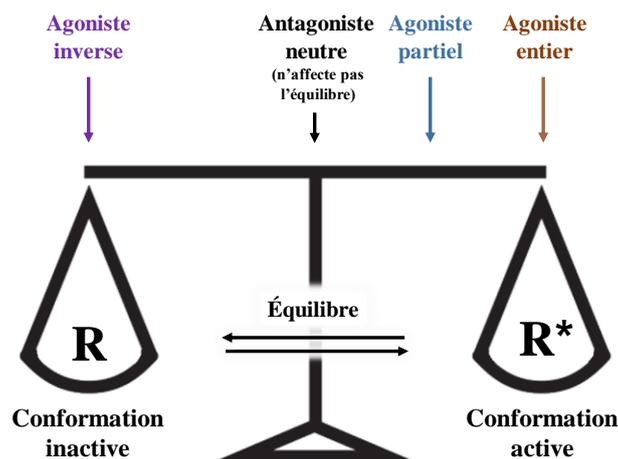
Dans un modèle d'injection intra-fémorale de cellules d'ostéosarcome (NTC-2472) chez la souris, ou neuro-traumatique par compression chronique de GRD ou CCI chez le rat, l'administration i.t. de roscovitine permet de diminuer l'hypersensibilité tactile et thermique (R. Zhang *et al.*, 2012; K. Li *et al.*, 2014; Lei Yang *et al.*, 2014). Chez des animaux CCI, l'expression de Cdk5 liée à la phosphorylation de CREB est augmentée dans la moelle spinale dorsale via un mécanisme d'origine épigénétique caractérisé par l'augmentation de l'acétylation par l'histone H4 du promoteur responsable de la transcription de Cdk5 (K. Li *et al.*, 2014).

Dans le mesure où ces modèles résultent de lésions traumatiques nerveuses périphériques, une étude s'est intéressée au rôle de la roscovitine dans la croissance neuronale après section du nerf sciatique chez le rat. L'analyse *ex vivo* de GRD a montré que la roscovitine favorisait la repousse des neurites des neurones. De même, *in vivo*, chez des rats lésés ayant reçu un traitement local de roscovitine, une augmentation du nombre d'axones néo-myélinisés est observée au niveau de la section nerveuse (Law *et al.*, 2016).

## 6. Activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

### 6.1 Notions pharmacologiques

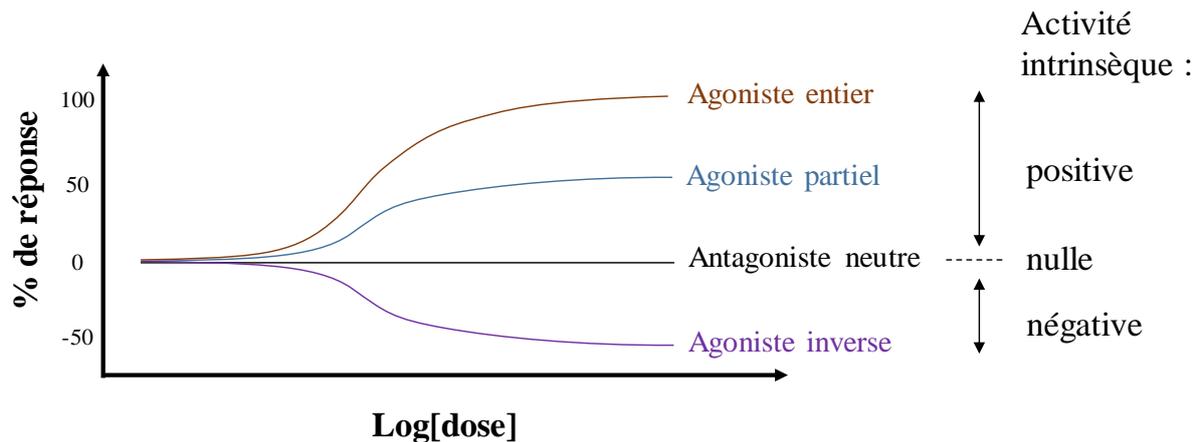
Un récepteur possède une activité constitutive lorsqu'il est capable de produire une réponse biologique en l'absence de la liaison de son ligand. De nombreux RCPG possèdent cette capacité (Cotecchia, 2007; Pydi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2016). Ce phénomène peut être expliqué par un modèle à deux états du récepteur, un état actif, noté R\*, et un état inactif, noté R ; lorsque le récepteur est doué d'une activité constitutive alors la conformation active R\* existe en absence de ligand. Dans ce modèle, un ligand **agoniste inverse** favorise la configuration R du récepteur en bloquant son activité constitutive, effet se traduisant par une activité négative (**Figure 18**).



**Figure 18** : Schéma représentatif du modèle à deux états R/R\* du récepteur.

Le degré d'activité constitutive d'un récepteur dépend de la facilité avec laquelle il atteint sa conformation R\* en l'absence de ligand, et de la propension du R\* à lier ses protéines effectrices (Bond and Ijzerman, 2006).

Dans ce modèle, un ligand ne modifiant pas la conformation R\* et R, donc dépourvu d'activité intrinsèque (efficacité nulle) mais bloquant la liaison de l'agoniste sur le récepteur par compétition, est un antagoniste neutre (**Figure 19**) (Kenakin, 2004; Bond and Ijzerman, 2006). Les antagonistes neutres inhibent les effets induits par la fixation du ligand sans affecter la signalisation basale, donc l'activité constitutive, alors que les agonistes inverses la diminuent (Perez, 2005) (**Figure 19**).



**Figure 19** : Effets dose/réponse de différents types de ligands. D'après Sato *et al.*, 2016

Il est intéressant de noter que de nombreux antagonistes ciblant les systèmes de neurotransmission peuvent avoir des propriétés agonistes inverses (Kenakin, 2004). C'est notamment le cas des traitements anti-obésité avec le rimonabant (SR141716) et le taranabant (MK-0364), agonistes inverses des récepteurs cannabinoïdes CB1 (Fong and Heymsfield, 2009) ; c'est aussi le cas, de certaines benzodiazépines (RO15-4513, RO19-4603, FG-7142) qui, de façon paradoxale, vont avoir des propriétés anxiogènes et convulsivantes (Shanbhogue *et al.*, 1990; June *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 2005). Le récepteur opioïdérique  $\mu$  pouvant être constitutivement actif, notamment dans des cas de toxicomanies opiacées (Liu and Prather, 2001), la naloxone a été identifiée comme agoniste inverse (Cruz *et al.*, 1996). Concernant les récepteurs sérotoninergiques, la primavanserine, antipsychotique utilisé chez les patients parkinsonniens, et la nélotanserine, traitement développé contre l'insomnie, sont des agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Al-Shamma *et al.*, 2010; Howland, 2016). D'autres antipsychotiques, tel que la risperidone, l'olanzapine et la volinanserine ont également des propriétés agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Nutt *et al.*, 2017).

A côté de l'activité intrinsèque d'un ligand donné, le microenvironnement du récepteur (le niveau de signalisation basale, certaines mutations du récepteur, la disponibilité des protéines G, le milieu ionique intracellulaire, etc) joue un rôle crucial dans la réponse du récepteur à un ligand donné (Sirohi and Walker, 2015). En l'absence d'activité constitutive du récepteur, les agonistes inverses et les antagonistes neutres sont indiscernables.

Ainsi pour étudier l'activité constitutive d'un récepteur, il est nécessaire de disposer d'outils pharmacologiques adéquats i.e. d'antagonistes neutres et d'agonistes inverses, ces derniers allant de pair avec l'activité constitutive.

## 6.2 Mise en évidence de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

L'activité constitutive des RCPG a été décrite pour la première fois par Costa et Herz (1989) pour les récepteurs delta opioïdes surexprimés dans les cellules de neuroglioblastome NG108-15. Depuis, la liste des RCPG dotés d'activité constitutive s'est considérablement allongée (Meyer *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015).

La caractérisation de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été faite par Kohen *et al.*, (2001) : en transfectant des cellules JEG-3 et COS-7 avec une concentration croissante de plasmide exprimant l'ADNc du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, ils constatèrent une augmentation croissante de la concentration d'AMPc dans le milieu, en absence de 5-HT. Le motif BBXXB (B: résidu basique, X : résidu non-basique), au niveau de la boucle i3 du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été identifié comme élément crucial modulant son activité constitutive (Pauwels and Wurch, 1998). Cependant d'autres études plus récentes, que nous aborderons par la suite, montreront que ce n'est pas uniquement cette séquence qui est responsable de la régulation de cette activité constitutive mais également d'autres partenaires protéiques. Le motif BBXXB est d'ailleurs conservé chez l'homme, le rat et la souris (Woolley *et al.*, 2004) Par technique de mutagenèse dirigée, cinq mutants du récepteur ont été générés sur ce motif (K<sup>264</sup>I, A<sup>265</sup>R, L<sup>266</sup>R, K<sup>267</sup>A et A<sup>268</sup>R). Parmi ces cinq mutants, K<sup>264</sup>I, K<sup>267</sup>A et A<sup>268</sup>R ont montré une réduction significative de l'activité constitutive par rapport au récepteur murin sauvage suggérant le rôle crucial de la séquence BBXXB dans l'activité constitutive du récepteur (Kohen *et al.*, 2001). Quelques années plus tard, par la même approche, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> humain a été étudié. Contrairement au récepteur murin où des altérations du motif BBXXB de la boucle i3 réduisent son activité basale, l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> humain est renforcée par la mutation de Ser<sup>267</sup>K du motif BBXXB (Purohit *et al.*, 2003, 2005; Romero *et al.*, 2007).

Cependant ce motif présent sur le récepteur n'est pas le seul élément capable de réguler son activité constitutive. D'autres études se sont intéressées à l'activité de deux formes mutées du récepteur: 5-HT<sub>6</sub>-Gs-dead et 5-HT<sub>6</sub>-D<sup>106</sup>A, exprimées dans des cellules NG108-15. La mesure de la production d'AMPc, a mis en évidence que la première forme, 5-HT<sub>6</sub>-Gs-dead, ne modifie pas les taux d'AMPc en absence et en présence de 5-HT signant l'abolition de la signalisation liée à l'activité constitutive du récepteur et induite par la 5-HT ; la seconde forme, 5-HT<sub>6</sub>-D<sup>106</sup>A, augmente la production d'AMPc en absence de 5-HT et ne la modifie pas en présence de 5-HT, suggérant la suppression de la signalisation induite par la 5-HT mais pas de son activité constitutive (Jacobshagen *et al.*, 2014).

Deux partenaires protéiques du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, la neurofibromine (Nf1, protéine à fonction suppresseur de tumeur via l'inhibition des protéines RAS) et Cdk5 ont été mis en évidence dans les neurones par co-IP (Meffre *et al.*, 2012; Duhr *et al.*, 2014).

L'association du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec la protéine Cdk5 est essentielle pour la différenciation neuronale induite par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Duhr *et al.*, 2014). Cette association est responsable d'une activité constitutive via la phosphorylation du récepteur sur le résidu Ser<sup>350</sup> de son extrémité C-ter (Duhr *et al.*, 2014). L'administration d'un agoniste inverse diminue cette phosphorylation, mettant en évidence sa capacité à inhiber l'interaction entre 5-HT<sub>6</sub> et Cdk5 mais également le caractère réciproque de cette interaction, Cdk5 participant non seulement à la signalisation induite par récepteur mais se comportant également comme un activateur (Duhr *et al.*, 2014).

La protéine Nf1, en interagissant avec l'extrémité C-ter intracellulaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub> induit également une activité constitutive du récepteur. Dans les neurones sous-exprimant Nf1 (par stratégie shRNA) l'administration d'un agoniste inverse ne diminue pas davantage le taux d'AMPc, indiquant une perte complète de l'activité constitutive du récepteur et soulignant le rôle important de Nf1 dans celle-ci (Deraredj Nadim *et al.*, 2016).

# **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**



---

L'activité constitutive est une propriété importante des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> jouant un rôle physiologique dans le développement neuronal grâce à son interaction avec Cdk5 (Duhr et al., 2014; Jacobshagen et al., 2014) et pathologique, via son interaction avec la neurofibromine (Deraredj Nadim et al., 2016). L'exploitation thérapeutique de cette propriété est en cours de développement avec la synthèse de nouveaux composés à propriété agoniste inverse et présentant une activité procognitive dans différents modèles de expérimentaux de déficits cognitif (Zajdel et al., 2016). En revanche, le rôle physiologique et physiopathologique de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et des voies de signalisation dépendantes, dans la douleur neuropathique, *in vivo*, reste à explorer. C'est dans cette perspective que s'inscrit mon travail de thèse avec pour objectifs principaux :

- de confirmer en immunohistochimie la localisation spinale et supra-spinale du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, chez la souris transgénique 5-HT<sub>6</sub>-GFP, déjà démontrée dans le striatum (Deraredj Nadim *et al.*, 2016) et les couches superficielles de la corne dorsale spinale (Abraira *et al.*, 2017), et de préciser sa localisation subcellulaire, dans des conditions physiologiques (souris saines) et pathologiques (souris SNL) ;

- d'explorer par des approches pharmacologiques, de biologie cellulaire et moléculaire si la voie de signalisation mTOR sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de la douleur neuropathique et les comorbidités cognitives associées (Radat *et al.*, 2013; Nadar *et al.*, 2016; Moriarty *et al.*, 2017) à l'aide de ligands classiques et nouvellement conçus (dérivés d'aryl pyrrole carboxamides (APC) permettant de d'évaluer l'activité agoniste-dépendante (antagoniste neutre) et agoniste-indépendante (agonistes inverses) du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et l'effet de l'inhibition de mTOR sur l'allodynie tactile et thermique et sur les comorbidités cognitives induites par la neuropathique traumatique (SNL) chez le rat ;

- de confirmer *in vivo* chez le rat SNL et *in vitro* sur des cultures cellulaires HEK-293 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, le lien entre l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et l'activation de la voie de signalisation mTOR. Après avoir identifié une séquence peptidique de l'extrémité C-ter du récepteur 5-HT<sub>6</sub> responsable de son interaction avec mTOR, nous avons désigné et conçu un peptide mimétique capable d'inhiber l'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>-mTOR, et évalué ses effets *in vivo* ;

- enfin, l'efficacité très limitée des antidépresseurs ISRS (NNT de 6,8) dans le traitement des douleurs neuropathiques et leur bonne tolérance par rapport aux tricycliques (Finnerup *et al.*, 2015) ont motivé sa combinaison avec l'agoniste inverse, à la recherche d'une potentialisation entre la fluoxétine, renforçant la neurotransmission 5-HT et le SB258585, sur l'hypersensibilité et les troubles cognitifs associés chez le rat SNL.

Dans un souci d'étendre nos résultats à d'autres étiologies de neuropathie et aux douleurs par excès de nociception, nous avons amorcé des travaux visant à apprécier l'efficacité de ces traitements pharmacologiques sur la douleur neuropathique chimio-induite (OXA) et la douleur inflammatoire chronique induite par administration intra-articulaire de CFA. Pour ce dernier type de douleur, bien que les AINS et le paracétamol constituent les traitements de référence, d'autres agents thérapeutiques comme les antidépresseurs ISRS ont fait preuve d'efficacité notamment dans les douleurs rhumatismales (Perrot *et al.*, 2006; Patetsos and Horjales-Araujo, 2016)

Enfin, le rôle d'un autre partenaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, la protéine Cdk5 (Duhr *et al.*, 2014) présente dans la moelle épinière (Terada *et al.*, 1998) et dont l'activité est augmentée dans le SNC de rats neuropathiques douloureux (Li *et al.*, 2010) a été abordé dans une étude pilote. Son blocage par la roscovitine diminue le comportement douloureux neuropathique (R. Zhang *et al.*, 2012; K. Li *et al.*, 2014; Lei Yang *et al.*, 2014), et nous avons testé l'effet d'un inhibiteur de Cdk5 nouvellement conçu sur les symptômes douloureux et chez le rat SNL.

# **MATERIELS ET METHODES**



## **Animaux et conditions expérimentales**

Les approches comportementales sont réalisées chez des rats mâles, adultes, de souche Sprague-Dawley (Centre d'élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) pesant entre 125-175 g. A leur arrivée à l'Unité de stabulation animale (USA) des Facultés de Médecine et de Pharmacie, les rats sont hébergés par groupes de quatre dans des cages aux parois transparentes (46 x 26 x 18 cm, Techniplast) dont le plancher est recouvert d'une litière absorbante (SAFE, Augy, France). La litière est changée une fois par semaine.

Certaines approches biomoléculaires sont réalisées chez des souris C57BL/6N knock-in 5-HT<sub>6</sub>-GFP exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à la GFP au niveau du domaine C-ter, générées par recombinaison homologue à l'Institut Clinique de la Souris ([www.ics-mci.fr/fr/](http://www.ics-mci.fr/fr/)) et données gracieusement par l'IGF de Montpellier (P. Marin). L'ADNc codant la GFP a été introduit à la fin de l'exon 4 du gène *htr6*, permettant un étiquetage du récepteur au niveau C-ter. Le récepteur marqué par la GFP présente une expression membranaire et une fonctionnalité similaire au récepteur WT. La construction génétique présente notamment les mêmes niveaux d'activité constitutive et d'affinité pour la 5-HT que le récepteur WT (Deraredj Nadim *et al.*, 2016). L'analyse par Western blot du récepteur 5-HT<sub>6</sub>-GFP immunoprécipité à partir de tissu cérébral de souris 5-HT<sub>6</sub>-GFP révèle l'expression d'une protéine immunoréactive GFP de la taille attendue (Deraredj Nadim *et al.*, 2016), et le schéma de distribution du récepteur 5-HT<sub>6</sub>-GFP dans le cerveau concorde avec celle de son ligand radiomarqué (Roberts *et al.*, 2002).

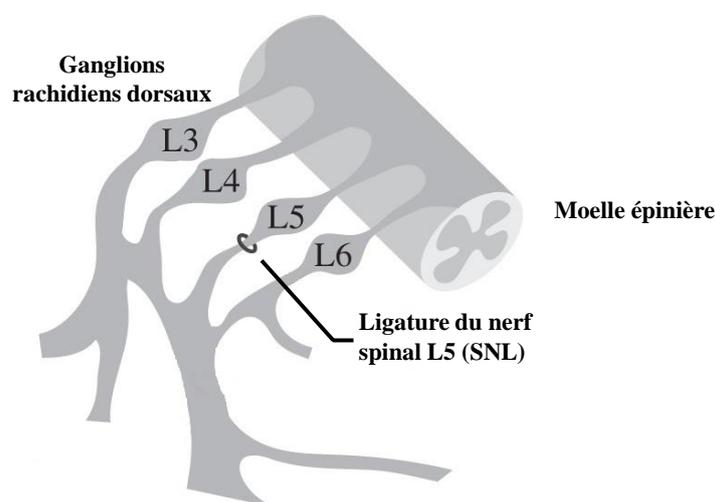
Les animaux ont accès *ad libidum* à la nourriture (A04, aliments composés complets, SAFE, Augy) et à l'eau dans un environnement maintenu à une température de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  selon un cycle jour/nuit de 12 h (7h00-19h00) et une hygrométrie à  $55 \pm 10\%$ . Les rats arrivent à l'USA 7 jours avant le début des expérimentations.

L'USA est une zone EOPS (Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) conventionnée et agréée par le Ministère de l'Agriculture. Le protocole a été soumis à l'approbation du Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Auvergne, CE2A (autorisation n° CE03-12 et autorisation en cours) et sont conformes aux règles NC3R ARRIVE (Kilkenny *et al.*, 2010).

## Modélisation de la douleur chez le rat

### 1. Modèle de douleur neuropathique traumatique : SNL, ligature de la racine du nerf spinal L5 (Kim and Chung, 1992)

Ce modèle symptomatique permet d'induire une douleur neuropathique par ligature du nerf spinal L5 (**Figure 20**) et d'évaluer le comportement douloureux de l'animal en dehors de toute atteinte motrice. Le nerf L4 est laissé intact même si sa proximité immédiate avec le nerf L5 ne permet pas d'exclure son atteinte exceptionnelle lors de la procédure chirurgicale. Sa lésion peut être suivie d'une paralysie flasque de la patte rendant alors l'évaluation de la douleur impossible.



**Figure 20** : Schématisation de l'organisation nerveuse et leurs origines spinales. D'après Starowicz and Przewlocka, 2012.

Les rats sont anesthésiés par une injection i.p. de xylazine (Rompun® 2 %, 10 mg/kg) et de kétamine (Imalgène 1000, 75 mg/kg). La région lombaire dorsale est ensuite tonduée et nettoyée avec de la povidone iodée 10 % (Bétadine®). Peau, aponévrose et muscle paraspinal sont incisés à l'aide d'un scalpel sur environ 2 cm de façon rostro-caudale à partir des crêtes iliaques, 1-2 millimètres latéralement à la colonne vertébrale. Selon la méthode décrite par Kim et Chung (1992), le processus transverse L6 est mis à nu : cet os plat de quelques millimètres de longueur est retiré à l'aide d'une gouge, dégageant ainsi le nerf spinal L5. Le nerf est isolé sur l'extrémité recourbée d'une pipette pasteur puis ligaturé avec un fil de soie (fil mersilk® 5.0 Ethicon®, Johnson & Johnson) en réalisant un nœud simple et serré.

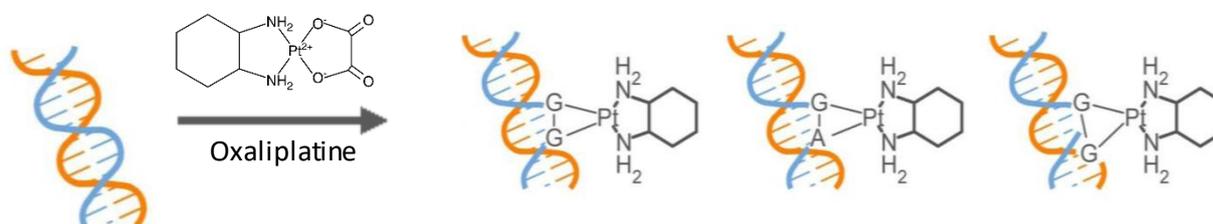
Le muscle est recousu par un surjet (fil monocryl® 4.0 Ethicon®, Johnson & Johnson) et la peau suturée à l'aide d'agrafes de Michel (A75 Perfect, Ets Bruneau). La cicatrice est ensuite désinfectée avec de la Bétadine® et vaporisée d'une solution antibiotique (Négérol®, thiamphénicol 0,095 mg/ml, Céva Santé Animale). Du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) est injecté par voie sous-cutanée (s.c.) (5 ml/kg) pour réhydrater le rat. Avant leur réveil, les rats reçoivent une injection de Meloxicam (Mobic®, 2 mg/kg s.c.). Les animaux sont ensuite placés dans un compartiment chauffé jusqu'à leur réveil et des pellets de nourriture sont déposés dans le fond de la cage afin d'en faciliter l'accès.

Certains rats subissent toutes les étapes de la chirurgie sans ligature : ce sont les rats contrôles désignés par le terme « Sham ».

## **2. Modèle de douleur neuropathique chimio-induit : administration aiguë d'oxaliplatine**

Ce modèle symptomatique permet d'induire une douleur neuropathique toxique par administration i.p. unique d'un agent antinéoplasique (**Figure 21**), l'oxaliplatine (OXA, 6 mg/kg) comme décrit par Ling *et al.* (Ling *et al.*, 2007). L'oxaliplatine (Debiopharm) est diluée dans une solution de glucose à 5% (Freeflex®, Fresenius Kabi).

Le modèle d'administration d'une dose unique d'oxaliplatine permet d'étudier la neurotoxicité aiguë caractérisée par l'apparition d'une hypersensibilité mécanique et thermique au froid se maintenant jusqu'à 7 jours après l'administration (Ferrier *et al.*, 2013).



**Figure 21** : Mécanisme d'action de l'oxaliplatine : Création de ponts inter et intra-brins inhibant la synthèse et la réplication de l'ADN

### **3. Modèle de douleur inflammatoire arthritique : administration intra-articulaire de CFA**

L'induction de la douleur inflammatoire arthritique est réalisée par injection intra-articulaire de 35 à 40  $\mu$ L de d'adjuvant de Freund complet (CFA, *Complete Freund Adjuvant*, Sigma Aldrich) au niveau de la cavité synoviale de la cheville gauche de l'animal sous anesthésie brève à l'isoflurane 3% (Piramal Heathcare). Cet agent, constitué de *Mycobacterium tuberculosis* inactivé en solution dans une émulsion huileuse non-métabolisable, va permettre la libération continue d'antigène stimulant une réponse immunitaire forte et persistante.

Les seuils de retrait de patte suite à une stimulation mécanique sont déterminés avant et 10 jours après l'injection de CFA ou de véhicule.

Dans ce modèle, l'articulation de la patte et les tissus mous environnants sont affectés par une réaction inflammatoire strictement unilatérale et localisée (**Figure 22**).



**Figure 22** : Patte du rat 24 h après injection intraplantaire de véhicule ou de CFA. D'après Sun *et al.*, 2017.

## Mesure de la sensibilité douloureuse

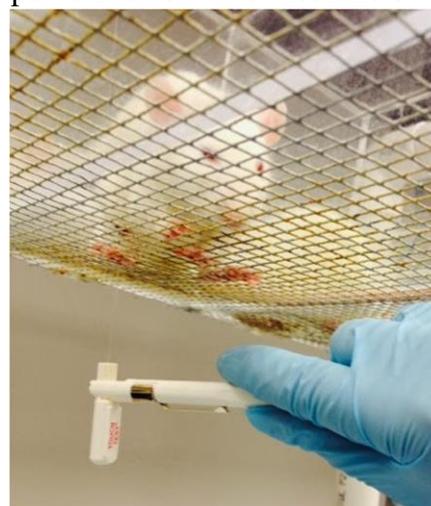
### 1. Evaluation de la sensibilité tactile : test des filaments de Von Frey

Les rats sont placés dans des cellules individuelles en plexiglas (25 × 20 × 25 cm), sur une surface grillagée, pendant 15 à 20 min pour habitude. Une gamme de huit filaments en nylon (Evaluateur sensoriel Touch Test™, Bioseb) permettant d'exercer une force croissante de 1,4 à 26 g selon une échelle logarithmique, est utilisée pour déterminer le seuil de réponse 50 % selon la méthode "up-down" (Dixon, 1980) (**Tableau 3**).

**Tableau 3:** Gamme des filaments de von Frey.

<b>Taille</b>	<b>4,17</b>	<b>4,31</b>	<b>4,56</b>	<b>4,74</b>	<b>4,93</b>	<b>5,07</b>	<b>5,18</b>	<b>5,46</b>
<b>Force (g)</b>	<b>1,4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>26</b>

Les filaments sont appliqués perpendiculairement à la surface plantaire de la patte ipsilatérale à la ligature, entre les coussinets, en commençant par le filament intermédiaire de 6 g (**Figure 23**). Il est nécessaire d'effectuer l'application toujours au même endroit car la sensibilité plantaire du rat décroît des orteils vers le talon. L'application dure 6 sec et la force exercée doit être suffisante pour faire fléchir le filament. Le choix des filaments suivants sera déterminé par la présence ou non de réponse du rat. Si le rat réagit au stimulus, c'est-à-dire s'il retire sa patte, la secoue ou la lèche, le filament suivant choisi sera celui de calibre immédiatement inférieur ; si le rat n'objective aucune réaction, le filament de calibre immédiatement supérieur sera alors appliqué. L'expérience se poursuit jusqu'à ce que 4 filaments soient appliqués après le premier changement de comportement de réponse du rat.



**Figure 23 :** Application d'un filament de von Frey.

**Traitement des données :** Calcul du seuil de réponse 50 % en grammes (g) selon la formule de Dixon (1980) :

$$\text{Seuil de réponse 50 \%} = (10[X_f + \kappa\delta])/10000$$

X<sub>f</sub> : dernier filament appliqué sur la patte (g)

κ : score (fonction du motif obtenu ; appendice de Chaplan *et al.*, 1994)

δ : différence moyenne entre les différents stimuli de la gamme (ici : 0,18)

Une diminution du seuil de réponse 50 % d'au moins 20 % par rapport au seuil initial traduit une allodynie tactile.

## **2. Evaluation de la sensibilité thermique au froid : test d'immersion de la patte**

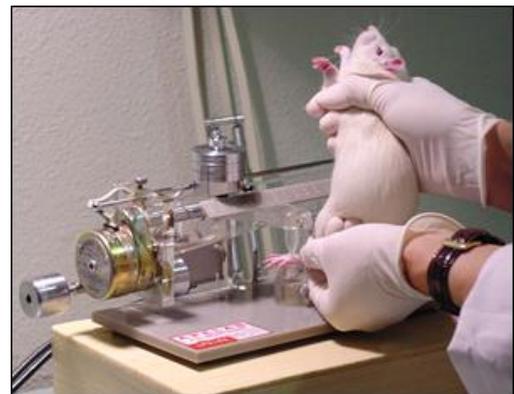
Ce test consiste à immerger la patte du rat dans un bain maintenu à  $15,0 \pm 0,2$  °C jusqu'à ce que le retrait de la patte ou des signes de lutte soient observés (temps maximal d'exposition: 15 sec) (**Figure 24**). L'animal est habitué la veille du test à la contention de façon à limiter le stress le jour de l'expérimentation. La latence de retrait de la patte est mesurée. Une durée d'immersion raccourcie de 20% par rapport au délai de réponse initial, traduit une allodynie thermique.



**Figure 24** : Test d'immersion de la patte.

## **3. Evaluation de la nociception mécanique : test de Randall Selitto**

Le test consiste en l'application d'une force mécanique croissante à l'aide d'un algésimètre Randall-Selitto (Ugo Basile) sur la patte postérieure de l'animal, jusqu'à ce qu'une réponse de vocalisation ou de « *struggle* » se produise (**Figure 25**) (force maximale appliquée : 750 g).



**Figure 25** : Test de Randall-Selitto.

## *Mesure des comorbidités associées à la douleur*

### 1. Troubles cognitifs

Les troubles cognitifs sont souvent retrouvés chez les patients douloureux chroniques (Nadar *et al.*, 2016; Moriarty *et al.*, 2017). Ils affectent différentes fonctions notamment la mémoire, l'attention, la vitesse de traitement et le fonctionnement exécutif (Nadar *et al.*, 2016). Ces troubles sont retrouvés dans différents modèles précliniques de douleur chronique qu'elle soit d'origine inflammatoire (CFA) (Grégoire *et al.*, 2014; Longqiu Yang *et al.*, 2014) ou neuropathique (SNI, SNL et CCI) (Grégoire *et al.*, 2012; Leite-Almeida *et al.*, 2012; Moriarty *et al.*, 2016; Palazzo *et al.*, 2016) chez le rat et la souris. Nous avons donc voulu confirmer la présence de troubles cognitifs chez le rat SNL et évaluer les effets des différents traitements sur ce symptôme. Pour cela, 2 tests permettant d'apprécier les performances cognitives ont été utilisés.

#### 1.1 Test de reconnaissance sociale

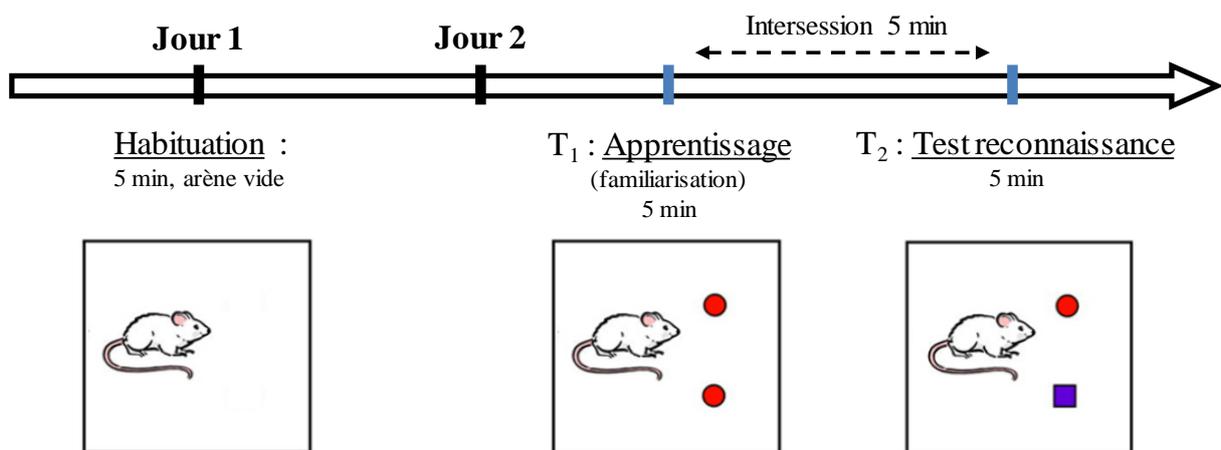
Le test de reconnaissance sociale mesure la capacité d'un rat adulte à reconnaître un congénère plus jeune. Les rats adultes sont hébergés individuellement en condition standard de stabulation 48 h avant le test. Le jour du test, dans des conditions de faible luminosité (30 lux), un rat juvénile est placé dans la cage du rat adulte pendant 10 min. Le temps passé par le rat adulte à interagir socialement avec le rat juvénile (renifler (**Figure 26**), suivre, mordre, sauter et ramper sur ou sous le juvénile) pendant les 5 premières (T<sub>1</sub>) et les 5 dernières minutes (T<sub>2</sub>), est mesuré. En condition normale (non pathologique), les deux rats interagissent fortement pendant les cinq premières minutes du test (T<sub>1</sub>), tandis que durant la seconde période (T<sub>2</sub>), le rat adulte perd son intérêt pour le rat juvénile, marquant ainsi une intégration de l'information. L'absence de désintéressement pendant la seconde période (T<sub>2</sub>) évoque un déficit de mémoire de reconnaissance sociale. Afin d'analyser ces résultats, nous exprimons la différence de temps d'interaction sociale au cours des deux périodes (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>).



**Figure 26 :** Interaction sociale entre le rat adulte et le rat juvénile

## 1.2 Test de reconnaissance d'un nouvel objet

Le test de reconnaissance d'un nouvel objet (NOR, *Novel Object Recognition*) permet d'évaluer la mémoire épisodique. Vingt-quatre heures avant le test, les rats sont individuellement habitués à l'arène (75 x 75 x 50 cm) pendant 5 min. Le jour du test, dans des conditions de faible luminosité (30 lux), le rat est autorisé à explorer librement deux objets familiers, c'est la session de familiarisation (5 min). Après un intervalle d'inter-session de 5 min pendant lequel le rat est replacé dans sa cage d'hébergement, les animaux sont réintroduits dans l'arène avec l'un des objets familiers et un nouvel objet (**Figure 27**). Lors de la seconde session, l'exploration de chaque objet est enregistrée séparément. L'emplacement du nouvel objet varie de façon pseudo-aléatoire au sein des groupes. Le comportement exploratoire est défini comme un reniflement, un toucher et une attention directe envers l'objet (vibrisses actives lorsque le museau se trouve à moins de 3 cm de l'objet). L'escalade de l'objet n'est pas considérée comme un comportement exploratoire et n'est donc pas comptabilisée. Après chaque session, l'arène et les objets sont méticuleusement nettoyés avec une solution d'éthanol à 30%. La mémoire de reconnaissance est exprimée comme un indice de reconnaissance qui est défini comme le rapport entre le temps passé à explorer le nouvel objet et le temps total consacré à l'exploration des objets familier et nouveau.



**Figure 27** : Test de reconnaissance d'un nouvel objet

## 2. Troubles anxieux

Tout comme les troubles cognitifs, les troubles anxieux sont fréquents chez les patients souffrant de douleurs chroniques avec une prévalence estimée à 12,1 % (Radat *et al.*, 2013). Ces troubles sont retrouvés dans différents modèles précliniques de douleur chronique qu'elle soit d'origine inflammatoire (CFA) (Grégoire and Neugebauer, 2013; Grégoire *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017) ou neuropathique (SNL, SNI, CCI et SCI) (Roeska *et al.*, 2009; Grégoire *et al.*, 2012; Leite-Almeida *et al.*, 2012; Galan-Arriero *et al.*, 2014, 2015; Jiang *et al.*, 2014; Alba-Delgado *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2017). Nous avons donc voulu confirmer la présence de troubles anxieux chez le rat SNL et évaluer les effets des différents traitements sur ce symptôme.

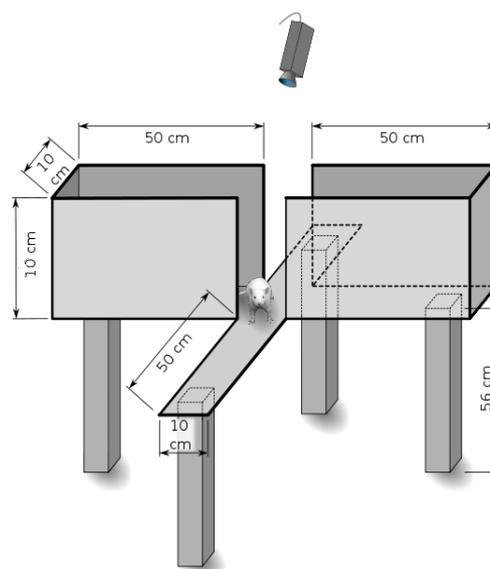
### 2.1 Test du labyrinthe en croix surélevé (EPM, *Elevated Plus Maze*)

Le test du labyrinthe en croix surélevé est couramment utilisé comme un paradigme d'anxiété ; il est basé sur le conflit entre la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement par rapport à celle à éviter les zones ouvertes, étroites et surélevées et à préférer les zones protégées par des parois (thigmotaxisme).

Le labyrinthe est composé de quatre bras en croix ( $50 \times 10$  cm chacun) et est disposé à 56 cm du sol (**Figure 28**). Deux bras opposés sont fermés : ils sont entourés de parois en plexiglas transparent de 10 cm de hauteur. Les deux bras ouverts sont juste bordés d'un pourtour en plexiglas de 2 mm de hauteur afin de limiter le risque de chute des animaux.

L'expérimentation a lieu dans une pièce calme faiblement éclairée (30 lux). Au début de l'expérimentation le rat est placé à l'intersection des quatre bras ( $10 \times 10$  cm), la tête dirigée vers un bras fermé. L'animal est filmé pendant 5 min. A la fin du test, l'animal est replacé dans sa cage et le dispositif nettoyé à l'aide d'une solution d'éthanol (30 %).

Le temps passé dans les bras ouverts et les bras fermés ainsi que le nombre d'entrées effectuées dans chacun des bras, sont comptabilisés. Plus le temps passé dans les bras ouverts est réduit, plus l'animal présente un phénotype anxieux. Les données sont analysées avec le logiciel Ethovision® XT (Noldus).



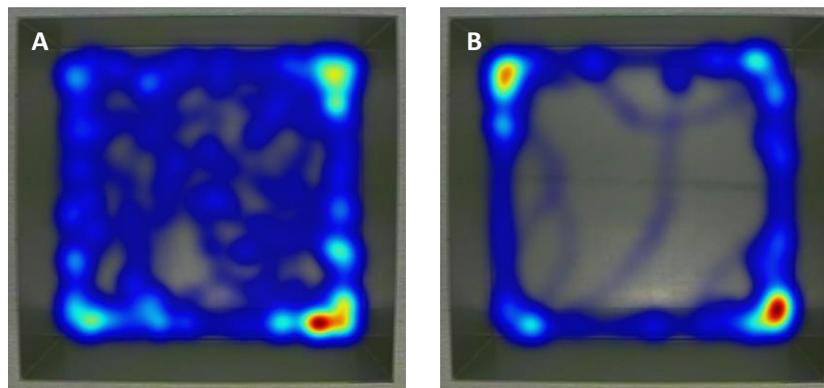
**Figure 28** : Représentation schématique du labyrinthe en croix surélevé

## 2.2 Test de l'arène ouverte ou « Open Field »

Ce test permet d'évaluer la réactivité émotionnelle de l'animal face à un nouvel environnement. Le rat est placé au centre d'une arène en plastique opaque de dimension  $75 \times 75 \times 45$  cm, dans une pièce calme, faiblement éclairée (30 lux).

Cette arène est subdivisée en 2 grandes zones virtuelles : le centre (30 x 30 cm), anxiogène, et la périphérie, non anxiogène. L'animal est initialement placé dans un coin de l'arène durant une période de 5 min au cours desquelles il est filmé. A la fin du test, l'animal est replacé dans sa cage et l'arène est nettoyée à l'aide d'une solution d'éthanol (30 %).

Les séquences enregistrées sont ensuite analysées par le logiciel Ethovision® XT (Noldus). Le temps passé au centre de l'arène et à la périphérie, ainsi que le nombre d'entrées dans la partie centrale sont analysés. Le comportement de thigmotaxie, est interprété comme un phénotype anxieux (**Figure 29**).

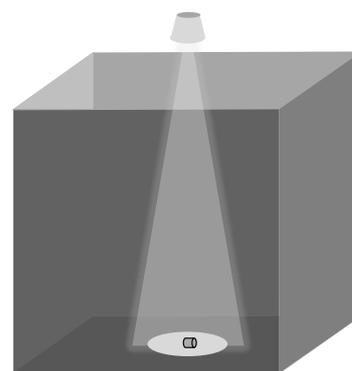


**Figure 29** : Heatmap du parcours des rats dans l'Open Field. (A) Comportement exploratoire sain. (B) Comportement de thigmotaxie.

### 2.3 Test d'hyponéophagie (NSF, *Novelty-Suppressed Feeding*)

Le test d'hyponéophagie (NSF) mesure l'aversion d'un rongeur à s'alimenter dans un nouvel environnement. Ce test évalue l'anxiété induite par un stress (nouvel environnement et forte luminosité) en mesurant la latence d'un animal à approcher et à manger un aliment familier dans un environnement aversif. Une situation de motivation conflictuelle est créée entre celle de se nourrir et la peur de s'aventurer au centre de l'arène fortement éclairé, donc anxiogène pour l'animal.

Les animaux sont privés de nourriture 24 h avant le test. Une heure avant le test, ils sont placés en habituation dans la pièce. Le test est réalisé dans une arène ouverte (75 x 75 x 45 cm) recouverte d'une couche de litière d'environ 1-2 cm; une croquette, identique à celles consommées habituellement, est placée sur un disque de papier blanc (Ø 10 cm) au centre de l'arène. Le centre de l'arène est éclairé, en plus de la lumière de la pièce, par une lampe amovible dont le faisceau lumineux est dirigé au centre de l'arène (900-1000 lux) (**Figure 30**).



**Figure 30** : Représentation schématique du dispositif de test.

L'animal est placé dans un coin de l'arène, face à la paroi. Les latences de reniflement et de grignotage de la croquette sont mesurées manuellement ; dès que l'animal débute le grignotage, il est retiré de l'arène et replacé dans sa cage. La latence maximale est fixée à 5 min. S'il y a présence d'urine et/ou de fèces, une partie de la litière est remplacée par de la litière propre mais il n'est pas nécessaire de changer de litière entre chaque animal. La croquette ainsi que le disque de papier sont changés entre chaque test. Un allongement de la latence indiquera un phénotype anxieux.

Les approches comportementales sont réalisées en aveugle en utilisant la méthode des blocs avec randomisation des traitements afin d'écartier toute influence environnementale incontrôlable pouvant modifier la réponse comportementale des animaux.

## Substances et modalités d'administration

### 1. Substances administrées

Les substances ont été acquises chez :

Tocris Bioscience, UK :

- **SB258585** hydrochloride, antagoniste/agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 523,8 g.mol<sup>-1</sup>
- **phéncyclidine** hydrochloride (PCP), antagoniste non-compétitif du récepteur NMDA, PM = 279,9 g.mol<sup>-1</sup>
- **rapamycine**, inhibiteur de mTOR, PM = 914,2 g.mol<sup>-1</sup>
- **WAY181187** oxalate, agoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 470,9 g.mol<sup>-1</sup>
- **WAY208466** dihydrochloride, agoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 420,3 g.mol<sup>-1</sup>

Département de Chimie Pharmaceutique, Université Jagellon, Cracovie, Pologne :

- **SB742457** (Interpirdine), antagoniste/agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 353,4 g.mol<sup>-1</sup>
- **PZ1388**, agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 498,4 g.mol<sup>-1</sup>
- **PZ668**, antagoniste neutre du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 456,0 g.mol<sup>-1</sup>
- **CPPQ**, antagoniste neutre du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, PM = 517,9 g.mol<sup>-1</sup>

Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont Auvergne

- **FG1061**, inhibiteur de Cdk5, PM = 269,26 g.mol<sup>-1</sup>

Thermo Fisher Scientific, IL, USA

- peptide **TAT-VEPE**, inhibiteur de l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et mTOR, de séquence : [NH<sub>2</sub>]YGRKKRRQRRRFFVTDSVEPVE[COOH], de pureté > 98%, PM = 2711,1 g.mol<sup>-1</sup>
- peptide **TAT** **contrôle** : de séquence [NH<sub>2</sub>]YGRKKRRQRRRTVNEKVS[COOH], de pureté > 98%, PM = 2491,2 g.mol<sup>-1</sup>

Sigma Aldrich, St Louis, USA :

- **CFA** (*Complete Freund Adjuvant*), *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) inactivé en suspension dans une solution huile de paraffine/mannide monooléate

Dochem, Hong Kong Industries CO., Ltd, Chine:

- **Fluoxétine**, antidépresseur ISRS, PM = 309,3 g.mol<sup>-1</sup>

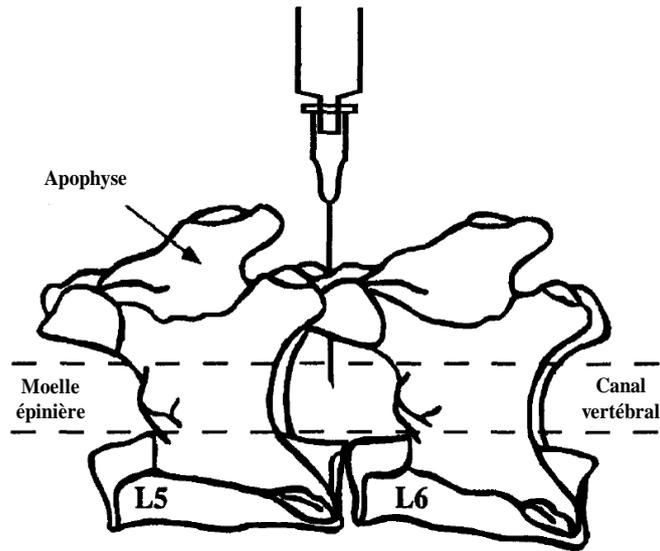
Debiopharm, Suisse:

- **oxaliplatine**, agent antinéoplasique neurotoxique, PM = 397,3 g.mol<sup>-1</sup>

## 2. Voies d'administrations

Afin d'éviter un éventuel biais expérimental induit par répétition des administrations i.p. de l'antidépresseur (garantes d'un plateau de concentration plasmatique stable), la fluoxétine est administrée via un système d'implant s.c. à libération continue. Ces implants ont été conçus par Innovative Research of America (IRA, Floride, USA) pour libérer une dose de 28 mg/jour/kg. La pose sous-cutanée de l'implant est réalisée sous anesthésie gazeuse par inhalation d'isoflurane (3 %). La région dorsale supérieure est tonduée et nettoyée avec de la Bétadine®. La peau est incisée (environ 6 mm) et un tunnel sous-cutané est réalisé d'introduire l'implant au niveau de la région inter-scapulaire. La peau est ensuite suturée à l'aide d'agrafes de Michel et la cicatrice désinfectée avec de la Bétadine®.

Les autres traitements sont administrés soit par voie i.p., soit par voie intrathécale (i.t.). Cette dernière est particulièrement adaptée à l'étude d'effets pharmacologiques au niveau spinal. Elle est réalisée selon la méthode décrite par (Mestre *et al.*, 1994). Le rat est rapidement anesthésié par inhalation d'isoflurane (3 %) et maintenu par l'expérimentateur au niveau de la ceinture pelvienne en décubitus ventral. Une aiguille de 25 G × 1', montée sur une seringue Hamilton de 50 µl, est insérée à travers les tissus entre les épines dorsales des vertèbres lombaires L5 et L6, perpendiculairement à la colonne vertébrale (**Figure 31**). Un mouvement latéral de la queue est observé lorsque l'aiguille pénètre dans l'espace sous-arachnoïdien : ce réflexe est garant de la réussite de l'injection. Le volume d'injection est de 10 µl. La seringue est maintenue en position quelques secondes, puis retirée progressivement afin d'éviter tout reflux de liquide.



**Figure 31** : Représentation schématique d'une injection intrathécale au niveau de l'espace intervertébral L5 et L6. D'après Mestre *et al.*, 1994.

### *Dosage plasmatique de fluoxétine*

Deux mL de sang sont prélevés par ponction intracardiaque après anesthésie au pentobarbital sodique (170 mg/kg, i.p.). Le sang est recueilli sur tube hépariné puis centrifugé 5 min à 4000 G afin de récupérer le plasma. Les taux plasmatiques de fluoxétine et de son métabolite actif, la norfluoxétine sont déterminés par chromatographie liquide haute pression (HPLC), couplée à une détection spectrophotométrique à barrette de diodes (Service de Pharmacologie, CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand).

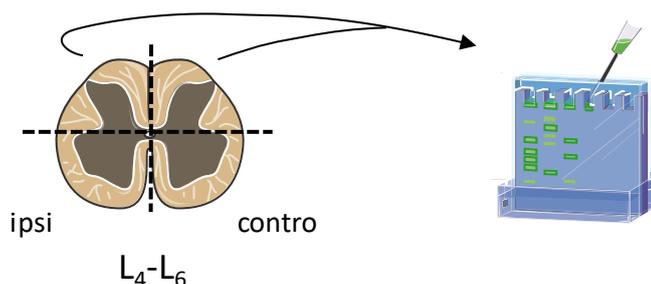
## Etudes biochimiques

### 1. Prélèvements de tissus

Selon le type d'analyses effectuées, deux méthodes de prélèvements de tissus ont été réalisées.

#### 1.1 Prélèvement de tissu frais

Ce type de prélèvement est réalisé en vue d'une analyse protéique quantitative par technique de Western-blot. L'animal est euthanasié par injection i.p. de pentobarbital sodique (44 mg) (Ceva, Santé Animale). Il est rapidement décapité, et la colonne vertébrale est sectionnée au niveau caudal, entre les crêtes iliaques. Du sérum physiologique froid (5 à 15 mL) est injecté dans la colonne vertébrale par l'orifice caudal à l'aide d'une seringue de 50 mL



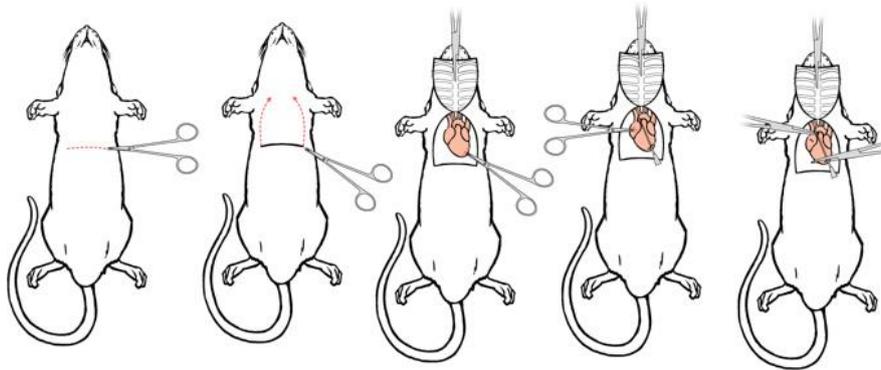
**Figure 32** : Schéma du prélèvement des portions dorsales, droite et gauche de la section L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> de moelle épinière de rat.

montée d'une aiguille 18 G dont l'extrémité a été coupée (longueur : 1 cm). La moelle épinière est alors éjectée sans les racines et le renflement lombaire (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>) est rapidement prélevé et plongé dans l'azote liquide. La section de moelle épinière est alors disséquée selon un plan horizontal et vertical permettant ainsi d'isoler les portions comprenant la corne dorsale et de séparer les deux côtés de la moelle (**Figure 32**). Les tissus sont conservés à -80°C.

#### 1.2 Prélèvement de tissu fixé

Ce type de prélèvement est réalisé en vue d'une observation microscopique des protéines d'intérêt, permettant de localiser précisément leur présence dans différents tissus.

L'animal est euthanasié par injection i.p. de pentobarbital sodique (44 mg) (Ceva, Santé Animale) puis rapidement exsanguiné par perfusion intracardiaque (**Figure 33**) de 100 mL de sérum physiologique froid à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson, Minipuls Evolution®) (débit : 33 mL/min), puis fixé par perfusion de 300 mL d'une solution de paraformaldéhyde 4 % (Sigma-Aldrich) dans du tampon phosphate 0,1M (PBS) froid. Les tissus d'intérêts (moelle épinière, GRD et cerveau) sont prélevés et post-fixés 48 h dans la même solution de paraformaldéhyde 4 % avant d'être transférés dans une solution cryoprotectrice contenant du sucrose 30 % dans du PBS 0,1 M.



**Figure 33** : Schéma de la dissection d'un rat afin de poser le dispositif de perfusion. D'après Gage *et al.*, 2012.

## 2. Immuno-histo-chimie

Tous les tissus fixés sont inclus dans un milieu de congélation de tissu (TFM, General Data Healthcare) et rapidement congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80 ° C. Des coupes transversales de 10-40 µm sont réalisées en utilisant un cryotome (Microm KS 34 et HM 450, Thermo Scientific). Elles sont ensuite conservées à 4 ° C dans du tampon phosphate contenant 0,1% d'azoture de sodium (Sigma-Aldrich)

Les coupes sont perméabilisées et saturées pendant 1 h à température ambiante dans une solution de PBS contenant 0,2% de Triton X-100 (VWR) et 4% de BSA (Sigma-Aldrich) puis incubées pendant une nuit à température ambiante avec l'anticorps primaire anti-GFP (1:500, Invitrogen) dans la même solution de perméabilisation. Les coupes sont ensuite incubées pendant 1 h avec l'anticorps secondaire conjugué à Alexa Fluor 488 (1: 1000, Sigma-Aldrich). Les marquages immunofluorescents sont observés avec un microscope Eclipse Ni-E (Nikon) équipé d'une épifluorescence. Les images sont acquises en utilisant le logiciel NIS-Elements 4.13 (Nikon) pilotant une caméra ORCA Flash 4.0 (Hamamatsu).

### 3. Western-Blot

Les protéines issues de tissus frais ou de cultures cellulaires sont extraites par lyse cellulaire à 4 °C, centrifugation (20 min à 12 000 G) et dénaturation (ajout de tampon Laemmli 20 % et chauffage à 100 °C pendant 5 min). Les protéines sont séparées par électrophorèse (1,5 h à 120 V) sur gel d'acrylamide 10 % (TGX Stain-Free™ FastCast™, Biorad) dans du tampon TG-SDS, puis transférées sur membrane de nitrocellulose avec un système Trans-Blot® Turbo™ (Biorad). Les membranes sont ensuite saturées pendant 1 h dans une solution de tampon phosphate à 0,1 % de Tween (Sigma-Aldrich) et 5 % de BSA (Sigma-Aldrich) et incubées la nuit à 4 °C avec la solution de saturation contenant 0,1 % d'anticorps primaire : p<sup>Ser2448</sup>-mTOR, mTOR, p<sup>Ser240/244</sup>-S6, S6, p<sup>42/44</sup>MAPK (Erk1/2),  $\beta$ -actin (Cell Signaling). Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (HRP). La révélation se fait par réaction de bioluminescence entre la HRP et le substrat (Clarity™ Western ECL). Les clichés sont pris par un dispositif de détection CCD haute résolution (ChemiDoc™ XRS+, Biorad) permettant l'obtention d'une image numérique qui est analysée par densitométrie à l'aide du logiciel Image Lab™ (Biorad).

### Etudes cellulaires

Afin d'étudier les mécanismes biomoléculaires mis en jeu par l'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, des cultures de cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) sont utilisées. Cette lignée cellulaire spécifique est dérivée de cellules rénales embryonnaires humaines ; elle est largement utilisée en raison de sa croissance fiable et de sa facilité à la transfection.

Les plasmides suivants sont transfectés dans les cellules HEK-293 à l'aide d'un kit Viromer® RED (Lipocalyx) :

CMV HA-5-HT<sub>6</sub>

CMV HA-5-HT<sub>6</sub>-GFP

CMV HA-5-HT<sub>6</sub>  $\Delta^{391}$  (partie C-ter tronquée de 49 AA)

CMV HA-5-HT<sub>6</sub>  $\Delta^{413}$  (partie C-ter tronquée de 28 AA)

CMV HA-5-HT<sub>6</sub>  $\Delta^{426}$  (partie C-ter tronquée de 21 AA)

Les 4 premiers plasmides ont été gracieusement donnés par Dr Philippe Marin (IGF, Montpellier). Le dernier a été généré par mutation dirigée du plasmide 5-HT<sub>6</sub> WT (**Figure 34A**). Cette mutation permet l'introduction d'un codon STOP à la place de l'acide glutamique en position 426 (**Figure 34B**). Elle a été réalisée à l'aide d'un kit de mutagenèse dirigée QuikChange (Agilent Technologies) et le produit de PCR a été transformé dans des bactéries DH5 $\alpha$  (Library Efficiency™, Invitrogen) afin d'en extraire le nouveau plasmide, CMV HA-5-HT<sub>6</sub>  $\Delta$ <sup>426</sup>.



**Figure 34 :** (A) Primers de mutagenèse dirigée utilisés. (B) Introduction d'un codon STOP en position 426.

Les cellules transfectées exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sous ses différentes formes sont ensuite stimulées par un agoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (le WAY208466, 1  $\mu$ M) (Tocris Bioscience) à 37°C pendant 3 min. Les cellules sont ensuite rincées avec une solution de PBS froid puis lysées afin d'en extraire les protéines. Une analyse quantitative de ces protéines est enfin réalisée par technique de Western-blot. Les techniques d'extraction protéique et de Western-blot sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

## **Méthodologie et statistiques**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  E.S. à la moyenne.

Les aires sous la courbe (A.U.C., *Area Under the Curve*) des variations des seuils de réponse sont calculées selon la méthode des trapèzes entre 0 et 180 min et sont exprimées en g.min.

Pour les tests de sensibilité, afin de comparer l'évolution de chaque paramètre dans le temps en fonction des traitements, une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées (deux facteurs) est réalisée afin de déterminer les effets du temps et du traitement. Si une interaction significative entre le facteur temps et le facteur groupe est observé, l'ANOVA est suivie d'un

---

test *post-hoc* de *Dunnnett* afin de comparer les différents groupes à un même temps et d'analyser l'effet des traitements pharmacologiques au cours du temps.

Pour la comparaison des A.U.C. et des données issues des tests d'anxiété, de cognition, et des études biochimiques et cellulaires, une ANOVA à un facteur suivie d'un test de *Bonferroni* est réalisée. Lorsque la comparaison est réalisée sur un jeu de données comportant 2 groupes, un *t test* à échantillons appariés est réalisé.

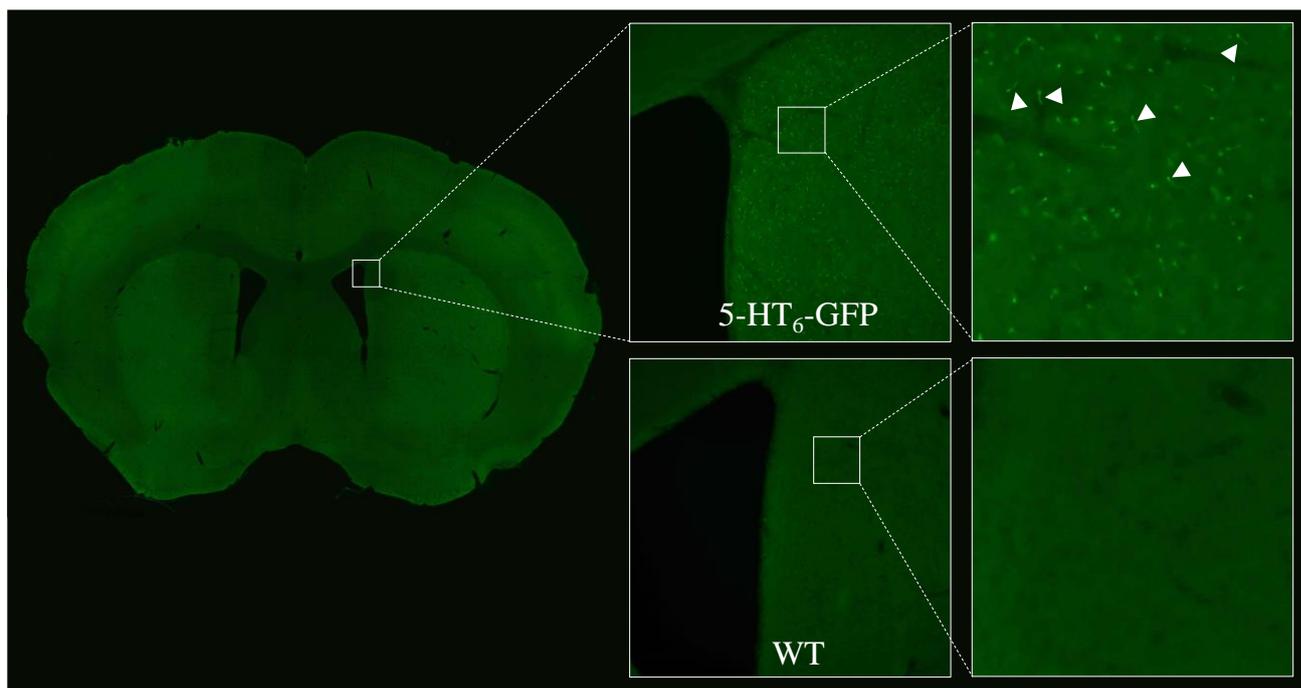
Le pourcentage d'effet maximal possible (EMP), permettant d'apprécier l'efficacité d'un traitement pharmacologique sur l'hypersensibilité tactile et thermique est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ de l'EMP} = \frac{\text{Seuil}_{\text{Avant SNL}} - \text{Seuil}_{\text{Après SNL}}}{T_{X \text{ min}} - \text{Seuil}_{\text{Après SNL}}}$$

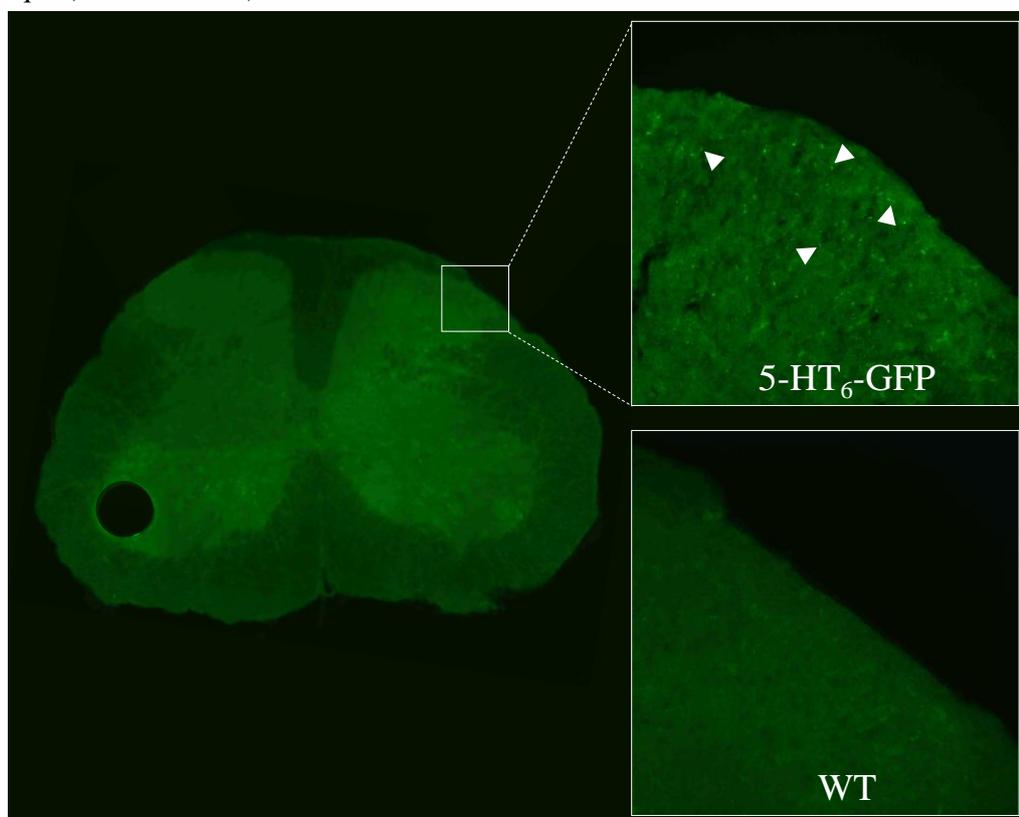
Le seuil de significativité  $\alpha$  est fixé à 5 %. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad, Prism.



# **RESULTATS**



**Figure 35** : Immunomarquage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur coupe de cerveau avec un anti-GFP. Forte densité du récepteur dans le striatum. Localisation du récepteur dans les cils primaires dont la forme est caractéristique (flèche blanche)



**Figure 36** : Immunomarquage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur coupe de moelle épinière avec un anticorps anti-GFP. Le récepteur est présent au niveau des cils primaires (flèches blanches).

## ***Chapitre 1. Localisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le SNC de souris 5-HT<sub>6</sub>-GFP***

À ce jour, aucun anticorps anti-récepteur 5-HT<sub>6</sub> du commerce n'est fiable et ne permet d'évaluer la localisation cellulaire et subcellulaire du récepteur dans le SNC. C'est pour cette raison que nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant la GFP au niveau du domaine C-ter du récepteur, générées par recombinaison homologue à l'Institut Clinique de la Souris ([www.ics-mci.fr](http://www.ics-mci.fr)).

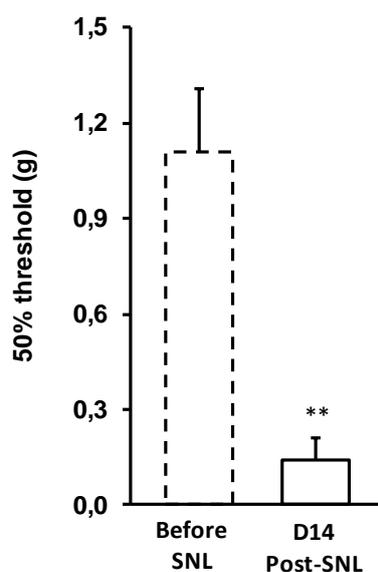
Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est fortement exprimé dans le striatum de rat et d'homme (Ward *et al.*, 1995; Gérard *et al.*, 1997; Marazziti *et al.*, 2012, 2013), et chez la souris 5-HT<sub>6</sub>-GFP (Deraredj Nadim *et al.*, 2016). La présence spinale du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez la souris (5-HT<sub>6</sub>-GFP-reportrice, GENSAT Founder: FV41) a récemment été rapportée dans les interneurons excitateurs des couches III à IV externe de la corne dorsale (Abraira *et al.*, 2017).

Afin de confirmer la présence du récepteur au niveau de la moelle épinière, notamment dans les couches superficielles de la corne dorsale, zone de relai et de modulation de l'information douloureuse, un marquage anti-GFP a été réalisé sur des coupes de moelle épinière du renflement lombaire (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>) et de striatum (contrôle positif) de souris 5-HT<sub>6</sub>-GFP sham et SNL, et de souris WT.

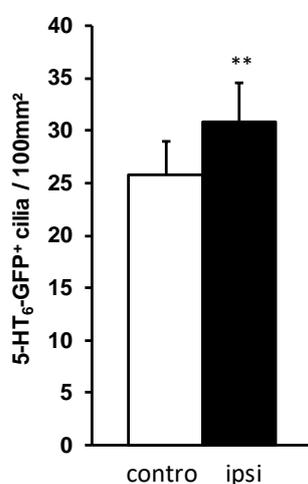
Par cette approche, nous souhaitons (i) confirmer la localisation spinale et supra-spinale du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, (ii) étudier sa localisation subcellulaire, (iii) évaluer si, en condition neuropathique (SNL), il y a modification de sa localisation et/ou de son niveau d'expression.

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> présente un fort niveau d'expression dans le striatum des souris 5-HT<sub>6</sub>-GFP (**Figure 35**). Sa distribution semble être exclusive au cil primaire. Chez les souris WT, l'absence de marquage permet de vérifier la spécificité du marquage utilisé.

Dans la moelle épinière, le récepteur est présent au niveau des couches superficielles I à III de la corne dorsale (**Figure 36**). Il semblerait que sa distribution soit également ciliaire bien que la longueur des cils et le nombre de cils marqués soient moins importants que dans le striatum.



**Figure 37** : Evolution des seuils de retrait 50% de la patte postérieure ipsilatérale à la ligature du nerf spinal L5 (SNL) (n = 5/groupe). Les valeurs sont exprimées en g  $\pm$  E.S..  
 \*\*  $p < 0,005$  par rapport aux valeurs mesurées avant SNL (Before SNL), d'après un t test à échantillons appariés.



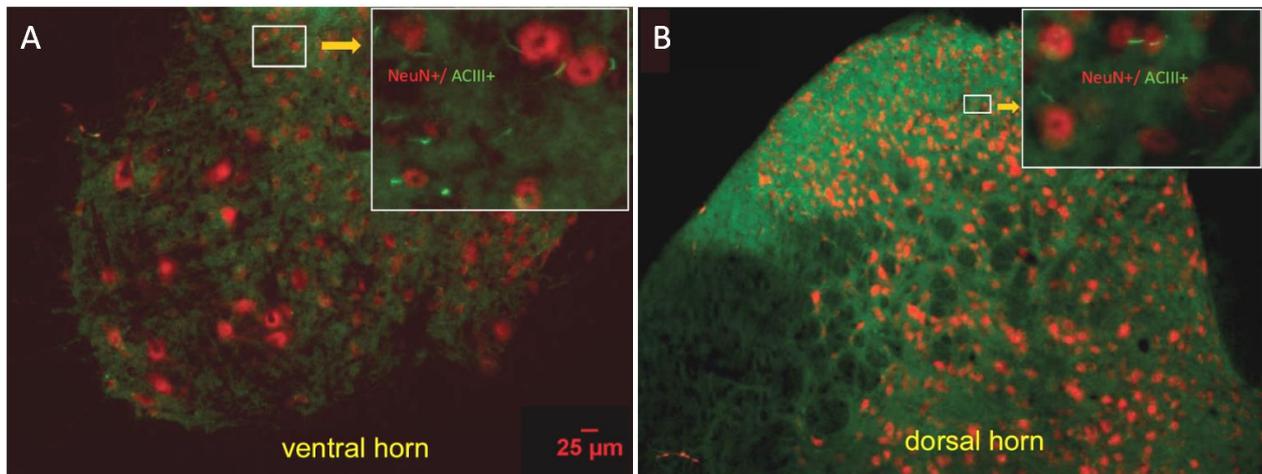
**Figure 38** : Nombre de cils primaires 5HT<sub>6</sub>-GFP<sup>+</sup> par 100 mm<sup>2</sup> au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière (n = 15/groupe). Les valeurs sont exprimées en nombre  $\pm$  E.S..  
 \*\*  $p < 0,005$  par rapport au nombre de cils marqués côté controlatéral à la lésion, d'après un t test à échantillons appariés.

Cette approche validée, nous nous sommes intéressés aux variations d'expression et de localisation du récepteur en condition neuropathique. Pour cela, la ligature du nerf spinal L5 a été réalisée chez des souris transgéniques 5-HT<sub>6</sub>-GFP. Les seuils de sensibilité tactile, mesurés par application de filaments de von Frey sur la patte ipsilatérale à la lésion ont été évalués avant chirurgie et 14 jours après.

Les souris SNL présentent une allodynie tactile caractérisée par une diminution moyenne de  $88,8 \pm 4,2$  % des seuils de retrait de la patte 14 jours après la chirurgie ( $1,11 \pm 0,20$  g avant SNL vs  $0,14 \pm 0,07$  g après SNL) (**Figure 37**).

Chez ces souris, une augmentation significative moyenne de  $22,3 \pm 6,8$  % du nombre de cils primaires positifs au marquage 5-HT<sub>6</sub>-GFP par 100 mm<sup>2</sup> est observée au niveau de la corne dorsale ipsilatérale à la lésion ( $25,73 \pm 3,21$  cils côté controlatéral vs  $30,87 \pm 3,72$  cils côté ipsilatéral) (**Figure 38**). Le marquage est toujours spécifique du cil primaire indiquant une absence de modification de la localisation subcellulaire du récepteur en condition neuropathique.

Les résultats issus de ces travaux sont les premiers à révéler une localisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les cils primaires des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière des souris transgéniques 5-HT<sub>6</sub>-GFP. La présence abondante du récepteur dans le striatum de ces souris est confirmée, corroborant les données de (Deraredj Nadim *et al.*, 2016), même si ces dernières n'ont pas mis en évidence la localisation ciliaire du récepteur, conformément aux observations de Hamon *et al.*, (1999) dans le noyau accumbens de rat.



**Figure 39** : Les cils primaires marqués par ACIII sont issus de neurones marqués au NeuN dans la moelle épinière. Des images microscopiques représentatives montrent la co-localisation globale de ACIII (vert) et NeuN (rouge) dans la corne ventrale (**A**) et la corne dorsale (**B**) de la moelle épinière L3 chez la souris. À plus fort grossissement, la forme caractéristique en bâtonnet des cils primaires (verts) marqués par ACIII, en provenance des neurones marqués au NeuN (en rouge) est observée. D'après Ma *et al.*, 2011.

La réalisation d'une co-localisation de la GFP avec un marqueur ciliaire neuronal spécifique tel que ACIII (Bishop *et al.*, 2007; Berbari *et al.*, 2014; Brodsky *et al.*, 2017) ou Arl13b (Kasahara *et al.*, 2014; Kowal and Falk, 2015) devrait confirmer l'expression spécifique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les cils primaires de la moelle épinière. Nos observations morphologiques des cils primaires 5-HT<sub>6</sub><sup>+</sup> sur les coupes de moelle épinière correspondent bien à celles des cils primaires neuronaux marqués avec l'ACIII dans la corne spinale ventrale et dorsale de souris (**Figure 39**) (Ma *et al.*, 2011).

En condition de douleur neuropathique induite par la ligature du nerf spinal chez la souris, une augmentation du nombre de cils primaires 5-HT<sub>6</sub><sup>+</sup> a lieu. Ces observations renforcent l'hypothèse du rôle délétère du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur neuropathique et identifie un nouveau mécanisme physiopathologique associé au récepteur. Cependant aucune modification du niveau d'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> n'a été retrouvée chez le rat SNL (Pineda-Farias *et al.*, 2017) pouvant être expliquée par (i) une modification de l'expression du récepteur en condition neuropathique espèce-dépendante, (ii) une relocalisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> indépendante de son niveau d'expression chez le rat douloureux ou encore (iii) un manque de spécificité et/ou de précision de la technique de détection (WB) du récepteur utilisée dans cette étude.

Le cil primaire étant capable de modifier sa morphologie en réponse aux conditions environnementales (Malicki and Johnson, 2017), et l'administration d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub> (SB399885) réduisant sa longueur dans des cultures de neurones primaires (Brodsky *et al.*, 2017), il serait à présent intéressant (i) d'étudier la morphologie des cils primaires 5-HT<sub>6</sub><sup>+</sup> en condition saine, neuropathique et après traitement avec les agonistes inverses et (ii) de caractériser le(s) type(s) cellulaire(s) sur lesquels sont localisés ces cils primaires 5-HT<sub>6</sub><sup>+</sup> afin de mettre à jour les mécanismes physiopathologiques associés au récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur neuropathique.

Enfin, il serait pertinent d'étudier chez ces souris l'activation de la voie mTOR dans la moelle épinière en condition saine, douloureuse et après traitement afin de mettre en évidence une interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et mTOR et/ou un lien entre l'augmentation du nombre de cils primaires 5-HT<sub>6</sub><sup>+</sup> et l'hyperactivation de la voie mTOR dans la douleur neuropathique.



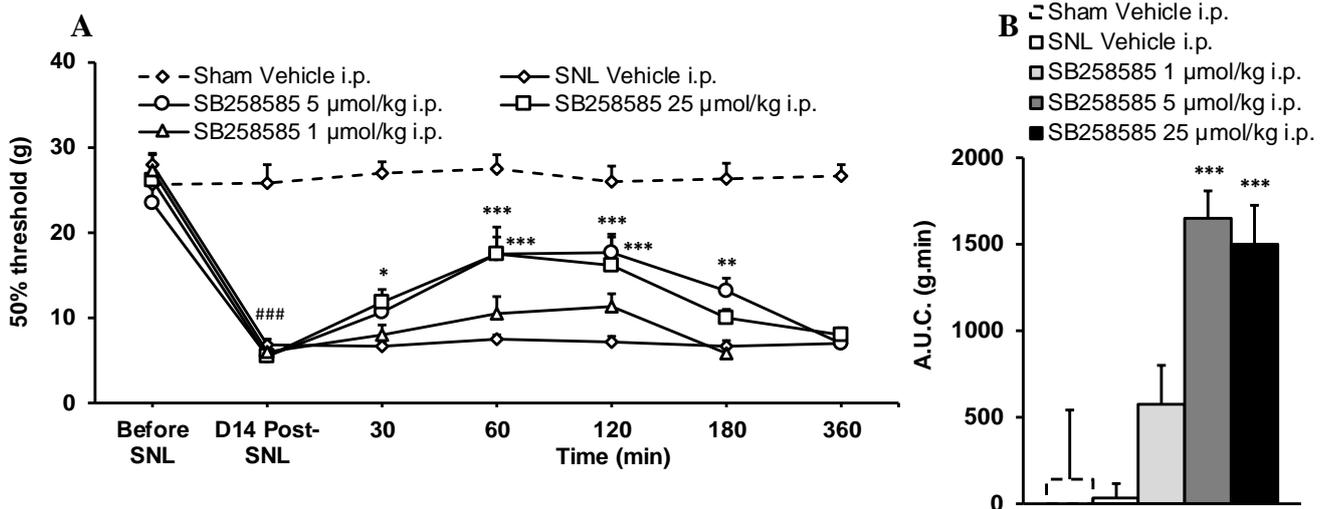
## ***Chapitre 2. Implication du couplage de la voie mTOR avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur neuropathique***

La revue de la littérature indique que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la voie de signalisation mTOR occupent une place intéressante pour le développement de nouveaux antalgiques pour le traitement de la douleur neuropathique et des troubles cognitifs associés. Pour rappel, leur blocage/inhibition est anti-allodynique et/ou procognitif dans différents modèles animaux de douleur neuropathique ou de déficits cognitifs (Hirst *et al.*, 2006; Loiseau *et al.*, 2008; Geranton *et al.*, 2009; Codony *et al.*, 2011; Devegowda *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; X. Wang *et al.*, 2016)

Nous avons évalué si le blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de l'activité mTOR au moyen de ligands classiques (SB258585 et SB742457) et nouvellement conçus (PZ1388) est efficace pour améliorer les symptômes douloureux et les déficits cognitifs induits par la ligation du nerf spinal chez le rat. Nous avons ensuite étudié les mécanismes intracellulaires consécutifs à l'activité des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et, en particulier, le rôle de la voie de signalisation mTOR au niveau spinal.

Pour cela, quatorze jours après l'induction de la neuropathie par SNL, les rats ont reçu une injection aiguë de SB258585 (1-25 µmol/kg, i.p. et 20-200 pmol/rat, i.t.), ou de SB742457 (5-75 µmol/kg, i.p.), ou de PZ1388 (1-25 µmol/kg, i.p.), et/ou de PZ668 (2 nmol/rat, i.t.), et/ou de CPPQ (2 nmol/rat, i.t.), ou de TAT-VEPE (30-300 ng/kg, i.t.), ou de rapamycine (0,3-10 nmol, i.t.), ou des véhicules respectifs. Un suivi de la sensibilité tactile ou thermique a été réalisé à l'aide du test des filaments de von Frey et du test d'immersion de la patte dans un bain à 15°C, ainsi qu'une évaluation des performances cognitives à l'aide des tests de reconnaissance sociale et de reconnaissance d'objet (NOR).

Quatre-vingt-quinze % des rats SNL développent une allodynie tactile à l'application des filaments de von Frey et une allodynie thermique à l'immersion de la patte dans un bain à 15 °C, 14 jours après SNL, comme le montre la diminution importante des seuils de retrait 50 % de la patte (5,62 ± 0,14 vs 28,30 ± 0,21 g avant SNL, d'après un t test à échantillons appariés apparié  $p < 0,0001$ ) et la latence de retrait de la patte immergée dans l'eau froide (6,34 ± 0,29 vs 13,70 ± 0,29 s avant la chirurgie, d'après un t test à échantillons appariés apparié  $p < 0,0001$ ).



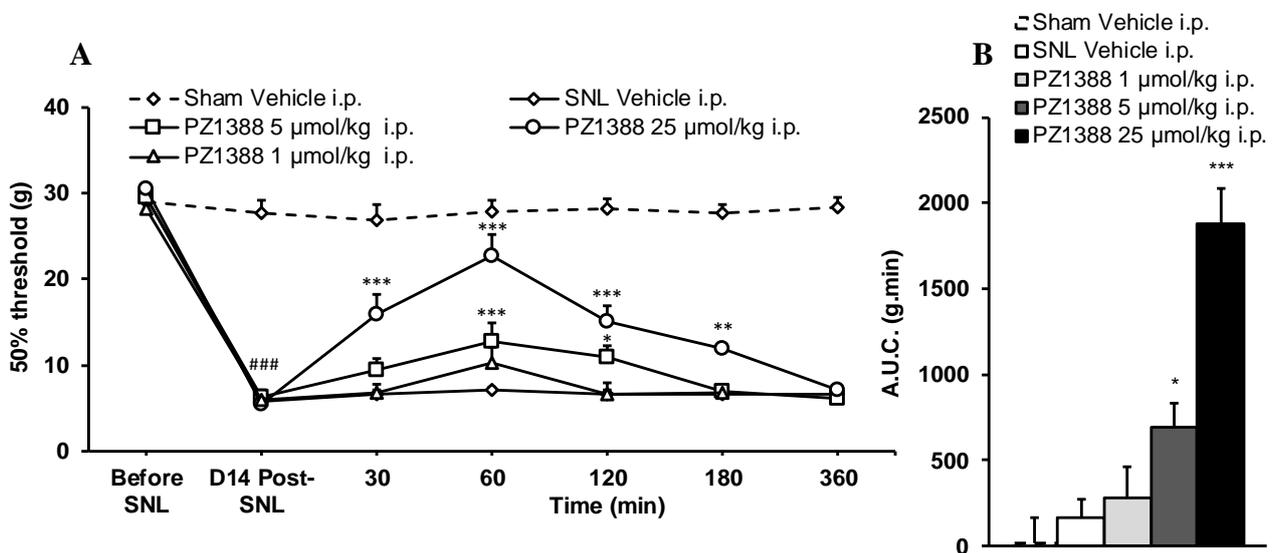
**Figure 40 :** (A) Evolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 mL/kg) ou de SB258585 (5 et 25 µmol/kg) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(B) Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0 à 180 min) des variations de seuils de retrait 50 %. Les valeurs sont exprimées en g.min ± E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.



**Figure 41 :** (A) Evolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 mL/kg) ou de PZ1388 (1-25 µmol/kg) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivies d'un test de Dunnett.

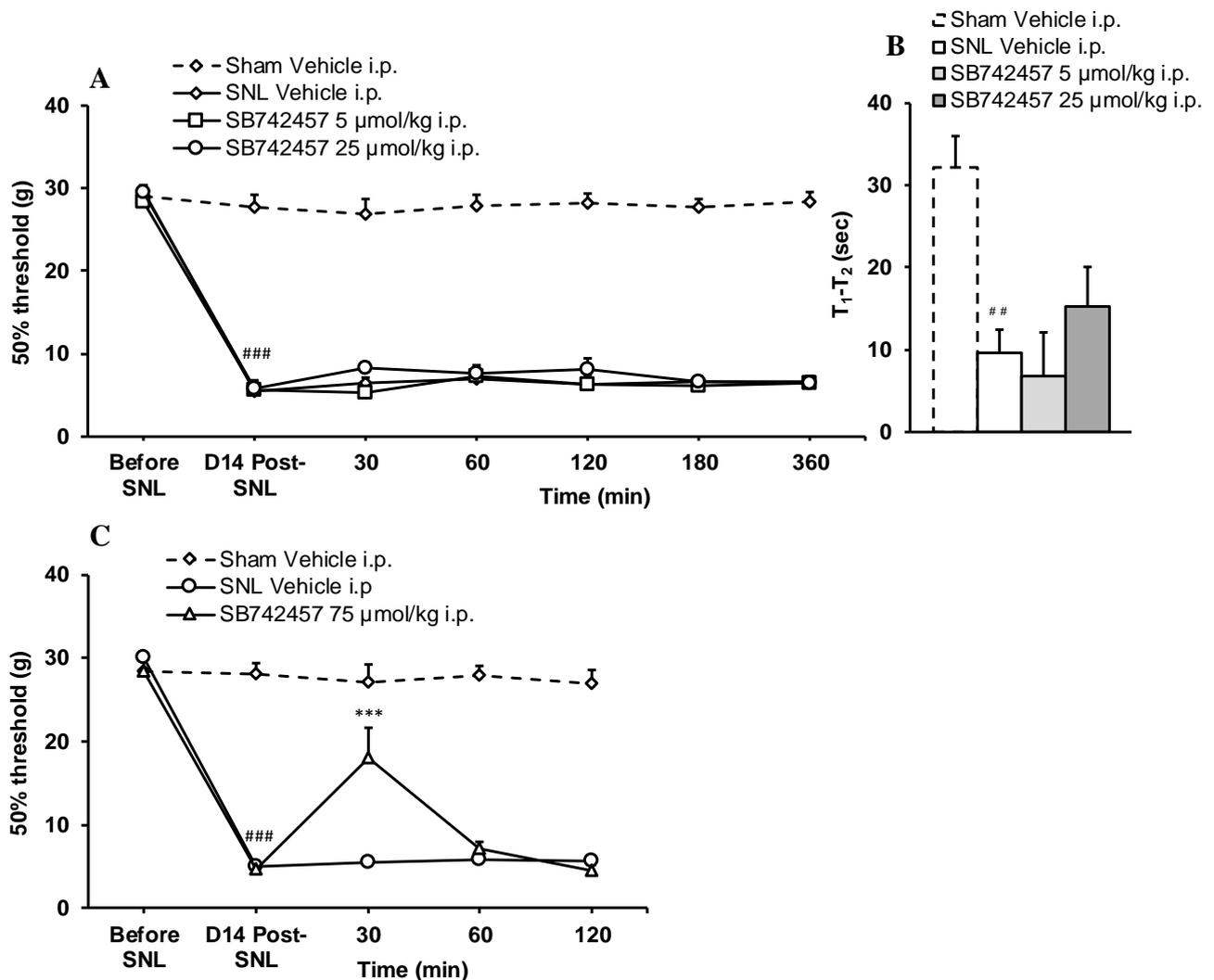
(B) Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle de 0 à 180 min des variations de seuils de retrait 50 %. Les valeurs sont exprimées en g.min ± ES.

\*  $p < 0,001$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

***Les ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub> affectent différemment l'allodynie tactile et thermique induite par SNL.***

L'administration systémique de SB258585 (5, 25 µmol/kg i.p.), classé comme antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, réduit partiellement l'allodynie tactile induite par SNL de 30-60 min à 180 min après l'injection (**Figure 40A**). L'acmé de l'effet est observée à T<sub>60</sub> et est identique pour les doses de 5 et 25 µmol/kg (17,43 ± 2,09 g et 17,44 ± 3,12 g), augmentation correspondant respectivement à 72,2 ± 9,5 % et 62,7 ± 20,2 % de l'effet maximal possible (EMP). L'effet anti-allodynique global mesuré par les A.S.C. (A.U.C.) (**Figure 40B**) des deux doses est identique (1644,8 ± 161,0 g.min et 1494,7 ± 232,4 g.min pour 5 et 25 µmol, respectivement).<sup>1</sup>

L'administration intrapéritonéale de PZ1388 (5, 25 µmol/kg), augmente de façon dose-dépendante les seuils de retrait de la patte de 30 à 180 minutes pour la dose de 25 µmol/kg et de 60 à 120 minutes pour la dose de 5 µmol/kg après l'injection (**Figure 41A, B**). L'acmé de l'effet est également observé à T<sub>60</sub> (12,72 ± 2,26 g et 22,76 ± 2,49 g), augmentation correspondant respectivement à 26,8 ± 9,9 % et 68,4 ± 10,9 % de l'EMP. L'effet global du composé mesuré par les A.S.C. confirme un effet dose-dépendant. Par conséquent, la dose la plus efficace, de 25 µmol/kg a été utilisée pour la suite des études comportementales.



**Figure 42 :** (A,B) Évolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau ppi, 5 mL/kg) ou de SB742457 (5-75 μmol/kg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

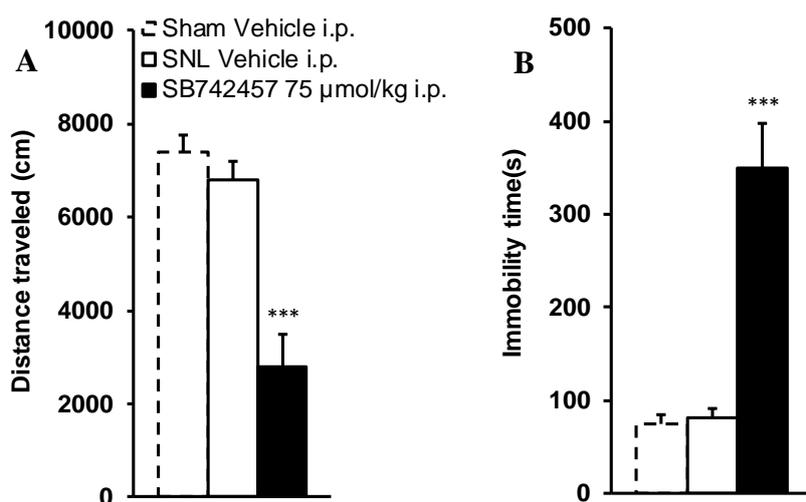
C) : Effet de l'administration i.p. de Véhicule (5 mL/kg) ou de SB742457 (5 et 25 μmol/kg) sur la différence de temps (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première (T<sub>1</sub>) et la seconde (T<sub>2</sub>) période du test (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en sec ± ES.

##  $p < 0,01$  par rapport au groupe Sham Vehicle, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

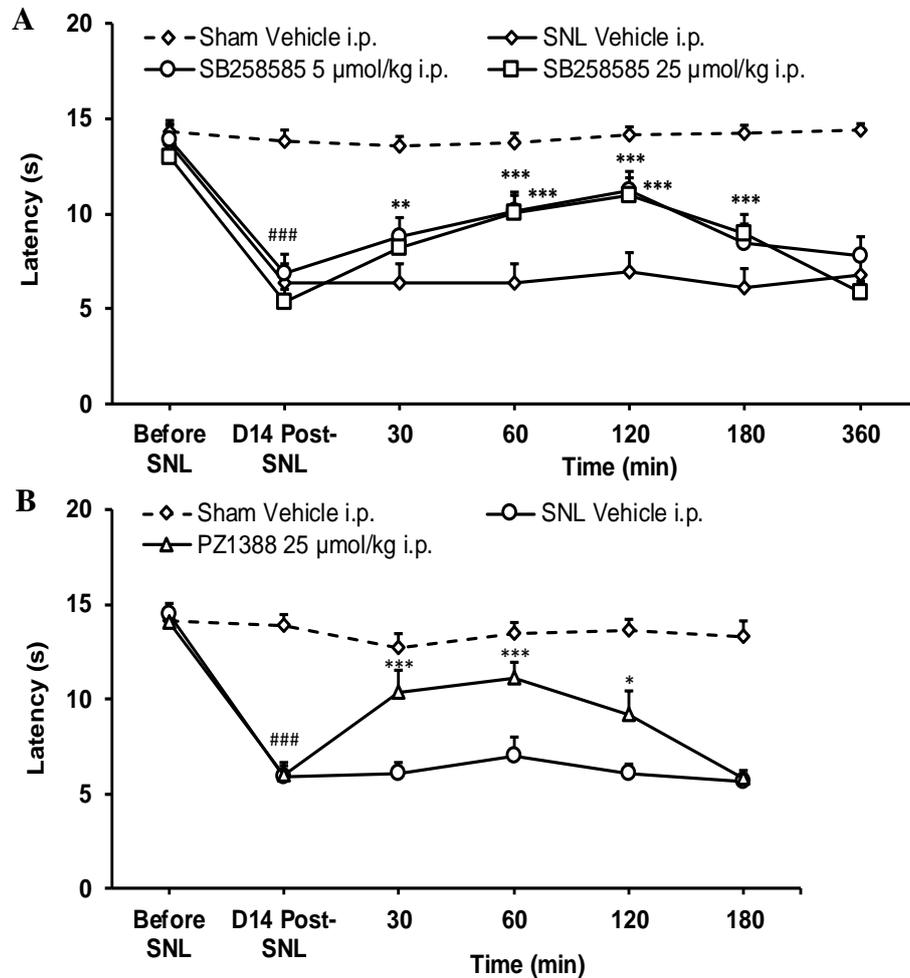
Le SB742457 (ou intepirdine) dont le développement a été récemment arrêté suite aux échecs en essais de phases III dans la MA et les démences à corps de Lewy, a été administré aux doses de 5, 25 et 75  $\mu\text{mol/kg}$  ; ces doses ont été choisies d'après celles utilisées par l'équipe du Dr Zajdel (3, 10 et 30 mg/kg) dans le modèle OXA chez le rat (données non publiées). Alors que les doses de 5 et 25  $\mu\text{mol/kg}$  ne modifient pas les seuils de retrait 50 % (**Figure 42A**) et l'altération des performances cognitives (**Figure 42B**), celle de 75  $\mu\text{mol/kg}$  entraîne une augmentation significative des mêmes seuils correspondant à  $54,1 \pm 13,8$  % de l'EMP ( $18,08 \pm 3,53$  g T<sub>30</sub> vs  $4,87 \pm 0,48$  g après SNL) (**Figure 42C**).

Néanmoins, lors du test, certains rats présentent une sédation importante 15-45 min après l'administration de SB742457. Afin de confirmer ces observations, un test d'Open-Field, permettant d'évaluer la locomotion ainsi que l'immobilité des animaux, est réalisé à T<sub>30</sub> post-injection de SB742457 (75  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou de véhicule. L'analyse de la distance totale parcourue (**Figure 43A**) et de la durée d'immobilité (**Figure 43B**) durant les 5 minutes d'enregistrement, met en évidence une diminution moyenne de  $58,7 \pm 11,2$  % de la distance totale parcourue ( $2788,10 \pm 717,58$  cm vs  $6812,21 \pm 393,79$  cm SNL Vehicle i.p.) et une augmentation moyenne de  $458 \pm 68,2$  % de la durée d'immobilité ( $349,49 \pm 47,67$  sec vs  $81,74 \pm 9,99$  cm SNL Vehicle i.p.) signant un effet sédatif du SB742457.

L'augmentation des seuils de retrait observée à T<sub>30</sub> n'est donc pas spécifique d'un effet anti-allodynique mais relève d'un effet sédatif de l'antagoniste. Le SB742457 a donc été abandonné pour la suite de mon travail de thèse.



**Fig. 43** : Effet de l'administration i.p. de Véhicule ou de SB742457 (75  $\mu\text{mol/kg}$ ) sur la distance totale parcourue (C) et la durée d'immobilité (D) du rat durant 5 minutes dans l'arène d'Open Field (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées respectivement en cm et sec  $\pm$  E.S..  
\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Vehicle, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.



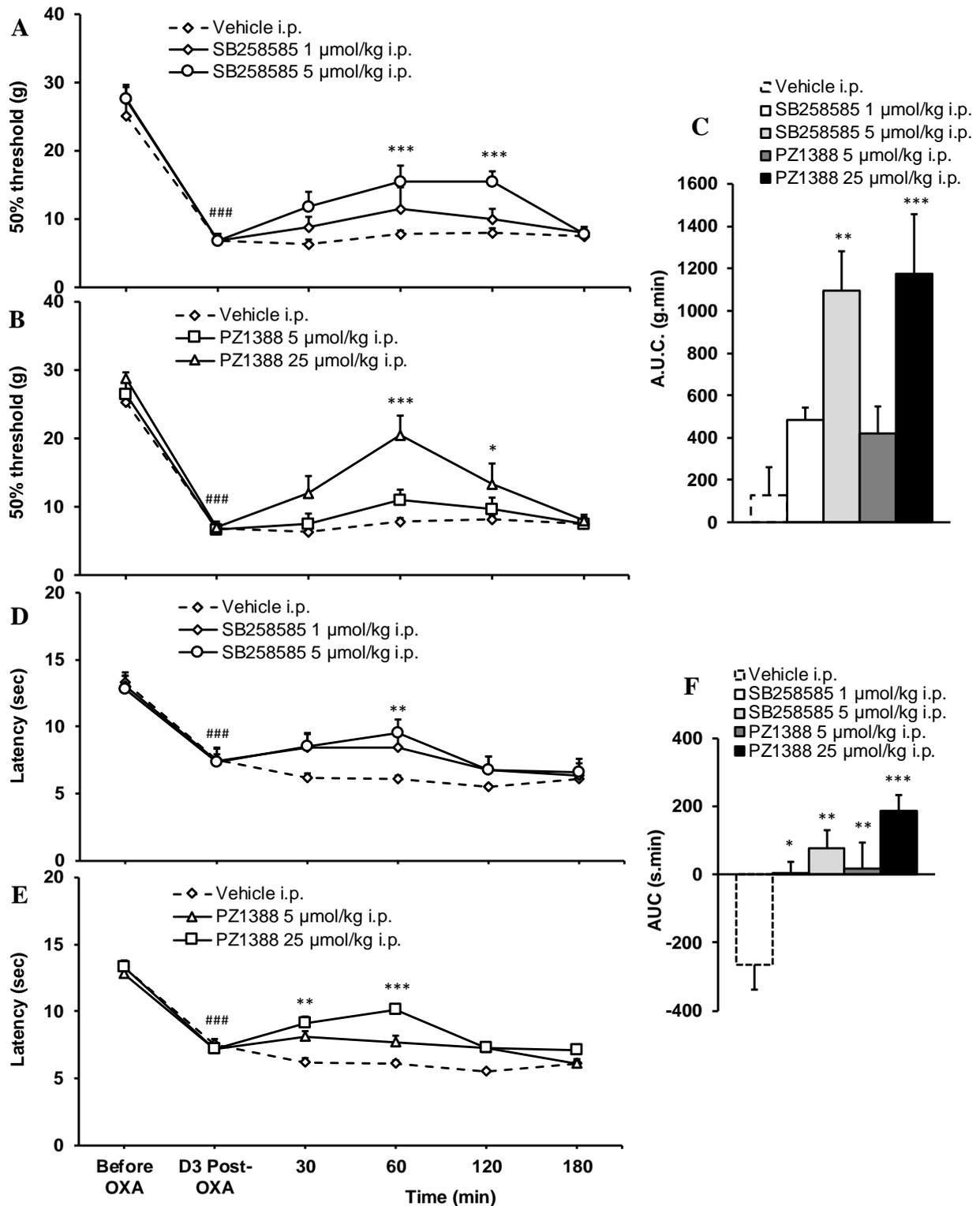
**Figure 44** : Evolution de la latence de retrait de la patte à l'immersion dans l'eau froide (15°C) après administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 ml/kg), de SB258585 (5 et 25 µmol/kg) (**A**) ou de PZ1388 (25 µmol/kg) (**B**) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ±. E.S..

\*  $p < 0,05$  \*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;  
 ###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

Nous avons ensuite évalué les effets pharmacologiques des 2 composés dénués d'effet sédatif sur l'allodynie thermique.

L'administration de SB258585 (5 et 25 µmol/kg) augmente significativement la latence de retrait de patte immergée dans l'eau froide (15°C) 60-120 min (5 µmol/kg) et 30-180 min (25 µmol/kg) après l'injection (**Figure 44A**). L'acmé de l'effet est observée 120 min après l'injection pour les deux doses et correspond respectivement à  $52,9 \pm 9,0$  % et  $58,6 \pm 1,5$  % de l'EMP. Comme observé sur l'allodynie tactile, aucun gain d'effet n'est obtenu avec la dose de 25 µmol/kg par rapport à la dose de 5 µmol/kg. Cette dernière sera donc utilisée pour la suite des études comportementales.

L'administration de 25 µmol/kg de PZ1388, augmente également la latence de retrait de la patte 30-120 min après l'injection. L'acmé de l'effet se produit à T<sub>60</sub> et correspond à  $57,3 \pm 9,0$  % de l'EMP (**Figure 44B**).



**Figure 45** : Evolution des seuils de retrait de la patte 50% (A,B) et de la latence de retrait de la patte à l'immersion dans l'eau froide (15°C) (D,E) après administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 ml/kg), de SB258585 (1 et 5 μmol/kg) (A,D) ou de PZ1388 (5 et 25 μmol/kg) (B,E) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g et s ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

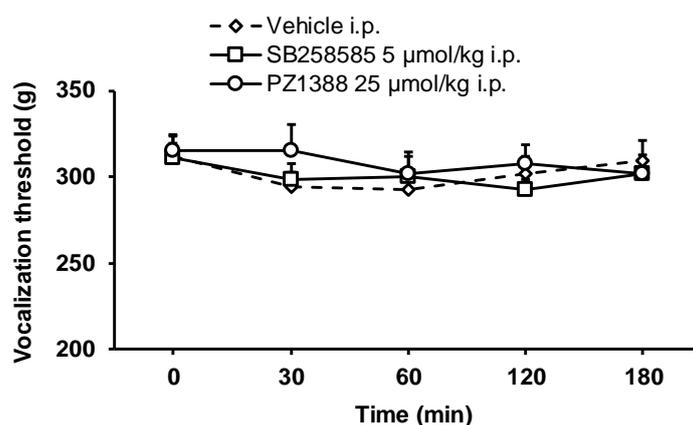
###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations de seuils de retrait 50 % (C) et de latence de retrait (F). Les valeurs sont exprimées en g.min et s.min ± E.S..

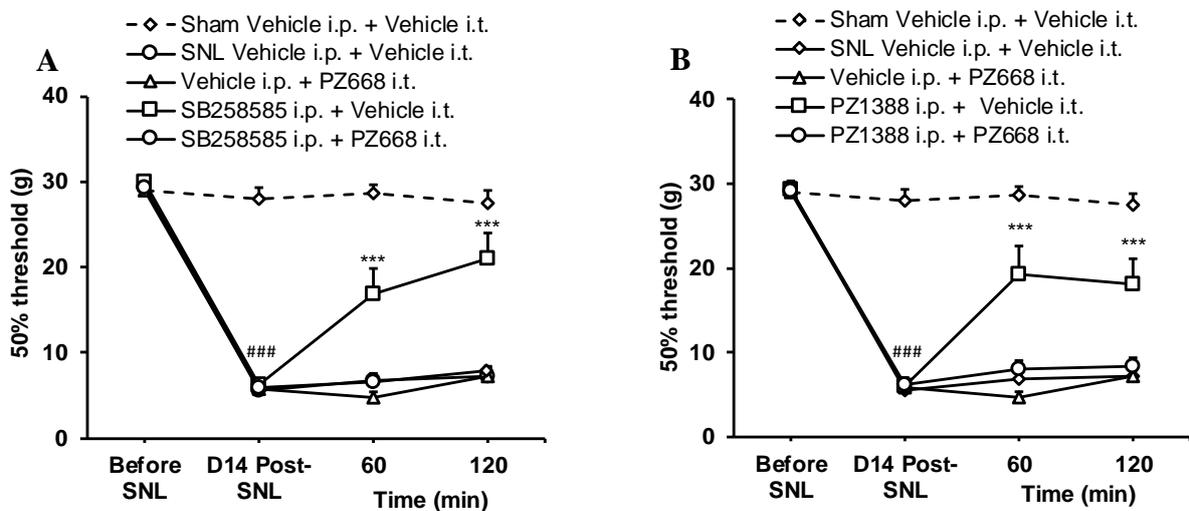
\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

Afin d'étendre ces résultats aux neuropathies d'étiologie toxique chimio-induite, les effets pharmacologiques du SB258585 et du PZ1388 ont été appréciés sur le modèle de neuropathie induite par l'OXA. Pour cela, des rats ont reçu une administration i.p. d'oxaliplatine (OXA, 6 mg/kg) ou de véhicule (glucose 5%). Trois jours après, 92,4 % des rats ayant reçu l'agent toxique, présentent une diminution moyenne de  $74,4 \pm 1,4$  % du seuil de retrait et de  $43,5 \pm 1,3$  % de la latence de retrait à l'immersion, indiquant l'apparition d'une allodynie tactile et thermique. L'administration systémique de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) (**Figure 45A, B, C**) et de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg) (**Figure 45D, E, F**), réduit significativement l'allodynie tactile et thermique avec une acmé à T<sub>60</sub> correspondant respectivement à  $47,1 \pm 14,2$  % et  $60,3 \pm 12,2$  % de l'EMP pour l'allodynie tactile et  $41,2 \pm 7,3$  % et  $48,4 \pm 6,3$  % de l'EMP pour l'allodynie thermique.

L'effet anti-allodynique des ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub> observé dans ces travaux est-il spécifique de la douleur neuropathique, ou peut-il aussi influencer la nociception? Pour initier un élément de réponse, les deux composés ont été administrés à des rats sains et évalués sur le seuil de sensibilité mécanique à l'application d'une pression croissante sur la patte postérieure des rats par leur vocalisation. L'administration systémique des traitements ne modifie pas les seuils de nociception mécanique induite par la pression de la patte des animaux (**Figure 46**).



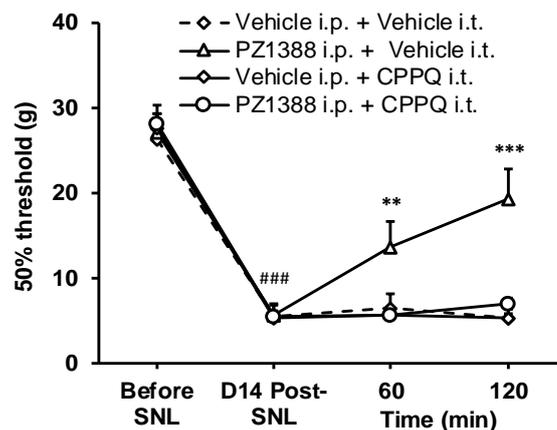
**Figure 46** : Evolution des seuils de vocalisation après administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 ml/kg), de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) ou de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg). (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g  $\pm$  E.S..



**Figure 47** : Évolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau ppi, 5 mL/kg), de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) ou de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg) et administration i.t. de Véhicule (10  $\mu$ L) ou de PZ668 (2 nmol) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g  $\pm$  E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.



**Figure 48** : Évolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau ppi, 5 mL/kg) ou de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg) et administration i.t. de véhicule (10  $\mu$ L) ou de CPPQ (2 nmol) (n = 8/groupe) Les valeurs sont exprimées en g  $\pm$  E.S..

\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

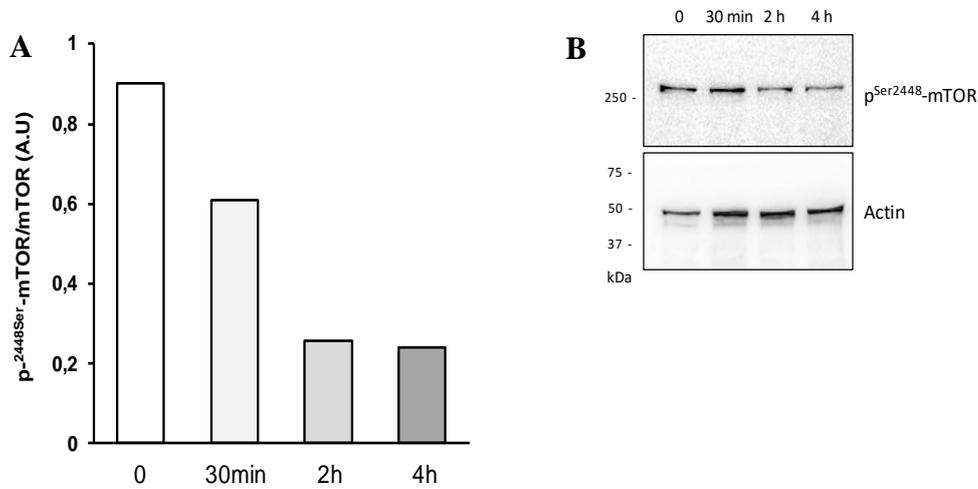
###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

***Mise en évidence de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez le rat SNL et propriétés agonistes inverses du SB258585 et du PZ1388***

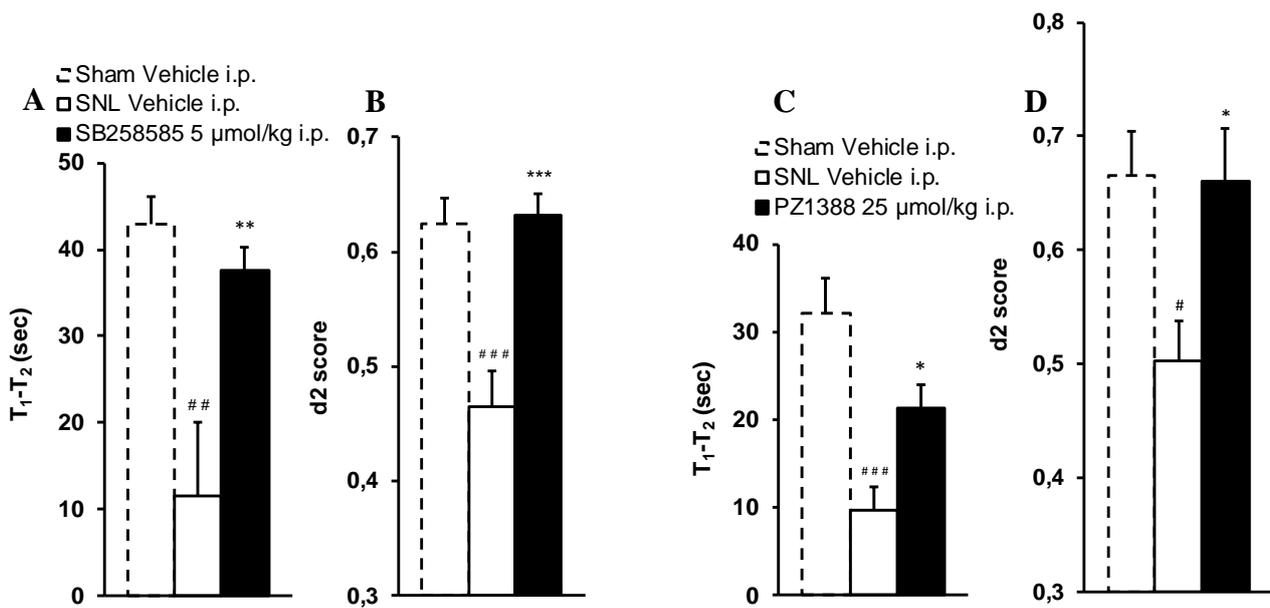
En raison de la démonstration d'une activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Duhr *et al.*, 2014; Deraredj Nadim *et al.*, 2016; Grychowska *et al.*, 2016) et des propriétés agonistes inverses de certains composés initialement décrits comme antagonistes neutres (Grychowska *et al.*, 2016; Zajdel *et al.*, 2016; Vanda *et al.*, 2018) il était légitime de s'interroger sur les propriétés des deux ligands 5-HT<sub>6</sub> (SB258585 et PZ1388) utilisés dans cette étude et dans ce contexte. Dans ce but, l'effet anti-allodynique des ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été évalué en présence d'un antagoniste neutre du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, puissant et sélectif (4-[[5-méthoxy-3-(1,2,3,6-tétrahydropyridine)-4-yl]-1H-indol-1-yl]sulfonyl}isoquinoléine, PZ668) (Zajdel *et al.*, 2016).

La co-administration du véhicule (i.p.) et de l'antagoniste neutre par voie i.t., ne modifie les seuils de retrait de la patte induit par l'application des filaments de von Frey, suggérant l'absence d'activation tonique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par la 5-HT endogène. La co-administration de SB258585 ou de PZ1388 (i.p.) et de l'antagoniste neutre, PZ668 (2 nmol/rat, i.t.) prévient totalement l'effet anti-allodynique du SB258585 et du PZ1388 chez les rats SNL (**Figure 47A, B**). Ces résultats suggèrent que, dans ce contexte de douleur neuropathique, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est doué d'une activité constitutive et que le SB258585 et le PZ1388 se comportent comme des agonistes inverses. Ce résultat a été confirmé avec un autre antagoniste neutre puissant (K<sub>i</sub> = 3 nm) et sélectif, le CPPQ ((S)-1-[(3-Chlorophenyl)sulfonyl]-4-(pyrrolidine-3-yl-amino)-1H-pyrrolo[3,2-c]quinoline dihydrochloride), composé n°14 de l'étude de Grychowska *et al.*, (2016). Le même profil de résultats est obtenu avec le CPPQ qu'avec le PZ668: une absence d'effet significatif de l'administration i.t. de l'antagoniste neutre seul sur l'allodynie tactile ainsi qu'une inhibition de l'effet anti-allodynique de l'administration i.p. de PZ1388 par la co-administration i.t. de CPPQ (**Figure 48**).

Dans la mesure où c'est l'administration spinale de l'antagoniste neutre qui abolit l'effet des agonistes inverses, il est probable que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> spinaux sont impliqués dans les effets anti-allodyniques des deux composés.



**Figure 49 :** (A) Évolution de la quantité de p-mTOR (Ser<sup>2448</sup>) après pré-traitement de SB258585 (1  $\mu$ M) sur des cellules HEK-293 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Les valeurs sont exprimées en U.A.. (B) Illustration du Western blot.



**Figure 50 :** Effet de l'administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i., 5 ml/kg), de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) (A,B) ou de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg) (C,D) sur la différence de temps (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première (T<sub>1</sub>) et la seconde (T<sub>2</sub>) période du test (A,C) et l'indice de discrimination d2 reflétant l'habilité du rat à discriminer un nouvel objet d'un objet familier (B,D) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en s ou sous forme d'indice  $\pm$  E.S..  
 \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule ;  
 ###  $p < 0,001$  par rapport au groupe Sham, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

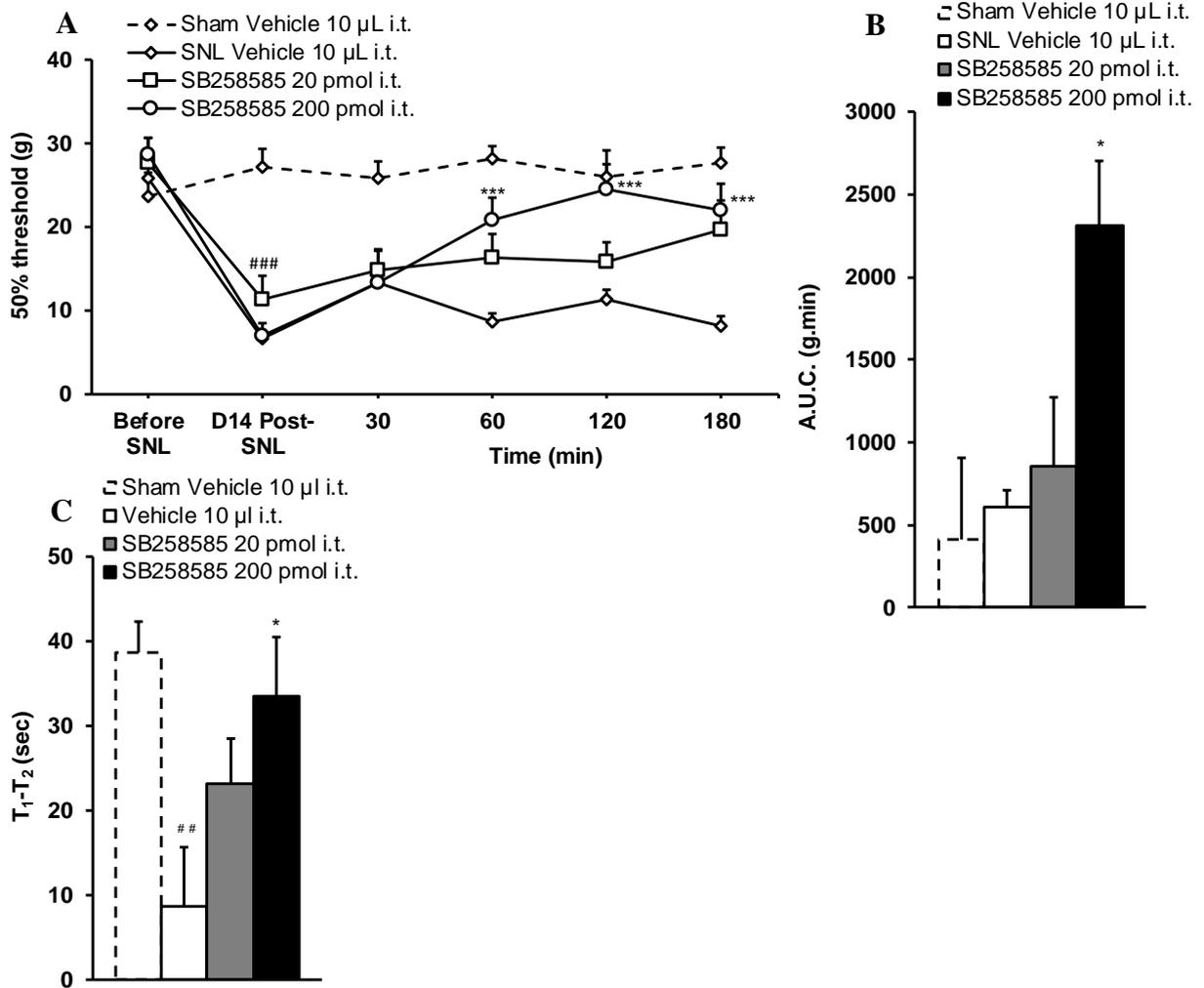
L'activité agoniste inverse du SB258585 a été confirmée *in vitro* dans des cellules HEK-293 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> : le SB258585 supprime l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> vis-à-vis de la phosphorylation de mTOR (Ser<sup>2448</sup>) (**Figure 49**).

***Les ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub> améliorent les symptômes cognitifs associés à la neuropathie douloureuse.***

Compte-tenu de l'effet pro-cognitif des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> dans des modèles animaux de déficits cognitifs (Hirst *et al.*, 2006; Loiseau *et al.*, 2008; Gravius *et al.*, 2011; Zajdel *et al.*, 2016; Vanda *et al.*, 2018), les effets pharmacologiques du SB258585 et du PZ1388 sur les déficits cognitifs associés à la douleur neuropathique ont été évalués à l'aide de tests appréciant la mémoire sociale (test de reconnaissance sociale) et la mémoire de travail (test de reconnaissance du nouvel objet).

Les rats SNL traités avec le véhicule ne parviennent pas à reconnaître le rat juvénile et à discriminer le nouvel objet aussi bien que les rats sham comme l'attestent les durées d'interaction (respectivement  $10,6 \pm 3,0$  s vs  $36,3 \pm 4,3$  s) et les scores de discrimination d2 (respectivement  $0,48 \pm 0,02$  vs  $0,65 \pm 0,02$ ) (**Figure 50A, B, C, D**).

L'administration de SB258585 (5 µmol/kg, i.p.) restaure totalement la mémoire de reconnaissance sociale et la mémoire épisodique (**Figure 50A, B**). Le PZ1388 (25 µmol/kg, i.p.) permet de réduire le déficit de mémoire de reconnaissance sociale induit par SNL (**Figure 50C**) et corrige totalement le déclin de la mémoire épisodique (**Figure 50D**). Il est important de noter que le comportement des rats adultes envers les rats juvéniles n'est pas qualitativement modifié par l'administration de SB258585 ou de PZ1388, aucun signe de comportement agressif ou d'anxiété n'est observé.



**Figure 51 :** (A) Evolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i, 10  $\mu$ L/rat) ou de SB258585 (20 et 200 pmol/rat) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g  $\pm$  E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(B) Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations de seuils de retrait 50 %. Les valeurs sont exprimées en g.min  $\pm$  E.S..

\*  $p < 0,05$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

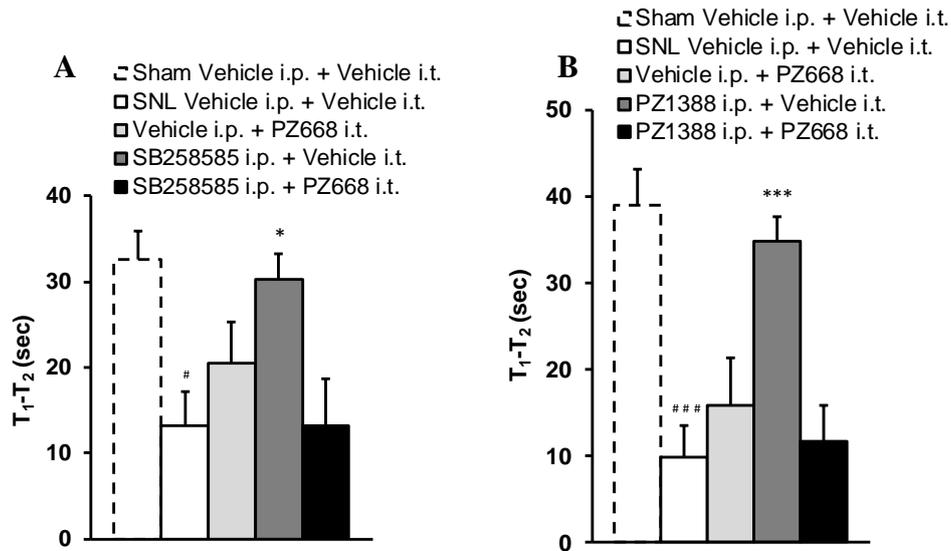
(C) Effet de l'administration i.t. de Véhicule ou de SB258585 (20 et 200 pmol/rat) sur la différence de temps (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première (T<sub>1</sub>) et la seconde (T<sub>2</sub>) période du test (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en s  $\pm$  E.S..

\*  $p < 0,05$  par rapport au groupe SNL Véhicule ;

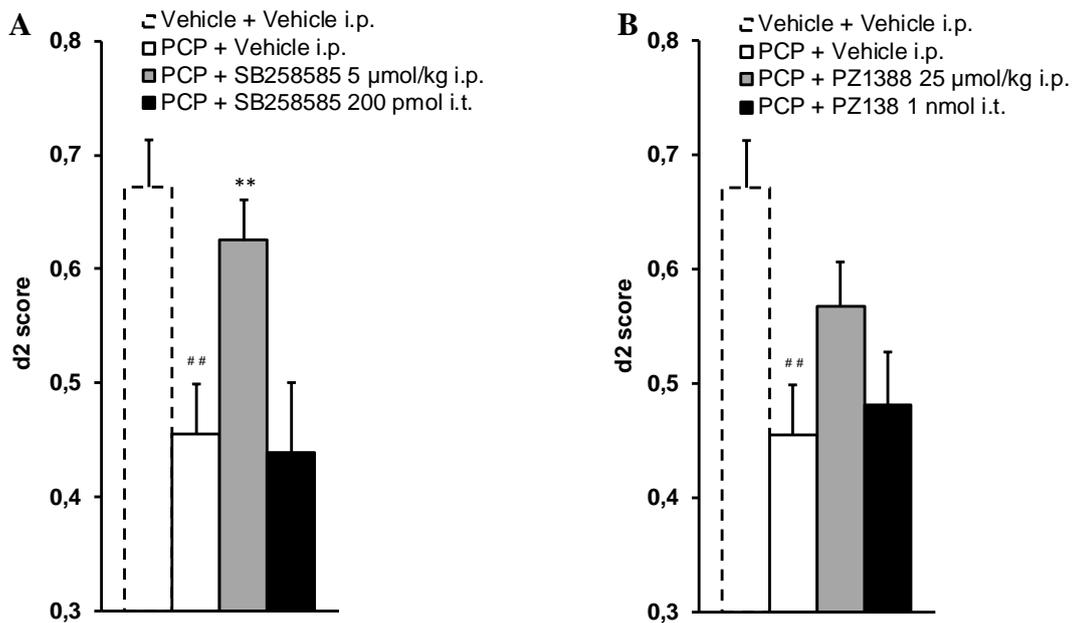
##  $p < 0,01$  par rapport au groupe Sham, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

L'ensemble de ces données suggère un effet pro-cognitif de l'administration systémique des agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez le rat neuropathique douloureux. Dans la mesure où les déficits cognitifs sont consécutifs à la neuropathie douloureuse, nous avons recherché si l'effet pro-cognitif du SB258585 résulte i) d'une amélioration de la douleur neuropathique (liée aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub> spinaux) ou, ii) d'un effet pro-cognitif intrinsèque (lié aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub> présents dans le système limbique et le cortex préfrontal). Si la première hypothèse est exacte, alors l'injection spinale (i.t.) de l'agoniste inverse 5-HT<sub>6</sub> devrait avoir un effet anti-allodymique et pro-cognitif chez les rats neuropathiques, mais aucun effet chez les rats non douloureux présentant une altération de la fonction cognitive, alors que l'administration systémique de l'agoniste inverse devrait avoir des effets pro-cognitifs chez ces rats (Loiseau *et al.*, 2008).

En effet, l'injection i.t. de SB258585 (200 pmol/rat) chez le rat SNL entraîne bien une diminution de l'allodynie tactile (**Figure 51A, B**) et restaure les performances cognitives (**Figure 51C**). Puisque l'amélioration du déficit cognitif est concomitante à celle de l'allodynie tactile après administration i.t. de SB258585, nous présumons que l'effet pro-cognitif dépend de l'effet antalgique du SB258585 et qu'il implique, au moins partiellement, les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> spinaux.

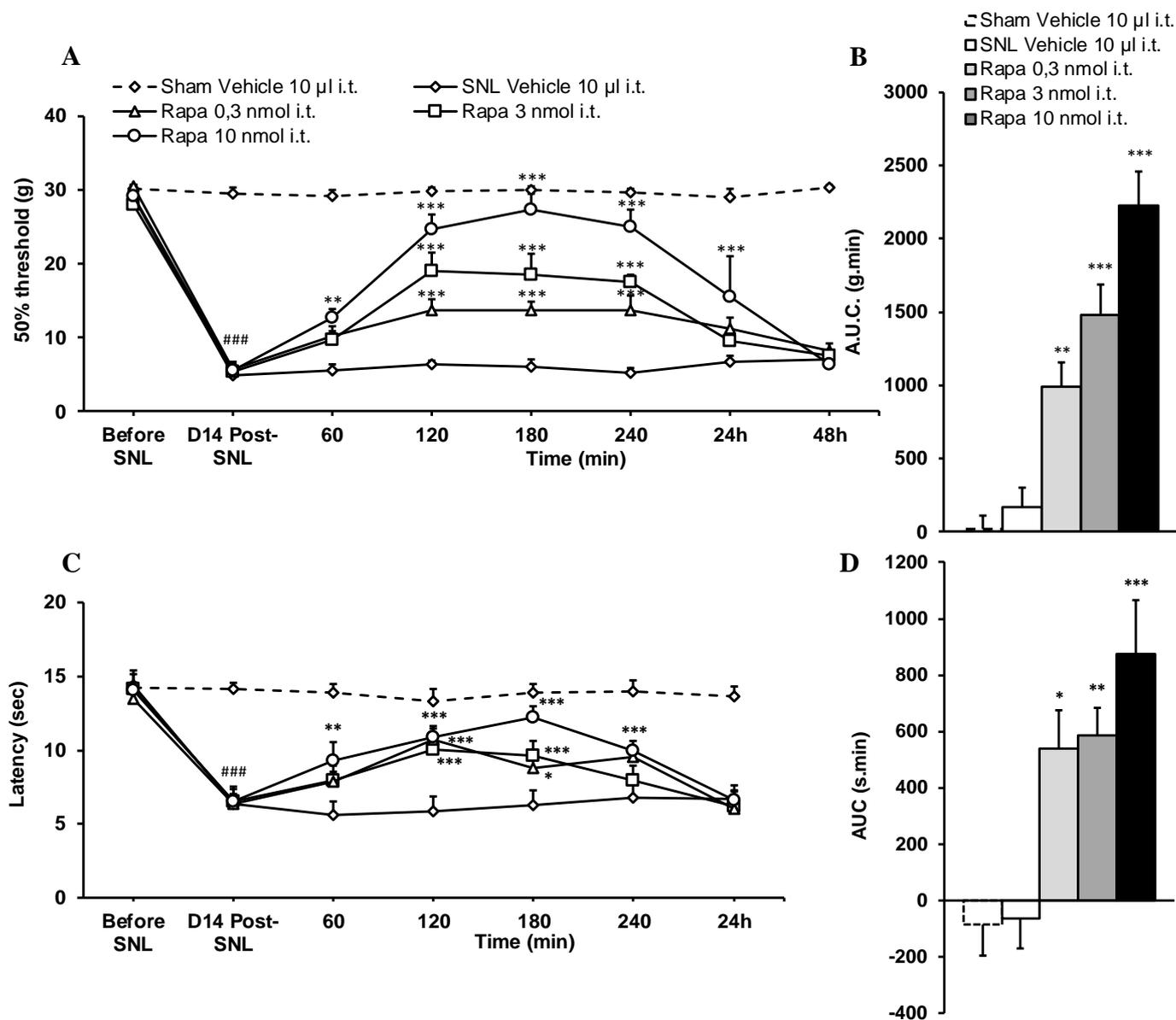


**Figure 52** : Effet de l'administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 ml/kg), de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) ou de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg) et i.t. de Véhicule (eau p.p.i, 10  $\mu$ l/rat) ou de PZ668 (2 nmol/rat, i.t.) sur la différence de temps ( $T_1$ - $T_2$ ) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première ( $T_1$ ) et la seconde ( $T_2$ ) période du test (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en s  $\pm$  E.S..  
 \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule (i.p. + i.t.) ;  
 #  $p < 0,05$  ###  $p < 0,001$  par rapport au groupe Sham, d'après une ANOVA à deux facteurs suivies d'un test de Dunnett.



**Figure 53** : Effet de l'administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i, 5 mL/kg), de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) (A), de PZ1388 (25  $\mu$ mol/kg) (B) ou de l'administration i.t. de SB258585 (200 pmol/rat) et de PZ1388 (1 nmol/rat) sur la différence de temps ( $T_1$ - $T_2$ ) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première ( $T_1$ ) et la seconde ( $T_2$ ) période du test dans le modèle de déficit cognitif induit par administration i.p. de PCP (5 mg/kg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées sous forme d'indice  $\pm$  E.S..  
 \*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe SNL Véhicule ;  
 ###  $p < 0,01$  par rapport au groupe Sham, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

De plus, en prévenant l'effet anti-allodymique de l'administration systémique (i.p.) de SB258585 ou de PZ1388 chez les rats SNL, l'antagoniste neutre par voie spinale (PZ668, 2 nmol/rat, i.t.) supprime également les effets pro-cognitifs des 2 composés (**Fig. 52A, B**), confirmant l'hypothèse précédente. Pour exclure un effet pro-cognitif supraspinal (impliquant l'amygdale ou le CPF) des composés administrés par voie spinale, le SB258585 et le PZ1388 ont été évalués sur la mémoire de travail chez des animaux exempts de douleur, mais présentant des troubles cognitifs, après injection systémique et après injection spinale. L'administration systémique de SB258585 (5 µmol/kg) et de PZ1388 (25 µmol/kg) restaure les déficits cognitifs induits par la PCP (5 mg/kg, i.p.) (indice d2 = 0,63 ± 0,06 et 0,57 ± 0,04, respectivement), aucune différence significative par rapport aux rats témoins n'est observée (**Figure 53A, B**). L'administration spinale de SB258585 (200 pmol/rat) et de PZ1388 (1 nmol/rat) n'améliore pas l'indice de discrimination d2 par rapport aux rats traités avec le véhicule. Ces données confirment donc que l'effet pro-cognitif des deux composés SB258585 et PZ1388 dépend de leur effet anti-allodymique chez les rats SNL et implique exclusivement les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> spinaux.



**Fig. 55** : Evolution des seuils de retrait de la patte 50% (A) et de la latence de retrait de la patte à l'immersion dans l'eau froide (15°C) (C) après administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i, 10 µl/rat) ou de Rapamycine (0,3-10 nmol/rat) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

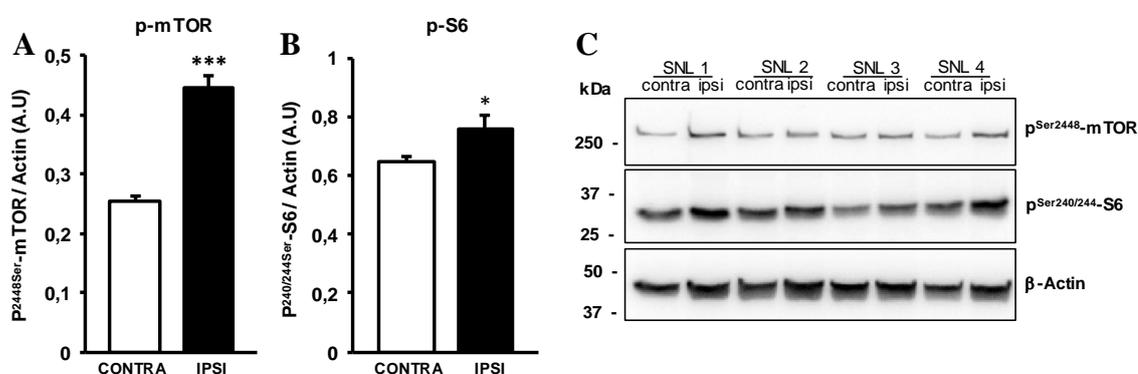
###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations de seuils de retrait 50 % (B) et de latence de retrait (D). Les valeurs sont exprimées en g.min et s.min ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

***La voie de signalisation mTOR sous la dépendance du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est impliquée dans la douleur neuropathique et les altérations cognitives associées.***

Partant du constat que i) dans les cellules HEK-293 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, la signalisation mTOR dépendante de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> mesurée par la phosphorylation de mTOR (sur le résidu Ser<sup>2448</sup>), est supprimée par le SB258585 et que, ii) la phosphorylation de mTOR (Ser<sup>2448</sup>) et S6 (Ser<sup>240/244</sup>) est régulée à la hausse dans la moelle spinale dorsale ipsilatérale à la lésion par rapport au côté controlatéral (**Figure 54**) l'effet d'un inhibiteur de mTOR, la rapamycine (0,3, 3, 10 nmol/rat) sur l'allodynie tactile et thermique a été évalué chez des rats SNL 1 à 48 h après administration.



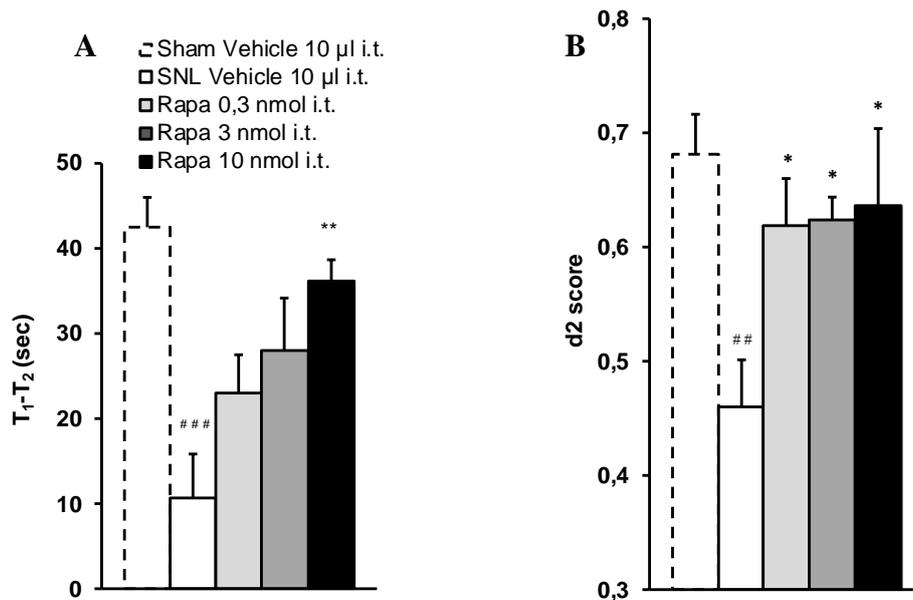
**Figure 54:** Quantification de la forme phosphorylée de mTOR (Ser<sup>2448</sup>) (A) et de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) (A) au niveau de la corne dorsale spinale du renflement lombaire ipsilatéral à la lésion comparée au côté controlatéral. Les valeurs sont exprimées en U.A. ± E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  ; \*  $p < 0,05$  par rapport au coté controlatéral.

(C) Illustration représentative des Western blots.

La rapamycine induit une augmentation dose-dépendante des seuils de retrait à l'application des filaments de von Frey avec un effet maximal 2-4 h après l'injection et qui perdure pendant 24 h pour la dose la plus élevée (**Figure 55A**). L'effet global de l'inhibiteur de mTOR mesuré par les variations des A.U.C. confirme un effet dose-dépendant (**Figure 55B**).

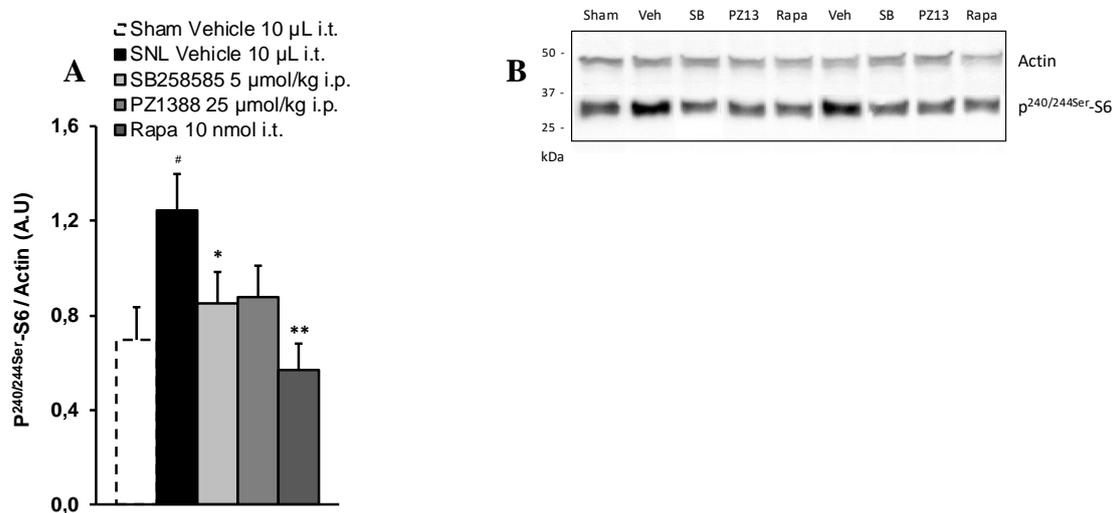
La rapamycine augmente également la latence de retrait de la patte immergée dans l'eau froide avec un effet maximal 3 h après l'injection (**Figure 55C**).



**Figure 56** : Effet de l'administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i, 10 µl/rat) ou de Rapamycine (0,3-10 nmol/rat) sur la différence de temps (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première (T<sub>1</sub>) et la seconde (T<sub>2</sub>) période du test (A) et l'indice de discrimination d2 reflétant l'habileté du rat à discriminer un nouvel objet d'un objet familier (B) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en s ou sous forme d'indice ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe SNL Véhicule ;

##  $p < 0,01$  ###  $p < 0,001$  par rapport au groupe Sham, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.



**Figure 57** : (A) Quantification de la forme phosphorylée de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) au niveau de la corne dorsale spinale du renflement lombaire ipsilatéral à la lésion après administration de SB258585 (5 µmol/kg, i.p.), de PZ1388 (25 µmol/kg, i.p.) ou de rapamycine (10 nmol/rat, i.t.). Les valeurs sont exprimées en U.A. ± E.S..

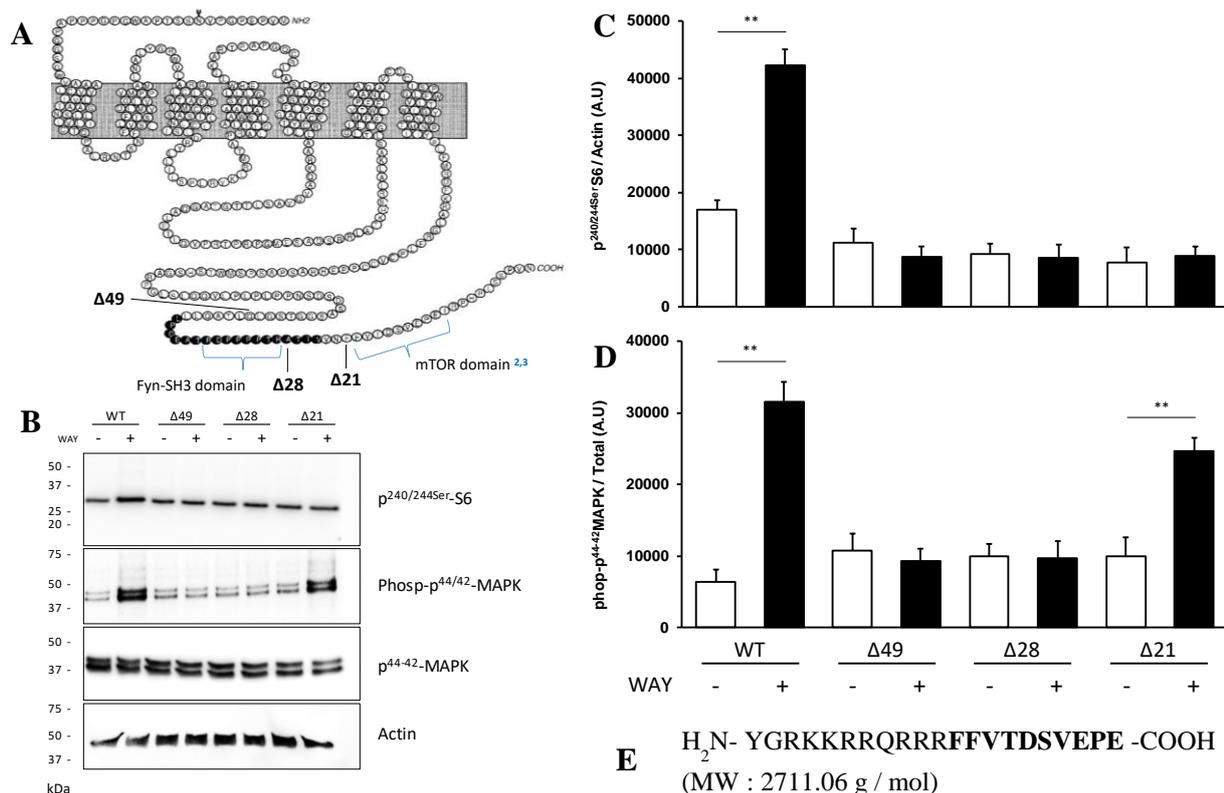
#  $p < 0,05$  par rapport au groupe Sham Véhicule ;

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Fisher

(B) Illustration représentative des Western blots.

Sur les déficits cognitifs, la rapamycine permet de recouvrer de manière dose-dépendante la mémoire de reconnaissance sociale induite par SNL (**Figure 56A**). Le test NOR révèle également une restauration complète du déficit de la mémoire de travail dès la dose de 3 nmol/rat (**Figure 56B**).

*In vivo*, la rapamycine réduit la phosphorylation de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) au niveau de la corne dorsale spinale du renflement lombaire de rats SNL (**Figure 57**). De façon importante, les deux composés (PZ1388 et SB258585) réduisent également le niveau de phosphorylation de S6 (**Figure 57**), suggérant un lien entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la signalisation mTOR dans la douleur neuropathique. Des études de l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont identifié une interaction physique entre l'extrémité C-ter du récepteur et mTOR (Meffre *et al.*, 2012) avec laquelle il est possible d'interférer, constituant ainsi un moyen original de démontrer un lien fonctionnel entre les deux protéines.

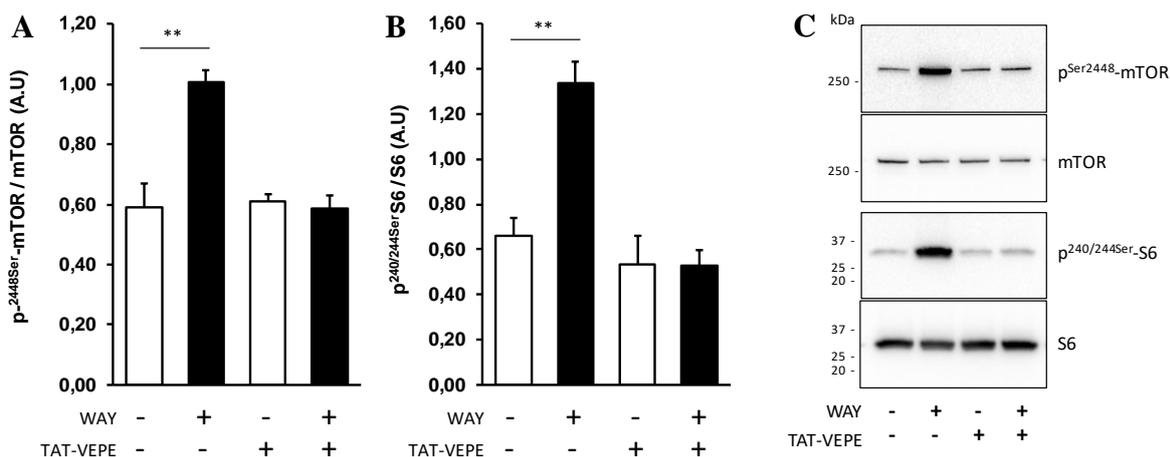


**Figure 58** : Quantification de la forme phosphorylée de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) (C) et de MAPK (D) sur des cellules HEK-293 exprimant la forme sauvage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ou les 3 formes mutantes en présence ou non de WAY208466 (1 μM). Les valeurs sont exprimées en U.A. ± E.S..

\*\*  $p < 0,01$

(B) Illustration représentative de Western blots.

(E) Séquence du peptide interférant synthétisé.



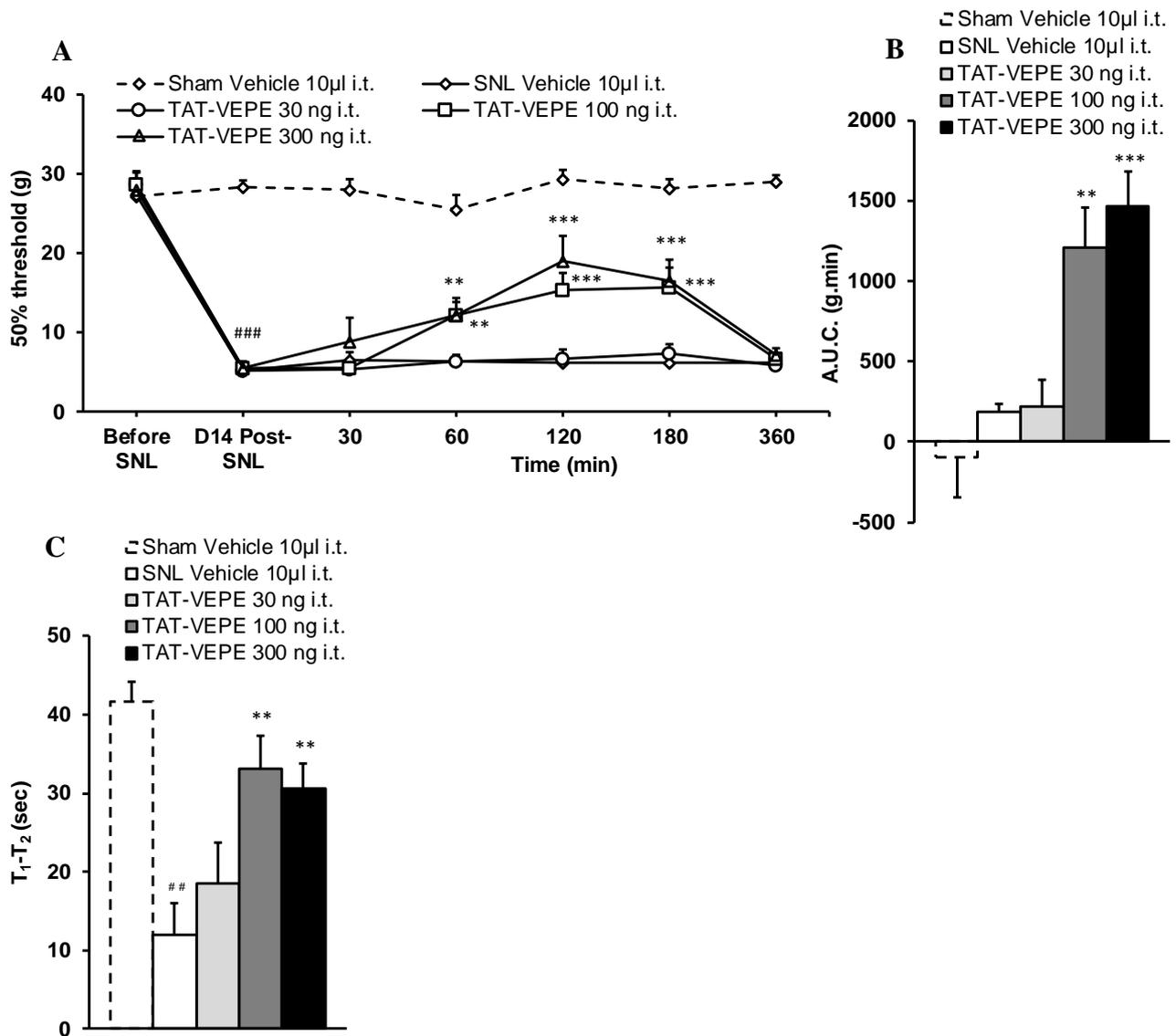
**Figure 59** : Quantification de la forme phosphorylée de mTOR (Ser<sup>2448</sup>) (A) et de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) sur des cellules HEK-293 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> en présence ou non du peptide TAT-VEPE (1 μg) et de WAY208466 (1 μM). Les valeurs sont exprimées en U.A. ± E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  ; \*  $p < 0,05$

(C) Illustration représentative des Western blots.

***L'inhibition de l'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>-mTOR améliore les symptômes de la douleur neuropathique.***

En utilisant plusieurs mutants du récepteur 5-HT<sub>6</sub> tronqué aux niveaux de résidus C-terminaux, nous avons identifié une séquence peptidique essentielle du domaine C-ter du récepteur pour son interaction avec mTOR. Pour cela, nous avons cloné trois formes mutantes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans lesquelles les acides aminés 49 ( $\Delta_{49}$ -5-HT<sub>6</sub>), 28 ( $\Delta_{28}$ -5-HT<sub>6</sub>) et 21 ( $\Delta_{21}$ -5-HT<sub>6</sub>) ont été supprimés. Nous avons transfecté la forme sauvage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (WT-5-HT<sub>6</sub>), et les 3 formes mutantes ( $\Delta_{49}$ -5-HT<sub>6</sub>,  $\Delta_{28}$ -5-HT<sub>6</sub> et  $\Delta_{21}$ -5-HT<sub>6</sub>) dans des cellules HEK-293 et avons testé si ces mutants étaient encore capables d'activer la phosphorylation de MAPK et lesquels d'entre eux n'activaient plus la phosphorylation de S6. Les trois mutants sont incapables d'activer la phosphorylation de S6 contrairement au récepteur sauvage (**Figure 58C**). Le récepteur sauvage et le récepteur  $\Delta_{21}$ -5-HT<sub>6</sub> conservent leur capacité à stimuler la phosphorylation de MAPK (**Figure 58D**). Nous avons ensuite généré un peptide interférant, pénétrant dans les cellules car fusionné au domaine de transduction de la protéine TAT du VIH appelé peptide « TAT-VEPE » (**Figure 58E**) pour bloquer l'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>-mTOR. Le prétraitement des cellules HEK-293 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec le peptide TAT-VEPE (1  $\mu$ g, 369 pmol) inhibant l'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>-mTOR, réduit fortement la phosphorylation de S6 (Ser<sup>240/244</sup>) et de mTOR (Ser<sup>2448</sup>) induite par l'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (agoniste, WAY208466, 1  $\mu$ M) (**Figure 59**).



**Figure 61 :** (A) Evolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i, 10 µl/rat) ou de TAT-VEPE (30-300 nmol/rat) (n= 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(B) Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations de seuils de retrait 50 %. Les valeurs sont exprimées en g.min ± E.S..

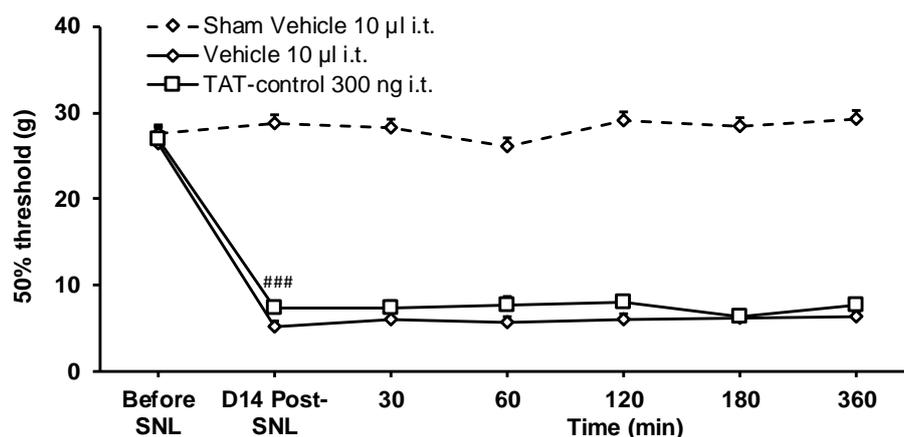
\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

(C) Effet de l'administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i., 10 µl/rat) ou de TAT-VEPE (100-300 ng/rat) sur la différence de temps (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première (T<sub>1</sub>) et la seconde (T<sub>2</sub>) période du test (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en sec ± E.S..

\*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe SNL Véhicule ;

##  $p < 0,01$ , par rapport au groupe Sham, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

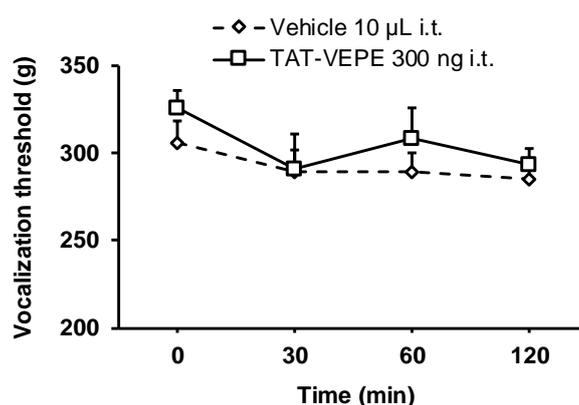
*In vivo*, l'injection spinale du peptide TAT-VEPE (100 et 300 ng/rat i.t.) mais pas celle du peptide contrôle, **Figure 60**) réduit efficacement l'allodynie tactile 1-3 h après l'injection (**Figure 61A**) et le déficit de reconnaissance sociale induit par SNL (**Figure 61C**) sans affecter la nociception mécanique, appréciée par le seuil de vocalisation induite la pression de la patte normale chez des rats sains (**Figure 62**).



**Figure 60** : Evolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i., 10 µl/rat) ou de TAT-contrôle (300 ng/rat) chez le rat SNL (n=8/groupe)

Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.



**Figure 62** : Evolution des seuils de retrait de vocalisation induite par pression de la patte après administration i.t. de Véhicule (eau p.p.i., 10 µl/rat) ou de TAT-VEPE (300 ng/rat) chez le rat sain (n=8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

Cette étude fournit, pour la première fois, des preuves solides de l'implication de la signalisation mTOR sous la dépendance de l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur neuropathique.

En utilisant des approches pharmacologiques et comportementales visant à bloquer sélectivement l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la signalisation mTOR et à évaluer les symptômes de la douleur neuropathique et les comorbidités associées, nous montrons que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est impliqué dans l'hypersensibilité et les altérations cognitives associées à la neuropathie périphérique.

L'administration d'un nouveau ligand du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à propriété agoniste inverse (PZ1388) mais pas celle d'un antagoniste neutre, un azinylsulfonylindole (PZ668), atténue l'hypersensibilité tactile et thermique et les symptômes cognitifs associés à la lésion nerveuse traumatique sans affecter la nociception mécanique. Le SB258585 aussi, initialement décrit dans la littérature comme antagoniste, améliore le comportement douloureux et les symptômes cognitifs de la douleur neuropathique, suggérant une propriété agoniste inverse, plutôt qu'antagoniste, du composé.

Enfin, grâce à une approche originale basée sur une stratégie peptido-mimétique visant à perturber l'interaction physique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec mTOR, nos résultats appuient fortement un lien entre l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et l'activation de la kinase mTOR impliquée dans la douleur neuropathique périphérique.

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, exclusivement localisé dans le système nerveux central des mammifères, représente une cible intéressante pour le développement de médicaments destinés aux maladies psychiatriques (schizophrénie, dépression), neurologiques (maladie d'Alzheimer, Parkinson et Lewy) et à la douleur. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et est couplé à la protéine G<sub>s</sub>. Son activation augmente la production d'AMPc dans des systèmes d'expression recombinants et des cellules natives. En plus de son couplage aux protéines G, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> interagit physiquement et active des partenaires protéiques de manière indépendante de la liaison d'agonistes sur le récepteur, comme le complexe mTORC1 et la neurofibromine exerçant une influence négative sur les fonctions cognitives dans la schizophrénie (Meffre *et al.*, 2012) et la neurofibromatose de type 1 (Deraredj Nadim *et al.*, 2016). À l'aide de ligands classiques (SB258585) et nouveaux visant à bloquer sélectivement l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, nous avons mis en évidence un nouveau rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> au niveau de la moelle spinale dorsale dans physiopathologie de la douleur neuropathique.

Le SB258585, précédemment classé comme antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, avec une affinité et une sélectivité élevées pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de rat par rapport aux autres types de récepteurs 5-HT (Hirst *et al.*, 2000), améliore l'hypersensibilité tactile et thermique ainsi que la mémoire de reconnaissance sociale et de reconnaissance d'un nouvel objet, tandis qu'un antagoniste neutre sélectif du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ne parvient pas à produire ces effets anti-allodyniques et à inverser les déficits cognitifs associés, renforçant la nécessité de développer des ligands à propriété agoniste inverse des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> pour le traitement de la douleur neuropathique.

C'est dans cette démarche que s'est inscrite la synthèse du PZ1388 par l'équipe du Pr Zajdel et l'évaluation de son efficacité lors de mon travail de thèse. Le PZ1388 a un effet anti-allodynique et améliore les performances cognitives des rats SNL douloureux. Contrairement à l'effet pro-cognitif du SB258585 ou du PZ1388 observé dans les modèles de déficits cognitifs induits par le PCP ou la scopolamine (Loiseau *et al.*, 2008; Meffre *et al.*, 2012; Zajdel *et al.*, 2016), le même ligand 5-HT<sub>6</sub> et le PZ1388 ne présentent pas d'effet pro-cognitif intrinsèques en conditions de douleur chronique suggérant différents mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ces conditions. Dans les modèles expérimentaux de déficits cognitifs, les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> corticaux et striataux sont principalement impliqués dans l'effet pro-cognitif des ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

Le SB258585 a déjà prouvé son efficacité sur l'hyperalgésie chimique, qu'il améliore (Castañeda-Corral *et al.*, 2009; Godínez-Chaparro *et al.*, 2012) et, plus récemment, sur l'allodynie tactile chez les rats neuropathiques (Pineda-Farias *et al.*, 2017). Comme il a été montré que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> était doué d'une activité constitutive (Duhr *et al.*, 2014; Jacobshagen *et al.*, 2014; Deraredj Nadim *et al.*, 2016) et que le SB258585 a des propriétés d'agoniste inverse, nous avons émis l'hypothèse que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> spinaux présentent une activité constitutive en condition de douleur neuropathique, responsable des différentes propriétés thérapeutiques des ligands 5-HT<sub>6</sub>. Une telle activité indépendante de la sérotonine a été décrite dans des formes mutantes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et des processus neuro-développementaux (Deraredj Nadim *et al.*, 2016).

Nos résultats montrent que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> activent également la signalisation mTOR dans la moelle spinale dorsale, un processus majeur dans l'hypersensibilité tactile et thermique. Plusieurs éléments indiquent que la signalisation mTOR dépendante du récepteur 5-HT<sub>6</sub> contribue, au moins en partie, à l'altération de la sensibilité tactile induite par la neuropathie traumatique douloureuse :

- tout d'abord, l'expression de p-S6 est significativement augmentée dans la moelle spinale dorsale des rats allodymiques SNL, comparativement aux rats sains (Sham). L'activité accrue de la kinase mTOR pourrait conduire à une altération de la signalisation intracellulaire dans les neurones spinaux ;

-deuxièmement, l'inhibition spinale de mTOR en utilisant la rapamycine, reproduit l'effet des agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur les fonctions sensibles et cognitives ;

- enfin, la rupture de l'interaction physique entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et mTOR par l'injection spinale du peptide interférant, mimant la séquence peptidique du domaine C-ter du récepteur, améliore les symptômes de la douleur neuropathique et les déficits cognitifs associés.

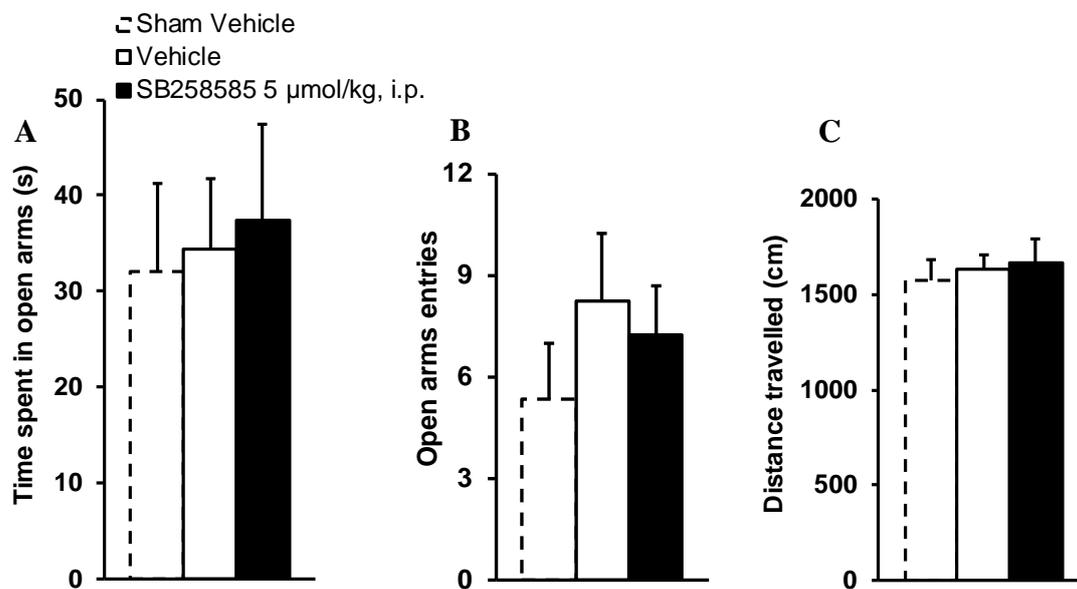
Le type neuronal responsable de cette cascade de signalisation impliquant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et mTOR est probablement de type exciteur/facilitateur de la transmission de l'information douloureuse et prend place au sein de circuits neuronaux complexes qu'il conviendrait d'explorer en électrophysiologie sur tranches (patch-clamp), travail abordé récemment par l'équipe de Abaira *et al.*, (2017).

***Résultats complémentaires : Comorbidités anxieuses associées au modèle SNL***

Les patients souffrant de douleur neuropathique présentent fréquemment des pathologies psychiatriques avec une prévalence de 16,5 % pour la dépression, 12,1 % pour l'anxiété généralisée, et enfin, de façon plus générale, de 29,7 % pour les troubles de l'humeur (Radat *et al.*, 2013). L'administration systémique d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (le SB399885, le SB742457 et le AVN-492) entraîne un effet anxiolytique chez le rat et la souris en condition physiologique (Wesołowska and Nikiforuk, 2007; Wesołowska, 2008; Abraham *et al.*, 2014; Grychowska *et al.*, 2016; Ivachtchenko *et al.*, 2016)

Nous nous proposons donc (i) de vérifier la présence de troubles de type anxieux chez le rat SNL afin (ii) d'évaluer l'effet pharmacologique d'agonistes inverses 5-HT<sub>6</sub> sur ce comportement.

Pour cela, quatorze jours après induction de la douleur neuropathique par SNL, les tests de l'EPM et du NSF sont réalisés afin de détecter un phénotype de type anxieux chez les rats douloureux.



**Figure 63 :** (A) Temps passé dans les bras ouverts de l'EPM après administration i.p. de véhicule (eau p.p.i., 5 ml/kg) ou de SB258585 (5 µmol/kg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en s ± E.S. (B) Nombre d'entrées dans les bras ouverts de l'EPM. Les valeurs sont exprimées en nb ± E.S.. (C) Distance totale parcourue sur l'EPM. Les valeurs sont exprimées en cm ± E.S..

*Test de l'EPM*

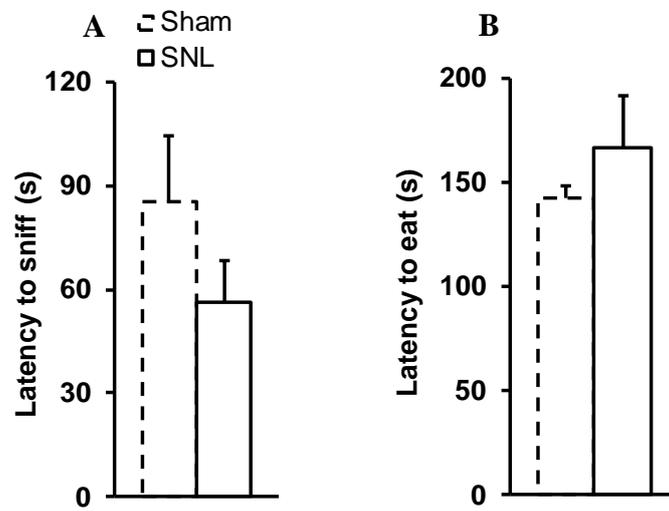
La ligature du nerf spinal chez le rat n'entraîne pas de variation significative du temps passé dans les bras ouverts ( $34,35 \pm 7,33$  s Vehicle *vs*  $32,10 \pm 9,20$  s Sham Vehicle) (**Figure 63A**) et du nombre d'entrées dans les bras ouverts ( $8,25 \pm 1,99$  Vehicle *vs*  $5,33 \pm 1,67$  Sham Vehicle) (**Figure 63B**).

L'administration i.p. de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) ne modifie pas non plus ces deux paramètres ( $37,38 \pm 10,13$  s SB258585 *vs*  $34,35 \pm 7,33$  s Vehicle pour le temps passé dans les bras ouverts et  $7,25 \pm 1,44$  SB258585 *vs*  $8,25 \pm 1,99$  Vehicle pour le nombre d'entrées dans les bras ouverts).

La mesure de la distance totale parcourue par l'animal durant le test, ne révèle aucune différence significative chez le rat SNL recevant le véhicule ou le SB258585 ( $1634,71 \pm 77,18$  cm Vehicle et  $1667,10 \pm 122,20$  cm SB258585 *vs*  $1570,99 \pm 112,24$  cm Sham Vehicle) permettant d'exclure un effet sur la locomotion dû à la ligature du nerf spinal et ou à de l'administration de SB258585 (**Figure 63C**).

Ces résultats, assez inattendus, ne permettent pas de mettre en évidence un phénotype anxieux chez le rat SNL, malgré sa démonstration dans une étude précédente menée au laboratoire. L'EPM, étant un test sensible et dépendant du milieu environnemental, il a été réitéré afin de reproduire et confirmer ce résultat.

Aucune différence significative n'a de nouveau été observée sur les 3 paramètres mesurés entre les animaux Sham et SNL ( $18,13 \pm 9,85$  s SNL *vs*  $17,84 \pm 6,53$  s Sham concernant le temps passé dans les bras ouverts,  $4,63 \pm 1,83$  SNL *vs*  $6,63 \pm 1,81$  Sham concernant le nombre d'entrées total dans les bras ouverts,  $1590,26 \pm 131,69$  cm SNL *vs*  $1551,37 \pm 173,78$  cm Sham concernant la distance totale parcourue) confirmant donc l'absence d'atteinte locomotrice et de comportement anxieux chez le rat SNL (données non présentées).



**Figure 64** : (A) Latence de reniflement de la nourriture. Les valeurs sont exprimées en  $s \pm ES$ . (n = 8/groupe).

(B) Latence à consommer la nourriture. Les valeurs sont exprimées en  $s \pm ES$ .

*Test d'hyponéophagie (NSF)*

Par rapport au rat Sham, le rat SNL affamé par une privation de nourriture, ne présente pas de modification significative de la latence à renifler la nourriture ( $85,14 \pm 19,48$  s SNL *vs*  $49,88 \pm 13,13$  s Sham) (**Figure 64A**) et à la consommer ( $166,88 \pm 24,71$  s SNL *vs*  $142,43 \pm 5,98$  s Sham) (**Figure 64B**) révélant l'absence d'un comportement anxieux dans ce test chez le rat douloureux.

Cette étude n'a pas permis de détecter de comorbidité anxieuse chez le rat SNL douloureux par l'utilisation du test de l'EPM et du NSF, confirmant (Kontinen *et al.*, 1999) et s'opposant (Jiang *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2017) à d'autres travaux réalisés chez ce modèle. Des troubles anxieux sont rapportés dans d'autres modèles de douleur neuropathique d'origine traumatique (CCI, SNI, SCI), iatrogène (didéoxycytidine), diabétique (STZ) et infectieuse (VZV, *varicella-zoster virus*) (Hasnie *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 2007; Roeska *et al.*, 2009; Grégoire *et al.*, 2012; Leite-Almeida *et al.*, 2012; Galan-Arriero *et al.*, 2014, 2015; Alba-Delgado *et al.*, 2016), ainsi que des modèles de douleur inflammatoire induits par l'injection intra-articulaire ou intra-plantaire de CFA (Grégoire and Neugebauer, 2013; Grégoire *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017).

Il semblerait que le modèle SNL ne soit pas adapté à l'étude des comportements anxieux associés à la douleur neuropathique chronique.

L'administration i.p. de SB258585 ( $5 \mu\text{mol/kg}$ ) n'a pas d'effet de type anxiolytique chez le rat SNL (dont le comportement anxieux n'est pas pathologique car non différent du groupe Sham) alors que d'autres ligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (SB399885, SB742457, AVN-492), ont une activité anxiolytique chez l'animal sain mais à des doses susceptibles de modifier l'activité locomotrice pour le SB399885 (Wesołowska and Nikiforuk, 2007; Wesołowska, 2008; Abraham *et al.*, 2014; Grychowska *et al.*, 2016; Ivachtchenko *et al.*, 2016)

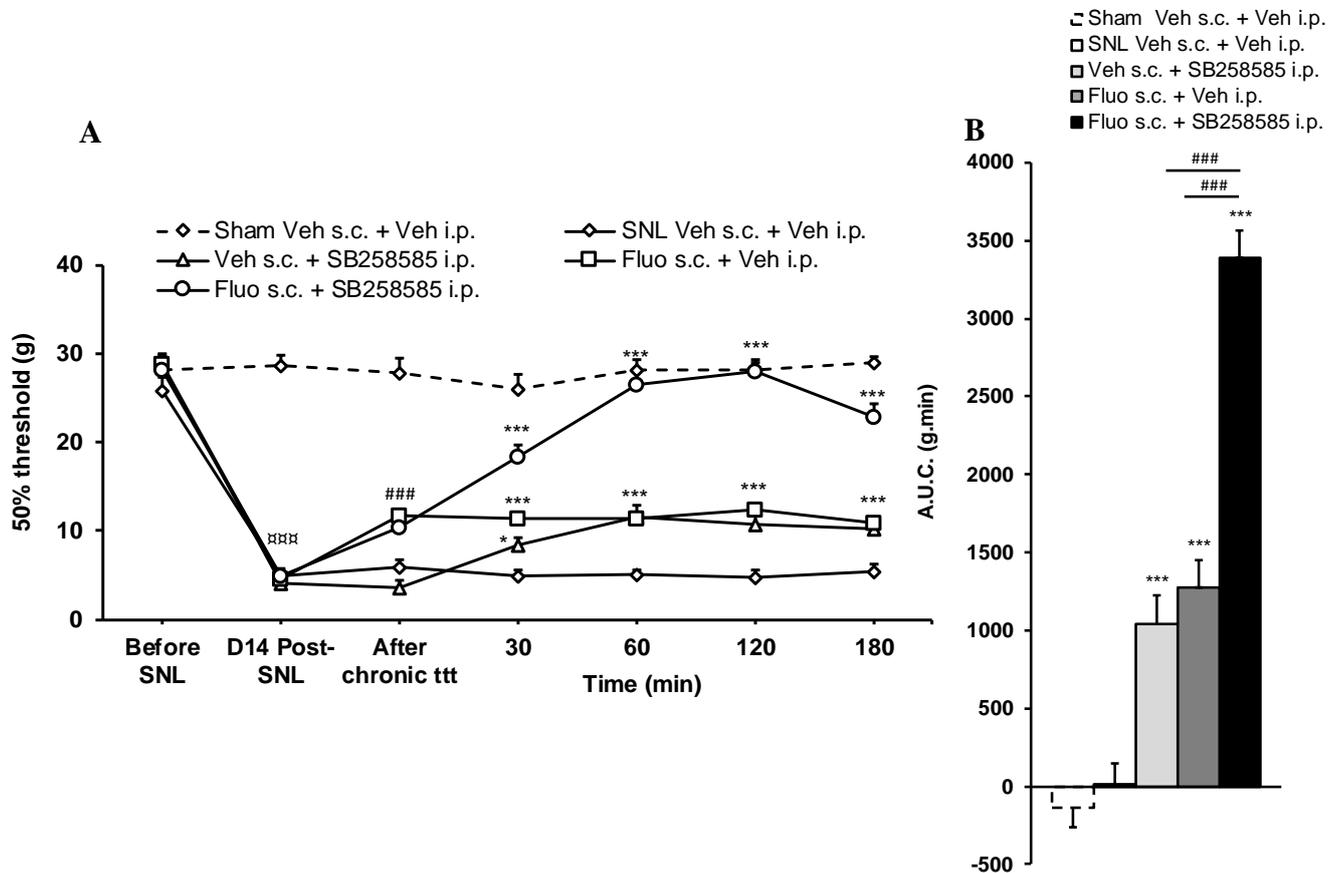
Par la mesure de la distance totale parcourue dans l'EPM, nous avons confirmé l'absence de perturbation locomotrice du SB258585 chez le rat SNL (Kontinen *et al.*, (1999)., contrairement au SB742457 (cf Chapitre II) permettant d'exclure un effet sédatif de l'agoniste inverse aux doses utilisées.



### **Chapitre 3. Potentialisation de l'activité de la fluoxétine**

Le traitement des douleurs neuropathiques est complexe, confronté à l'inefficacité des antalgiques classiques (AINS et paracétamol) et à la grande variabilité de la réponse aux antalgiques de 1<sup>ère</sup> intention. Ces derniers, comprenant les antidépresseurs tricycliques (ATC), les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN), et les antiépileptiques ligands de la sous-unité  $\alpha_2\text{-}\delta$  des canaux calciques voltage-dépendants ( $\text{Cav}$ ), bénéficient d'une recommandation élevée d'après la classification GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation*) et font partie des recommandations du groupe NeuPSIG de l'IASP (Finnerup *et al.*, 2015). En revanche, les ISRS comme la fluoxétine, bien tolérés, ne présentent qu'une efficacité très limitée avec un NNT de 6,8 (Finnerup *et al.*, 2010) ce qui leur vaut d'être classés selon ces critères, parmi les traitements aux recommandations non concluantes (Finnerup *et al.*, 2015). Les travaux antérieurs menés au laboratoire se sont intéressés aux raisons de cette très faible efficacité et ont montré que l'activité de la fluoxétine pouvait être renforcée en restaurant l'activité du récepteur de la sérotonine de type 5-HT<sub>2A</sub> (Dupuis *et al.*, 2017). Dans cette même démarche, il a été recherché la possibilité d'une synergie entre la fluoxétine, renforçant la neurotransmission 5-HT et l'agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> le SB258585 qui, compte-tenu de son affinité pour le récepteur ( $K_i = 1,8 \text{ nM}$ ) (Hirst *et al.*, 2003), rentre en compétition avec la 5-HT endogène ( $K_i = 56,0 \text{ nM}$ ) (Bard *et al.*, 1993) pour ce récepteur sans perturber la liaison de l'amine aux autres récepteurs. Nous proposons donc d'étudier les effets pharmacologiques de l'administration de fluoxétine en combinaison avec le SB258585, sur l'hypersensibilité et les troubles cognitifs associés chez le rat SNL.

Pour cela, quatorze jours après la ligature du nerf spinal L5, un pellet placebo ou un pellet à libération continue de fluoxétine (Fluo, 28 mg/jour/kg) est implanté par voie s.c. au niveau de la région inter-scapulaire. Cinq jours après l'implantation, une injection unique de 5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p. de SB258585 ou de véhicule (Veh) est réalisée. Un suivi de la sensibilité tactile est réalisé avant et après chirurgie, après administration chronique de fluoxétine, et après l'administration aiguë de SB258585. Les performances cognitives sont évaluées à la fin du traitement.



**Figure 65 :** (A) Évolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau ppi, 5 ml/kg) ou de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) 5 jours après la pose d'un implant s.c. inerte (placebo) ou de fluoxétine (28 mg/kg/j) (n = 8-11/groupe). Les valeurs sont exprimées en g  $\pm$  E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement aiguë (After chronic ttt) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant pose de l'implant s.c. (D14 Post-SNL) ;

⚡  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(B) : Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations des seuils de retrait 50 % induites par l'administration i.p. de Véhicule (5 ml/kg) ou de SB258585 (5  $\mu$ mol/kg) 5 jours après la pose d'un implant s.c. inerte (placebo) ou de fluoxétine (n = 8-11/groupe). Les valeurs sont exprimées en g.min  $\pm$  E.S..

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe Véhicule s.c. + Véhicule i.p. ;

###  $p < 0,001$ , d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

***Effet de la co-administration Fluoxétine + SB258585 sur l'hypersensibilité tactile***

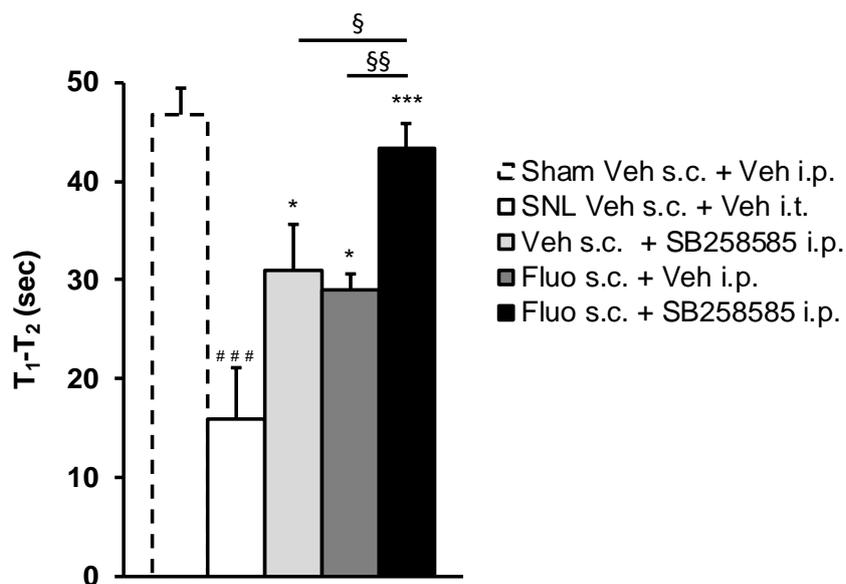
Quatorze jours après la chirurgie, les rats SNL présentent une diminution significative moyenne de  $83,2 \pm 1,4$  % du seuil de retrait 50 % à l'application des filaments de von Frey ( $4,66 \pm 0,38$  g après SNL vs  $28,02 \pm 0,59$  g avant SNL) traduisant une allodynie tactile (**Figure 65A**).

Cinq jours après la pose de l'implant de fluoxétine, une augmentation significative des seuils de retrait correspondant à  $26,3 \pm 2,3$  % de l'EMP est observée ( $4,58 \pm 0,75$  g après SNL vs  $11,66 \pm 0,31$  g après Fluo + Veh ;  $4,89 \pm 0,74$  g après SNL vs  $10,41 \pm 0,51$  g après Fluo + SB258585), révélant un effet anti-allodynique de la fluoxétine (**Figure 65A**). Cet effet est maintenu tout au long de l'expérimentation. L'implantation de pellets inertes et l'administration de Véhicule (SNL Placebo + Veh.) n'entraînent aucune variation significative du seuil de retrait 50 % (**Figure 65A**).

L'administration de SB258585 ( $5 \mu\text{mol/kg}$  i.p.) chez les rats SNL ayant reçu un implant placebo induit un effet anti-allodynique significatif entre T<sub>30</sub> et T<sub>180</sub>. Aucune différence significative entre les rats SNL traités avec la Fluo + Veh et ceux traités avec le Placebo + SB258585 aux points T<sub>60</sub>, T<sub>120</sub> et T<sub>180</sub> n'est observée, indiquant une efficacité similaire des 2 traitements.

La co-administration de Fluo ( $28 \text{ mg/kg/j}$ , s.c., 5 jours) avec le SB258585 ( $5 \mu\text{mol/kg}$  i.p., 1 injection.) entraîne une forte augmentation du seuil de retrait dès T<sub>30</sub> révélant un effet anti-allodynique robuste de la combinaison. A T<sub>60</sub> et T<sub>120</sub> les valeurs du groupe Fluo + SB258585 ne présentent pas de différence significative avec celles avant SNL ( $26,47 \pm 1,60$  g T<sub>60</sub> et  $28,05 \pm 1,02$  g T<sub>120</sub> vs  $28,15 \pm 1,04$  g avant SNL) et celles des animaux Sham ( $26,47 \pm 1,60$  g vs  $28,20 \pm 1,14$  à T<sub>60</sub> et  $28,05 \pm 1,02$  g vs  $28,20 \pm 1,14$  g à T<sub>120</sub>) indiquant une suppression complète de l'allodynie tactile.

L'effet global mesuré par les A.S.C. confirme l'efficacité du SB258585 par voie i.p. ( $1041,2 \pm 186,4$  g.min Placebo + SB258585 vs  $12,5 \pm 132,4$  g.min Placebo + Veh) ; celle de l'administration continue de fluoxétine ( $1278,9 \pm 170,7$  g.min Fluo + Veh vs  $12,5 \pm 132,4$  g.min Placebo + Veh) ainsi qu'un effet additif de la combinaison de ces 2 traitements, significativement supérieur à celui de la Fluo ou du SB258585 co-administrés avec le Veh ou le placebo ( $3388,7 \pm 174,5$  g.min Fluo + SB258585 vs  $1041,2 \pm 186,4$  g.min Placebo + SB258585 et  $1278,95 \pm 170,69$  g.min Fluo + Veh) (**Figure 65B**).

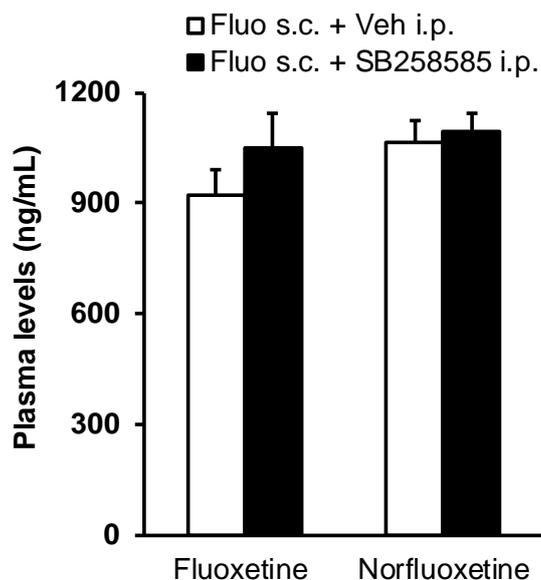


**Figure 66** : Effet de l'administration i.p. de Véhicule (5 mL/kg) ou de SB258585 (5 µmol/kg) 5 jours après la pose d'un implant s.c. (placebo) ou de fluoxétine (28 mg/kg/j) sur la différence de temps (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) passé en interaction sociale avec un rat juvénile entre la première (T<sub>1</sub>) et la seconde (T<sub>2</sub>) période du test (n = 8-11/groupe). Les valeurs sont exprimées en sec ± E.S..

###  $p < 0,001$  par rapport au groupe Sham ;

\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe SNL Véhicule s.c. + Véhicule i.p. ;

§  $p < 0,05$  §§  $p < 0,01$ , d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.



**Figure 67** : Concentrations plasmatiques en fluoxétine et norfluoxétine de rats ayant reçu un implant de fluoxétine (28 mg/kg/jour) (n = 8/groupe) pendant 7 jours. Les valeurs sont exprimées en ng/mL ± E.S..

### *Effet sur les performances cognitives*

La différence de temps passé en interaction avec le rat juvénile entre la 1<sup>ère</sup> (0-5 min) et la 2<sup>ème</sup> période du test (5-10 min) est significativement réduite chez les rats SNL Placebo + Veh par rapport aux rats Sham Placebo + Veh (respectivement  $15,87 \pm 5,29$  sec vs  $46,73 \pm 2,76$  sec) traduisant un déficit cognitif.

Les rats SNL traités avec la Fluo + Veh ou avec le Placebo + SB258585 présentent une augmentation significative de la différence de temps passé à interagir avec le rat juvénile durant les 2 périodes du test (respectivement  $29,05 \pm 1,59$  sec et  $31,03 \pm 4,54$  sec vs  $15,87 \pm 5,29$  sec SNL Placebo + Veh), confirmant, l'amélioration des troubles cognitifs par le SB258585 et mettant en évidence un effet similaire de la fluoxétine (**Figure 66**).

Les animaux ayant reçu la combinaison Fluo + SB258585, présentent une forte différence T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>. Ces valeurs sont significativement supérieures à celle des animaux traités à la Fluo + Veh et Placebo + SB258585 ( $43,36 \pm 2,54$  sec vs  $29,05 \pm 1,59$  sec et  $31,03 \pm 4,54$  sec), et non différentes de celles des animaux Sham Placebo + Veh ( $43,36 \pm 2,54$  sec vs  $46,73 \pm 2,76$  sec), ce qui révèle d'une part, un effet bénéfique de la combinaison pharmacologique sur l'amélioration des troubles cognitifs supérieur à celui des 2 traitements individuels, mais aussi une restauration totale des performances cognitives des animaux SNL par celle-ci.

### *Concentrations plasmatiques de fluoxétine et norfluoxétine*

Les concentrations plasmatiques en fluoxétine et son métabolite actif, la norfluoxétine sont homogènes entre les 2 groupes de rats traités par la Fluo + Veh et Fluo + SB258585. En effet, aucune différence significative n'est observée dans les concentrations en fluoxétine ( $921,0 \pm 70,9$  vs  $1048,0 \pm 96,8$  ng/mL) et en norfluoxétine ( $1066,0 \pm 56,8$  vs  $1092,0 \pm 49,7$  ng/mL) entre les deux groupes d'animaux (**Figure 67**).

Les résultats obtenus dans cette étude révèlent un effet anti-allodynique et pro-cognitif partiel de l'administration de l'agoniste inverse 5-HT<sub>6</sub> ou de la fluoxétine dans le modèle de douleur neuropathique induit par SNL chez le rat. Leur combinaison est synergique conduisant à une correction complète de l'hypersensibilité tactile et des troubles cognitifs, développés dans ce contexte douloureux.

La pose d'implant sous-cutané de fluoxétine permet d'éviter la répétition des injections i.p., anxiogène, et d'obtenir des taux plasmatiques reproductibles entre les animaux, en rapport (d'un facteur 100) avec ceux mesurés chez des patients recevant une dose quotidienne de 0,31 mg/kg/j (20 mg/j, soit une dose également 100 fois supérieure) (Shi *et al.*, 2010).

Une amélioration partielle de l'allodynie tactile induite par SNL lors du traitement à la fluoxétine est observée, conformément aux résultats antérieurs obtenus au laboratoire et aux données de la littérature (LaBuda and Little, 2005; Dupuis *et al.*, 2017). L'ISRS a aussi prouvé son efficacité partielle sur l'allodynie tactile et thermique dans le modèle CCI (Murad and Ayuob, 2015; Zychowska *et al.*, 2015). De même, sur les troubles de discrimination sociale, la libération continue de fluoxétine exerce une efficacité partielle, similaire à celle de l'agoniste inverse 5-HT<sub>6</sub>. L'effet pro-cognitif de l'ISRS a déjà été rapporté par d'autres auteurs chez la souris (Carlini *et al.*, 2012; Marwari and Dawe, 2018) et chez l'homme (Mowla *et al.*, 2007; Xuan Liu *et al.*, 2014). De manière intéressante, une synergie additive de la combinaison fluoxétine + agoniste inverse 5-HT<sub>6</sub> conduisant à un rétablissement total de la sensibilité tactile et des performances cognitives, a été observée. Une stratégie combinatoire similaire a récemment permis d'améliorer l'efficacité des gabapentinoïdes (gabapentine, prégabaline) à l'aide d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub>, le SB742457, sur le comportement douloureux et les troubles cognitifs associés dans le modèle PSNL (Jayarajan *et al.*, 2015). Cependant, nous avons trouvé un effet sédatif du SB742457 (cf page 142) interrogeant sur la spécificité de cet effet antiallodynique.

Une étude *ex vivo* (Asaoka *et al.*, 2015) sur des coupes de raphé de rat, a mis en évidence une potentialisation de l'augmentation des concentrations extracellulaires en 5-HT induite par un ISRS, le citalopram, par la co-administration d'un antagoniste 5-HT<sub>6</sub>, le SB299885, le mécanisme évoqué étant une suppression de l'inhibition GABAergique locale. On ne peut totalement exclure un effet désinhibiteur du SB2585858 s'exerçant indirectement sur les neurones 5-HT-

La poursuite du suivi de la sensibilité tactile jusqu'à l'extinction de l'effet anti-allodynique aurait probablement montré un allongement de l'effet de la combinaison Fluo + SB258585 vs. Placebo + SB258585, tel qu'il a été retrouvé dans l'étude de Jayarajan *et al.*, (2015) avec la combinaison gabapentinoïdes + SB742457.

La co-administration d'un agoniste inverse 5-HT<sub>6</sub> augmente de façon importante les effets antalgiques et pro-cognitifs de la fluoxétine, mettant en évidence l'intérêt d'une telle combinaison dans la prise en charge des patients souffrant de douleurs neuropathique. Dans la mesure où plusieurs ligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (Idalopirdine (Lu AE58054), Intepirdine (SB742457) et SUVN-502) ont été en essai de phase II et III (dans la maladie d'Alzheimer) où ils ont montré des profils de sécurité satisfaisants (Khoury *et al.*, 2018), il pourrait être envisagé une étude clinique chez des patients douloureux neuropathiques traités à la fluoxétine. Cette combinaison pourrait apporter un bénéfice réel comme l'ont montré d'autres combinaisons associant par exemple un opioïde (morphine, oxycodone) ou un antidépresseur (nortriptyline, duloxétine) avec un gabapentinoïde, dans la prise en charge des douleurs neuropathiques (Eisenberg and Suzan, 2014; Gilron *et al.*, 2015).

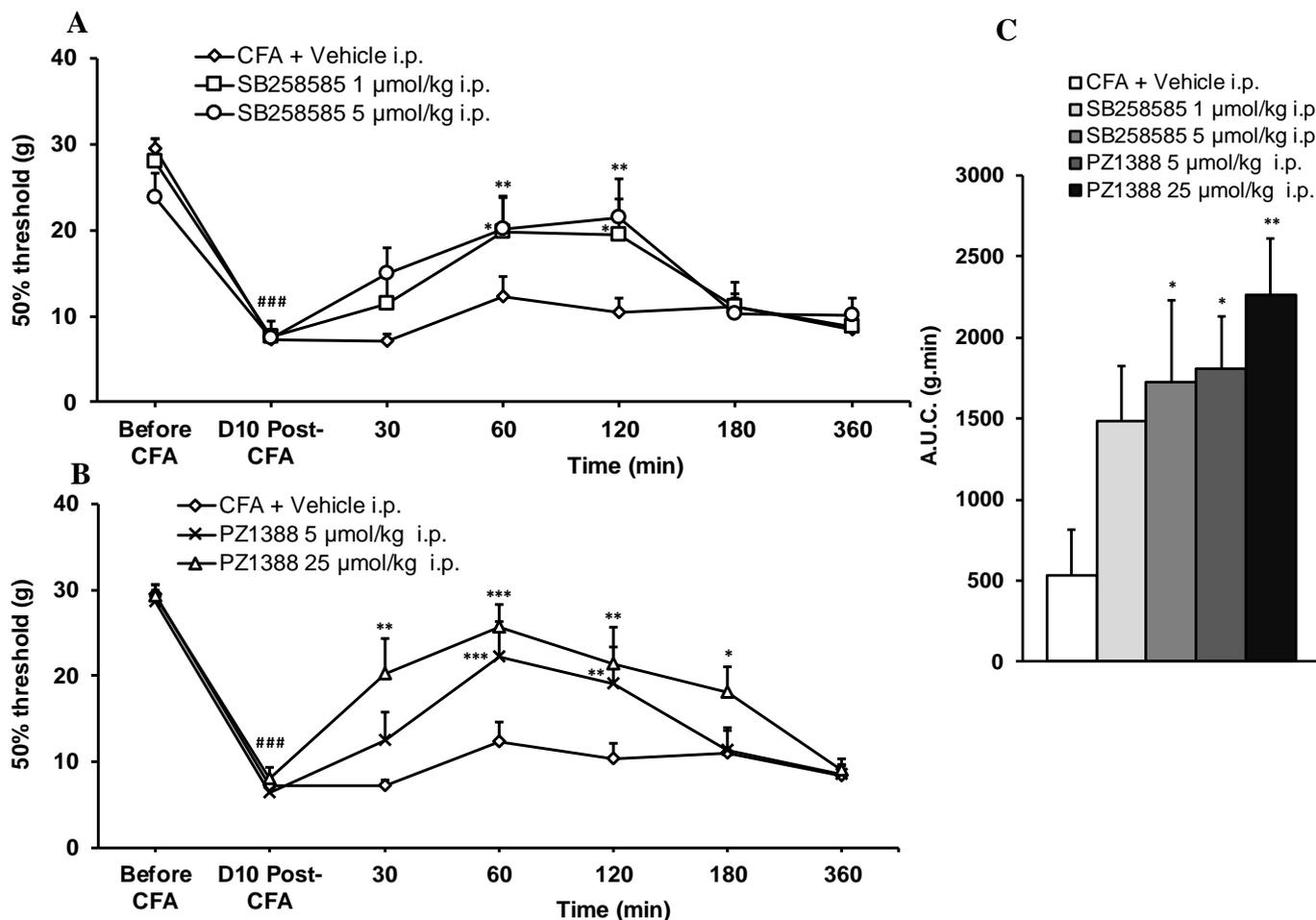


***Chapitre 4. Recherche d'une activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur par excès de nociception chronique et de l'implication d'un autre partenaire du récepteur dans la douleur neuropathique : Quelles perspectives ?***

Les données de la littérature sont un faveur d'une implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur inflammatoire : l'administration locale (intraplantaire), spinale ou systémique d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (le SB258585 et le SB271046) réduit la phase tonique du test au formol (injection intraplantaire) chez le rat (Finn *et al.*, 2007; Castañeda-Corral *et al.*, 2009; Godínez-Chaparro *et al.*, 2012).

En clinique, les douleurs inflammatoires chroniques revêtent des formes aussi différentes que la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante ou l'arthrite juvénile idiopathique touchant respectivement 0,53 à 0,55 %, 0,18 % et 0,07 à 0,15 % de la population (Exarchou *et al.*, 2015; Barut *et al.*, 2017; Hunter *et al.*, 2017). Dans ce contexte où la prise en charge de la douleur demeure insatisfaisante, la mise en évidence de l'activité antalgique des agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>6</sub> constituerait une avancée thérapeutique. Nous proposons d'évaluer les effets des deux agoniste inverses 5-HT<sub>6</sub> (SB258585 et PZ1388) sur l'allodynie tactile induite par l'injection intraplantaire de CFA chez le rat et sur les troubles cognitifs associés.

Pour cela, dix jours après l'injection intra-articulaire de CFA reproduisant les symptômes de l'arthrite inflammatoire localisée, les rats reçoivent une injection i.p. de véhicule (eau p.p.i.), de SB258585 (1, 5 µmol/kg) ou de PZ1388 (5, 25 µmol/kg). Ces doses ont été déterminées d'après les doses efficaces des deux composés chez le rat SNL. Un suivi cinétique de la sensibilité tactile à l'aide du test des filaments de von Frey et une mesure des performances cognitives par le test de reconnaissance du nouvel objet (NOR) ont été réalisés.



**Figure 68** : Évolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.p. de Véhicule (eau p.p.i., 5 mL/kg) ou (A) de SB258585 (1 et 5 μmol/kg) ou (B) de PZ1388 (5 et 25 μmol/kg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D10 Post-CFA) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant injection de CFA (Before CFA), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(C) : Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations des seuils de retrait 50 % induites par l'administration i.p de Véhicule (5 mL/kg) ou de SB258585 (1 et 5 μmol/kg) ou de PZ1388 (5 et 25 μmol/kg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en g.min ± E.S..

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe CFA + Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

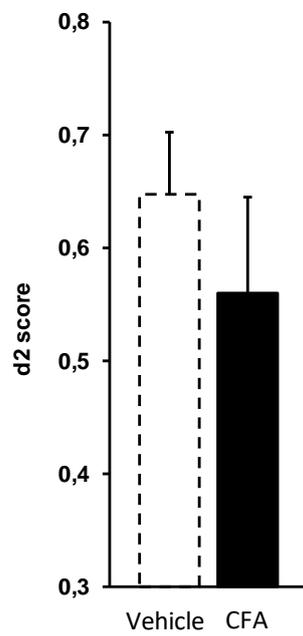
*Effets des agonistes inverses 5-HT<sub>6</sub>, SB258585 et PZ1388 sur l'hypersensibilité tactile*

Dix jours après l'injection de CFA, les rats présentent une diminution significative moyenne de  $71,9 \pm 2,4$  % du seuil de retrait à l'application des filaments de von Frey ( $7,32 \pm 0,53$  g après CFA vs  $27,76 \pm 0,95$  g avant CFA) traduisant une allodynie tactile (**Figure 68A, B**).

L'administration i.p. de 1 et 5  $\mu\text{mol/kg}$  de SB258585 entraîne une augmentation significative du seuil de retrait 60-120 min après traitement avec un effet maximal à T<sub>60</sub> pour la dose de 1  $\mu\text{mol/kg}$ , augmentation correspondant à  $68,0 \pm 14,7$  % de l'EMP ( $19,73 \pm 4,11$  g T<sub>60</sub> vs  $7,57 \pm 1,78$  g avant CFA) et à T<sub>120</sub> pour la dose de 5  $\mu\text{mol/kg}$ , augmentation correspondant à  $73,5 \pm 17,1$  % de l'EMP ( $21,49 \pm 4,47$  g T<sub>120</sub> vs  $7,42 \pm 0,95$  g avant CFA) (**Figure 68A**). Pour ces 2 points la restauration de la sensibilité tactile est complète dans la mesure où aucune différence significative n'est observée avec les seuils avant injection de CFA (T<sub>60</sub> et T<sub>120</sub> vs avant CFA).

L'administration i.p. de PZ1388 entraîne une augmentation significative du seuil de retrait 60-120 min et 30-180 min après traitement pour les doses de 5 et 25  $\mu\text{mol/kg}$  respectivement (**Figure 68B**). L'acmé de l'effet, observé à T<sub>60</sub>, correspond à  $67,9 \pm 15,1$  % de l'EMP ( $22,17 \pm 4,16$  g T<sub>60</sub> vs  $6,37 \pm 1,35$  g avant CFA) pour la dose de 5  $\mu\text{mol/kg}$  et à  $80,4 \pm 9,7$  % de l'EMP ( $25,59 \pm 2,63$  g T<sub>60</sub> vs  $8,04 \pm 1,31$  g avant CFA) pour la dose de 25  $\mu\text{mol/kg}$ . La restauration de la sensibilité tactile est complète pour la dose de 5  $\mu\text{mol/kg}$  aux points T<sub>60</sub> et T<sub>120</sub> dans la mesure où aucune différence significative n'est observée avec les seuils avant CFA. Pour la dose de 25  $\mu\text{mol/kg}$  cette restauration est totale aux points T<sub>30</sub>, T<sub>60</sub> et T<sub>120</sub> et partielle au point T<sub>180</sub>.

L'effet global mesuré par les A.S.C. confirme l'efficacité du SB258585 (5  $\mu\text{mol/kg}$ ) ( $1724,2 \pm 505,7$  g.min) et de PZ1388 ( $1803,8 \pm 329,2$  g.min et  $2262,7 \pm 344,8$  g.min pour 5 et 25  $\mu\text{mol/kg}$  i.p. respectivement) vs le véhicule ( $532,00 \pm 283,23$  g.min) (**Figure 68C**). Il n'y a pas de différence significative des valeurs d'A.S.C. entre ces 3 groupes. L'effet de la dose de 25  $\mu\text{mol/kg}$  d'PZ1388 est significatif 30 min à 3 heures après administration contre 1 à 2 heures pour la dose de 5  $\mu\text{mol/kg}$  de PZ1388 et de 5  $\mu\text{mol/kg}$  de SB258585 suggérant une meilleure cinétique de ce traitement.



**Figure 69** : Index de discrimination du nouvel objet par rapport à l'objet familier (10 jours après administration de CFA). Les valeurs sont exprimées sous forme d'indice  $\pm$  E.S..

***Présence de troubles cognitifs induit par le modèle CFA***

La recherche de troubles cognitifs associés à la douleur inflammatoire induite par le CFA, à l'aide du test de NOR, n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de l'indice de discrimination d2 entre les groupes CFA et témoin ( $0,56 \pm 0,09$  vs  $0,65 \pm 0,05$ ) (**Figure 69**).

Cette étude préliminaire a révélé l'effet anti-allodymique du SB258585 sur la douleur inflammatoire chronique induite par le CFA chez le rat mais apporte peu d'éléments quant à la nature de l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans ce type de douleur.

Néanmoins, dans la mesure où ce modèle entraîne une sensibilisation spinale (Seybold *et al.*, 2003; Gao and Ji, 2010; Luo *et al.*, 2014), une activité constitutive du récepteur similaire à ce qui est observé chez le rat SNL pourrait être mise en cause ; hypothèse à confirmer à l'aide d'un antagoniste neutre.

Chez le rat CFA, la voie de signalisation mTOR au niveau des GRD, du renflement lombaire spinal et du CCA (Liang *et al.*, 2013; Shuo Li *et al.*, 2017) est amplifiée, et le comportement douloureux est diminué par l'injection i.t. de rapamycine (Liang *et al.*, 2013). Si l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est confirmée il sera intéressant d'explorer la voie de signalisation mTOR sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans ce contexte douloureux.

L'activité antalgique de l'administration locale de SB258585 dans la patte postérieure du rat sur la seconde phase du test au formol, rapportée par Godínez-Chaparro (Godínez-Chaparro *et al.*, 2011), ne permet pas d'exclure totalement un effet périphérique des agonistes inverses dans le modèle CFA.

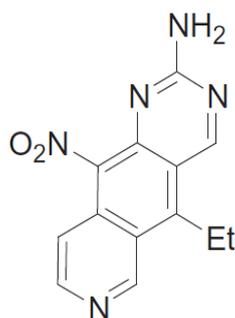
Même si l'indice de discrimination d2 des rats CFA douloureux est abaissé, la différence n'est pas significative excluant donc la présence de troubles cognitifs dans ce modèle. L'absence d'atteinte cognitive chez le rat CFA est confirmée dans l'étude de Freitas *et al.*, (2015) où l'attention des rats n'est pas affectée par l'injection le CFA mais altérée par l'injection intraplantaire de formol. Cependant, d'autres études ont pu mettre en évidence l'apparition de troubles cognitifs dans ce modèle chez le rat et la souris (Cain *et al.*, 1997; Pais-Vieira *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2012; Longqiu Yang *et al.*, 2014), à l'aide de différents tests

de cognition (test de 5-CSRTT (*5-choice serial reaction time task*), DNMTP (delayed non-matching to position) et le test de conditionnement à la peur)) suggérant un effet délétère de la douleur inflammatoire chronique induite par le CFA sur les performance cognitives, dépendant du test de cognition utilisé.

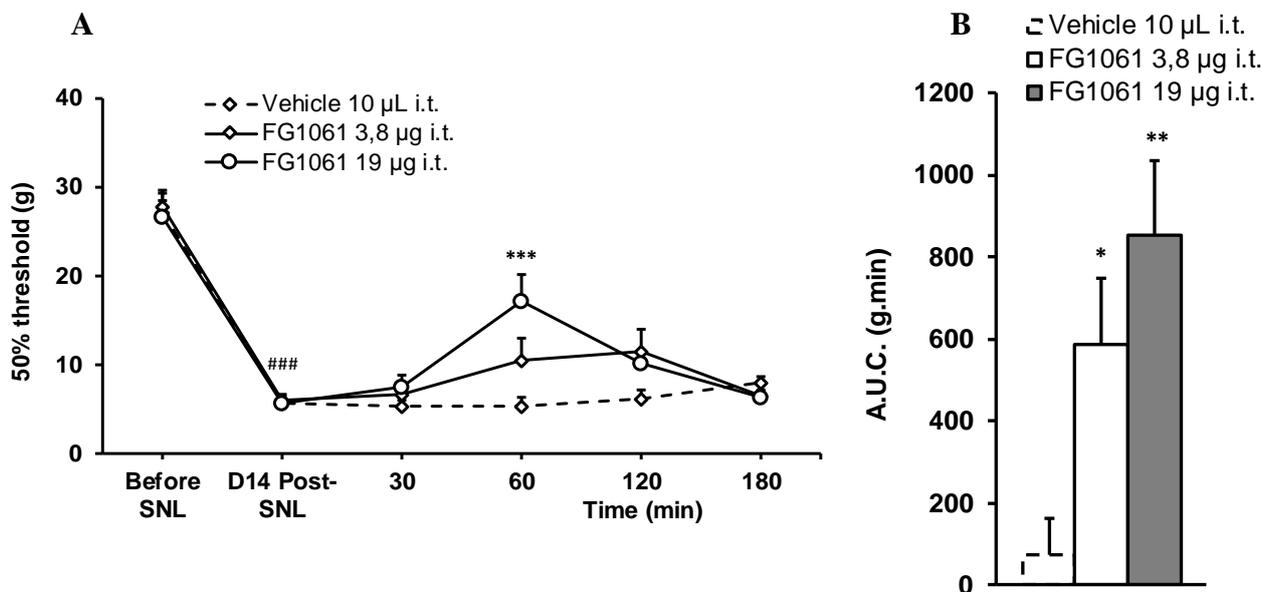
Nous pourrions donc envisager l'étude de troubles cognitifs à l'aide d'autres tests comportementaux ainsi que l'étude de différentes comorbidités associées à la douleur inflammatoire induite par le CFA notamment anxieuses et/ou dépressives déjà rapportées (Narita *et al.*, 2006; Parent *et al.*, 2012; G. F. Zhang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017) et l'effet des agonistes inverses sur ceux-ci.

La protéine Cdk5 a été identifiée comme partenaire physiologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, qu'elle phosphoryle sur son extrémité C-ter, promouvant ainsi l'élongation des neurites et la migration neuronale au cours du développement neuronal (Duhr *et al.*, 2014; Jacobshagen *et al.*, 2014). Dans la mesure où (i) cette protéine est présente dans la moelle épinière (Terada *et al.*, 1998), (ii) que son activité est augmentée dans le SNC de rats neuropathiques douloureux (Li *et al.*, 2010) et, (iii) que son blocage par la roscovitine diminue le comportement douloureux dans différents modèles de neuropathie (R. Zhang *et al.*, 2012; K. Li *et al.*, 2014; Lei Yang *et al.*, 2014), nous proposons d'étudier l'effet spinal d'un inhibiteur de Cdk5, le FG1061 (**Figure 70**), synthétisé par l'équipe de F. Anizon de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (Zeinyeh *et al.*, 2016), sur les symptômes d'allodynie tactile et thermique chez le rat SNL.

Pour cela, 14 jours après induction de la neuropathie par SNL, les rats reçoivent une injection i.t. de véhicule (DMSO 20 %) ou de FG1061 aux doses de 3,8 ou 19 µg. Ces doses ont été déterminées d'après les données de la littérature sur la roscovitine (doses par voie i.t.) (R. Zhang *et al.*, 2012; Duhr *et al.*, 2014; Xiaojie Liu *et al.*, 2014; Fang-Hu *et al.*, 2015) et d'après la puissance relative du FG1061 par rapport à la roscovitine ( $[IC_{50}]_{FG1061} : 0,1 \mu M / [IC_{50}]_{roscovitine} : 0,2 \mu M = 0,5$ ) (Zeinyeh *et al.*, 2016). Un suivi cinétique de la sensibilité tactile et thermique a été réalisé.



**Figure 70** : Structure du FG1061. D'après Zeinyeh *et al.*, 2016.



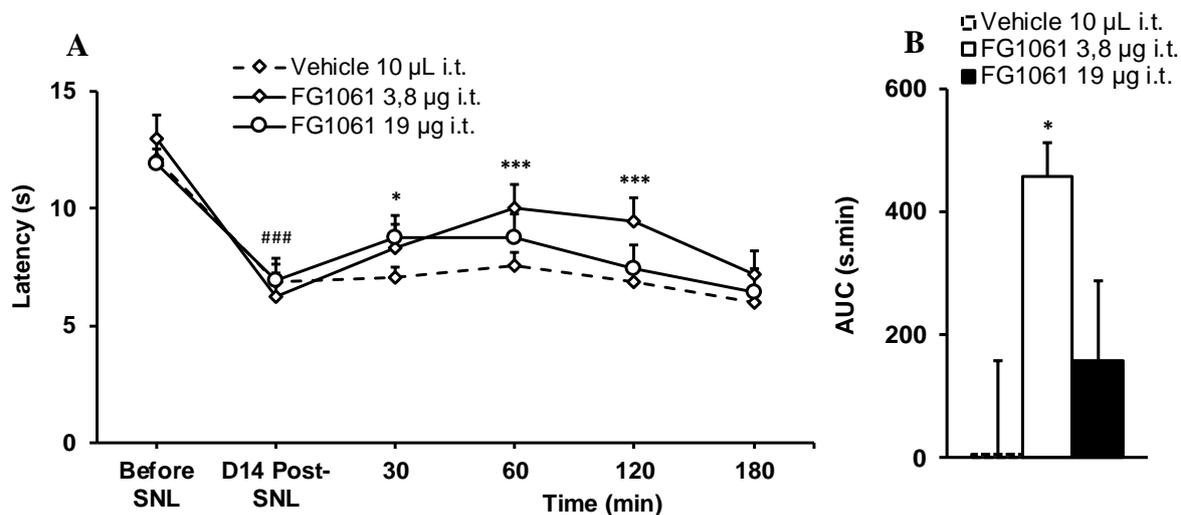
**Figure 71 :** (A) Évolution des seuils de retrait de la patte 50% après administration i.t. de Véhicule (DMSO 20 %, 10 µL) ou de FG1061 (3,8 et 19 µg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en  $g \pm E.S.$

\*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(B) : Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations des seuils de retrait 50 % induites par l'administration de Véhicule (10 µL) ou de FG1061 (3,8 et 19 µg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en  $g.min \pm E.S.$

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.



**Figure 72 :** (A) Évolution de la latence de retrait de la patte immergée à 15 °C après administration i.t. de Véhicule (DMSO 20 %, 10 µL) ou de FG1061 (3,8 et 19 µg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en  $s \pm E.S.$

\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant traitement (D14 Post-SNL) ;

###  $p < 0,001$  par rapport aux valeurs mesurées avant chirurgie (Before SNL), d'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

(B) : Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution temporelle (0-180 min) des variations de latence de retrait induites par l'administration i.t. Véhicule (10 µL) ou de FG1061 (3,8 et 19 µg) (n = 8/groupe). Les valeurs sont exprimées en  $s.min \pm E.S.$

\*  $p < 0,05$  par rapport au groupe Véhicule, d'après une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Bonferroni.

### *Effet de l'inhibition de Cdk5 sur l'hypersensibilité tactile*

Quatorze jours après la chirurgie, les rats SNL présentent une diminution significative moyenne de  $78,6 \pm 1,4$  % du seuil de retrait 50 % à l'application des filaments de von Frey ( $27,23 \pm 1,09$  g avant SNL vs  $5,78 \pm 0,40$  g après SNL) traduisant une allodynie tactile (**Figure 71A**).

L'administration i.t. de véhicule ou de  $3,8 \mu\text{g}$  de FG1061 n'entraîne aucune variation significative des seuils de retrait. Cependant l'effet global de l'inhibiteur, apprécié par les A.S.C., est significatif ( $585,6 \pm 163,1$  g.min vs  $73,5 \pm 88,3$  g.min pour le Véhicule) (**Figure 71A**).

A la dose de  $19 \mu\text{g}$ , le FG1061 augmente significativement les seuils de retrait de la patte 1 h après l'injection, l'augmentation correspondant à  $57,7 \pm 14,1$  % de l'EMP ( $17,11 \pm 3,15$  g  $T_{60}$  vs  $5,68 \pm 0,94$  g après SNL), effet confirmé par les A.S.C ( $855,2 \pm 178,8$  g.min vs  $73,5 \pm 88,3$  g.min pour le Véhicule).

Aucune différence significative entre les A.S.C. des 2 doses de l'inhibiteur n'est observée (**Figure 71B**).

### *Effet de l'inhibition de Cdk5 sur l'hypersensibilité thermique*

Les rats SNL présentent une diminution significative moyenne de  $44,6 \pm 3,7$  % de la latence de retrait de la patte immergée dans un bain à  $15^\circ\text{C}$  ( $12,3 \pm 0,3$  s avant SNL vs  $6,7 \pm 0,3$  s après SNL), traduisant une allodynie thermique au froid (**Figure 72A**).

L'injection spinale de véhicule et de FG1061 à la dose de  $19 \mu\text{g}$  n'induit pas de variation significative du délai de retrait de la patte.

L'administration i.t. de  $3,8 \mu\text{g}$  de FG1061 entraîne une augmentation significative de la latence de retrait de la patte 30-120 min après l'injection ( $8,3 \pm 0,2$  s à  $T_{30}$ ,  $10,0 \pm 0,7$  s à  $T_{60}$ ,  $9,5 \pm 0,5$  s à  $T_{120}$  vs  $6,2 \pm 0,3$  s J14 Post-SNL) ; l'acmé de l'effet est observé à  $T_{60}$  et correspond à  $55,4 \pm 7,5$  % de l'EMP.

Le calcul des A.S.C. confirme ces observations avec un effet significatif de la dose de  $3,8 \mu\text{g}$  ( $456,6 \pm 55,5$  s.min vs  $5,8 \pm 152,5$  s.min pour le Véhicule) et une absence d'efficacité à la dose de  $19 \mu\text{g}$  (**Figure 72B**).

L'inhibition spinale de Cdk5 par la roscovitine exerce un effet antalgique dans différents modèles de douleur neuropathique d'étiologies traumatique et cancéreuse (R. Zhang *et al.*, 2012; K. Li *et al.*, 2014; Lei Yang *et al.*, 2014).

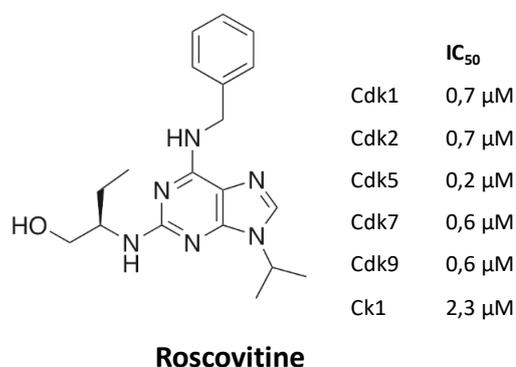
Les résultats de cette étude mettent en évidence un effet anti-allodynique de l'administration i.t. d'un nouvel inhibiteur de Cdk5, le FG1061, sur l'hypersensibilité tactile et thermique, confirmant le rôle de Cdk5 au niveau spinal dans la douleur neuropathique traumatique.

Vis-à-vis de deux symptômes d'allodynie, l'effet du FG1061 permet d'atteindre environ 55 % de l'EMP avec cependant des différences de puissance et de cinétique liées aux modalités de stimulation :

- après stimulation mécanique, l'effet anti-allodynique tactile est observé pour la plus forte dose, 1 h après l'injection, et est de courte durée;
- après stimulation thermique, l'effet anti-allodynique est uniquement observé avec la plus faible dose, il apparaît précocement et dure jusqu'à 2 h après l'injection pour disparaître au-delà.

Mis en regard des effets de la roscovitine rapportés dans le modèle de compression chronique de GRD, où l'inhibiteur n'a pas d'effet sur l'allodynie tactile et thermique 2 h après son administration i.t. mais 24 à 72 h après (Lei Yang *et al.*, 2014), ces résultats suggèrent des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques différentes des 2 inhibiteurs de Cdk5, molécule- et modèle- dépendantes.

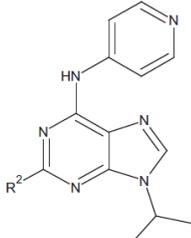
Les différences d'efficacité des différents composés pourraient être expliquées par des différences de sélectivité vis-à-vis d'autres Cdk ayant des propriétés autres. Par exemple, la roscovitine présente une certaine affinité vis-à-vis de Cdk qui, contrairement à Cdk5, contrôlent le cycle cellulaire, et sont également impliquées dans les mécanismes de douleur neuropathique (**Figure 73**) (Bach *et al.*, 2005; Demange *et al.*, 2013). L'administration de flavopiridol (Alvocidib), un inhibiteur pan-Cdk ayant une IC<sub>50</sub> de 41 nM pour Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6 et de 300 nM pour Cdk7 (Senderowicz, 2002), réduit le comportement douloureux dans les modèles SNI et SCI (Tsuda *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016). Dans ce dernier modèle,



**Figure 73** : Structure de la roscovitine et concentrations inhibitrices (IC<sub>50</sub>) vis-à-vis de différentes Cdk.

l'inhibition du cycle cellulaire par administration i.t. ou systémique d'un autre inhibiteur pan-Cdk, le CR-8 (Bettayeb *et al.*, 2008), réduit l'allodynie mécanique (Wu, Raver, *et al.*, 2013; Wu, Renn, *et al.*, 2013).

Même si le FG1061 possède une plus faible  $IC_{50}$  que la roscovitine pour Cdk5, il n'est pas spécifique de cette kinase et présente une affinité pour Dyrk1A, GSK3 et Ck1 (Zeinyeh *et al.*, 2016) ; or, ces deux dernières, sont impliquées dans la douleur neuropathique traumatique (SNL, PSNL) et chimio-induite (PTX) (Sakurai *et al.*, 2009; Mazzardo-Martins *et al.*, 2012; Weng *et al.*, 2014). Il serait intéressant d'utiliser des outils pharmacologiques plus sélectifs, tels que les purines tri-substituées dérivées de la roscovitine, comme le composé 3j (Demange *et al.*, 2013) qui présente une forte sélectivité pour Cdk5 (**Figure 74**), afin de caractériser l'effet thérapeutique du blocage spécifique de Cdk5 dans la douleur neuropathique.

Compd.	Scaffold	R <sup>2</sup>	CDK2	CDK5	GSK-3 $\alpha\beta$	DYRK1A	CK1
2c		Cl	0.7	7.4	18	3.9	2.1
3j		(R)-1-Hydroxy-but-2-ylamino	0.038	0.017	>10	4.1	1
3k		(S)-1-Hydroxy-but-2-ylamino	0.05	0.05	6	0.8	>1
3l		(R)-1-Hydroxy-3-methylbut-2-ylamino	0.02	0.021	12	0.78	1.8
3m		(S)-1-Hydroxy-3-methylbut-2-ylamino	0.13	0.2	7.8	0.9	3.3

**Figure 74** : Structures et concentrations inhibitrices ( $IC_{50}$  en  $\mu M$ ) d'inhibiteurs de Cdk5 dont le 3j. D'après Demange *et al.*, 2013.

Dans la mesure où le récepteur 5-HT<sub>6</sub> interagit de façon constitutive avec Cdk5 et que celle-ci phosphoryle le résidu Ser<sup>350</sup> du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (démonstration faite avec la roscovitine et le SB258585 par Duhr *et al.*, (2014)) il serait intéressant d'explorer *in vivo* la phosphorylation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (p-Ser<sup>350</sup>) dans la corne dorsale spinale d'animaux neuropathiques douloureux, traités ou non avec le FG1061.



# **DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION**



Malgré une meilleure connaissance de la physiopathologie des douleurs neuropathiques, et mis à part l'autorisation de mise sur le marché des gabapentinoïdes (prégabaline, gabapentine) dans cette indication il y a 20 ans, la thérapeutique médicamenteuse des douleurs neuropathiques n'a pas connu d'évolution conceptuelle marquante si ce n'est récemment avec l'inhibiteur de FLT3, le BDT001 (Rivat *et al.*, 2018).

Le laboratoire Neuro-Dol travaille depuis plusieurs années sur la compréhension de la résistance des douleurs neuropathiques à la sérotonine, caractérisée en clinique par la quasi-inefficacité des antidépresseurs ISRS. Cet intérêt a conduit à décrire un dysfonctionnement du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par les interactions qu'il établit avec des protéines à domaines PDZ rendant compte, au moins en partie, de l'inefficacité des ISRS dans cette indication (Pichon *et al.*, 2010; Dupuis *et al.*, 2017) et à proposer une stratégie de combinaison visant à renforcer les effets antalgiques des ISRS.

Parmi les autres alternatives thérapeutiques ciblant le système sérotoninergique, quelques données de la littérature suggèrent que les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> pourraient occuper une place privilégiée: leurs propriétés antalgiques (Devegowda *et al.*, 2013; Jayarajan *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2017; Pineda-Farias *et al.*, 2017) et procognitives répondent au besoin de molécules actives sur la composante sensori-discriminative de la douleur et sur les comorbidités cognitives fréquemment associées.

En combinant des études comportementales à des techniques de biologie cellulaire et moléculaire, nous avons développé un projet visant à décrypter le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et d'une des voies de signalisation sous-jacentes (mTOR) dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques et des comorbidités associées.

Nous avons, dans un premier temps, vérifié le pouvoir antalgique du blocage pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de protéines partenaires, telles que mTOR et Cdk5 (Meffre *et al.*, 2012; Duhr *et al.*, 2014) sur les symptômes douloureux fréquemment rapportés chez les patients souffrant de douleurs neuropathiques, notamment l'hypersensibilité tactile et thermique avec une prévalence respective de 64 % et 38 % (Backonja and Stacey, 2004). Dans ce but, il était pertinent d'utiliser le modèle de douleur neuropathique traumatique induit par ligature de la racine du nerf spinal L5 (SNL) (Kim and Chung, 1992) pour plusieurs raisons : contrairement au modèle CCI (Bennett and Xie, 1988), le plus couramment utilisé en recherche préclinique (Jaggi *et al.*, 2011) induit par la ligature d'un nerf mixte sensitivo-moteur, (i) il n'y a pas d'atteinte motrice pouvant induire un biais dans l'appréciation de la réponse à

l'application du filament de von Frey ou à l'immersion dans l'eau froide (15°C) ; (ii) il est exempt d'autotomie (Challa, 2015), pourvoyeuse de biais expérimentaux et éthiquement questionnable ; enfin, (iii) l'allodynie est plus sévère (Kim *et al.*, 1997) laissant plus de marge expérimentale à l'évaluation d'effets pharmacologiques.

Le modèle SNL, pour lequel l'allodynie tactile et thermique débute dès le premier jour suivant la chirurgie et perdure respectivement jusqu'à 20 et 12 semaines après (Kim *et al.*, 1997), induit également un comportement de douleur spontanée associé à des secouements de la patte (Choi *et al.*, 1994) et à une modification de la posture. Cette modification posturale se traduit par un moindre appui sur la patte ipsilatérale à la lésion (King *et al.*, 2006) pouvant expliquer l'atrophie du muscle soléaire de celle-ci (Rahmati *et al.*, 2015) mais ne modifiant pas l'activité locomotrice générale du rat SNL (Kontinen *et al.*, 1999), observation retrouvée dans nos travaux.

Nous aurions donc pu élargir l'étude des symptômes sensitifs à la douleur spontanée également présente chez 94 % des patients neuropathiques (Backonja and Stacey, 2004) et se caractérisant par des paresthésies, des douleurs paroxystiques ou par des douleurs superficielles, apparentées à des brûlures. Chez l'homme, son évaluation est assez aisée car elle s'exprime verbalement. Chez l'animal, différents tests peuvent être réalisés tels que l'évaluation de la modification posturale, avec le test du « *dynamic weight bearing* », ayant déjà fait ses preuves dans différents modèles de douleurs neuropathiques et inflammatoires (Tétreault *et al.*, 2011), l'évaluation du comportement fouisseur (Wodarski *et al.*, 2016), significativement augmenté dans les modèles de douleur neuropathique traumatique (PSNL et par transection du nerf spinal L5 ou du nerf tibial) (Andrews *et al.*, 2012) et iatrogènes (PTX, stavudine) (Huang *et al.*, 2013; Griffiths *et al.*, 2018), l'analyse de l'expression faciale associée à la douleur (Sotocinal *et al.*, 2011), pertinente dans le modèle IoN-CCI et SCI chez la souris (Wu *et al.*, 2016; Akintola *et al.*, 2017). Il est également possible de mesurer les mouvements spontanés de la patte ipsilatérale à la lésion (tressaillement, patte en suspension...) reflétant une douleur spontanée de type paroxystique, par implantation d'un aimant dans la patte du rat modifiant le champ électromagnétique au sein de sa cage (Kawasaki-Yatsugi *et al.*, 2012), méthode objective et automatisée.

D'un point de vue épidémiologique, les comorbidités douleur-troubles cognitifs, dépressifs, ou anxieux est relativement fréquente : 11,4 % des patients douloureux neuropathiques souffrent également de troubles cognitifs, 16,5 % de dépression, 12,1 % d'anxiété généralisée et 29,7 % de troubles de l'humeur (Povedano *et al.*, 2007; Radat *et al.*, 2013). Les patients douloureux chroniques sont d'ailleurs plus sujet à une chronicisation des troubles anxio-dépressifs (Gerrits *et al.*, 2012).

Différentes hypothèses ont été avancées concernant la co-occurrence de la douleur chronique et des troubles anxieux : (i) la douleur chronique entraîne de l'anxiété (il est facile d'imaginer combien la douleur chronique peut être éprouvante et qu'après de nombreux essais infructueux visant à trouver sa cause ou à la traiter, les patients peuvent développer une forme d'anxiété et de peur), (ii) l'état anxieux exacerbe la douleur (l'inconfort associé à l'anxiété et la peur peut abaisser le seuil de la douleur et jouer un rôle dans le chronicisation de la douleur (Hasenbring *et al.*, 2014)) ; (iii) une prédisposition génétique se manifestant par des altérations neurobiologiques, des événements environnementaux ou des facteurs de stress psychosociaux peut être responsable à la fois d'anxiété et de douleur (Bandelow, 2015)). Il est également aisé d'imaginer que la douleur puisse interférer avec l'attention et la concentration. Une altération du fonctionnement exécutif (réalisation de plusieurs tâches concomitantes et perception du temps à la réalisation d'une tâche) est observée expérimentalement chez le patient douloureux (Keogh *et al.*, 2013) et un ralentissement du traitement de l'information et de la mémoire de travail est trouvé chez le patients douloureux chroniques (Schiltenswolf *et al.*, 2017) mettant en évidence une altération des processus cognitifs induite par la douleur.

Les principales structures cérébrales impliquées dans les composantes émotionnelles et cognitives et appartenant à la matrice douleur sont le cortex cingulaire antérieur (CCA), l'insula, l'amygdale et le cortex préfrontal (CPF) (Apkarian *et al.*, 2005). Il y a deux systèmes différents de modulation de la douleur par, i) l'attention (composante cognitive) qui active le circuit CPF (aire 7 de Brodmann) dont les axones projettent sur le cortex sensoriel primaire S1 et secondaire S2 et l'insula, puis implique des voies descendantes de l'insula sur l'amygdale et la substance grise périaqueducule (SGPA) et par ii) l'émotion qui met en jeu l'axe CCA-CPF-SGPA (cette voie sous-tend l'analgésie placebo).

Les techniques d'imagerie ont permis, chez l'animal comme chez l'homme, de mieux comprendre comment l'état motivationnel et l'état émotionnel modulent la sensation douloureuse. Ainsi, l'activation du CCA chez l'animal aurait un rôle anticipatoire, responsable d'une anxiété associée à l'incertitude de la survenue d'un événement aversif (Johansen *et al.*, 2001). Dans l'attente d'un événement négatif (assimilé à un effet « nocebo »), une augmentation de l'activité du CCA et de l'insula parallèlement à l'augmentation du caractère désagréable de la douleur sont observées. L'anticipation d'un effet antalgique, induite par exemple par un « placebo », se traduit par l'activation de l'axe CCA-CPF-SGPA superposable à ce qui est observé lors de la modulation émotionnelle de la douleur (Tracey and Mantyh, 2007).

Chez l'homme, des connexions reliant la SGPA aux sites amygdaliens et corticaux ont été bien caractérisées (Bingel *et al.*, 2007; Bingel and Tracey, 2008). Ces études suggèrent que les interactions entre le CPF et l'amygdale modulent les fonctions affectivo-émotionnelles et cognitives de la douleur. L'amygdale joue un rôle important dans les réactions émotionnelles, le stress et l'anxiété et est considérée comme une composante essentielle de la matrice de la douleur. Cette région peut contribuer de manière significative à l'intégration de la douleur et des réponses associées telles que la peur et l'anxiété.

L'administration de SB258585 a un effet pro-cognitif dans différents modèles de déficits chez le rat (Loiseau *et al.*, 2008; Gravius *et al.*, 2011; Meffre *et al.*, 2012). Cet effet est lié aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub> présents dans les régions limbiques et corticales. Cependant, nos résultats ont mis en évidence que l'effet procognitif du SB258585 chez le rat douloureux neuropathique ne mettait pas en jeu de structures nerveuses supraspinales, mais était spinal et directement lié à l'effet anti-allodynique du composé : son administration i.t. et i.p. entraînait une restauration des performances cognitives chez le rat douloureux corrélée à l'amélioration de l'allodynie. Il est facile d'imaginer que si la douleur d'un individu est réduite, une partie de ses ressources peuvent être remobilisées vers une meilleure attention et concentration.

Nous avons montré, chez les Souris KI GFP-5-HT<sub>6</sub>, que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont présents dans la corne dorsale de la moelle spinale et, d'après des observations morphologiques qui demandent à être confirmées par un marqueur spécifique, dans le cil primaire des neurones. Le type cellulaire impliqué pourrait être des interneurons excitateurs des couches III à IV externe au niveau d'une zone d'intégration clé de l'information douloureuse véhiculée par les

mécanorécepteurs à bas seuil LTMR (*low-threshold mechanoreceptor*), la LTMR zone, comme l'indiquent les travaux d'Abraira *et al.*, (2017). L'analyse génétique des différents sous-types d'interneurones de cette zone révèle que 9,6 % des interneurones excitateurs expriment spécifiquement le récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

Nos travaux mettent en évidence une activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> jamais décrite dans la douleur neuropathique, récepteur connu pour ses effets sur les fonctions cognitives et sur le développement neural. Nous avons montré que des agonistes inverses du récepteur, le SB258585 et le PZ1388, contrairement aux antagonistes neutres (PZ668, CPPQ) améliorent le comportement douloureux. A côté de leur localisation ciliaire spinale nous avons trouvé une augmentation du nombre de cils primaires 5-HT<sub>6</sub><sup>+</sup> en condition de douleur neuropathique chez la souris SNL. Il semblerait donc probable, conformément à l'étude de Abraira *et al.*, (2017), qu'une augmentation du nombre d'interneurones excitateurs exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ait lieu. Une augmentation de l'activité des interneurones excitateurs et une diminution de l'excitabilité des interneurones inhibiteurs a été caractérisée au niveau de la couche II de la corne dorsale spinale chez des animaux douloureux neuropathiques (SCI et PSNL) (Imlach *et al.*, 2016; Kopach *et al.*, 2017). Nous pouvons formuler l'hypothèse, qu'indépendamment de la diminution du niveau de 5-HT endogène dans la moelle épinière (Liu *et al.*, 2010; Dam *et al.*, 2014) et de l'augmentation du nombre d'afférences nociceptives projetant dans les couches superficielles (notamment la couche II) (Redondo-Castro *et al.*, 2013) en condition de douleur neuropathique, la simple augmentation de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> au niveau des interneurones excitateurs, associée à son activité constitutive, peut entraîner une hyperexcitabilité responsable d'une facilitation de la transmission douloureuse et l'apparition d'une hypersensibilité mécanique et thermique.

Nos travaux mettent également en évidence, le rôle de la voie mTOR sous la dépendance du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la douleur neuropathique. Nous avons montré que l'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, qu'elle soit liée à la présence d'un agoniste *in vitro*, ou indépendamment de la fixation de son ligand *in vitro* et *in vivo* chez le rat douloureux, entraîne une augmentation de l'activation de la voie mTOR au niveau des cornes dorsales spinales, augmentation retrouvée dans d'autres études (Zhang *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; X. Wang *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Cette hyperactivation est responsable, au moins en partie des symptômes douloureux neuropathique, dans la mesure où l'administration spinale de rapamycine, en diminuant la phosphorylation de cette voie au niveau des cornes dorsales spinales, diminue

également l'allodynie mécanique et thermique chez le rat SNL. L'approche originale, après identification de la séquence peptidique sur l'extrémité C-ter du récepteur 5-HT<sub>6</sub> spécifique de son interaction physique avec mTOR, consistant à l'administration d'un peptide interférant mimant cette séquence, et piégeant mTOR (peptide (TAT-VEPE) s'est révélée encourageante : à côté de ses propriétés antalgiques dans les modèles SNL et OXA, cette approche, tout comme le blocage du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de mTOR, a permis de restaurer les performances cognitives des animaux. Ces résultats apportent la preuve d'un lien direct entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et mTOR et de son rôle délétère dans la douleur neuropathique.

La démonstration d'une interaction réciproque entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et Cdk5 (Dühr *et al.*, 2014) se traduisant par la phosphorylation de l'extrémité C-ter (Ser<sup>350</sup>) du récepteur par la kinase, nous incite à poursuivre ce travail pour déterminer si Cdk5 (avec Cdc42) est impliquée dans l'activité constitutive du récepteur et la place de mTOR dans celle-ci. La mesure *in vitro* des concentrations d'AMPc reflétant l'activité constitutive du récepteur en présence ou non de rapamycine, du peptide TAT-VEPE, de roscovitine devrait apporter les premiers éléments de réponse.

Enfin, nos résultats confirment la faible efficacité de la fluoxétine, bien connue des cliniciens (Finnerup *et al.*, 2010), sur l'allodynie tactile dans le modèle SNL chez le rat, rapportée par Dupuis *et al.*, (2017). Cet effet modeste est retrouvé dans le modèle de douleur neuropathique diabétique (STZ) (Pichon *et al.*, 2010). La 5-HT joue un rôle clé dans la modulation de l'information douloureuse. Des travaux fondamentaux réalisés dans différents modèles de neuropathie douloureuse montrent que sa concentration est diminuée dans la moelle spinale dorsale et le thalamus dans le modèle SNL (Goettl *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010; Dam *et al.*, 2014), au niveau du RMg dans les modèles CCI et STZ (Sounvoravong *et al.*, 2004), au niveau de la moelle spinale et de la RVM dans le modèle de douleur associée à la maladie de Parkinson, (Wang *et al.*, 2017). Dans ce modèle ainsi que dans le modèle SNL, une réduction du nombre de neurones sérotoninergiques de la RVM et de la moelle spinale ont été mis en évidence (Leong *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). Ainsi, la douleur neuropathique pourrait résulter d'une perte ou d'une activité réduite du système sérotoninergique inhibiteur. Le mécanisme d'action antalgique des antidépresseurs ISRS communément avancé est un renforcement des voies descendantes inhibitrices bulbospinales issues du tronc cérébral par inhibition de la recapture de la 5-HT. Cette augmentation de la concentration extracellulaire de 5-HT (Sorkin *et al.*, 1991) va être responsable de l'activation des différents récepteurs sérotoninergiques, certains ayant un rôle antalgique, d'autres pro-algique, l'effet résultant de

l'addition de ces deux versants du système sérotoninergique. Nous avons montré qu'il était possible d'intervenir sur l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et sur la voie de signalisation mTOR dépendante de celle-ci (versant pro-algique) et nous avons obtenu un bénéfice supplémentaire en renforçant la neurotransmission sérotoninergique avec la fluoxétine. La potentialisation de l'effet anti-allodynique de la fluoxétine par l'agoniste inverse 5-HT<sub>6</sub> pourrait passer par une modulation de la neurotransmission GABAergique et glutamatergique qu'il serait intéressant d'évaluer par les variations de concentration extracellulaire de ces neurotransmetteurs en microdialyse spinale.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis i) d'identifier la localisation sub-cellulaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la moelle épinière et de mettre en évidence une augmentation du nombre de neurones l'exprimant en condition neuropathique ; ii) de décrire, pour la première fois, dans ce contexte douloureux l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de caractériser l'implication de la voie mTOR sous la dépendance du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ; iv) de proposer une stratégie combinatoire en vue d'optimiser l'efficacité antalgique des ISRS.

Ce travail ouvre de nouvelles pistes pour la prise en charge des douleurs neuropathiques chroniques avec le développement de nouveaux agonistes inverses du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (le composé PZ1388 fait l'objet d'un dépôt de brevet) dans cette indication et offre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la douleur chronique neuropathique ou inflammatoire par l'exploration des autres partenaires du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, (Cdk5 par exemple) et la caractérisation des acteurs cellulaires et moléculaires impliqués



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## A

- Abdelaziz, D. M., Stone, L. S. and Komarova, S. V. (2014) Osteolysis and pain due to experimental bone metastases are improved by treatment with rapamycin. *Breast Cancer Res. Treat.*, *143*, 227–237.
- Abi-Dargham, A., Laruelle, M., Wong, D. T., Robertson, D. W., Weinberger, D. R. and Kleinman, J. E. (1993) Pharmacological and Regional Characterization of [<sup>3</sup>H]LY278584 Binding Sites in Human Brain. *J. Neurochem.*, *730–737*.
- Abraham, R., Nirogi, R., Shinde, A. and Benade, V. S. (2014) Therapeutic Potential of 5-HT<sub>6</sub> Antagonist SB399885 in Traumatic Stress Disorder. *Drug Res. (Stuttg.)*, *65*, 442–445.
- Abraira, V. E., Kuehn, E. D., Watanabe, M., Dymecki, S. M., Chirila, A. M., Springel, M. W., Toliver, A. A., Zimmerman, A. L., Orefice, L. L., Bai, L., Song, B. J., Bashista, K. A., O'Neill, T. G., Zhuo, J., Tsan, C., Hoynowski, J. and Ginty, D. D. (2017) The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell*, *168*, 295–310.e19.
- Aira, Z., Buesa, I., García Del Caño, G., Salgueiro, M., Mendiabale, N., Mingo, J., Aguilera, L., Bilbao, J. and Azkue, J. J. (2012) Selective impairment of spinal mu-opioid receptor mechanism by plasticity of serotonergic facilitation mediated by 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Pain*, *153*, 1418–1425.
- Akintola, T., Raver, C., Studlack, P., Uddin, O., Masri, R. and Keller, A. (2017) The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiol. Pain*, *2*, 13–17.
- Al-Shamma, H. A., Anderson, C., Chuang, E., Luthringer, R., Grottick, A. J., Hauser, E., Morgan, M., Shanahan, W., Teegarden, B. R., Thomsen, W. J. and Behan, D. (2010) Nelotanserin, a Novel Selective Human 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> Inverse Agonist for the Treatment of Insomnia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *332*, 281–290.
- Alba-Delgado, C., Cebada-Aleu, A., Mico, J. A. and Berrocoso, E. (2016) Comorbid anxiety-like behavior and locus coeruleus impairment in diabetic peripheral neuropathy: A comparative study with the chronic constriction injury model. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, *71*, 45–56.
- Amaya-Castellanos, E., Pineda-Farias, J. B., Castañeda-Corral, G., Vidal-Cantú, G. C., Murbartián, J., Rocha-González, H. I. and Granados-Soto, V. (2011) Blockade of 5-HT<sub>7</sub> receptors reduces tactile allodynia in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *99*, 591–597.
- Amodeo, D. A., Peterson, S., Pahua, A., Posadas, R., Hernandez, A., Hefner, E., Qi, D. and Vega, J. (2018) 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD386088 impairs behavioral flexibility and working memory. *Behav. Brain Res.*, *349*, 8–15.
- Andoh, T., Sakamoto, A. and Kuraishi, Y. (2013) Effects of xaliproden, a 5-HT<sub>1A</sub> agonist, on mechanical allodynia caused by chemotherapeutic agents in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, *721*, 231–236.

- Andrews, N., Legg, E., Lisak, D., Issop, Y., Richardson, D., Harper, S., Pheby, T., Huang, W., Burgess, G., Machin, I. and Rice, A. S. C. (2012) Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur. J. Pain*, *16*, 485–495.
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R.-D. and Zubieta, J.-K. (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain*, *9*, 463–84.
- Ardid, D., Alloui, A., Brousse, G., Jourdan, D., Picard, P., Dubray, C. and Eschalier, A. (2001) Potentiation of the antinociceptive effect of clomipramine by a 5-HT<sub>1A</sub> antagonist in neuropathic pain in rats. *Br. J. Pharmacol.*, *132*, 1118–26.
- Argyriou, A. A., Cavaletti, G., Antonacopoulou, A., Genazzani, A. A., Briani, C., Bruna, J., Terrazzino, S., Velasco, R., Alberti, P., Campagnolo, M., Lonardi, S., Cortinovis, D., Cazzaniga, M., Santos, C., Psaromyalou, A., Angelopoulou, A. and Kalofonos, H. P. (2013) Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: Results from a prospective multicenter study. *Cancer*, *119*, 3570–3577.
- Arnt, J., Bang-Andersen, B., Grayson, B., Bymaster, F. P., Cohen, M. P., DeLapp, N. W., Giethlen, B., Kreilgaard, M., McKinzie, D. L., Neill, J. C., Nelson, D. L., Nielsen, S. M., Poulsen, M. N., Schaus, J. M. and Witten, L. M. (2010) Lu AE58054, a 5-HT<sub>6</sub> antagonist, reverses cognitive impairment induced by subchronic phencyclidine in a novel object recognition test in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, *13*, 1021–1033.
- Asada, A., Yamamoto, N., Gohda, M., Saito, T., Hayashi, N. and Hisanaga, S. I. (2008) Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J. Neurochem.*, *106*, 1325–1336.
- Asada, A., Saito, T. and Hisanaga, S.-I. (2012) Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner. *J. Cell Sci.*, *125*, 3421–9.
- Asante, C. O., Wallace, V. C. and Dickenson, A. H. (2010) Mammalian target of rapamycin signaling in the spinal cord is required for neuronal plasticity and behavioral hypersensitivity associated with neuropathy in the rat. *J. Pain*, *11*, 1356–1367.
- Asaoka, N., Nagayasu, K., Nishitani, N., Yamashiro, M., Shirakawa, H., Nakagawa, T. and Kaneko, S. (2015) Olanzapine augments the effect of selective serotonin reuptake inhibitors by suppressing GABAergic inhibition via antagonism of 5-HT<sub>6</sub> receptors in the dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, *95*, 261–268.
- Atri, A., Frölich, L., Ballard, C., Tariot, P. N., Molinuevo, J. L., Boneva, N., Windfeld, K., Raket, L. L. and Cummings, J. L. (2018) Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease three randomized clinical trials. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 130–142.
- Attal, N., Cruccu, G., Baron, R., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T. S. and Nurmikko, T. (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol.*, *17*, 1113–1123.

Attal, N., Lanteri-Minet, M., Laurent, B., Fermanian, J. and Bouhassira, D. (2011) The specific disease burden of neuropathic pain: Results of a French nationwide survey. *Pain*, *152*, 2836–2843.

Avan, A., Postma, T. J., Ceresa, C., Avan, A., Cavaletti, G., Giovannetti, E. and Peters, G. J. (2015) Platinum-Induced Neurotoxicity and Preventive Strategies: Past, Present, and Future. *Oncologist*, *20*, 411–432.

Avila-Rojas, S. H., Velázquez-Lagunas, I., Salinas-Abarca, A. B., Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J. B. and Granados-Soto, V. (2015) Role of spinal 5-HT<sub>5A</sub>, and 5-HT<sub>1A/1B/1D</sub>, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res.*, *1622*, 377–385.

Aydede, M. and Shriver, A. (2018) Recently introduced IASP definition of ‘ nociplastic pain ’ needs better formulation. *Pain*, *159*, 1–3.

Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Kheck, N. M. and Whitaker-Azmitia, P. M. (1996) Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*, *14*, 35–46.

## B

Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D. C., Galons, H., Dierick, J. F., Pinna, L. A., Meggio, F., Totzke, F., Schächtele, C., Lerman, A. S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N. and Meijer, L. (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.*, *280*, 31208–31219.

Backonja, M. M. and Stacey, B. (2004) Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. *J. Pain*, *5*, 491–497.

Baek, H., Shin, H. J., Kim, J. J., Shin, N., Kim, S., Yi, M. H., Zhang, E., Hong, J., Kang, J. W., Kim, Y., Kim, C. S. and Kim, D. W. (2017) Primary cilia modulate TLR4-mediated inflammatory responses in hippocampal neurons. *J. Neuroinflammation*, *14*, 189.

Baganz, N. L. and Blakely, R. D. (2013) A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.*, *4*, 48–63.

Baker, L. P., Nielsen, M. D., Impey, S., Metcalf, M. A., Poser, S. W., Chan, G., Obrietan, K., Hamblin, M. W. and Storm, D. R. (1998) Stimulation of type 1 and type 8 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the G(s)-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT<sub>7A</sub> receptor. *J. Biol. Chem.*, *273*, 17469–17476.

Bandelow, B. (2015) Generalized anxiety disorder and pain. *Mod. Trends Pharmacopsychiatry*, 153–165.

Baptista-De-Souza, D., Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Micheli, L., Nunes-De-Souza, R. L., Canto-De-Souza, A. and Ghelardini, C. (2014) Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: Effect on the 5HT<sub>2C</sub>receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, *735*, 141–149.

Bard, J. A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T. A. and Weinshank, R. L. (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) positively linked to adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, *268*, 23422–

23426.

Bardin, L. (2011) The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav. Pharmacol.*, 390–404.

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

Baron, R., Binder, A. and Wasner, G. (2010) Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.*, 9, 807–819.

Barut, K., Adrovic, A., Şahin, S. and Kasapçopur, Ö. (2017) Juvenile idiopathic arthritis. *Balkan Med. J.*, 90–101.

Baumgarten, H. G. and Lachenmayer, L. (2004) Serotonin neurotoxins - Past and present. *Neurotox. Res.*, 6, 589–614.

Beaupré, M., De Guise, É. and McKerral, M. (2012) The Association between Pain-Related Variables, Emotional Factors, and Attentional Functioning following Mild Traumatic Brain Injury. *Rehabil. Res. Pract.*, 2012, 1–10.

Bee, L. A. and Dickenson, A. H. (2007) Rostral ventromedial medulla control of spinal sensory processing in normal and pathophysiological states. *Neuroscience*, 147, 786–793.

Bee, L. A. and Dickenson, A. H. (2008) Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin. *Pain*, 140, 209–223.

Beecher, H. K. (1946) Pain in Men Wounded in Battle. *Ann. Surg.*, 123, 96–105.

Behbehani, M. M. and Fields, H. L. (1979) Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Res.*, 170, 85–93.

Beis, D., Holzwarth, K., Flinders, M., Bader, M., Wöhr, M. and Alenina, N. (2015) Brain serotonin deficiency leads to social communication deficits in mice. *Biol. Lett.*, 11, 20150057–20150057.

Bennett, G. J. and Xie, Y. K. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33, 87–107.

Bentley, J. C., Bourson, A., Boess, F. G., Fone, K. C. F., Marsden, C. A., Petit, N. and Sleight, A. J. (1999) Investigation of stretching behaviour induced by the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, Ro 04-6790, in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 126, 1537–1542.

Berberi, N. F., Malarkey, E. B., Yazdi, S. M. Z. R., McNair, A. D., Kippe, J. M., Croyle, M. J., Kraft, T. W. and Yoder, B. K. (2014) Hippocampal and cortical primary cilia are required for aversive memory in mice. *PLoS One*. Edited by A. Kavushansky, 9, e106576.

Berger, M., Gray, J. A. and Roth, B. L. (2009) The Expanded Biology of Serotonin. *Annu. Rev. Med.*, 60,

355–366.

Berrocoso, E., De Benito, M. D. and Mico, J. A. (2007) Role of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and opioid receptors in the antiallodynic effect of tramadol in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 193, 97–105.

Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, A., Ferandin, Y., Endicott, J. A., Galons, H. and Meijer, L. (2008) CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 27, 5797–5807.

Bingel, U., Schoell, E. and Büchel, C. (2007) Imaging pain modulation in health and disease. *Curr. Opin. Neurol.*, 424–431.

Bingel, U. and Tracey, I. (2008) Imaging CNS Modulation of Pain in Humans. *Physiology*, 23, 371–380.

Bishop, G. A., Berbari, N. F., Lewis, J. and Mykytyn, K. (2007) Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.*, 505, 562–571.

Bockaert, J., Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M. and Cory, R. N. (1987) Piperazine derivatives including the putative anxiolytic drugs, buspirone and ipsapirone, are agonists at 5-HT<sub>1A</sub> receptors negatively coupled with adenylyl cyclase in hippocampal neurons. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 335, 588–592.

Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V. and Dumuis, A. (2008) 5-HT<sub>4</sub> receptors: History, molecular pharmacology and brain functions. *Neuropharmacology*, 55, 922–931.

Bockaert, J., Sebben, M. and Dumuis, A. (1990) Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub>(5-HT<sub>4</sub>) receptors positively coupled to adenylyl cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives. *Mol. Pharmacol.*, 37, 408–411.

Boess, F. G., Monsma, F. J., Bourson, A., Zwingelstein, C. and Sleight, A. J. (1998) Residues in transmembrane regions III and VI contribute to the 5-HT<sub>6</sub> receptor ligand binding site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 242–243.

Bokare, A. M., Bhonde, M., Goel, R. and Nayak, Y. (2018) 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist and antagonist modulates ICV-STZ-induced memory impairment in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 235, 1557–1570.

Bonaventure, P., Voorn, P., Luyten, W. H. M. L., Jurzak, M., Schotte, A. and Leysen, J. E. (1997) Detailed mapping of serotonin 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptor messenger RNA and ligand binding sites in guinea-pig brain and trigeminal ganglion: Clues for function. *Neuroscience*, 82, 469–484.

Bonaventure, P., Langlois, X. and Leysen, J. E. (1998) Co-localization of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptor mRNA in serotonergic cell bodies in guinea pig dorsal raphe nucleus: A double labeling in situ hybridization histochemistry study. *Neurosci. Lett.*, 254, 113–116.

Bond, R. A. and Ijzerman, A. P. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.*, 92–96.

Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B. and Touboul, C. (2008) Prevalence of chronic pain

with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, *136*, 380–387.

Bradley, P. B., Engel, G., Feniuk, W., Fozard, J. R., Humphrey, P. P. A., Middlemiss, D. N., Mylecharane, E. J., Richardson, B. P. and Saxena, P. R. (1986) Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*, *25*, 563–576.

Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R. and Gallacher, D. (2006) Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur. J. Pain*, *10*, 287–333.

Brenchat, A., Nadal, X., Romero, L., Ovalle, S., Muro, A., Sánchez-Arroyos, R., Portillo-Salido, E., Pujol, M., Montero, A., Codony, X., Burgueño, J., Zamanillo, D., Hamon, M., Maldonado, R. and Vela, J. M. (2010) Pharmacological activation of 5-HT<sub>7</sub> receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain*, *149*, 483–494.

Brenchat, A., Zamanillo, D., Hamon, M., Romero, L. and Vela, J. M. (2012) Role of peripheral versus spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the modulation of pain under sensitizing conditions. *Eur. J. Pain*, January, 72–81.

Brodsky, M., Gibson, A. W., Smirnov, D., Nair, S. G. and Neumaier, J. F. (2016) Striatal 5-HT<sub>6</sub> Receptors Regulate Cocaine Reinforcement in a Pathway-Selective Manner. *Neuropsychopharmacology*, *41*, 2377–87.

Brodsky, M., Lesiak, A. J., Croicu, A., Cohenca, N., Sullivan, J. M. and Neumaier, J. F. (2017) 5-HT<sub>6</sub> receptor blockade regulates primary cilia morphology in striatal neurons. *Brain Res.*, *1660*, 10–19.

Brola, W., Mitosek-Szewczyk, K. and Opara, J. (2014) Symptomatology and pathogenesis of different types of pain in multiple sclerosis. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 272–279.

Bromidge, S. M., Brown, A. M., Clarke, S. E., Dodgson, K., Gager, T., Grassam, H. L., Jeffrey, P. M., Joiner, G. F., King, F. D., Middlemiss, D. N., Moss, S. F., Newman, H., Riley, G., Routledge, C. and Wyman, P. (1999) 5-Chloro-N-(4-methoxy-3-piperazin-1-yl-phenyl)-3-methyl-2-benzothiophenesulfonamide (SB-271046): a potent, selective, and orally bioavailable 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist. *J. Med. Chem.*, *42*, 202–5.

de Bruin, N. M. W. J., McCreary, A. C., van Loevezijn, A., de Vries, T. J., Venhorst, J., van Drimmelen, M. and Kruse, C. G. (2013) A novel highly selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist attenuates ethanol and nicotine seeking but does not affect inhibitory response control in Wistar rats. *Behav. Brain Res.*, *236*, 157–165.

de Bruin, N. M. W. J., van Drimmelen, M., Kops, M., van Elk, J., Wetering, M. M. van de and Schwienbacher, I. (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. *Behav. Brain Res.*, *244*, 15–28.

Burgess, S. E., Gardell, L. R., Ossipov, M. H., Malan, T. P., Vanderah, T. W., Lai, J. and Porreca, F. (2002) Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *J. Neurosci.*, *22*, 5129–36.

## C

- Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R. and Oddo, S. (2010) Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- $\beta$ , and Tau: Effects on cognitive impairments. *J. Biol. Chem.*, *285*, 13107–13120.
- Caccamo, A., Belfiore, R. and Oddo, S. (2018) Genetically reducing mTOR signaling rescues central insulin dysregulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, *68*, 59–67.
- Cai, Y. Q., Wang, W., Hou, Y. Y. and Pan, Z. Z. (2014) Optogenetic activation of brainstem serotonergic neurons induces persistent pain sensitization. *Mol. Pain*, *10*, 70.
- Cain, C. K., Francis, J. M., Plone, M. A., Emerich, D. F. and Lindner, M. D. (1997) Pain-related disability and effects of chronic morphine in the adjuvant-induced arthritis model of chronic pain. *Physiol. Behav.*, *62*, 199–205.
- Callaghan, C. K., Hok, V., Della-Chiesa, A., Virley, D. J., Upton, N. and O'Mara, S. M. (2012) Age-related declines in delayed non-match-to-sample performance (DNMS) are reversed by the novel 5HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB742457. *Neuropharmacology*, *63*, 890–897.
- Cardenas, C. G., Del Mar, L. P., Cooper, B. Y. and Scroggs, R. S. (1997) 5HT<sub>4</sub> receptors couple positively to tetrodotoxin-insensitive sodium channels in a subpopulation of capsaicin-sensitive rat sensory neurons. *J. Neurosci.*, *17*, 7181–9.
- Carlini, V. P., Poretti, M. B., Rask-Andersen, M., Chavan, R. A., Ponzio, M. F., Sawant, R. S., de Barioglio, S. R., Schiöth, H. B. and de Cuneo, M. F. (2012) Differential effects of fluoxetine and venlafaxine on memory recognition: Possible mechanisms of action. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, *38*, 159–167.
- Carr, G. V., Schechter, L. E. and Lucki, I. (2011) Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, *213*, 499–507.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J. C. and De Maeyer, E. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science (80-. )*, *268*, 1763–1766.
- Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H. I., Araiza-Saldaña, C. I., Ambriz-Tututi, M., Vidal-Cantú, G. C. and Granados-Soto, V. (2009) Role of peripheral and spinal 5-HT<sub>6</sub> receptors according to the rat formalin test. *Neuroscience*, *162*, 444–452.
- Castro, M. E., Pascual, J., Romón, T., Del Arco, C., Del Olmo, E. and Pazos, A. (1997) Differential distribution of [<sup>3</sup>H]sumatriptan binding sites (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> receptors) in human brain: Focus on brainstem and spinal cord. *Neuropharmacology*, *36*, 535–542.

- Cervantes-Durán, C., Vidal-Cantú, G. C., Godínez-Chaparro, B. and Granados-Soto, V. (2016) Role of spinal 5-HT<sub>2</sub> receptors subtypes in formalin-induced long-lasting hypersensitivity. *Pharmacol. Reports*, *68*, 434–442.
- Challa, S. R. (2015) Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int. J. Neurosci.*, *125*, 170–174.
- Chang, E. Y., Chen, X., Sandhu, A., Li, C. Y. and Luo, Z. D. (2013) Spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors facilitate behavioural hypersensitivity induced by elevated calcium channel alpha-2-delta-1 protein. *Eur. J. Pain (United Kingdom)*, *17*, 505–513.
- Chen, J., Alberts, I. and Li, X. (2014) Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *Int. J. Dev. Neurosci.*, *35*–41.
- Chen, J. J., Vasko, M. R., Wu, X., Staeva, T. P., Baez, M., Zgombick, J. M. and Nelson, D. L. (1998) Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *287*, 1119–27.
- Chen, Y., Oatway, M. A. and Weaver, L. C. (2009) Blockade of the 5-HT<sub>3</sub> receptor for days causes sustained relief from mechanical allodynia following spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, *87*, 418–424.
- Cheng, J., McCorvy, J. D., Giguere, P. M., Zhu, H., Kenakin, T., Roth, B. L. and Kozikowski, A. P. (2016) Design and Discovery of Functionally Selective Serotonin 2C (5-HT<sub>2C</sub>) Receptor Agonists. *J. Med. Chem.*, *59*, 9866–9880.
- Cheng, Z. F., Fields, H. L. and Heinricher, M. M. (1986) Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Res.*, *375*, 57–65.
- Choi, Y., Young Wook, Y., Heung Sik, N., Sun Ho, K. and Jin Mo, C. (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, *59*, 369–376.
- Choi, Y. H., Kang, H., Lee, W. K., Kim, T., Rhim, H. and Yu, Y. G. (2007) An inhibitory compound against the interaction between Gαs and the third intracellular loop region of serotonin receptor subtype 6 (5-HT<sub>6</sub>) disrupts the signaling pathway of 5-HT<sub>6</sub>. *Exp. Mol. Med.*, *39*, 335–342.
- Chopra, K. and Tiwari, V. (2012) Alcoholic neuropathy: Possible mechanisms and future treatment possibilities. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, *73*, 348–362.
- Chuang, A. T. T., Foley, A., Pugh, P. L., Sunter, D., Tong, X., Regan, C., Dawson, L. A., Medhurst, A. D. and Upton, N. (2006) 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-742457 as a novel cognitive enhancing agent for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.*, *2*, S631–S632.
- Claeysen, S., Bockaert, J. and Giannoni, P. (2015) Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.*, *6*, 940–943.
- Classey, J. D., Bartsch, T. and Goadsby, P. J. (2010) Distribution of 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> receptor

expression in rat trigeminal and dorsal root ganglia neurons: Relevance to the selective anti-migraine effect of triptans. *Brain Res.*, *1361*, 76–85.

Cloetta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R. M., Lin, S., Oliveri, F., Atanasoski, S. and Ruegg, M. A. (2013) Inactivation of mTORC1 in the Developing Brain Causes Microcephaly and Affects Gliogenesis. *J. Neurosci.*, *33*, 7799–7810.

Codony, X., Burgueño, J., Ramírez, M. J. and Vela, J. M. (2010) 5-HT<sub>6</sub> Receptor Signal Transduction. Second Messenger Systems. *Int. Rev. Neurobiol.*, *94*, 89–110.

Codony, X., Vela, J. M. and Ramírez, M. J. (2011) 5-HT<sub>6</sub> receptor and cognition. *Curr. Opin. Pharmacol.*, *11*, 94–100.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H. and Raja, S. N. (2017) Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, *3*, 17002.

Colpaert, F. C., Wu, W. P., Hao, J. X., Royer, I., Sautel, F., Wiesenfeld-Hallin, Z. and Xu, X. J. (2004) High-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation causes a curative-like action on allodynia in rats with spinal cord injury. *Eur. J. Pharmacol.*, *497*, 29–33.

Cook, J. B., Foster, K. L., Eiler, W. J. A., McKay, P. F., Woods, J., Harvey, S. C., Garcia, M., Grey, C., McCane, S., Mason, D., Cummings, R., Li, X., Cook, J. M. and June, H. L. (2005) Selective GABA<sub>A</sub>α5 benzodiazepine inverse agonist antagonizes the neurobehavioral actions of alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, *29*, 1390–1401.

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

Costa, T. and Herz, A. (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *86*, 7321–7325.

Cotecchia, S. (2007) Constitutive activity and inverse agonism at the α<sub>1</sub>adrenoceptors. *Biochem. Pharmacol.*, *73*, 1076–1083.

Cruz, S. L., Villarreal, J. E. and Volkow, N. D. (1996) Further evidence that naloxone acts as an inverse opiate agonist: Implications for drug dependence and withdrawal. *Life Sci.*, *58*, PL381-PL389.

Cui, J., He, W., Yi, B., Zhao, H., Lu, K., Ruan, H. and Ma, D. (2014) mTOR pathway is involved in ADP-evoked astrocyte activation and ATP release in the spinal dorsal horn in a rat neuropathic pain model. *Neuroscience*, *275*, 395–403.

Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D. J. and Willis, W. D. (1999) Periaqueductal Gray Stimulation-Induced Inhibition of Nociceptive Dorsal Horn Neurons in Rats is Associated With the Release of Norepinephrine, Serotonin, and Amino Acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *289*, 868–876.

## D

---

- Dam, L. J., Hai, L. and Ha, Y. M. (2014) Role of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in the effects of intrathecal nefopam in neuropathic pain in rats. *Neurosci. Lett.*, *566*, 50–54.
- Daval, G., Vergé, D., Basbaum, A. I., Bourgoin, S. and Hamon, M. (1987) Autoradiographic evidence of serotonin<sub>1</sub> binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, *83*, 71–76.
- Davies, P. A., Pistis, M., Hanna, M. C., Peters, J. A., Lambert, J. J., Hales, T. G. and Kirkness, E. F. (1999) The S-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature*, *397*, 359–363.
- Davis, G. and Curtin, C. M. (2016) Management of Pain in Complex Nerve Injuries. *Hand Clin.*, 257–262.
- Dawson, L. A. (2011) The Central Role of 5-HT<sub>6</sub> Receptors in Modulating Brain Neurochemistry. *Int. Rev. Neurobiol.*, *96*, 1–26.
- Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. and Li, P. (2000) In vivo effects of the 5-HT<sub>6</sub> antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *Br. J. Pharmacol.*, *130*, 23–26.
- Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. and Li, P. (2001) The 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, *25*, 662–668.
- Dayer, A. G., Jacobshagen, M., Chaumont-Dubel, S. and Marin, P. (2015) 5-HT<sub>6</sub> Receptor: A New Player Controlling the Development of Neural Circuits. *ACS Chem. Neurosci.*, *6*, 951–960.
- Demange, L., Abdellah, F. N., Lozach, O., Ferandin, Y., Gresh, N., Meijer, L. and Galons, H. (2013) Potent inhibitors of CDK5 derived from roscovitine: Synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *23*, 125–131.
- Denk, F., McMahon, S. B. and Tracey, I. (2014) Pain vulnerability: A neurobiological perspective. *Nat. Neurosci.*, 192–200.
- Deraredj Nadim, W., Chaumont-Dubel, S., Madouri, F., Cobret, L., De Tautzia, M.-L., Zajdel, P., Bénédicti, H., Marin, P. and Morisset-Lopez, S. (2016) Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor promotes receptor constitutive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *113*, 12310–12315.
- Derkach, V., Surprenant, A. and North, R. A. (1989) 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature*, *339*, 706–709.
- Dermanovic Dobrota, V., Hrabac, P., Skegro, D., Smiljanic, R., Dobrota, S., Prkacin, I., Brkljacic, N., Peros, K., Tomic, M., Lukinovic-Skudar, V. and Basic Kes, V. (2014) The impact of neuropathic pain and other comorbidities on the quality of life in patients with diabetes. *Health Qual. Life Outcomes*, *12*, 1–8.

- Descarries, L. and Riad, M. (2012) Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors and SERT. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, *367*, 2416–2425.
- Deseure, K., Koek, W., Colpaert, F. C. and Adriaensen, H. (2002) The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist F 13640 attenuates mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, *456*, 51–57.
- Deseure, K., Bréand, S. and Colpaert, F. C. (2007) Curative-like analgesia in a neuropathic pain model: Parametric analysis of the dose and the duration of treatment with a high-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.*, *568*, 134–141.
- Devegoda, V. N., Hong, J. R., Cho, S., Lim, E. J., Choo, H., Keum, G., Rhim, H. and Nam, G. (2013) Synthesis and the 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonistic effect of 3-arylsulfonylamino-5,6-dihydro-6-substituted pyrazolo[3,4]pyridinones for neuropathic pain treatment. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, *23*, 4696–4700.
- Dhariwala, F. A. and Rajadhyaksha, M. S. (2008) An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 351–369.
- Dogrul, A., Ossipov, M. H. and Porreca, F. (2009) Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res.*, *1280*, 52–59.
- Dogrul, A. and Seyrek, M. (2006) Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT<sub>7</sub>, but not 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the spinal cord. *Br. J. Pharmacol.*, *149*, 498–505.
- Doly, S., Fischer, J., Brisorgueil, M. J., Vergé, D. and Conrath, M. (2004) 5-HT<sub>5A</sub> receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J. Comp. Neurol.*, *476*, 316–329.
- Doly, S., Madeira, A., Fischer, J., Brisorgueil, M. J., Daval, G., Bernard, R., Vergé, D. and Conrath, M. (2004) The 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Is Widely Distributed in the Rat Spinal Cord and Mainly Localized at the Plasma Membrane of Postsynaptic Neurons. *J. Comp. Neurol.*, *472*, 496–511.
- Doly, S., Fischer, J., Brisorgueil, M. J., Vergé, D. and Conrath, M. (2005) Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in rat dorsal spinal cord: Immunocytochemical evidence. *J. Comp. Neurol.*, *490*, 256–269.
- Dorfman, D., Mc, G., Schnur, J., Dm, S., Davidson G, Montgomery G, Rj, E., Rosario D, Db, C., Jc, M., Simpson, D. and Alexander T (2013) Neuropathie sensorielle douloureuse associée au VIH. *Pain Med*, *14*, 1048–56.
- Duan, Z., Li, J., Pang, X., Wang, H. and Su, Z. (2018) Blocking Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Alleviates Neuropathic Pain Induced by Chemotherapeutic Bortezomib. *Cell. Physiol. Biochem.*, *48*, 54–62.
- Duan, Z., Su, Z., Pang, X. and Wang, H. (2018) Involvement of pro-inflammation signal pathway in inhibitory effects of rapamycin on oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Mol. Pain*, *14*, 174480691876942.

Dudek, M., Marcinkowska, M., Bucki, A., Olczyk, A. and Kołaczkowski, M. (2015) Idalopirdine – a small molecule antagonist of 5-HT<sub>6</sub> with therapeutic potential against obesity. *Metab. Brain Dis.*, *30*, 1487–1494.

Duhr, F., Déléris, P., Raynaud, F., Séveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury La Cour, C., Millan, M. J., Bockaert, J., Marin, P. and Chaumont-Dubel, S. (2014) Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT<sub>6</sub> receptors to promote neurite growth. *Nat. Chem. Biol.*, *10*, 590–597.

Dumont, F. J., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Melino, M. R. and Sigal, N. H. (1990) Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J. Immunol.*, *144*, 251–8.

Dupuis, A., Wattiez, A. S., Pinguet, J., Richard, D., Libert, F., Chalus, M., Aissouni, Y., Sion, B., Ardid, D., Marin, P., Eschalier, A. and Courteix, C. (2017) Increasing spinal 5-HT<sub>2A</sub> receptor responsiveness mediates anti-allodynic effect and potentiates fluoxetine efficacy in neuropathic rats. Evidence for GABA release. *Pharmacol. Res.*, *118*, 93–103.

## E

---

East, S. Z., Burnet, P. W. J., Leslie, R. A., Roberts, J. C. and Harrison, P. J. (2002) 5-HT<sub>6</sub> receptor binding sites in schizophrenia and following antipsychotic drug administration: Autoradiographic studies with [<sup>125</sup>I]SB-258585. *Synapse*, *45*, 191–199.

Egan, C. T., Herrick-Davis, K. and Teitler, M. (1998) Creation of a constitutively activated state of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor by site-directed mutagenesis: inverse agonist activity of antipsychotic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *286*, 85–90.

Eide, P. K., Hole, K., Berge, O. G. and Broch, O. J. (1988) 5-HT depletion with 5,7-DHT, PCA and PCPA in mice: differential effects on the sensitivity to 5-MeODMT, 8-OH-DPAT and 5-HTP as measured by two nociceptive tests. *Brain Res.*, *440*, 42–52.

Eippert, F., Bingel, U., Schoell, E. D., Yacubian, J., Klinger, R., Lorenz, J. and Büchel, C. (2009) Activation of the Opioidergic Descending Pain Control System Underlies Placebo Analgesia. *Neuron*, *63*, 533–543.

Eisenberg, E. and Suzan, E. (2014) Drug combinations in the treatment of neuropathic pain. *Curr. Pain Headache Rep.*, *18*, 1–8.

Ellis, R. J., Rosario, D., Clifford, D. B., McArthur, J. C., Simpson, D., Alexander, T., Gelman, B. B., Vaida, F., Collier, A., Marra, C. M., Ances, B., Atkinson, J. H., Dworkin, R. H., Morgello, S. and Grant, I. (2010) Continued high prevalence and adverse clinical impact of human immunodeficiency virus-associated sensory neuropathy in the era of combination antiretroviral therapy: The CHARTER study. *Arch. Neurol.*, *67*, 552–558.

Emery, A. E. H. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-A world survey. *Neuromuscul. Disord.*, *1*, 19–29.

Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E. and Weihe, E. (1996) Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *93*, 5166–5171.

Erlander, M. G., Lovenberg, T. W., Baront, B. M., De Lfcea, L., Danielson, P. E., Racket, M., Slonet, A. L., Siegelt, B. W., Foye, P. E., Cannon, K., Burns, J. E. and Sutcliffe, J. G. (1993) Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Neurobiology*, *90*, 3452–3456.

Eser, F., Aktekin, L., Bodur, H. and Atan, C. (2009) Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol. India*, *57*, 434.

Exarchou, S., Lindström, U., Askling, J., Eriksson, J. K., Forsblad-d’Elia, H., Neovius, M., Turesson, C., Kristensen, L. E. and Jacobsson, L. T. H. (2015) The prevalence of clinically diagnosed ankylosing spondylitis and its clinical manifestations: A nationwide register study. *Arthritis Res. Ther.*, *17*, 118.

## F

---

Fang-Hu, Zhang, H. H., Yang, B. X., Huang, J. L., Shun, J. L., Kong, F. J., Peng-Xu, Chen, Z. G. and Lu, J. M. (2015) Cdk5 contributes to inflammation-induced thermal hyperalgesia mediated by the p38 MAPK pathway in microglia. *Brain Res.*, *1619*, 166–175.

Farber, L., Stratz, T., Bruckle, W., Spath, M., Pongratz, D., Lautenschlager, J., Kotter, I., Zoller, B., Peter, H. H., Neeck, G., Alten, R. and Muller, W. (2000) Efficacy and tolerability of tropisetron in primary fibromyalgia--a highly selective and competitive 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist. German Fibromyalgia Study Group. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, *113*, 49–54.

Farina, G., Menditto, E., Corea, G., Manna, S., Pagliaro, C., Troncone, C., Linguiti, C., Orlando, V., Putignano, D., Tari, D. U. and Buffardi, G. (2015) Valutazione dell’appropriatezza prescrittiva in psichiatria: un progetto di clinical audit nella ASL di Caserta. *Riv. Psichiatr.*, *50*, 274–284.

Feldman, E. L., Nave, K. A., Jensen, T. S. and Bennett, D. L. H. (2017) New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, 1296–1313.

Feliciano, D. M., Su, T., Lopez, J., Platel, J. C. and Bordey, A. (2011) Single-cell Tsc1 knockout during corticogenesis generates tuber-like lesions and reduces seizure threshold in mice. *J. Clin. Invest.*, *121*, 1596–1607.

Feng, S. fang, Shi, T. yao, Fan-Yang, Wang, W. ning, Chen, Y. chun and Tan, Q. rong (2012) Long-lasting effects of chronic rTMS to treat chronic rodent model of depression. *Behav. Brain Res.*, *232*, 245–251.

Feng, T., Yin, Q., Weng, Z. lin, Zhang, J. cheng, Wang, K. feng, Yuan, S. ying and Cheng, W. (2014) Rapamycin ameliorates neuropathic pain by activating autophagy and inhibiting interleukin-1 $\beta$  in the rat spinal cord. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.*, *34*, 830–837.

- Ferguson, S. M., Mitchell, E. S. and Neumaier, J. F. (2008) Increased Expression of 5-HT<sub>6</sub> Receptors in the Nucleus Accumbens Blocks the Rewarding But Not Psychomotor Activating Properties of Cocaine. *Biol. Psychiatry*, *63*, 207–213.
- Ferguson, S. S. G., Downey, W. E., Colapietro, A.-M., Barak, L. S., Mnard, L. and Caron, M. G. (1996) Role of beta-Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein-Coupled Receptor Internalization. *Science* (80-. ), *271*, 363–366.
- Fernandez, S. P. and Gaspar, P. (2012) Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion. *Neuropharmacology*, 144–154.
- Ferrier, J., Bayet-Robert, M., Pereira, B., Daulhac, L., Eschalier, A., Pezet, D., Moulinoux, J.-P. and Balayssac, D. (2013) A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. *PLoS One*, *8*, e77828.
- Fields, H. L., AI, B. and MM, H. (2005) *Central nervous system mechanisms of pain modulation*. Edited by Textbook of pain. Churchill Livingstone.
- Fields, H. L., Malick, A. and Burstein, R. (1995) Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.*, *74*, 1742–1759.
- Fijał, K., Pachuta, A., McCreary, A. C., Wydra, K., Nowak, E., Papp, M., Bieñkowski, P., Kotlińska, J. and Filip, M. (2010) Effects of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor ligands on responding for cocaine reward and seeking in rats. *Pharmacol. Reports*, *62*, 1005–1014.
- Fillingim, R. B. (2000) Sex, gender, and pain: women and men really are different. *Curr. Rev. Pain*, 24–30.
- Finn, D. P., Fone, K. C. F., Beckett, S. R. G., Baxter, J. A., Ansell, L., Marsden, C. A. and Chapman, V. (2007) The effects of pharmacological blockade of the 5-HT<sub>6</sub> receptor on formalin-evoked nociceptive behaviour, locomotor activity and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, *569*, 59–63.
- Finnegan, T. F. (2004) Activation of  $\mu$ -Opioid Receptors Inhibits Synaptic Inputs to Spinally Projecting Rostral Ventromedial Medulla Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *309*, 476–483.
- Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T. S., Kamerman, P. R., Lund, K., Moore, A., Raja, S. N., Rice, A. S. C., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B. H. and Wallace, M. (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.*, *14*, 162–173.
- Finnerup, N. B., Sindrup, S. H. and Jensen, T. S. (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*, *150*, 573–581.
- Fletcher, D., Stamer, U. M., Pogatzki-Zahn, E., Zaslansky, R., Tanase, N. V., Perruchoud, C., Kranke, P., Komann, M., Lehman, T., Lavand homme, P., Vercauteren, M., Meissner, W., Iohom, G., Cinnella, G., Aurilio, C., Belii, A., Filipescu, D., Rehberg-Klug, B., Decostered, I., Suter, M. R., Blumenthal, S., Puig, M.,

- Garcia-Filoso, A., Brandner, B., Varvinskiy, A. M., Lisnyy, I. and Kuchyn, I. (2015) Chronic postsurgical pain in Europe: An observational study. *Eur. J. Anaesthesiol.*, *32*, 725–734.
- Foley, A. G., Murphy, K. J., Hirst, W. D., Gallagher, H. C., Hagan, J. J., Upton, N., Walsh, F. S. and Regan, C. M. (2004) The 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-271046 Reverses Scopolamine-Disrupted Consolidation of a Passive Avoidance Task and Ameliorates Spatial Task Deficits in Aged Rats. *Neuropsychopharmacology*, *29*, 93–100.
- Fong, T. M. and Heymsfield, S. B. (2009) Cannabinoid-1 receptor inverse agonists: current understanding of mechanism of action and unanswered questions. *Int. J. Obes. (Lond)*, *33*, 947–55.
- Fonseca, B. D., Smith, E. M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M. and Pause, A. (2014) The ever-evolving role of mTOR in translation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, *36*, 102–112.
- Fonseca, M. I., Ni, Y. G., Dunning, D. D. and Miledi, R. (2001) Distribution of serotonin 2A, 2C and 3 receptor mRNA in spinal cord and medulla oblongata. *Mol. Brain Res.*, *89*, 11–19.
- Fornai, F., Chen, K., Giorgi, F. S., Gesi, M., Alessandri, M. G. and Shih, J. C. (1999) Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B-deficient mice: A brain dialysis study. *J. Neurochem.*, *73*, 2434–2440.
- de Foubert, G., Khundakar, A. A. and Zetterström, T. S. (2013) Effects of repeated 5-HT<sub>6</sub> receptor stimulation on BDNF gene expression and cell survival. *Neurosci. Lett.*, *553*, 211–215.
- de Foubert, G., O’Neill, M. J. and Zetterström, T. S. C. (2007) Acute onset by 5-HT<sub>6</sub>-receptor activation on rat brain brain-derived neurotrophic factor and activity-regulated cytoskeletal-associated protein mRNA expression. *Neuroscience*, *147*, 778–785.
- Francken, B. J. B. (1998) The human 5-HT<sub>5A</sub> receptor couples to G<sub>i</sub> and G<sub>o</sub> proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, *361*, 299–309.
- Frassetto, A., Zhang, J., Lao, J. Z., White, A., Metzger, J. M., Fong, T. M. and Chen, R. Z. (2008) Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT<sub>6</sub> receptor. *Brain Res.*, *1236*, 140–144.
- Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res*, *51*, 313–319.
- Freitas, K. C., Hillhouse, T. M., Leidl, M. D. and Negus, S. S. (2015) Effects of acute and sustained pain manipulations on performance in a visual-signal detection task of attention in rats. *Drug Dev. Res.*, *76*, 194–203.
- Fu, J., Wang, H., Gao, J., Yu, M., Wang, R., Yang, Z. and Zhang, T. (2017) Rapamycin Effectively Impedes Melamine-Induced Impairments of Cognition and Synaptic Plasticity in Wistar Rats. *Mol. Neurobiol.*, *54*, 819–832.
- Fukuo, Y., Kishi, T., Yoshimura, R., Kitajima, T., Okochi, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Naitoh, H., Umene-Nakano, W., Inada, T., Kunugi, H., Kato, T., Yoshikawa, T., Ujike, H., Nakamura,

J., Ozaki, N. and Iwata, N. (2010) Serotonin 6 receptor gene and mood disorders: Case-control study and meta-analysis. *Neurosci. Res.*, *67*, 250–255.

## G

---

Van Gaalen, M. M., Schettters, D., Schoffelmeer, A. N. M. and De Vries, T. J. (2010) 5-HT<sub>6</sub> antagonism attenuates cue-induced relapse to cocaine seeking without affecting cocaine reinforcement. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, *13*, 961–965.

Gaddum, J. H. and Picarelli, Z. P. (1957) Two Kinds of Tryptamine Receptor. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, *12*, 323–328.

Galan-Arriero, I., Avila-Martin, G., Ferrer-Donato, A., Gomez-Soriano, J., Bravo-Esteban, E. and Taylor, J. (2014) Oral administration of the p38 $\alpha$  MAPK inhibitor, UR13870, inhibits affective pain behavior after spinal cord injury. *Pain*, *155*, 2188–2198.

Galan-Arriero, I., Avila-Martin, G., Ferrer-Donato, A., Gomez-Soriano, J., Piazza, S. and Taylor, J. (2015) Early treatment with UR13870, a novel inhibitor of p38 $\alpha$  mitogenous activated protein kinase, prevents hyperreflexia and anxiety behaviors, in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, *604*, 69–74.

Gao, Y. J. and Ji, R. R. (2010) Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: Involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *J. Neurochem.*, *115*, 505–514.

Garami, A., Zwartkruis, F. J. T., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S. C., Hafen, E., Bos, J. L. and Thomas, G. (2003) Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell*, *11*, 1457–1466.

Gardell, L. R., Vanderah, T. W., Gardell, S. E., Wang, R., Ossipov, M. H., Lai, J. and Porreca, F. (2003) Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation. *J Neurosci*, *23*, 8370–8379.

Garnovskaya, M. N., Nebigil, C. G., Arthur, J. M., Spurney, R. F., Raymond, J. R., Spurney, F. and Carolina, N. (1995) 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. *Mol. Pharmacol.*, *48*, 230–7.

Gasull-Camós, J., Martínez-Torres, S., Tarrés-Gatius, M., Ozaita, A., Artigas, F. and Castañé, A. (2018) Serotonergic mechanisms involved in antidepressant-like responses evoked by GLT-1 blockade in rat infralimbic cortex. *Neuropharmacology*, *139*, 41–51.

Gauriau, C. and Bernard, J. F. (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.*, *87*, 251–258.

- Gautier, A., El Ouaraki, H., Bazin, N., Salam, S., Vodjdani, G., Bourgoïn, S., Pezet, S., Bernard, J. F. and Hamon, M. (2017) Lentiviral vector-driven inhibition of 5-HT synthesis in B3 bulbo-spinal serotonergic projections – Consequences on nociception, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp. Neurol.*, 288, 11–24.
- Geranton, S. M., Jimenez-Diaz, L., Torsney, C., Tochiki, K. K., Stuart, S. A., Leith, J. L., Lumb, B. M. and Hunt, S. P. (2009) A Rapamycin-Sensitive Signaling Pathway Is Essential for the Full Expression of Persistent Pain States. *J. Neurosci.*, 29, 15017–15027.
- Gérard, C., El Mestikawy, S., Lebrand, C., Adrien, J., Ruat, M., Traiffort, E., Hamon, M. and Martres, M. P. (1996) Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse*, 23, 164–173.
- Gérard, C., Martres, M. P., Lefèvre, K., Miquel, M. C., Vergé, D., Lanfumey, L., Doucet, E., Hamon, M. and El Mestikawy, S. (1997) Immune-localization of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res.*, 746, 207–219.
- Germain, D. P. (2010) Fabry disease. *Orphanet J. Rare Dis.*, 30.
- Gerrits, M. M. J. G., Vogelzangs, N., Van Oppen, P., Van Marwijk, H. W. J., Van Der Horst, H. and Penninx, B. W. J. H. (2012) Impact of pain on the course of depressive and anxiety disorders. *Pain*, 153, 429–436.
- Gershon, M. D., Liu, K. P., Karpiak, S. E. and Tamir, H. (1983) Storage of serotonin in vivo as a complex with serotonin-binding protein in central and peripheral serotonergic neurons. *J. Neurosci.*, 3, 1901–1911.
- Gershon, M. D. (2013) 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 14–21.
- Giat, E. and Yom-Tov, E. (2018) Evidence from web-based dietary search patterns to the role of B12 deficiency in non-specific chronic pain: A large-scale observational study. *J. Med. Internet Res.*, 20, e4.
- Gilron, I., Tu, D., Holden, R. R., Jackson, A. C. and Merton-Shore, D. Du (2015) Combination of morphine with nortriptyline for neuropathic pain. *Pain*, 156, 1440–1448.
- Ginzel, K. H. (1957) The action of lysergic acid diethylamide (LSD 25), its 2-brom derivative (BOL 148) and of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the peristaltic reflex of the guinea-pig ileum. *J. Physiol.*, 137, 62P–3.
- Godínez-Chaparro, B., Barragán-Iglesias, P., Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H. I. and Granados-Soto, V. (2011) Role of peripheral 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain*, 152, 687–697.
- Godínez-Chaparro, B., López-Santillán, F. J., Orduña, P. and Granados-Soto, V. (2012) Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Neuroscience*, 222, 379–391.
- Godínez-Chaparro, B., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Manzano-García, A., Rojas-Piloni,

- G., Condés-Lara, M. and González-Hernández, A. (2016) The potential role of serotonergic mechanisms in the spinal oxytocin-induced antinociception. *Neuropeptides*, *60*, 51–60.
- Goettl, V. M., Huang, Y., Hackshaw, K. V and Stephens, R. L. (2002) Reduced basal release of serotonin from the ventrobasal thalamus of the rat in a model of neuropathic pain. *Pain*, *99*, 359–366.
- Goetz, S. C. and Anderson, K. V. (2010) The primary cilium: A signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.*, 331–344.
- Grailhe, R., Grabtree, G. W. and Hen, R. (2001) Human 5-HT<sub>5</sub> receptors: The 5-HT<sub>5A</sub> receptor is functional but the 5-HT<sub>5B</sub> receptor was lost during mammalian evolution. *Eur. J. Pharmacol.*, *418*, 157–167.
- Gravius, A., Laszy, J., Pietraszek, M., S??ghy, K., Nagel, J., Chambon, C., Wegener, N., Valastro, B., Danysz, W. and Gyerty??n, I. (2011) Effects of 5-HT<sub>6</sub> antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. *Behav. Pharmacol.*, *22*, 122–135.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Mohammadi, E., Tyler, K., Pietra, C., Bee, L. A. and Dickenson, A. (2014) Synergistic Effect of 5-Hydroxytryptamine 3 and Neurokinin 1 Receptor Antagonism in Rodent Models of Somatic and Visceral Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *351*, 146–152.
- Grégoire, S., Michaud, V., Chapuy, E., Eschalier, A. and Ardid, D. (2012) Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: Effect of duloxetine and gabapentin. *Pain*, *153*, 1657–1663.
- Grégoire, S., Wattiez, A. S., Etienne, M., Marchand, F. and Ardid, D. (2014) Monoarthritis-induced emotional and cognitive impairments in rats are sensitive to low systemic doses or intra-amygdala injections of morphine. *Eur. J. Pharmacol.*, *735*, 1–9.
- Grégoire, S. and Neugebauer, V. (2013) 5-HT<sub>2CR</sub> blockade in the amygdala conveys analgesic efficacy to SSRIs in a rat model of arthritis pain. *Mol. Pain*, *9*, 41.
- Griffiths, L. A., Duggett, N. A., Pitcher, A. L. and Flatters, S. J. L. (2018) Evoked and Ongoing Pain-Like Behaviours in a Rat Model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Pain Res. Manag.*, *2018*, 1–11.
- Gruver, C. and Guthmiller, K. B. (2018) *Postherpetic Neuralgia* StatPearls.
- Grychowska, K., Satała, G., Kos, T., Partyka, A., Colacino, E., Chaumont-Dubel, S., Bantreil, X., Wesółowska, A., Pawłowski, M., Martinez, J., Marin, P., Subra, G., Bojarski, A. J., Lamaty, F., Popik, P. and Zajdel, P. (2016) Novel 1 H -Pyrrolo[3,2- c ]quinoline Based 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonists with Potential Application for the Treatment of Cognitive Disorders Associated with Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Neurosci.*, *7*, 972–983.
- Gu, H., Caplan, M. J. and Rudnick, G. (1997) Cloned Catecholamine Transporters Expressed in Polarized Epithelial Cells: Sorting, Drug Sensitivity, and Ion-Coupling Stoichiometry. *Adv. Pharmacol.*, *42*, 175–179.
- Guo, J.-R., Wang, H., Jin, X.-J., Jia, D.-L., Zhou, X. and Tao, Q. (2017) Effect and mechanism of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of

---

chronic constriction injury. *Oncotarget*, 8, 52923–52934.

Guo, J. S., Jing, P. B., Wang, J. A., Zhang, R., Jiang, B. C., Gao, Y. J. and Zhang, Z. J. (2015) Increased autophagic activity in dorsal root ganglion attenuates neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Neurosci. Lett.*, 599, 158–163.

## H

---

Ha, A. D. and Jankovic, J. (2012) Pain in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 485–491.

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

Hains, B. C., Willis, W. D. and Hulsebosch, C. E. (2003) Serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> reduce hyperexcitability of dorsal horn neurons after chronic spinal cord hemisection injury in rat. *Exp. Brain Res.*, 149, 174–186.

Hammond, N., Wang, Y., Dimachkie, M. M. and Barohn, R. J. (2013) Nutritional neuropathies. *Neurol. Clin.*, 477–489.

Hamon, M., Doucet, E., Lefevre, K., Miquel, M. C., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J. and Verge, D. (1999) Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology*, 21, 68S–76S.

Hanley, N. R. S. and Hensler, J. G. (2002) Mechanisms of ligand-induced desensitization of the 5-hydroxytryptamine(2A) receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300, 468–77.

Hannon, J. and Hoyer, D. (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.*, 195, 198–213.

Haroutiunian, S., Nikolajsen, L., Finnerup, N. B. and Jensen, T. S. (2013) The neuropathic component in persistent postsurgical pain: A systematic literature review. *Pain*, 154, 95–102.

Harris, T. E., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Rhoads, R. E. and Lawrence, J. C. (2006) mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J.*, 25, 1659–1668.

Hasenbring, M. I., Chehadi, O., Titze, C. and Kreddig, N. (2014) Fear and anxiety in the transition from acute to chronic pain: there is evidence for endurance besides avoidance. *Pain Manag.*, 4, 363–374.

Hashemi-Firouzi, N., Shahidi, S., Soleimani-Asl, S. and Komaki, A. (2018) 5-Hydroxytryptamine receptor 6 antagonist, SB258585 exerts neuroprotection in a rat model of Streptozotocin-induced Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.*, 17 August, 1–11.

Hashizume, H., Kawakami, M., Yoshida, M., Okada, M., Enyo, Y. and Inomata, Y. (2007) Sarpogrelate hydrochloride, a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, attenuates neurogenic pain induced by nucleus pulposus in

rats. *Spine (Phila. Pa. 1976)*, *32*, 315–320.

Hasnie, F. S., Breuer, J., Parker, S., Wallace, V., Blackbeard, J., Lever, I., Kinchington, P. R., Dickenson, A. H., Pheby, T. and Rice, A. S. C. (2007) Further characterization of a rat model of varicella zoster virus-associated pain: Relationship between mechanical hypersensitivity and anxiety-related behavior, and the influence of analgesic drugs. *Neuroscience*, *144*, 1495–1508.

Hatcher, P. D., Brown, V. J., Tait, D. S., Bate, S., Overend, P., Hagan, J. J. and Jones, D. N. C. (2005) 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists improve performance in an attentional set shifting task in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *181*, 253–259.

Haus, U., Varga, B., Stratz, T., Späth, M. and Müller, W. (2000) Oral treatment of fibromyalgia with tropisetron given over 28 days: influence on functional and vegetative symptoms, psychometric parameters and pain. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, *113*, 55–8.

Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 1926–1945.

Hayashida, K. I., Kimura, M., Yoshizumi, M., Hobo, S., Obata, H. and Eisenach, J. C. (2012) Ondansetron reverses antihypersensitivity from clonidine in rats after peripheral nerve injury: Role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in  $\alpha$ 2-adrenoceptor and 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor analgesia. *Anesthesiology*, *117*, 389–398.

He, W. you, Zhang, B., Xiong, Q. ming, Yang, C. xiang, Zhao, W. cheng, He, J., Zhou, J. and Wang, H. B. (2016) Intrathecal administration of rapamycin inhibits the phosphorylation of DRG Nav1.8 and attenuates STZ-induced painful diabetic neuropathy in rats. *Neurosci. Lett.*, *619*, 21–28.

Heal, D., Gosden, J. and Smith, S. (2011) The 5-HT<sub>6</sub> Receptor as a Target for Developing Novel Antiobesity Drugs. *Int. Rev. Neurobiol.*, *96*, 73–109.

Van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H. and Torrance, N. (2014) Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain*, 654–662.

Hedlund, P. B. and Sutcliffe, J. G. (2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT<sub>7</sub>receptor research. *Trends Pharmacol. Sci.*, 481–486.

Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L. and Lumb, B. M. (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.*, 214–225.

Heinricher, M. M., Barbaro, N. M. and Fields, H. L. (1989) Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: Firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens. Mot. Res.*, *6*, 427–439.

Heinricher, M. M., Morgan, M. M. and Fields, H. L. (1992) Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience*, *48*, 533–543.

Helboe, L., Egebjerg, J. and de Jong, I. E. M. (2015) Distribution of serotonin receptor 5-HT<sub>6</sub> mRNA in rat neuronal subpopulations: A double in situ hybridization study. *Neuroscience*, *310*, 442–454.

- Helmstetter, F. J., Tershner, S. A., Poore, L. H. and Bellgowan, P. S. F. (1998) Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Res.*, *779*, 104–118.
- Helton, L. A., Thor, K. B. and Baez, M. (1994) 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub>, and 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor mRNA expression in the spinal cord of rat, cat, monkey and human. *Neuroreport*, *5*, 2617–2620.
- Hentall, I. D., Pinzon, A. and Noga, B. R. (2006) Spatial and temporal patterns of serotonin release in the rat's lumbar spinal cord following electrical stimulation of the nucleus raphe magnus. *Neuroscience*, *142*, 893–903.
- Herrick-Davis, K., Egan, C. and Teitler, M. (1997) Activating mutations of the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *J Neurochem*, *69*, 1138–44.
- Herrik, K. F., Mørk, A., Richard, N., Bundgaard, C., Bastlund, J. F. and de Jong, I. E. M. (2016) The 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist idalopirdine potentiates the effects of acetylcholinesterase inhibition on neuronal network oscillations and extracellular acetylcholine levels in the rat dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*, *107*, 351–363.
- Higgs, S., Cooper, A. J. and Barnes, N. M. (2016) The 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, lorcaserin, and the 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, SB-742457, promote satiety; a microstructural analysis of feeding behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)*, *233*, 417–24.
- Hirano, K., Searle, K. L., Nasir, S., Aw, C.-C., Browne, E. R. and Rutter, A. R. (2011) In vivo 5-HT<sub>6</sub> receptor occupancy by antipsychotic drugs in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, *503*, 240–243.
- Hirst, W. D., Minton, J. A., Bromidge, S. M., Moss, S. F., Latter, A. J., Riley, G., Routledge, C., Middlemiss, D. N. and Price, G. W. (2000) Characterization of [(125)I]-SB-258585 binding to human recombinant and native 5-HT<sub>6</sub> receptors in rat, pig and human brain tissue. *Br. J. Pharmacol.*, *130*, 1597–605.
- Hirst, W. D., Abrahamsen, B., Blaney, F. E., Calver, A. R., Aloj, L., Price, G. W. and Medhurst, A. D. (2003) Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *Mol. Pharmacol.*, *64*, 1295–1308.
- Hirst, W. D., Stean, T. O., Rogers, D. C., Sunter, D., Pugh, P., Moss, S. F., Bromidge, S. M., Riley, G., Smith, D. R., Bartlett, S., Heidbreder, C. A., Atkins, A. R., Lacroix, L. P., Dawson, L. A., Foley, A. G., Regan, C. M. and Upton, N. (2006) SB-399885 is a potent, selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. *Eur. J. Pharmacol.*, *553*, 109–119.
- Hoeffler, C. A., Sanchez, E., Hagerman, R. J., Mu, Y., Nguyen, D. V., Wong, H., Whelan, A. M., Zukin, R. S., Klann, E. and Tassone, F. (2012) Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes. Brain. Behav.*, *11*, 332–41.

- Hong, J. R., Choo, H. and Nam, G. (2017) Neuropathic pain-alleviating effects of pyrazole-conjugated arylsulfonamides as 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, *27*, 4146–4149.
- Hoogeveen-Westerveld, M., Van Unen, L., Van Den Ouweland, A., Halley, D., Hoogeveen, A. and Nellist, M. (2012) The TSC1-TSC2 complex consists of multiple TSC1 and TSC2 subunits. *BMC Biochem.*, *13*, 18.
- Hopkin, R. J., Bissler, J., Banikazemi, M., Clarke, L., Eng, C. M., Germain, D. P., Lemay, R., Tytki-Szymanska, A. and Wilcox, W. R. (2008) Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr. Res.*, *64*, 550–5.
- Horiuchi, H., Ogata, T., Morino, T., Takeba, J. and Yamamoto, H. (2003) Serotonergic signaling inhibits hyperalgesia induced by spinal cord damage. *Brain Res.*, *963*, 312–320.
- Hosobuchi, Y., Adams, J. E. and Linchitz, R. (1977) Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science (80- )*, *197*, 183–186.
- Hou, H., Miao, J., Cao, R., Han, M., Sun, Y., Liu, X. and Guo, L. (2017) Rapamycin Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing the mTOR-STAT3 Pathway. *Neurochem. Res.*, *42*, 2831–2840.
- Hou, L. (2004) Activation of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Is Required for Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression. *J. Neurosci.*, *24*, 6352–6361.
- Howland, R. H. (2016) Pimavanserin: An Inverse Agonist Antipsychotic Drug. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.*, *54*, 21–24.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R. and Humphrey, P. P. (1994) *International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin)* *Pharmacol. Rev.*
- Hu, L., Wang, B. and Zhang, Y. (2017) Serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptors affect cognition in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating cilia function. *Alzheimer's Res. Ther.*, *9*, 76.
- Huang, W., Calvo, M., Karu, K., Olausen, H. R., Bathgate, G., Okuse, K., Bennett, D. L. H. and Rice, A. S. C. (2013) A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. *Pain*, *154*, 560–575.
- Hunter, T. M., Boytsov, N. N., Zhang, X., Schroeder, K., Michaud, K. and Araujo, A. B. (2017) Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004–2014. *Rheumatol. Int.*, *37*, 1551–1557.
- Hurley, P. T., McMahon, R. A., Fanning, P., O'Boyle, K. M., Rogers, M. and Martin, F. (1998) Functional coupling of a recombinant human 5-HT(5A) receptor to G-proteins in HEK-293 cells. *Br. J. Pharmacol.*, *124*, 1238–1244.

---

Hyman, S. E., Malenka, R. C. and Nestler, E. J. (2006) Neural mechanisms of addiction : The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, *29*, 565–598.

## I

---

Idris, N., Neill, J., Grayson, B., Bang-Andersen, B., Witten, L. M., Brennum, L. T. and Arnt, J. (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 (Berl.)*, *208*, 23–36.

Ikoma, Y., Kusumoto-Yoshida, I., Yamanaka, A., Ootsuka, Y. and Kuwaki, T. (2018) Inactivation of serotonergic neurons in the rostral medullary raphé attenuates stress-induced tachypnea and tachycardia in mice. *Front. Physiol.*, *9*, 832.

Imlach, W. L., Bhola, R. F., Mohammadi, S. A. and Christie, M. J. (2016) Glycinergic dysfunction in a subpopulation of dorsal horn interneurons in a rat model of neuropathic pain. *Sci. Rep.*, *6*, 37104.

Ivachtchenko, A., Ivanenkov, Y. and Veselov, M. (2016) Preclinical evaluation of AVN-322, novel and highly selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, *13*, 1–1.

## J

---

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

Jaggi, A. S., Jain, V. and Singh, N. (2011) Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, *1–28*.

Jahrling, J. B., Lin, A.-L., DeRosa, N., Hussong, S. A., Van Skike, C. E., Girotti, M., Javors, M., Zhao, Q., Maslin, L. A., Asmis, R. and Galvan, V. (2018) mTOR drives cerebral blood flow and memory deficits in LDLR *-/-* mice modeling atherosclerosis and vascular cognitive impairment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, *38*, 58–74.

Jank, R., Gallee, A., Boeckle, M., Fiegl, S. and Pieh, C. (2017) Chronic Pain and Sleep Disorders in Primary Care. *Pain Res. Treat.*, *2017*, 1–9.

Jastrzębska-Więsek, M., Siwek, A., Partyka, A., Szewczyk, B., Sowa-Kućma, M., Wasik, A., Kołaczkowski, M. and Wesołowska, A. (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. Arch. Pharmacol.*, *388*, 1079–1088.

Jastrzębska-Więsek, M., Siwek, A., Partyka, A., Antkiewicz-Michaluk, L., Michaluk, J., Romańska, I.,

- Kołaczkowski, M. and Wesołowska, A. (2016) Study of a mechanism responsible for potential antidepressant activity of EMD 386088, a 5-HT<sub>6</sub> partial agonist in rats. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, *389*, 839–49.
- Jayarajan, P., Nirogi, R., Shinde, A., Goura, V., Babu, V. A., Yathavakilla, S. and Bhyrapuneni, G. (2015) 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist attenuates the memory deficits associated with neuropathic pain and improves the efficacy of gabapentinoids. *Pharmacol. Reports*, *67*, 934–942.
- Jensen, J. B., du Jardin, K. G., Song, D., Budac, D., Smagin, G., Sanchez, C. and Pehrson, A. L. (2014) Vortioxetine, but not escitalopram or duloxetine, reverses memory impairment induced by central 5-HT depletion in rats: Evidence for direct 5-HT receptor modulation. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, *24*, 148–159.
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. C. and Treede, R. D. (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain*, *152*, 2204–2205.
- Ji, G., Zhang, W., Mahimainathan, L., Narasimhan, M., Kiritoshi, T., Fan, X., Wang, J., Green, T. A. and Neugebauer, V. (2017) 5-HT 2C Receptor Knockdown in the Amygdala Inhibits Neuropathic-Pain-Related Plasticity and Behaviors. *J. Neurosci.*, *37*, 1378–1393.
- Jiang, B., Wang, F., Yang, S., Fang, P., Deng, Z. F., Xiao, J. L., Hu, Z. L. and Chen, J. G. (2015) SKF83959 produces antidepressant effects in a chronic social defeat stress model of depression through BDNF-TrkB pathway. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, *18*, 1–13.
- Jiang, H., Fang, D., Kong, L. Y., Jin, Z. R., Cai, J., Kang, X. J., Wan, Y. and Xing, G. G. (2014) Sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala via the decreased GABAergic inhibition contributes to the development of neuropathic pain-related anxiety-like behaviors in rats. *Mol. Brain*, *7*, 72.
- Jiang, Z., Wu, S., Wu, X., Zhong, J., Lv, A., Jiao, J. and Chen, Z. (2016) Blocking mammalian target of rapamycin alleviates bone cancer pain and morphine tolerance via  $\mu$ -opioid receptor. *Int. J. Cancer*, *138*, 2013–2020.
- Jiménez-Díaz, L., Géranton, S. M., Passmore, G. M., Leith, J. L., Fisher, A. S., Berliocchi, L., Sivasubramaniam, A. K., Sheasby, A., Lumb, B. M. and Hunt, S. P. (2008) Local translation in primary afferent fibers regulates nociception. *PLoS One*, *3*, e1961.
- Johansen, J. P., Fields, H. L. and Manning, B. H. (2001) The affective component of pain in rodents: Direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *98*, 8077–8082.
- Johnston, I. N., Maier, S. F., Rudy, J. W. and Watkins, L. R. (2012) Post-conditioning experience with acute or chronic inflammatory pain reduces contextual fear conditioning in the rat. *Behav. Brain Res.*, *226*, 361–368.
- Johnston, J. P. (1968) Some Observations Upon a New Inhibitor of Monoamine Oxidase in Brain Tissue. *Biochem. Pharmacol.*, *17*, 1285–1297.
- Jonnakuty, C. and Gagnoli, C. (2008) What do we know about serotonin?. *J. Cell. Physiol.*, 301–306.

---

June, H. L., Murphy, J. M., Mellor-Burke, J. J., Lumeng, L. and Li, T. K. (1994) The benzodiazepine inverse agonist RO19-4603 exerts prolonged and selective suppression of ethanol intake in alcohol-preferring (P) rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, *115*, 325–331.

## K

---

Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., O'Donovan, M., Correll, C. U., Kane, J. M., Van Os, J. and Insel, T. R. (2015) Schizophrenia. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, *1*, 15067.

Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S.-I., Natsume, T. and Mizushima, N. (2010) Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J. Biol. Chem.*, *285*, 20109–16.

Kanai, A., Suzuki, A., Osawa, S. and Hoka, S. (2006) Sumatriptan alleviates pain in patients with trigeminal neuralgia. *Clin. J. Pain*, *22*, 677–680.

Kanai, A., Saito, M. and Hoka, S. (2006) Subcutaneous sumatriptan for refractory trigeminal neuralgia. *Headache*, *46*, 577–582.

Kanayama, M., Hashimoto, T., Shigenobu, K., Oha, F. and Yamane, S. (2005) New treatment of lumbar disc herniation involving 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor inhibitor: a randomized controlled trial. *J. Neurosurg. Spine*, *2*, 441–6.

Kang, H., Lee, W. K., Choi, Y. H., Vukoti, K. M., Bang, W. G. and Yu, Y. G. (2005) Molecular analysis of the interaction between the intracellular loops of the human serotonin receptor type 6 (5-HT<sub>6</sub>) and the alpha subunit of GS protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *329*, 684–92.

Karam, C. and Dyck, P. J. B. (2015) Toxic Neuropathies. *Semin. Neurol.*, *448–457*.

Karila, D., Freret, T., Bouet, V., Boulouard, M., Dallemagne, P. and Rochais, C. (2015) Therapeutic Potential of 5-HT<sub>6</sub> Receptor Agonists. *J. Med. Chem.*, *7901–7912*.

Kasahara, K., Miyoshi, K., Murakami, S., Miyazaki, I. and Asanuma, M. (2014) Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker Arl13b. *Acta Med. Okayama*, *317–322*.

Kato, K., Kikuchi, S. I., Konno, S. I. and Sekiguchi, M. (2008) Participation of 5-hydroxytryptamine in pain-related behavior induced by nucleus pulposus applied on the nerve root in rats. *Spine (Phila. Pa. 1976.)*, *33*, 1330–1336.

Kato, K., Sekiguchi, M., Kikuchi, S. I. and Konno, S. I. (2015) The effect of a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist on pain-related behavior, endogenous 5-hydroxytryptamine production, and the expression 5-HT<sub>2A</sub> receptors in dorsal root ganglia in a rat lumbar disc herniation model. *Spine (Phila. Pa. 1976.)*, *40*, 357–362.

- Kawasaki-Yatsugi, S., Nagakura, Y., Ogino, S., Sekizawa, T., Kiso, T., Takahashi, M., Ishikawa, G., Ito, H. and Shimizu, Y. (2012) Automated measurement of spontaneous pain-associated limb movement and drug efficacy evaluation in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pain (United Kingdom)*, *16*, 1426–1436.
- Kayser, V., Aubel, B., Hamon, M. and Bourgoin, S. (2002) The antimigraine 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.*, *137*, 1287–1297.
- Kayser, V., Latrémolière, A., Hamon, M. and Bourgoin, S. (2011) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated modulations of the anti-allodynic effects of 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptor stimulation in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pain*, *15*, 451–458.
- Kenakin, T. (2004) Efficacy as a Vector: the Relative Prevalence and Paucity of Inverse Agonism. *Mol. Pharmacol.*, *65*, 2–11.
- Kenakin, T. (2011) Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *336*, 296–302.
- Keogh, E., Moore, D. J., Duggan, G. B., Payne, S. J. and Eccleston, C. (2013) The disruptive effects of pain on complex cognitive performance and executive control. *PLoS One*, *8*, e83272.
- Kerba, M., Wu, J. S. Y., Duan, Q., Hagen, N. A. and Bennett, M. I. (2010) Neuropathic pain features in patients with bone metastases referred for palliative radiotherapy. *J. Clin. Oncol.*, *28*, 4892–4897.
- Khoury, R., Grysman, N., Gold, J., Patel, K. and Grossberg, G. T. (2018) The role of 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin. Investig. Drugs*, *27*, 523–533.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. and Altman, D. G. (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.*, *8*, e1000412.
- Kim, K. J., Yoon, Y. W. and Chung, J. M. (1997) Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp. Brain Res.*, *113*, 200–206.
- Kim, S. H., Kim, D. H., Lee, K. H., Im, S. K., Hur, E. M., Chung, K. C. and Rhim, H. (2014) Direct interaction and functional coupling between human 5-HT<sub>6</sub> receptor and the light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B-LC1). *PLoS One*. Edited by P. Svenningsson, *9*, e91402.
- Kim, S. H. and Chung, J. M. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, *50*, 355–363.
- Kimura, M., Obata, H. and Saito, S. (2014) Peripheral nerve injury reduces analgesic Effects of systemic morphine via spinal 5-hydroxytryptamine 3 receptors. *Anesthesiology*, *121*, 362–371.
- King, T., Rao, S., Vanderah, T., Chen, Q., Vardanyan, A. and Porreca, F. (2006) Differential Blockade of Nerve Injury-Induced Shift in Weight Bearing and Thermal and Tactile Hypersensitivity by Milnacipran. *J. Pain*, *7*, 513–520.

- Kishi, T., Fukuo, Y., Okochi, T., Kawashima, K., Kitajima, T., Inada, T., Ozaki, N., Musso, G. M., Kane, J. M., Correll, C. U. and Iwata, N. (2012) Serotonin 6 receptor gene and schizophrenia: Case-control study and meta-analysis. *Hum. Psychopharmacol.*, 63–69.
- Kjelsberg, M. A., Cotecchia, S., Ostrowski, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992) Constitutive activation of the  $\beta$ 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site: Evidence for a region which constrains receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 267, 1430–1433.
- Klingebl, M., Dinekov, M. and Köhler, C. (2017) Analysis of ribosomal protein S6 baseline phosphorylation and effect of tau pathology in the murine brain and human hippocampus. *Brain Res.*, 1659, 121–135.
- Knoll, J. and Magyar, K. (1972) Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 5, 393–408.
- Knob, J., Zallakian, M. and Njus, D. (1981) Stoichiometry of hydrogen ion-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry*, 20, 6625–6629.
- Koed, K. and Linnet, K. (2000) Opposing changes in serotonin and norepinephrine transporter mRNA levels after serotonin depletion. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 10, 501–509.
- Kohen, R., Metcalf, M. A., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J. E., Meltzer, H. Y., Sibley, D. R., Roth, B. L. and Hamblin, M. W. (1996) Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT<sub>6</sub> serotonin receptor. *J. Neurochem.*, 66, 47–56.
- Kohen, R., Fashingbauer, L. A., Heidmann, D. E. a, Guthrie, C. R. and Hamblin, M. W. (2001) Cloning of the mouse 5-HT<sub>6</sub> serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Mol. Brain Res.*, 90, 110–117.
- Kondo, D., Saegusa, H. and Tanabe, T. (2018) Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/mammalian target of rapamycin/peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  pathway for induction and maintenance of neuropathic pain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 499, 253–259.
- Kontinen, V. K., Kauppila, T., Paananen, S., Pertovaara, A. and Kalso, E. (1999) Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. *Pain*, 80, 341–346.
- Kopach, O., Medvediev, V., Krotov, V., Borisyuk, A., Tsybaliuk, V. and Voitenko, N. (2017) Opposite, bidirectional shifts in excitation and inhibition in specific types of dorsal horn interneurons are associated with spasticity and pain post-SCI. *Sci. Rep.*, 7, 5884.
- Kotańska, M., Lustyk, K., Bucki, A., Marcinkowska, M., Śniecikowska, J. and Kołaczowski, M. (2018) Idalopirdine, a selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, reduces food intake and body weight in a model of excessive eating. *Metab. Brain Dis.*, 33, 733–740.
- Kowal, T. J. and Falk, M. M. (2015) Primary cilia found on HeLa and other cancer cells. *Cell Biol. Int.*, 39, 1341–1347.

Kronenberg, G., Kirste, I., Inta, D., Chourbaji, S., Heuser, I., Endres, M. and Gass, P. (2009) Reduced hippocampal neurogenesis in the GR<sup>+/-</sup> genetic mouse model of depression. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 259, 499–504.

Krupnick, J. G., Goodman Jr., O. B., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1997) Arrestin/Clathrin Interaction: Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxyl terminus. *J Biol Chem*, 272, 15011–15016.

Krupnick, J. G. and Benovic, J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 289–319.

Kuffler, D. P. (2018) Origins of phantom limb pain. *Mol. Neurobiol.*, 55, 60–69.

Kupers, R., Frokjaer, V. G., Naert, A., Christensen, R., Budtz-Joergensen, E., Kehlet, H. and Knudsen, G. M. (2009) A PET [<sup>18</sup>F]altanserin study of 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in the human brain and responses to painful heat stimulation. *Neuroimage*, 44, 1001–1007.

Kwiat, G. C. and Basbaum, A. I. (1992) The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosens. Mot. Res.*, 9, 157–173.

Kwon, M., Han, J., Kim, U. J., Cha, M., Um, S. W., Bai, S. J., Hong, S.-K. and Lee, B. H. (2017) Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling in the Insular Cortex Alleviates Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *Front. Mol. Neurosci.*, 10, 79.

## L

---

LaBuda, C. J. and Little, P. J. (2005) Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 144, 175–181.

Lacroix, L. P., Dawson, L. A., Hagan, J. J. and Heidbreder, C. A. (2004) 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-271046 Enhances Extracellular Levels of Monoamines in the Rat Medial Prefrontal Cortex. *Synapse*, 51, 158–164.

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

Lalut, J., Karila, D., Dallemagne, P. and Rochais, C. (2017) Modulating 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors in Alzheimer's disease treatment. *Future Med. Chem.*, 9, 781–795.

Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 274–293.

Laporte, A. M., Koscielniak, T., Ponchant, M., Vergé, D., Hamon, M. and Gozlan, H. (1992) Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat CNS using [<sup>125</sup>I]iodo-zacopride and [<sup>3</sup>H]zacopride as radioligands. *Synapse*, 10, 271–281.

Laporte, A. M., Fattaccini, C. M., Lombard, M. C., Chauveau, J. and Hamon, M. (1995) Effects of dorsal

- rhizotomy and selective lesion of serotonergic and noradrenergic systems on 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat spinal cord. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, *100*, 207–223.
- Laporte, A. M., Doyen, C., Nevo, I. T., Chauveau, J., Hauw, J. J. and Hamon, M. (1996) Autoradiographic mapping of serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the aged human spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.*, *11*, 67–75.
- Law, V., Dong, S., Rosales, J. L., Jeong, M.-Y., Zochodne, D. and Lee, K.-Y. (2016) Enhancement of Peripheral Nerve Regrowth by the Purine Nucleoside Analog and Cell Cycle Inhibitor, Roscovitine. *Front. Cell. Neurosci.*, *10*, 238.
- Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2005) Transduction of receptor signals by  $\beta$ -arrestins. *Science* (80-. ), *512*–517.
- Leite-Almeida, H., Cerqueira, J. J., Wei, H., Ribeiro-Costa, N., Anjos-Martins, H., Sousa, N., Pertovaara, A. and Almeida, A. (2012) Differential effects of left/right neuropathy on rats' anxiety and cognitive behavior. *Pain*, *153*, 2218–2225.
- Leong, M. L., Gu, M., Speltz-Paiz, R., Stahura, E. I., Mottey, N., Steer, C. J. and Wessendorf, M. (2011) Neuronal Loss in the Rostral Ventromedial Medulla in a Rat Model of Neuropathic Pain. *J. Neurosci.*, *31*, 17028–17039.
- Leonhardt, S., Herrick-Davis, K. and Titeler, M. (1989) Detection of a Novel Serotonin Receptor Subtype (5-HT<sub>1E</sub>) in Human Brain: Interaction with a GTP-Binding Protein. *J. Neurochem.*, *53*, 465–471.
- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C. R., Hamer, D. H. and Murphy, D. L. (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* (80-. ), *274*, 1527–1531.
- Lesch, K. P. and Gutknecht, L. (2005) Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, *29*, 1062–1073.
- Lesiak, A. J., Brodsky, M., Cohenca, N., Croicu, A. G. and Neumaier, J. F. (2018) Restoration of Physiological Expression of 5-HT<sub>6</sub> Receptor into the Primary Cilia of Null Mutant Neurons Lengthens Both Primary Cilia and Dendrites s. *Mol. Pharmacol. Mol Pharmacol*, *94*, 731–742.
- Li, G., Lu, X., Zhang, S., Zhou, Q. and Zhang, L. (2015) mTOR and Erk1/2 Signaling in the Cerebrospinal Fluid-Contacting Nucleus is Involved in Neuropathic Pain. *Neurochem. Res.*, *40*, 1053–1062.
- Li, K., Zhao, G. Q., Li, L. Y., Wu, G. Z. and Cui, S. Sen (2014) Epigenetic upregulation of Cdk5 in the dorsal horn contributes to neuropathic pain in rats. *Neuroreport*, *25*, 1116–1121.
- Li, S.-F., Zhang, Y.-Y., Li, Y.-Y., Wen, S. and Xiao, Z. (2014) Antihyperalgesic effect of 5-HT<sub>7</sub> receptor activation on the midbrain periaqueductal gray in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *127*, 49–55.

- Li, S., Cai, J., Feng, Z. B., Jin, Z. R., Liu, B. H., Zhao, H. Y., Jing, H. B., Wei, T. J., Yang, G. N., Liu, L. Y., Cui, Y. J. and Xing, G. G. (2017) BDNF Contributes to Spinal Long-Term Potentiation and Mechanical Hypersensitivity Via Fyn-Mediated Phosphorylation of NMDA Receptor GluN2B Subunit at Tyrosine 1472 in Rats Following Spinal Nerve Ligation. *Neurochem. Res.*, *42*, 2712–2729.
- Li, S., Han, J., Wang, D.-S., Yang, Q., Feng, B., Kang, W.-B., Yang, L., Liu, G. and Zhao, M.-G. (2017) Sinomenine attenuates chronic inflammatory pain in mice. *Metab. Brain Dis.*, *32*, 211–219.
- Li, W., Fang, M. and Cai, X. (2010) [Expression and activity of Cdk5/p35 in a rat model of trigeminal neuropathic pain]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, *19*, 545–8.
- Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A. W., Orlando, D. A., Lovén, J., Kwok, S. M., Feldman, D. A., Bateup, H. S., Gao, Q., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Lewis, C. A., Vander Heiden, M. G., Sur, M., Young, R. A. and Jaenisch, R. (2013) Global transcriptional and translational repression in human-embryonic- stem-cell-derived rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell*, *13*, 446–458.
- Li, Z., Huang, M., Prus, A. J., Dai, J. and Meltzer, H. Y. (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 Res.*, *1134*, 70–78.
- Liang, L., Tao, B., Fan, L., Yaster, M., Zhang, Y. and Tao, Y. X. (2013) MTOR and its downstream pathway are activated in the dorsal root ganglion and spinal cord after peripheral inflammation, but not after nerve injury. *Brain Res.*, *1513*, 17–25.
- Licausi, F. and Hartman, N. W. (2018) Role of mTOR complexes in neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*
- Lieben, C. K. J., Blokland, A., Şik, A., Sung, E., Van Nieuwenhuizen, P. and Schreiber, R. (2005) The selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist Ro4368554 restores memory performance in cholinergic and serotonergic models of memory deficiency in the rat. *Neuropsychopharmacology*, *30*, 2169–2179.
- Liedgens, H., Obradovic, M., De Courcy, J., Holbrook, T. and Jakubanis, R. (2016) A burden of illness study for neuropathic pain in Europe. *Clin. Outcomes Res.*, *8*, 113–126.
- Lin, A. L., Jahrling, J. B., Zhang, W., Derosa, N., Bakshi, V., Romero, P., Galvan, V. and Richardson, A. (2017) Rapamycin rescues vascular, metabolic and learning deficits in apolipoprotein E4 transgenic mice with pre-symptomatic Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, *37*, 217–226.
- Lin, H., Heo, B. H., Kim, W. M., Kim, Y. C. and Yoon, M. H. (2015) Antiallodynic effect of tianeptine via modulation of the 5-HT<sub>7</sub> receptor of GABAergic interneurons in the spinal cord of neuropathic rats. *Neurosci. Lett.*, *598*, 91–95.
- Lin, S.-Y., Chang, W.-J., Lin, C.-S., Huang, C.-Y., Wang, H.-F. and Sun, W.-H. (2011) Serotonin Receptor 5-HT<sub>2B</sub> Mediates Serotonin-Induced Mechanical Hyperalgesia. *J. Neurosci.*, *31*, 1410–1418.
- Lin, S. L., Setya, S., Johnson-Farley, N. N. and Cowen, D. S. (2002) Differential coupling of 5-HT<sub>1</sub> receptors to G proteins of the Gi family. *Br. J. Pharmacol.*, *136*, 1072–8.

- Ling, B., Coudoré-Civiale, M. A., Balayssac, D., Eschalier, A., Coudoré, F. and Authier, N. (2007) Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology*, *234*, 176–184.
- Lisi, L., Navarra, P., Cirocchi, R., Sharp, A., Stigliano, E., Feinstein, D. L. and Dello Russo, C. (2012) Rapamycin reduces clinical signs and neuropathic pain in a chronic model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, *243*, 43–51.
- Liu, F. Y., Qu, X. X., Ding, X., Cai, J., Jiang, H., Wan, Y., Han, J. S. and Xing, G. G. (2010) Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. *Brain Res.*, *1330*, 45–60.
- Liu, J. G. and Prather, P. L. (2001) Chronic exposure to mu-opioid agonists produces constitutive activation of mu-opioid receptors in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment. *Mol. Pharmacol.*, *60*, 53–62.
- Liu, K. C., Li, J. Y., Tan, H. H., Du, C. X., Xie, W., Zhang, Y. M., Ma, W. L. and Zhang, L. (2015) Serotonin<sub>6</sub> receptors in the dorsal hippocampus regulate depressive-like behaviors in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson's rats. *Neuropharmacology*, *95*, 290–298.
- Liu, X., Zhang, J., Sun, D., Fan, Y., Zhou, H. and Fu, B. (2014) Effects of fluoxetine on brain-derived neurotrophic factor serum concentration and cognition in patients with vascular dementia. *Clin. Interv. Aging*, *9*, 411–419.
- Liu, X., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, W., Sun, Y. E., Gu, X. and Ma, Z. (2014) Intrathecal administration of roscovitine prevents remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia and decreases the phosphorylation of N-methyl-d-aspartate receptor and metabotropic glutamate receptor 5 in spinal cord. *Brain Res. Bull.*, *106*, 9–16.
- Liu, X. Y., Wu, S. X., Wang, Y. Y., Wang, W., Zhou, L. and Li, Y. Q. (2005) Changes of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by bee venom-induced inflammatory pain. *Neurosci. Lett.*, *375*, 42–46.
- Liu, Y.-D., Wang, Z.-B., Han, G. and Zhao, P. (2017) Hyperbaric oxygen treatment attenuates neuropathic pain by elevating autophagy flux via inhibiting mTOR pathway.pdf. *Am. J. Transl. Res.*, *2629–2638*.
- Liu, Y. N., Yang, X., Suo, Z. W., Xu, Y. M. and Hu, X. D. (2014) Fyn kinase-regulated NMDA receptor- and AMPA receptor-dependent pain sensitization in spinal dorsal horn of mice. *Eur. J. Pain (United Kingdom)*, *18*, 1120–1128.
- Loiseau, F., Dekeyne, A. and Millan, M. J. (2008) Pro-cognitive effects of 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists in the social recognition procedure in rats: Implication of the frontal cortex. *Psychopharmacology (Berl.)*, *196*, 93–104.
- Lorke, D. E., Lu, G., Cho, E. and Yew, D. T. (2006) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC Neurosci.*, *7*, 36.

Lovenberg, T. W., Baron, B. M., de Lecea, L., Miller, J. D., Prosser, R. A., Rea, M. A., Foye, P. E., Racke, M., Slone, A. L., Siegel, B. W., Danielson, P. E., Sutcliffe, J. G. and Erlander, M. G. (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*, *11*, 449–458.

Lowther, S., De Paermentier, F., Crompton, M. R. and Horton, R. W. (1992) The distribution of 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>1E</sub> binding sites in human brain. *Eur J Pharmacol*, *222*, 137–142.

Lu, K.-L., Shen, W.-Z., Luo, T., Wang, Y., Yue, Y. and Wu, A.-S. (2016) The mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor rapamycin improves postoperative cognitive dysfunction (POCD). *Int. J. Clin. Exp. Med.*, *9*, 2103–2111.

Lucaites, V. L., Nelson, D. L., Wainscott, D. B. and Baez, M. (1996) Receptor subtype and density determine the coupling repertoire of the 5-HT<sub>2</sub>receptor subfamily. *Life Sci.*, *59*, 1081–1095.

Luo, J. G., Zhao, X. L., Xu, W. C., Zhao, X. J., Wang, J. N., Lin, X. W., Sun, T. and Fu, Z. J. (2014) Activation of spinal NF- $\kappa$ B/p65 contributes to peripheral inflammation and hyperalgesia in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, *66*, 896–906.

Lv, J., Li, Z., She, S., Xu, L. and Ying, Y. (2015) Effects of intrathecal injection of rapamycin on pain threshold and spinal cord glial activation in rats with neuropathic pain. *Neurol. Res.*, *37*, 739–743.

## M

---

Ma, X., Peterson, R. and Turnbull, J. (2011) Adenylyl Cyclase type 3, a marker of primary cilia, is reduced in primary cell culture and in lumbar spinal cord in situ in G93A SOD1 mice. *BMC Neurosci.*, *12*, 71.

MacLeod, N., Kelly, C., Stobo, J., McMahon, L., Taggart, D., Fallon, M. and Laird, B. J. (2016) Pain in malignant pleural mesothelioma: A prospective characterization study. *Pain Med. (United States)*, *17*, 2119–2126.

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

Majumder, S., Caccamo, A., Medina, D. X., Benavides, A. D., Javors, M. A., Kraig, E., Strong, R., Richardson, A. and Oddo, S. (2012) Lifelong rapamycin administration ameliorates age-dependent cognitive deficits by reducing IL-1 $\beta$  and enhancing NMDA signaling. *Aging Cell*, *11*, 326–335.

Malicki, J. J. and Johnson, C. A. (2017) The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol.*, 126–140.

Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. and Cantley, L. C. (2002) Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt

pathway. *Mol. Cell*, *10*, 151–162.

Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Schmid, L., Vatteroni, E., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., Piano, I., Gargini, C., Castagna, M., Catena-Dell’Osso, M. and Lucacchini, A. (2012) Distribution of serotonin receptor of type 6 (5-HT<sub>6</sub>) in human brain post-mortem. A pharmacology, autoradiography and immunohistochemistry study. *Neurochem. Res.*, *37*, 920–927.

Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Testa, G., Schmid, L., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., Piano, I., Gargini, C., Castagna, M., Catena-Dell’Osso, M. and Lucacchini, A. (2013) Serotonin receptor of type 6 (5-HT<sub>6</sub>) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: An immunohistochemical and immunofluorescence study. *Neurochem. Int.*, *62*, 182–188.

Marcos, B., Chuang, T. T., Gil-Bea, F. J. and Ramirez, M. J. (2008) Effects of 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonism and cholinesterase inhibition in models of cognitive impairment in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, *155*, 434–440.

Marcos, B., García-Alloza, M., Gil-Bea, F. J., Chuang, T. T., Francis, P. T., Chen, C. P., Tsang, S. W. T. Y., Lai, M. K. P. and Ramirez, M. J. (2008) Involvement of an altered 5-HT<sub>6</sub> receptor function in behavioral symptoms of Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers. Dis.*, *14*, 43–50.

Marcos, B., Cabero, M., Solas, M., Aisa, B. and Ramirez, M. J. (2010) Signalling pathways associated with 5-HT<sub>6</sub> receptors: Relevance for cognitive effects. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, *13*, 775–784.

Maricq, A., Peterson, A., Brake, A., Myers, R. and Julius, D. (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, *254*, 432–437.

Marin, P., Meffre, J. and Bockaert, J. (2013) mTOR Une nouvelle cible pour le traitement des troubles cognitifs de la schizophrénie?. *Med. Sci.*, *29*, 5–7.

Marinelli, S., Nazio, F., Tinari, A., Ciarlo, L., D’Amelio, M., Pieroni, L., Vacca, V., Urbani, A., Cecconi, F., Malorni, W. and Pavone, F. (2014) Schwann cell autophagy counteracts the onset and chronification of neuropathic pain. *Pain*, *155*, 93–107.

Marlier, L., Teilhac, J. R., Cerruti, C. and Privat, A. (1991) Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat spinal cord. *Brain Res.*, *550*, 15–23.

Marshall, A. M., Hernandez, L. L. and Horseman, N. D. (2014) Serotonin and serotonin transport in the regulation of lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, *19*, 139–146.

Martin, A. L., Steurer, M. A. and Aronstam, R. S. (2015) Constitutive activity among orphan class-A G protein coupled receptors. *PLoS One*, *10*.

Marwari, S. and Dawe, G. S. (2018) (R)-fluoxetine enhances cognitive flexibility and hippocampal cell proliferation in mice. *J. Psychopharmacol.*, *32*, 441–457.

Masini, D., Bonito-Oliva, A., Bertho, M. and Fisone, G. (2018) Inhibition of mTORC1 signaling reverts cognitive and affective deficits in a mouse model of Parkinson’s disease. *Front. Neurol.*, *9*, 208.

- Mathieson, S., Maher, C. G., Terwee, C. B., Folly De Campos, T. and Lin, C. W. C. (2015) Neuropathic pain screening questionnaires have limited measurement properties. A systematic review. *J. Clin. Epidemiol.*, *68*, 957–966.
- Matthes, H., Boschert, U., Amlaiky, N., Grailhe, R., Plassat, J. L., Muscatelli, F., Mattei, M. G. and Hen, R. (1993) Mouse 5-hydroxytryptamine<sub>5A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>5B</sub> receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol. Pharmacol.*, *43*, 313–9.
- Maurer, M. S., Hanna, M., Grogan, M., Dispenzieri, A., Witteles, R., Drachman, B., Judge, D. P., Lenihan, D. J., Gottlieb, S. S., Shah, S. J., Steidley, D. E., Ventura, H., Murali, S., Silver, M. A., Jacoby, D., Fedson, S., Hummel, S. L., Kristen, A. V., Damy, T., Planté-Bordeneuve, V., Coelho, T., Mundayat, R., Suhr, O. B., Waddington Cruz, M. and Rapezzi, C. (2016) Genotype and Phenotype of Transthyretin Cardiac Amyloidosis: THAOS (Transthyretin Amyloid Outcome Survey). *J. Am. Coll. Cardiol.*, *68*, 161–172.
- Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Stramosk, J., Cidral-Filho, F. J. and Santos, A. R. S. (2012) Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. *Neuroscience*, *226*, 411–420.
- McAllister, G., Charlesworth, A., Snodin, C., Beer, M. S., Noble, A. J., Middlemiss, D. N., Iversen, L. L. and Whiting, P. (1992) Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT<sub>1E</sub>): a fifth 5HT<sub>1</sub>-like subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*, 5517–5521.
- McCarthy, M. M., Nielsen, D. A. and Goldman, D. (1995) Antisense oligonucleotide inhibition of tryptophan hydroxylase activity in mouse brain. *Regul. Pept.*, *59*, 163–170.
- McCleane, G. J., Suzuki, R. and Dickenson, A. H. (2003) Does a single intravenous injection of the 5HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron have an analgesic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Anesth. Analg.*, *97*, 1474–1478.
- McIntosh, A. M., Hall, L. S., Zeng, Y., Adams, M. J., Gibson, J., Wigmore, E., Hagenaars, S. P., Davies, G., Fernandez-Pujals, A. M., Campbell, A. I., Clarke, T. K., Hayward, C., Haley, C. S., Porteous, D. J., Deary, I. J., Smith, D. J., Nicholl, B. I., Hinds, D. A., Jones, A. V., Scollen, S., Meng, W., Smith, B. H. and Hocking, L. J. (2016) Genetic and Environmental Risk for Chronic Pain and the Contribution of Risk Variants for Major Depressive Disorder: A Family-Based Mixed-Model Analysis. *PLoS Med.* Edited by C. J. Woolf, *13*, e1002090.
- Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D. J. G., Dekeyne, A., Séveno, M., Rivet, J. M., Gaven, F., Déléris, P., Hervé, D., Fone, K. C. F., Bockaert, J., Millan, M. J. and Marin, P. (2012) 5-HT<sub>6</sub> receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol. Med.*, *4*, 1043–1056.
- Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Sanoja, R., Yan, J., Lark, A., Khoutorsky, A., Johnson, J., Peebles, K. A., Lepow, T., Sonenberg, N., Dussor, G. and Price, T. J. (2011) Targeting adenosine

- monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Mol. Pain*, 7, 1744-8069-7-70.
- Meneses, A., Manuel-Apolinar, L., Castillo, C. and Castillo, E. (2007) Memory consolidation and amnesia modify 5-HT<sub>6</sub> receptors expression in rat brain: An autoradiographic study. *Behav. Brain Res.*, 178, 53-61.
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Flores-Galvez, D., Castillo, C. and Castillo, E. (2008) The effects of the 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD and the 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist AS19 on memory formation. *Behav. Brain Res.*, 195, 112-119.
- Meneses, A. (2014) Memory formation and memory alterations: 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors, novel alternative. *Rev. Neurosci.*, 325-356.
- Mengod, G., Vilaró, M. T., Raurich, A., López-Giménez, J. F., Cortés, R. and Palacios, J. M. (1996) 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem. J.*, 28, 747-58.
- Mengod, G., Palacios, J. M. and Cortés, R. (2015) Cartography of 5-HT 1A and 5-HT 2A Receptor Subtypes in Prefrontal Cortex and Its Projections. *ACS Chem. Neurosci.*, 6, 1089-1098.
- Messina, D., Annesi, G., Serra, P., Nicoletti, G., Pasqua, A., Annesi, F., Tomaino, C., Cirò-Candiano, I. C., Carrideo, S., Caracciolo, M., Spadafora, P., Zappia, M., Savettieri, G. and Quattrone, A. (2002) Association of the 5-HT<sub>6</sub> receptor gene polymorphism C267T with Parkinson's disease. *Neurology*, 58, 828-829.
- Meuser, T., Pietruck, C., Gabriel, A., Xie, G.-X., Lim, K.-J. and Pierce Palmer, P. (2002) 5-HT<sub>7</sub> receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sci.*, 71, 2279-2289.
- Meye, F. J., Ramakers, G. M. J. and Adan, R. A. H. (2014) The vital role of constitutive GPCR activity in the mesolimbic dopamine system. *Transl. Psychiatry*, 361.
- Meyuhas, O. (2015) Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. in *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 41-73.
- Millan, M. J. (2002) Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.*, 355-474.
- Miller, K. J. and Teitler, M. (1992) Quantitative autoradiography of 5-CT-sensitive (5-HT<sub>1D</sub>) and 5-CT-insensitive (5-HT<sub>1E</sub>) serotonin receptors in human brain. *Neurosci. Lett.*, 136, 223-226.
- Mills, A. and Martin, G. R. (1995) Autoradiographic mapping of [3H]sumatriptan binding in cat brain stem and spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.*, 280, 175-178.
- Miltenburg, N. C. and Boogerd, W. (2014) Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat. Rev.*, 40, 872-882.
- Minson, J., Pilowsky, P., Llewellyn-Smith, I., Kaneko, T., Kapoor, V. and Chalmers, J. (1991) Glutamate in spinally projecting neurons of the rostral ventral medulla. *Brain Res.*, 555, 326-331.
- Mixcoatl-Zecuatl, T. and Jolival, C. G. (2011) A spinal mechanism of action for duloxetine in a rat model

of painful diabetic neuropathy. *Br. J. Pharmacol.*, *164*, 159–169.

Moes, D. J. A. R., Guchelaar, H. J. and De Fijter, J. W. (2015) Sirolimus and everolimus in kidney transplantation. *Drug Discov. Today*, 1243–1249.

Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L. and Gwaltney-Brant, S. M. (2008) Serotonin: A review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 187–199.

Molineaux, S. M., Jessell, T. M., Axel, R. and Julius, D. (1989) 5-HT<sub>1c</sub> receptor is a prominent serotonin receptor subtype in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *86*, 6793–7.

Molinoff, P. B. and Axelrod, J. (1971) Biochemistry of catecholamines. *Annu. Rev. Biochem.*, *40*, 465–500.

Monsma, F. J., Shen, Y., Ward, R., Hamblin, M. W. and Sibley, D. R. (1993) Cloning and Expression of a Novel Serotonin Receptor with High Affinity for Tricyclic Psychotropic Drugs. *Mol. Pharmacol.*, *43*, 320–327.

Morales, M., Battenberg, E. and Bloom, F. E. (1998) Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT<sub>3</sub> receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, *402*, 385–401.

Morales, M., McCollum, N. and Kirkness, E. F. (2001) 5-HT<sub>3</sub>-receptor subunits A and B are co-expressed in neurons of the dorsal root ganglion. *J. Comp. Neurol.*, *438*, 163–172.

Morgan, M. M. and Heinricher, M. M. (1992) Activity of neurons in the rostral medulla of the halothane-anesthetized rat during withdrawal from noxious heat. *Brain Res.*, *582*, 154–158.

Moriarty, O., Gorman, C. L., McGowan, F., Ford, G. K., Roche, M., Thompson, K., Dockery, P., McGuire, B. E. and Finn, D. P. (2016) Impaired recognition memory and cognitive flexibility in the rat L5-L6 spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Scand. J. Pain*, *10*, 61–73.

Moriarty, O., Ruane, N., Gorman, D. O., Maharaj, C. H., Mitchell, C., Sarma, K. M., Finn, D. P. and McGuire, B. E. (2017) Cognitive Impairment in Patients with Chronic Neuropathic or Radicular Pain : An Interaction of Pain and Age. *Front. Behav. Neurosci.*, *11*, 100.

Mork, A., Russell, R. V., de Jong, I. E. M. and Smagin, G. (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. *Eur. J. Pharmacol.*, *799*, 1–6.

Morozova, M. A., Lepilkina, T. A., Rupchev, G. E., Beniashvily, A. G., Burminskiy, D. S., Potanin, S. S., Bondarenko, E. V., Kazey, V. I., Lavrovsky, Y. and Ivachtchenko, A. V. (2014) Add-on clinical effects of selective antagonist of 5-HT<sub>6</sub> receptors AVN-211 (CD-008-0173) in patients with schizophrenia stabilized on antipsychotic treatment: Pilot study. *CNS Spectr.*, *19*, 316–323.

Mowla, A., Mosavinasab, M. and Pani, A. (2007) Does fluoxetine have any effect on the cognition of patients with mild cognitive impairment?: A double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *J. Clin. Psychopharmacol.*, *27*, 67–70.

Muñoz-Islas, E., Vidal-Cantú, G. C., Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Quiñonez-Bastidas, G. N., Pineda-Farias, J. B., Barragán-Iglesias, P. and Granados-Soto, V. (2014) Spinal 5-HT<sub>5A</sub> receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *120*, 25–32.

Murad, H. and Ayuob, N. (2015) Co-Administration of Pioglitazone Improves Fluoxetine's Antinociceptive, Neuroprotective, and Antidepressant Effects in Chronic Constriction Injury in Rats. *Pain Physician*, *18*, 609–20.

Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K. and Yamanaka, S. (2004) mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.*, *24*, 6710–6718.

## N

Nadar, M. S., Jasem, Z. and Manee, F. S. (2016) The cognitive functions in adults with chronic pain: A comparative study. *Pain Res. Manag.*, *2016*, 5719380.

Nakae, A., Nakai, K., Tanaka, T., Hagihira, S., Shibata, M., Ueda, K. and Masimo, T. (2008) The role of RNA editing of the serotonin 2C receptor in a rat model of oro-facial neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.*, *27*, 2373–2379.

Nakai, K., Nakae, A., Oba, S., Mashimo, T. and Ueda, K. (2010) 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pain*, *14*, 999–1006.

Nakai, K., Nakae, A., Kubo, T., Minegishi, Y., Fujino, Y. and Hosokawa, K. (2014) Role of spinal 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in a rat model of trigeminal neuropathic pain: 14AP6-7. *Eur. J. Anaesthesiol.*, *31*, 230–231.

Nakamura, K., Wu, S. X., Fujiyama, F., Okamoto, K., Hioki, H. and Kaneko, T. (2004) Independent inputs by VGLUT2- and VGLUT3-positive glutamatergic terminals onto rat sympathetic preganglionic neurons. *Neuroreport*, *15*, 431–436.

Nakazawa, K., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S. and Belforte, J. E. (2012) GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, 1574–1583.

Narita, M., Kaneko, C., Miyoshi, K., Nagumo, Y., Kuzumaki, N., Nakajima, M., Nanjo, K., Matsuzawa, K., Yamazaki, M. and Suzuki, T. (2006) Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, *31*, 739–750.

Nasirinezhad, F., Hosseini, M., Karami, Z., Yousefifard, M. and Janzadeh, A. (2016) Spinal 5-HT<sub>3</sub> receptor mediates nociceptive effect on central neuropathic pain; possible therapeutic role for tropisetron. *J. Spinal Cord Med.*, *39*, 212–219.

Nicholson, R., Small, J., Dixon, A. K., Spanswick, D. and Lee, K. (2003) Serotonin receptor mRNA

expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.*, 337, 119–22.

Nikai, T., Basbaum, A. I. and Ahn, A. H. (2008) Profound reduction of somatic and visceral pain in mice by intrathecal administration of the anti-migraine drug, sumatriptan. *Pain*, 139, 533–540.

Nikiforuk, A., Kos, T. and Wesołowska, A. (2011) The 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology (Berl.)*, 217, 411–418.

Nikolaeva, I., Crowell, B., Valenziano, J., Meaney, D. and D’Arcangelo, G. (2016) Beneficial Effects of Early mTORC1 Inhibition after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*, 33, 183–193.

Nikolaeva, I., Kazdoba, T. M., Crowell, B. and D’Arcangelo, G. (2017) Differential roles for Akt and mTORC1 in the hypertrophy of Pten mutant neurons, a cellular model of brain overgrowth disorders. *Neuroscience*, 354, 196–207.

Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K., Bhyrapuneni, G. and Jasti, V. (2009) Safety, tolerability and pharmacokinetics of SUVN-502 - A 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, first in human phase-1 single ascending dose (sAD) study. *Alzheimer’s Dement.*, 5, 250.

Niscola, P., Scaramucci, L., Romani, C., Giovannini, M., Tendas, A., Brunetti, G., Cartoni, C., Palumbo, R., Vischini, G., Siniscalchi, A., Fabritiis, P. de and Caravita, T. (2010) Pain management in multiple myeloma. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 415–425.

Nitanda, A., Yasunami, N., Tokumo, K., Fujii, H., Hirai, T. and Nishio, H. (2005) Contribution of the peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.*, 47, 394–400.

Nutt, D., Stahl, S., Blier, P., Drago, F., Zohar, J. and Wilson, S. (2017) Inverse agonists – What do they mean for psychiatry?. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 27, 87–90.

## O

---

O’Connor, A. B., Schwid, S. R., Herrmann, D. N., Markman, J. D. and Dworkin, R. H. (2008) Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification. *Pain*, 137, 96–111.

Oatway, M. A., Chen, Y. and Weaver, L. C. (2004) The 5-HT<sub>3</sub> receptor facilitates allodynia following spinal cord injury. *Pain*, 110, 259–268.

Obara, I., Tochiki, K. K., Géranton, S. M., Carr, F. B., Lumb, B. M., Liu, Q. and Hunt, S. P. (2011) Systemic inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduces neuropathic pain in mice. *Pain*, 152, 2582–2595.

Obata, H., Saito, S., Sakurazawa, S., Sasaki, M., Usui, T. and Goto, F. (2004) Antiallodynic effects of intrathecally administered 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists in rats with nerve injury. *Pain*, 108, 163–169.

---

Obata, H., Ito, N., Sasaki, M., Saito, S. and Goto, F. (2007) Possible involvement of spinal noradrenergic mechanisms in the antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists in the rats with peripheral nerve injury. *Eur. J. Pharmacol.*, *567*, 89–94.

Obosi, L. A., Hen, R., Beadle, D. J., Bermudez, I. and King, L. A. (1997) Mutational analysis of the mouse 5-HT<sub>7</sub>receptor: Importance of the third intracellular loop for receptor-G-protein interaction. *FEBS Lett.*, *412*, 321–324.

Okamoto, K., Imbe, H., Morikawa, Y., Itoh, M., Sekimoto, M., Nemoto, K. and Senba, E. (2002) 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain*, *99*, 133–143.

Orhan, C. E., Önal, A. and Ülker, S. (2010) Antihyperalgesic and antiallodynic effect of sirolimus in neuropathic pain and the role of cytokines in this effect. *Neurosci. Lett.*, *481*, 17–20.

Ossipov, M. H. (2012) The Perception and Endogenous Modulation of Pain. *Scientifica (Cairo)*, *2012*, 1–25.

Ouadid, H., Seguin, J., Dumuis, A., Bockaert, J. and Nargeot, J. (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine receptors. *Mol. Pharmacol.*, *41*, 346–351.

## P

---

Pais-Vieira, M., Lima, D. and Galhardo, V. (2009) Sustained attention deficits in rats with chronic inflammatory pain. *Neurosci. Lett.*, *463*, 98–102.

Palazzo, E., Luongo, L., Guida, F., Marabese, I., Romano, R., Iannotta, M., Rossi, F., D’Aniello, A., Stella, L., Marmo, F., Usiello, A., de Bartolomeis, A., Maione, S. and de Novellis, V. (2016) d-Aspartate drinking solution alleviates pain and cognitive impairment in neuropathic mice. *Amino Acids*, *48*, 1553–1567.

Pałucha-Poniewiera, A., Podkowa, K., Lenda, T. and Pilc, A. (2017) The involvement of monoaminergic neurotransmission in the antidepressant-like action of scopolamine in the tail suspension test. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, *79*, 155–161.

Pareek, T. K. (2013) Cdk5: An Emerging Kinase in Pain Signaling. *Brain Disord. Ther.*, *01*.

Pareek, T. K. and Kulkarni, A. B. (2006) Cdk5: A new player in pain signaling. *Cell Cycle*, 585–588.

Parent, A. J., Beaudet, N., Beaudry, H., Bergeron, J., Berube, P., Drolet, G., Sarret, P. and Gendron, L. (2012) Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*, *229*, 160–167.

Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., Castagna, M., Cassano, G. B. and Marazziti, D. (1998) Distribution of the 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor mRNA in the human brain. *Brain Res. Mol. brain Res.*, *56*, 1–8.

- Patel, K. R., Cherian, J., Gohil, K. and Atkinson, D. (2014) Schizophrenia: overview and treatment options. *P T*, *39*, 638–45.
- Patetsos, E. and Horjales-Araujo, E. (2016) Treating chronic pain with SSRIs: What do we know?. *Pain Res. Manag.*
- Pauwels, P. J. and Wurch, T. (1998) Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors. *Mol. Neurobiol.*, *17*, 109–135.
- Payet, J. M., Burnie, E., Sathananthan, N. J., Russo, A. M., Lawther, A. J., Kent, S., Lowry, C. A. and Hale, M. W. (2018) Exposure to Acute and Chronic Fluoxetine has Differential Effects on Sociability and Activity of Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus of Juvenile Male BALB/c Mice. *Neuroscience*, *386*, 1–15.
- Pazos, A., Cortés, R. and Palacios, J. M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.*, *346*, 231–249.
- Perez-García, G. and Meneses, A. (2005) Oral administration of the 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists SB-357134 and SB-399885 improves memory formation in an autoshaping learning task. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *81*, 673–682.
- Perez, D. M. (2005) Multiple Signaling States of G-Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol. Rev.*, *57*, 147–161.
- Peroutka, S. J., Lebovitz, R. M. and Snyder, S. H. (1979) Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides. *Mol. Pharmacol.*, *16*, 700–708.
- Perrot, S., Maheu, E., Javier, R. M., Eschalié, A., Coutaux, A., Lebars, M., Bertin, P., Bannwarth, B. and Trèves, R. (2006) Guidelines for the use of antidepressants in painful rheumatic conditions. *Eur. J. Pain*, *10*, 185–192.
- Petrovic, P., Kalso, E., Petersson, K. M. and Ingvar, M. (2002) Placebo and opioid analgesia - Imaging a shared neuronal network. *Science (80-. )*, *295*, 1737–1740.
- Pham, P. C., Khaing, K., Sievers, T. M., Pham, P. M., Miller, J. M., Pham, S. V., Pham, P. A. and Pham, P. T. (2017) 2017 update on pain management in patients with chronic kidney disease. *Clin. Kidney J.*, 688–697.
- Pichon, X., Wattiez, A. S., Becamel, C., Ehrlich, I., Bockaert, J., Eschalié, A., Marin, P. and Courteix, C. (2010) Disrupting 5-HT<sub>2A</sub> receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Mol. Ther.*, *18*, 1462–1470.
- Pierce, P. A., Xie, G. X., Levine, J. D. and Peroutka, S. J. (1996) 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neurosci.*, *70*, 553–559.

- Pierce, P. A., Xie, G. X., Meuser, T. and Peroutka, S. J. (1997) 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: A polymerase chain reaction study. *Neuroscience*, *81*, 813–819.
- Pineda-Farias, J. B., Velázquez-Lagunas, I., Barragán-Iglesias, P., Cervantes-Durán, C. and Granados-Soto, V. (2015) 5-HT<sub>2B</sub> Receptor Antagonists Reduce Nerve Injury-Induced Tactile Allodynia and Expression of 5-HT<sub>2B</sub> Receptors. *Drug Dev. Res.*, *76*, 31–39.
- Pineda-Farias, J. B., Barragán-Iglesias, P., Valdivieso-Sánchez, A., Rodríguez-Silverio, J., Flores-Murrieta, F. J., Granados-Soto, V. and Rocha-González, H. I. (2017) Spinal 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors contribute to the maintenance of neuropathic pain in rats. *Pharmacol. Reports*, *69*, 916–923.
- Pitsikas, N., Zisopoulou, S., Pappas, I. and Sakellaridis, N. (2008) The selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist Ro 04-6790 attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. *Behav. Brain Res.*, *188*, 304–9.
- Plante-Bordeneuve, V. (2014) Update in the diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol*, *261*, 1227–1233.
- Plassat, J. L., Amlaiky, N. and Hen, R. (1993) Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.*, *44*, 229–36.
- Po, K. T., Siu, A. M. H., Lau, B. W. M., Chan, J. N. M., So, K. F. and Chan, C. C. H. (2015) Repeated, high-dose dextromethorphan treatment decreases neurogenesis and results in depression-like behavior in rats. *Exp. Brain Res.*, *233*, 2205–2214.
- Pompeiano, M., Palacios, J. M. and Mengod, G. (1994) Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Mol. Brain Res.*, *23*, 163–178.
- Ponimaskin, E. G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D. W. and Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2002) 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the G $\alpha$  subunit of heterotrimeric G13protein. *J. Biol. Chem.*, *277*, 20812–20819.
- Povedano, M., Gascón, J., Gálvez, R., Ruiz, M. and Rejas, J. (2007) Cognitive Function Impairment in Patients with Neuropathic Pain Under Standard Conditions of Care. *J. Pain Symptom Manage.*, *33*, 78–89.
- Pozzi, L., Invernizzi, R., Garavaglia, C. and Samanin, R. (1999) Fluoxetine increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex by a mechanism not dependent on serotonin: A comparison with citalopram. *J. Neurochem.*, *73*, 1051–1057.
- Prabowo, A. S., Anink, J. J., Lammens, M., Nellist, M., Van Den Ouweland, A. M. W., Adle-Biassette, H., Sarnat, H. B., Flores-Sarnat, L., Crino, P. B. and Aronica, E. (2013) Fetal brain lesions in tuberous sclerosis complex: TORC1 activation and inflammation. *Brain Pathol.*, *23*, 45–59.
- Pranzatelli, M. R., Murthy, J. N. and Pluchino, R. S. (1992) Identification of spinal 5-HT<sub>1C</sub> binding sites in the rat: characterization of [3H]mesulergine binding. *J Pharmacol Exp Ther*, *261*, 161–165.

Pullagurla, M. R., Westkaemper, R. B. and Glennon, R. A. (2004) Possible differences in modes of agonist and antagonist binding at human 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, *14*, 4569–4573.

Purohit, A., Smith, C., Herrick-Davis, K. and Teitler, M. (2005) Stable expression of constitutively activated mutant h5HT<sub>6</sub> and h5HT<sub>7</sub> serotonin receptors: inverse agonist activity of antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl.)*, *179*, 461–469.

Purohit, A., Herrick-Davis, K. and Teitler, M. (2003) Creation, expression, and characterization of a constitutively active mutant of the human serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor. *Synapse*, *47*, 218–224.

Pydi, S. P., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2014) Constitutive activity of bitter taste receptors (T2Rs). *Adv. Pharmacol.*, *70*, 303–326.

## Q

---

Quiedeville, A., Boulouard, M., Hamidouche, K., Da Silva Costa-Aze, V., Nee, G., Rochais, C., Dallemagne, P., Fabis, F., Freret, T. and Bouet, V. (2015) Chronic activation of 5-HT<sub>4</sub> receptors or blockade of 5-HT<sub>6</sub> receptors improve memory performances. *Behav. Brain Res.*, *293*, 10–17.

## R

---

Radat, F., Margot-Duclot, A. and Attal, N. (2013) Psychiatric co-morbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: A multicentre cohort study. *Eur. J. Pain (United Kingdom)*, *17*, 1547–1557.

Radja, F., Laporte, A. M., Daval, G., Vergé, D., Gozlan, H. and Hamon, M. (1991) Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. *Neurochem. Int.*, *18*, 1–15.

Rahim, R. S., Meedeniya, A. C. B. and Crane, D. I. (2014) Central serotonergic neuron deficiency in a mouse model of Zellweger syndrome. *Neuroscience*, *274*, 229–241.

Rahman, W., Suzuki, R., Webber, M., Hunt, S. P. and Dickenson, A. H. (2006) Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain*, *123*, 264–274.

Rahmati, M., Taherabadi, S. J. and Mehrabi, M. (2015) Decreased Activity in Neuropathic Pain Form and Gene Expression of Cyclin-Dependent Kinase5 and Glycogen Synthase Kinase-3 Beta in Soleus Muscle of Wistar Male Rats. *Iran. Red Crescent Med. J.*, *17*, e23324.

Rangaraju, S., Verrier, J. D., Madorsky, I., Nicks, J., Dunn, W. A. and Notterpek, L. (2010) Rapamycin Activates Autophagy and Improves Myelination in Explant Cultures from Neuropathic Mice. *J. Neurosci.*, *30*, 11388–11397.

Rapport, M. M., Green, A. A. and Page, I. H. (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and

characterization. *J Biol Chem*, *176*, 1243–51.

Redondo-Castro, E., García-Alías, G. and Navarro, X. (2013) Plastic changes in lumbar segments after thoracic spinal cord injuries in adult rats: An integrative view of spinal nociceptive dysfunctions. *Restor. Neurol. Neurosci.*, *31*, 411–430.

Rees, S., den Daas, I., Foord, S., Goodson, S., Bull, D., Kilpatrick, G. and Lee, M. (1994) Cloning and characterisation of the human 5-HT<sub>5</sub> serotonin receptor. *FEBS Lett.*, *355*, 242–246.

Reiter, J. F., Blacque, O. E. and Leroux, M. R. (2012) The base of the cilium: Roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.*, 608–618.

Ren, L. Q., Wienecke, J., Chen, M., Møller, M., Hultborn, H. and Zhang, M. (2013) The time course of serotonin 2C receptor expression after spinal transection of rats: An immunohistochemical study. *Neuroscience*, *236*, 31–46.

Resh, M. D. (1998) Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, *30*, 1159–1162.

Reynolds, D. V (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science (80-. )*, *164*, 444–445.

Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, É., Langlois, X., El Mestikawy, S., Hamon, M. and Descarries, L. (2000) Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, *417*, 181–194.

Ribiere, C., Bernardin, M., Sacconi, S., Delmont, E., Fournier-Mehouas, M., Rauscent, H., Benchortane, M., Staccini, P., Lantéri-Minet, M. and Desnuelle, C. (2012) Pain assessment in Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *Ann. Phys. Rehabil. Med.*, *55*, 160–173.

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

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

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

Riccioni, T., Bordi, F., Minetti, P., Spadoni, G., Yun, H. M., Im, B. H., Tarzia, G., Rhim, H. and Borsini, F. (2011) ST1936 stimulates cAMP, Ca<sup>2+</sup>, ERK1/2 and Fyn kinase through a full activation of cloned human 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, *661*, 8–14.

Richardson, D. E. and Akil, H. (1977) Long term results of periventricular gray self-stimulation.

Neurosurgery, *1*, 199–202.

Ridet, J. -L., Tamir, H. and Privat, A. (1994) Direct immunocytochemical localization of 5-hydroxytryptamine receptors in the adult rat spinal cord: A light and electron microscopic study using an anti-idiotypic antiserum. *J. Neurosci. Res.*, *38*, 109–121.

Riemer, C., Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J. R., Poli, S., Porter, R. H. P. and Bös, M. (2003) Influence of the 5-HT<sub>6</sub> 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-HT<sub>6</sub> receptor antagonist. *J. Med. Chem.*, *46*, 1273–1276.

Rivat, C., Sar, C., Mechaly, I., Leyris, J.-P., Diouloufet, L., Sonrier, C., Philipson, Y., Lucas, O., Mallié, S., Jouvenel, A., Tassou, A., Haton, H., Venteo, S., Pin, J.-P., Trinquet, E., Charrier-Savournin, F., Mezghrani, A., Joly, W., Mion, J., Schmitt, M., Pattyn, A., Marmigère, F., Sokoloff, P., Carroll, P., Rognan, D. and Valmier, J. (2018) Inhibition of neuronal FLT3 receptor tyrosine kinase alleviates peripheral neuropathic pain in mice. *Nat. Commun.*, *9*, 1042.

Rivot, J. P., Chiang, C. Y. and Besson, J. M. (1982) Increase of serotonin metabolism within the dorsal horn of the spinal cord during nucleus raphe magnus stimulation, as revealed by in vivo electrochemical detection. *Brain Res.*, *238*, 117–126.

Roberts, J. C., Reavill, C., East, S. Z., Harrison, P. J., Patel, S., Routledge, C. and Leslie, R. A. (2002) The distribution of 5-HT<sub>6</sub> receptors in rat brain: An autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist [125I]SB-258585. *Brain Res.*, *934*, 49–57.

Roeska, K., Ceci, A., Treede, R. D. and Doods, H. (2009) Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. *Neurosci. Lett.*, *464*, 160–164.

Romero, G., Pujol, M., Pérez, P., Buschmann, H. and Pauwels, P. J. (2007) Whole spectrum analysis of ligand efficacy at constitutively active human wild-type and S267K 5-HT<sub>6</sub> receptors in HEK-293F cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, *55*, 144–150.

Roth, B. L., Nakaki, T., Chuang, D. M. and Costa, E. (1984) Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover. *Neuropharmacology*, *23*, 1223–1225.

Roth, B. L., Craigo, S. C., Choudhary, M. S., Uluer, A., Monsma, F. J., Shen, Y., Meltzer, H. Y. and Sibley, D. R. (1994) Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *268*, 1403–1410.

Roth, B. L., Willins, D. L., Kristiansen, K. and Kroeze, W. K. (1998) 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub>-family receptors (5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub>), 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub>): Where structure meets function. *Pharmacol. Ther.*, *231*–257.

Roth, B. L. and Chuang, D. M. (1987) Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sci.*,

---

1051–1064.

Rozas, N. S., Redell, J. B., Hill, J. L., McKenna, J., Moore, A. N., Gambello, M. J. and Dash, P. K. (2015) Genetic Activation of mTORC1 Signaling Worsens Neurocognitive Outcome after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*, *32*, 149–158.

Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J. M., Tardivellacombe, J., Diaz, J., Leurs, R. and Schwartz, J. C. (1993) A Novel Rat Serotonin (5-HT<sub>6</sub>) Receptor: Molecular Cloning, Localization and Stimulation of cAMP Accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *193*, 268–276.

Rudnick, G. (2006) Structure/function relationships in serotonin transporter: new insights from the structure of a bacterial transporter. *Handb Exp Pharmacol*, 59–73.

Russo, A., Pellitteri, R., Monaco, S., Romeo, R. and Stanzani, S. (2005) ‘In vitro’ postnatal expression of 5-HT<sub>7</sub> receptors in the rat hypothalamus: An immunohistochemical analysis. *Dev. Brain Res.*, *154*, 211–216.

Rustøen, T., Wahl, A. K., Hanestad, B. R., Lerdal, A., Paul, S. and Miaskowski, C. (2005) Age and the experience of chronic pain: Differences in health and quality of life among younger, middle-aged, and older adults. *Clin. J. Pain*, *21*, 513–523.

## S

---

Sakurai, E., Kurihara, T., Kouchi, K., Saegusa, H., Zong, S. and Tanabe, T. (2009) Upregulation of casein kinase Iepsilon in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain. *Mol. Pain*, *5*, 74.

Salas, R., Ramirez, K., Vanegas, H. and Vazquez, E. (2016) Activity correlations between on-like and off-like cells of the rostral ventromedial medulla and simultaneously recorded wide-dynamic-range neurons of the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res.*, *1652*, 103–110.

Sałat, K., Kołaczkowski, M., Furgała, A., Rojek, A., Śniecikowska, J., Varney, M. A. and Newman-Tancredi, A. (2017) Antinociceptive, antiallodynic and antihyperalgesic effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor selective agonist, NLX-112 in mouse models of pain. *Neuropharmacology*, *125*, 181–188.

Sánchez-Brualla, I., Boulenguez, P., Brocard, C., Liabeuf, S., Viallat-Lieutaud, A., Navarro, X., Udina, E. and Brocard, F. (2017) Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors restores KCC2 function and reduces neuropathic pain after spinal cord injury. *Neuroscience*.

Sanchez, A., Niedbala, B. and Feria, M. (1995) Modulation of neuropathic pain in rats by intrathecally injected serotonergic agonists. *Neuroreport*, *6*, 2585–2588.

Sare, R. M., Song, A., Loutaev, I., Cook, A., Maita, I., Lemons, A., Sheeler, C. and Smith, C. B. (2017) Negative effects of chronic rapamycin treatment on behavior in a mouse model of fragile X syndrome. *Front. Mol. Neurosci.*, *10*, 452.

- Sargent, B. J. and Henderson, A. J. (2011) Targeting 5-HT receptors for the treatment of obesity. *Curr. Opin. Pharmacol.*, *11*, 52–58.
- Sasaki, M., Obata, H., Saito, S. and Goto, F. (2003) Antinociception with intrathecal alpha-methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine 2A/2C receptor agonist, in two rat models of sustained pain. *Anesth. Analg.*, *96*, 1072–contents.
- Sato, J., Makita, N. and Iiri, T. (2016) Inverse agonism: the classic concept of GPCRs revisited [Review]. *Endocr. J.*, *63*, 507–514.
- Schechter, L. E., Lin, Q., Smith, D. L., Zhang, G., Shan, Q., Platt, B., Brandt, M. R., Dawson, L. A., Cole, D., Bernotas, R., Robichaud, A., Rosenzweig-Lipson, S. and Beyer, C. E. (2008) Neuropharmacological Profile of Novel and Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Agonists: WAY-181187 and WAY-208466. *Neuropsychopharmacology*, *33*, 1323–1335.
- Schiltewolf, M., Akbar, M., Neubauer, E., Gantz, S., Flor, H., Hug, A. and Wang, H. (2017) The cognitive impact of chronic low back pain: Positive effect of multidisciplinary pain therapy. *Scand. J. Pain*, *17*, 273–278.
- Schneider, M., de Vries, P. J., Schönig, K., Rößner, V. and Waltereit, R. (2017) mTOR inhibitor reverses autistic-like social deficit behaviours in adult rats with both Tsc2 haploinsufficiency and developmental status epilepticus. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, *267*, 455–463.
- Schoeffter, P. and Waeber, C. (1994) 5-Hydroxytryptamine receptors with a 5-HT<sub>6</sub> receptor-like profile stimulating adenylyl cyclase activity in pig caudate membranes. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, *350*, 356–360.
- Schreiber, A. K. (2015) Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J. Diabetes*, *6*, 432.
- Schubert-Bast, S., Rosenow, F., Klein, K. M., Reif, P. S., Kieslich, M. and Strzelczyk, A. (2018) The role of mTOR inhibitors in preventing epileptogenesis in patients with TSC: Current evidence and future perspectives. *Epilepsy Behav.*, June.
- Sebben, M., Ansanay, H., Bockaert, J. and Dumuis, A. (1994) 5HT<sub>6</sub> receptors positively coupled to adenylyl cyclase in striatal neurones in culture. *Neuroreport*, *5*, 2553–2557.
- Senderowicz, A. M. (2002) The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *Oncologist*, *7 Suppl 3*, 12–19.
- Seo, J. and Tsai, L.-H. (2014) 5-HT<sub>6</sub>R can do it alone. *Nat. Chem. Biol.*, *10*, 488–489.
- Seybold, V. S., Jia, Y. P. and Abrahams, L. G. (2003) Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain*, *105*, 47–55.
- Shabbir, F., Patel, A., Mattison, C., Bose, S., Krishnamohan, R., Sweeney, E., Sandhu, S., Nel, W., Rais, A.,

- Sandhu, R., Ngu, N. and Sharma, S. (2013) Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression. *Neurochem. Int.*, 324–329.
- Shah, K. and Lahiri, D. K. (2014) Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *J. Cell Sci.*, 127, 2391–2400.
- Shajib, M. S. and Khan, W. I. (2015) The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol.*, 561–574.
- Shanbhogue, R., Hrishikeshavan, H. J., Devi, K. and Munonyedi, S. (1990) Behavioral neurobiology of inverse agonist FG 7142 induced anxiety syndrome in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 14, 249–260.
- Shi, S., Liu, Y., Wu, J., Li, Z., Zhao, Y., Zhong, D. and Zeng, F. (2010) Comparative bioavailability and tolerability of a single 20-mg dose of two fluoxetine hydrochloride dispersible tablet formulations in fasting, healthy Chinese male volunteers: An open-label, randomized-sequence, two-period crossover study. *Clin. Ther.*, 32, 1977–1986.
- Shih, M. H., Kao, S. C., Wang, W., Yaster, M. and Tao, Y. X. (2012) Spinal cord NMDA receptor-mediated activation of mammalian target of rapamycin is required for the development and maintenance of bone cancer-induced pain hypersensitivities in rats. *J. Pain*, 13, 338–349.
- Shin, S. C. and Robinson-Papp, J. (2012) Amyloid neuropathies. *Mt. Sinai J. Med.*, 79, 733–748.
- Shortall, S. E., Negm, O. H., Fowler, M., Fairclough, L. C., Tighe, P. J., Wigmore, P. M. and King, M. V. (2018) Characterization of Behavioral, Signaling and Cytokine Alterations in a Rat Neurodevelopmental Model for Schizophrenia, and Their Reversal by the 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-399885. *Mol. Neurobiol.*, 8 February, 1–18.
- Sigaut, S., Maze, M., Lesimple, B. and Degos, V. (2015) Dysfonctions cognitives postopératoires. *Prat. en Anesth. Reanim.*, 19, 115–119.
- Da Silva Costa-Aze, V., Quiedeville, A., Boulouard, M. and Dauphin, F. (2012) 5-HT<sub>6</sub> receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, 222, 99–115.
- Sirohi, S. and Walker, B. M. (2015) Maturational alterations in constitutive activity of medial prefrontal cortex kappa-opioid receptors in Wistar rats. *J. Neurochem.*, 135, 659–665.
- Sleight, A. J., Boess, F. G., Bös, M., Levet-Trafit, B., Riemer, C. and Bourson, A. (1998) Characterization of Ro 04-6790 and Ro 63-0563: Potent and selective antagonists at human and rat 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 124, 556–562.
- Smith, M. T., Perlis, M. L., Smith, M. S., Giles, D. E. and Carmody, T. P. (2000) Sleep quality and presleep arousal in chronic pain. *J. Behav. Med.*, 23, 1–13.

- Sokolov, A. M., Seluzicki, C. M., Morton, M. C. and Feliciano, D. M. (2018) Dendrite growth and the effect of ectopic Rheb expression on cortical neurons. *Neurosci. Lett.*, *671*, 140–147.
- Solaro, C. and Messmer Uccelli, M. (2011) Management of pain in multiple sclerosis: A pharmacological approach. *Nat. Rev. Neurol.*, 519–527.
- Sommer, C., Geber, C., Young, P., Forst, R., Birklein, F. and Schoser, B. (2018) Polyneuropathies. *Dtsch. Arztebl. Int.*, *115*, 83–90.
- Sommer, C., Leinders, M. and Üçeyler, N. (2018) Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. *Pain*, *159*, 595–602.
- Song, Z., Meyerson, B. A. and Linderoth, B. (2011) Spinal 5-HT receptors that contribute to the pain-relieving effects of spinal cord stimulation in a rat model of neuropathy. *Pain*, *152*, 1666–1673.
- Sorkin, L. S., Hughes, M. G., Liu, D., Willis, W. D. J. and McAdoo, D. J. (1991) Release and metabolism of 5-hydroxytryptamine in the cat spinal cord examined with microdialysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *257*, 192–199.
- Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C. S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D. and Mogil, J. S. (2011) The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol. Pain*, *7*, 55.
- Sounvoravong, S., Nakashima, M. N., Wada, M. and Nakashima, K. (2004) Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, *484*, 217–223.
- Staff, N. P., Grisold, A., Grisold, W. and Windebank, A. J. (2017) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Ann. Neurol.*, *772*–781.
- Staff, N. P. and Windebank, A. J. (2014) Peripheral neuropathy due to vitamin deficiency, toxins, and medications. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.*, 1293–1306.
- Stahl, S. M. (2007) Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *CNS Spectr.*, 265–268.
- Stean, T. O., Hirst, W. D., Thomas, D. R., Price, G. W., Rogers, D., Riley, G., Bromidge, S. M., Serafinowska, H. T., Smith, D. R., Bartlett, S., Deeks, N., Duxon, M. and Upton, N. (2002) Pharmacological profile of SB-357134: A potent, selective, brain penetrant, and orally active 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *71*, 645–654.
- Van Steenwinckel, J., Brisorgueil, M. J., Fischer, J., Vergé, D., Gingrich, J. A., Bourgoin, S., Hamon, M., Bernard, R. and Conrath, M. (2008) Role of spinal serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in 2',3'-dideoxycytidine-induced neuropathic pain in the rat and the mouse. *Pain*, *137*, 66–80.

- Van Steenwinckel, J., Noghero, A., Thibault, K., Brisorgueil, M. J., Fischer, J. and Conrath, M. (2009) The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neuroscience*, *161*, 838–846.
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W. R., Li, X. and Mead, P. S. (2016) Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, *2*, 16090.
- Stornetta, R. L. and Guyenet, P. G. (1999) Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. *J. Comp. Neurol.*, *407*, 367–380.
- Stroth, N., Niso, M., Colabufo, N. A., Perrone, R., Svenningsson, P., Lacivita, E. and Leopoldo, M. (2015) Arylpiperazine agonists of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor preferentially activate cAMP signaling versus recruitment of  $\beta$ -arrestin-2. *Bioorganic Med. Chem.*, *23*, 4824–4830.
- Stuber, G. D., Sparta, D. R., Stamatakis, A. M., Van Leeuwen, W. A., Hardjoprajitno, J. E., Cho, S., Tye, K. M., Kempadoo, K. A., Zhang, F., Deisseroth, K. and Bonci, A. (2011) Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*, *475*, 377–382.
- Suárez-Santiago, J. E., Briones-Aranda, A., Espinosa-Raya, J. and Picazo, O. (2017) Agonist E-6837 and antagonist SB-271046 of 5-HT<sub>6</sub> receptors both reverse the depressive-like effect induced in mice by subchronic ketamine administration. *Behav. Pharmacol.*, *28*, 582–585.
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z. and Shen, W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.*, 228–235.
- Suwa, B., Bock, N., Preusse, S., Rothenberger, A. and Manzke, T. (2014) Distribution of Serotonin 4(a) Receptors in the juvenile Rat Brain and Spinal Cord. *J. Chem. Neuroanat.*, *55*, 67–77.
- Svenningsson, P., Tzavara, E. T., Qi, H., Carruthers, R., Witkin, J. M., Nomikos, G. G. and Greengard, P. (2007) Biochemical and Behavioral Evidence for Antidepressant-Like Effects of 5-HT<sub>6</sub> Receptor Stimulation. *J. Neurosci.*, *27*, 4201–4209.
- Swiech, L., Perycz, M., Malik, A. and Jaworski, J. (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 116–132.

## T

---

- Takei, N. and Nawa, H. (2014) mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front. Mol. Neurosci.*, *7*, 28.
- Tassone, A., Madeo, G., Schirinzi, T., Vita, D., Puglisi, F., Ponterio, G., Borsini, F., Pisani, A. and Bonsi, P. (2011) Activation of 5-HT<sub>6</sub> receptors inhibits corticostriatal glutamatergic transmission. *Neuropharmacology*, *61*, 632–637.

- Terada, M., Yasuda, H., Kogawa, S., Maeda, K., Haneda, M., Hidaka, H., Kashiwagi, A. and Kikkawa, R. (1998) Expression and Activity of Cyclin-Dependent Kinase 5/p35 in Adult Rat Peripheral Nervous System. *J. Neurochem.*, *71*, 2600–2606.
- Tétreault, P., Dansereau, M. A., Doré-Savard, L., Beaudet, N. and Sarret, P. (2011) Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol. Behav.*, *104*, 495–502.
- Thibault, K., Van Steenwinckel, J., Brisorgueil, M. J., Fischer, J., Hamon, M., Calvino, B. and Conrath, M. (2008) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain*, *140*, 305–322.
- Thomanetz, V., Angliker, N., Cloëtta, D., Lustenberger, R. M., Schweighauser, M., Oliveri, F., Suzuki, N. and Rüegg, M. A. (2013) Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J. Cell Biol.*, *201*, 293–308.
- Thomas, D. R. and Hagan, J. J. (2004) 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.*, *3*, 81–90.
- Thome, J., Retz, W., Baader, M., Pesold, B., Hu, M., Cowen, M., Durany, N., Adler, G., Henn, F. A. and Rösler, M. (2001) Association analysis of HTR<sub>6</sub> and HTR<sub>2A</sub> polymorphisms in sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*, *108*, 1175–1180.
- Tian, B., Wang, X. L., Huang, Y., Chen, L. H., Cheng, R. X., Zhou, F. M., Guo, R., Li, J. C. and Liu, T. (2016) Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in cholestatic itch and antinociception induced by bile duct ligation in rats. *Sci. Rep.*, *6*, 36286.
- Torrance, N., Smith, B. H., Bennett, M. I. and Lee, A. J. (2006) The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results From a General Population Survey. *J. Pain*, *7*, 281–289.
- Tracey, I. and Mantyh, P. W. (2007) The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron*, *55*, 377–391.
- Treede, R.-D., Jensen, T. S., Campbell, J. N., Cruccu, G., Dostrovsky, J. O., Griffin, J. W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T. and Serra, J. (2008) Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, 1630–1635.
- Truini, A., Barbanti, P., Pozzilli, C. and Cruccu, G. (2013) A mechanism-based classification of pain in multiple sclerosis. *J. Neurol.*, *260*, 351–67.
- Tsai, L. H., Takahashi, T., Caviness, V. S. and Harlow, E. (1993) Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development*, *119*, 1029–1040.
- Tsai, S.-J., Liu, H.-C., Liu, T.-Y., Wang, Y.-C. and Hong, C.-J. (1999) Association analysis of the 5-HT<sub>6</sub> receptor polymorphism C267T in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, *276*, 138–139.
- Tsai, V., Parker, W. E., Orlova, K. A., Baybis, M., Chi, A. W. S., Berg, B. D., Birnbaum, J. F., Estevez, J., Okochi, K., Sarnat, H. B., Flores-Sarnat, L., Aronica, E. and Crino, P. B. (2014) Fetal Brain mTOR Signaling

---

Activation in Tuberous Sclerosis Complex. *Cereb. Cortex*, *24*, 315–327.

Tsou, K. and Jang, C. S. (1964) Studies on the site of analgesic action of morphine by intracerebral microinjection. *Sci. Sin.*, *13*, 1099–1109.

Tsuchiya, M., Yamazaki, H. and Hori, Y. (1999) Enkephalinergic neurons express 5-HT<sub>3</sub> receptors in the spinal cord dorsal horn: single cell RT-PCR analysis. *Neuroreport*, *10*, 2749–2753.

Tsuda, M., Kohro, Y., Yano, T., Tsujikawa, T., Kitano, J., Tozaki-Saitoh, H., Koyanagi, S., Ohdo, S., Ji, R. R., Salter, M. W. and Inoue, K. (2011) JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain*, *134*, 1127–1139.

## U

---

Ulugol, A., Oltulu, C., Gunduz, O., Citak, C., Carrara, R., Shaqafi, M. R., Sanchez, A. M. and Dogrul, A. (2012) 5-HT<sub>7</sub> receptor activation attenuates thermal hyperalgesia in streptozocin-induced diabetic mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *102*, 344–348.

Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M. and Mailman, R. B. (2006) Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *320*, 1–13.

Urtikova, N., Berson, N., Van Steenwinckel, J., Doly, S., Truchetto, J., Maroteaux, L., Pohl, M. and Conrath, M. (2012) Antinociceptive effect of peripheral serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation on neuropathic pain. *Pain*, *153*, 1320–1331.

Utreras, E., Keller, J., Terse, A., Prochazkova, M., Iadarola, M. J. and Kulkarni, A. B. (2012) Transforming growth factor- $\beta$ 1 regulates Cdk5 activity in primary sensory neurons. *J. Biol. Chem.*, *287*, 16917–16929.

## V

---

Valentini, V., Frau, R., Bordi, F., Borsini, F. and Di Chiara, G. (2011) A microdialysis study of ST1936, a novel 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist. *Neuropharmacology*, *60*, 602–608.

Valentini, V., Piras, G., De Luca, M. A., Perra, V., Bordi, F., Borsini, F., Frau, R. and Di Chiara, G. (2013) Evidence for a role of a dopamine/5-HT<sub>6</sub> receptor interaction in cocaine reinforcement. *Neuropharmacology*, *65*, 58–64.

Valkovic, P., Minar, M., Singliarova, H., Harsany, J., Hanakova, M., Martinkova, J., Benetin, J. and LeDoux, M. S. (2015) Pain in Parkinson's disease: A cross-sectional study of its prevalence, types, and relationship to depression and quality of life. *PLoS One*, *10*, e0136541.

Vanda, D., Soural, M., Canale, V., Chaumont-Dubel, S., Satała, G., Kos, T., Funk, P., Fülöpová, V., Lemrová,

- B., Koczurkiewicz, P., Pękala, E., Bojarski, A. J., Popik, P., Marin, P. and Zajdel, P. (2018) Novel non-sulfonamide 5-HT<sub>6</sub> receptor partial inverse agonist in a group of imidazo[4,5-b]pyridines with cognition enhancing properties. *Eur. J. Med. Chem.*, *144*, 716–729.
- Vanegas, H., Barbaro, N. M. and Fields, H. L. (1984) Tail-flick related activity in medullospinal neurons. *Brain Res.*, *321*, 135–141.
- Vergne-Salle, P., Dufauret-Lombard, C., Bonnet, C., Simon, A., Trèves, R., Bonnabau, H. and Bertin, P. (2011) A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of dolasetron, a 5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonist, in patients with fibromyalgia. *Eur. J. Pain*, *15*, 509–514.
- Verkerk, A. J. M. H., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Eussen, B. E., van Ommen, G. J. B., Blonden, L. A. J., Riggins, G. J., Chastain, J. L., Kunst, C. B., Galjaard, H., Thomas Caskey, C., Nelson, D. L., Oostra, B. A. and Warran, S. T. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, *65*, 905–914.
- Vezina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S. N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)*, *28*, 721–726.
- Viguiet, F., Michot, B., Kayser, V., Bernard, J. F., Vela, J. M., Hamon, M. and Bourgoin, S. (2012) GABA, but not opioids, mediates the anti-hyperalgesic effects of 5-HT<sub>7</sub>receptor activation in rats suffering from neuropathic pain. *Neuropharmacology*, *63*, 1093–1106.
- Viguiet, F., Michot, B., Hamon, M. and Bourgoin, S. (2013) Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms -Implications of 5-HT<sub>7</sub>and other 5-HT receptor types. *Eur. J. Pharmacol.*, 8–16.
- Vilaró, M. T., Cortés, R., Gerald, C., Branchek, T. A., Palacios, J. M. and Mengod, G. (1996) Localization of 5-HT<sub>4</sub> receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, *43*, 356–60.
- Villarinho, J. G., Pinheiro, K. de V., Pinheiro, F. de V., Oliveira, S. M., Machado, P., Martins, M. A. P., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Fachineto, R. and Ferreira, J. (2013) The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, *44*, 136–142.
- Violin, J. D., Crombie, A. L., Soergel, D. G. and Lark, M. W. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: Promise and progress. *Trends Pharmacol. Sci.*, 308–316.
- Vitalis, T., Ansorge, M. S. and Dayer, A. G. (2013) Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptor subtypes. *Front. Cell. Neurosci.*, *7*, 93.

## W

- 
- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Vardy, E., McCorvy, J. D., Jiang, Y., Chu, M., Siu, F. Y., Liu, W., Xu, H. E., Cherezov, V., Roth, B. L. and Stevens, R. C. (2013) Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* (80-. ), *340*, 615–619.
- Wallace, V. C. J., Blackbeard, J., Segerdahl, A. R., Hasnie, F., Pheby, T., McMahon, S. B. and Rice, A. S. C. (2007) Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral- associated neuropathic pain. *Brain*, *130*, 2688–2702.
- Walstab, J., Rappold, G. and Niesler, B. (2010) 5-HT<sub>3</sub>receptors: Role in disease and target of drugs. *Pharmacol. Ther.*, 146–169.
- Walther, D. J. and Bader, M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.*, *66*, 1673–1680.
- Wang, C. C., Man, G. C. W., Chu, C. Y., Borchert, A., Ugun-Klusek, A., Billett, E. E., Kühn, H. and Ufer, C. (2014) Serotonin receptor 6 mediates defective brain development in monoamine oxidase A-deficient mouse embryos. *J. Biol. Chem.*, *289*, 8252–8263.
- Wang, C. T., Mao, C. J., Zhang, X. Q., Zhang, C. Y., Lv, D. J., Yang, Y. P., Xia, K. L., Liu, J. Y., Wang, F., Hu, L. F., Xu, G. Y. and Liu, C. F. (2017) Attenuation of hyperalgesia responses via the modulation of 5-hydroxytryptamine signalings in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Mol. Pain*, *13*, 1744806917691525.
- Wang, H. Y., Lu, C. W., Lin, T. Y., Kuo, J. R. and Wang, S. J. (2016) WAY208466 inhibits glutamate release at hippocampal nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.*, *781*, 117–127.
- Wang, J., Feng, D. Y., Li, Z. H., Feng, B., Zhang, H., Zhang, T., Chen, T. and Li, Y. Q. (2015) Activation of the mammalian target of rapamycin in the rostral ventromedial medulla contributes to the maintenance of nerve injury-induced neuropathic pain in rat. *Neural Plast.*, *2015*, 394820.
- Wang, Q. S., Tian, J. S., Cui, Y. L. and Gao, S. (2014) Genipin is active via modulating monoaminergic transmission and levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat model of depression. *Neuroscience*, *275*, 365–373.
- Wang, R., King, T., De Felice, M., Guo, W., Ossipov, M. H. and Porreca, F. (2013) Descending facilitation maintains long-term spontaneous neuropathic pain. *J. Pain*, *14*, 845–853.
- Wang, X., Li, X., Huang, B. and Ma, S. (2016) Blocking mammalian target of rapamycin (mTOR) improves neuropathic pain evoked by spinal cord injury. *Transl. Neurosci.*, *7*, 50–55.
- Wang, X. and Proud, C. G. (2011) MTORC1 signaling: What we still dont know. *J. Mol. Cell Biol.*, 206–220.
- Ward, R. P., Hamblin, M. W., Lachowicz, J. E., Hoffman, B. J., Sibley, D. R. and Dorsa, D. M. (1995)

- Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, *64*, 1105–1111.
- Watson, J. C. and Sandroni, P. (2016) Central Neuropathic Pain Syndromes. in *Mayo Clin. Proc.*, 372–385.
- Way, S. W., Rozas, N. S., Wu, H. C., Mckenna, J., Reith, R. M., Hashmi, S. S., Dash, P. K. and Gambello, M. J. (2012) The differential effects of prenatal and/or postnatal rapamycin on neurodevelopmental defects and cognition in a neuroglial mouse model of tuberous sclerosis complex. *Hum. Mol. Genet.*, *21*, 3226–3236.
- Wei, F., Dubner, R., Zou, S., Ren, K., Bai, G., Wei, D. and Guo, W. (2010) Molecular Depletion of Descending Serotonin Unmasks Its Novel Facilitatory Role in the Development of Persistent Pain. *J. Neurosci.*, *30*, 8624–8636.
- Wei, F., Dubner, R. and Ren, K. (1999) Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation. *Pain*, 127–141.
- Wei, H. and Pertovaara, A. (2006) 5-HT<sub>1A</sub> receptors in endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, *535*, 157–165.
- Weng, H. R., Gao, M. and Maixner, D. W. (2014) Glycogen synthase kinase 3 beta regulates glial glutamate transporter protein expression in the spinal dorsal horn in rats with neuropathic pain. *Exp. Neurol.*, *252*, 18–27.
- Weng, R., Shen, S., Tian, Y., Burton, C., Xu, X., Liu, Y., Chang, C., Bai, Y. and Liu, H. (2015) Metabolomics Approach Reveals Integrated Metabolic Network Associated with Serotonin Deficiency. *Sci. Rep.*, *5*, 11864.
- Wesołowska, A. (2008) The anxiolytic-like effect of the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-399885: The impact of benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, *580*, 355–360.
- Wesołowska, A. (2010) Potential role of the 5-HT<sub>6</sub> receptor in depression and anxiety: An overview of preclinical data. *Pharmacol. Reports*, 564–577.
- Wesołowska, A. and Nikiforuk, A. (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*, 1274–1283.
- Wesołowska, A., Nikiforuk, A. and Stachowicz, K. (2007) Anxiolytic-like and antidepressant-like effects produced by the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-258585 after intrahippocampal administration to rats. *Behav. Pharmacol.*, *18*, 439–446.
- West, P. J., Marcy, V. R., Marino, M. J. and Schaffhauser, H. (2009) Activation of the 5-HT<sub>6</sub> receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *Neuroscience*, *164*, 692–701.
- Willins, D. L., Deutch, A. Y. and Roth, B. L. (1997) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse*, *27*, 79–82.

- Wodarski, R., Delaney, A., Ultenius, C., Morland, R., Andrews, N., Baastrup, C., Bryden, L. A., Caspani, O., Christoph, T., Gardiner, N. J., Huang, W., Kennedy, J. D., Koyama, S., Li, D., Ligocki, M., Lindsten, A., Machin, I., Pekcec, A., Robens, A., Rotariu, S. M., Voß, S., Segerdahl, M., Stenfors, C., Svensson, C. I., Treede, R. D., Uto, K., Yamamoto, K., Rutten, K. and Rice, A. S. C. (2016) Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: A prospective multicentre study. *Pain*, *157*, 2350–2365.
- Woods, S., Clarke, N. N., Layfield, R. and Fone, K. C. F. (2012) 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms. *Br. J. Pharmacol.*, *167*, 436–449.
- Woolley, M. ., Bentley, J. ., Sleight, A. ., Marsden, C. . and Fone, K. C. . (2001) A role for 5-HT<sub>6</sub> receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology*, *41*, 210–219.
- Woolley, M. L., Marsden, C. A., Sleight, A. J. and Fone, K. C. F. (2003) Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl.)*, *170*, 358–367.
- Woolley, M., Marsden, C. and Fone, K. (2004) 5-HT<sub>6</sub> Receptors. *Curr. Drug Target -CNS Neurol. Disord.*, *3*, 59–79.
- Wu, J., Raver, C., Piao, C., Keller, A. and Faden, A. I. (2013) Cell Cycle Activation Contributes to Increased Neuronal Activity in the Posterior Thalamic Nucleus and Associated Chronic Hyperesthesia after Rat Spinal Cord Contusion. *Neurotherapeutics*, *10*, 520–538.
- Wu, J., Renn, C. L., Faden, A. I. and Dorsey, S. G. (2013) TrkB.T1 contributes to neuropathic pain after spinal cord injury through regulation of cell cycle pathways. *J. Neurosci.*, *33*, 12447–63.
- Wu, J., Zhao, Z., Zhu, X., Renn, C. L., Dorsey, S. G. and Faden, A. I. (2016) Cell cycle inhibition limits development and maintenance of neuropathic pain following spinal cord injury. *Pain*, *157*, 488–503.
- Wu, S. X., Zhu, M., Wang, W., Wang, Y. Y., Li, Y. Q. and Yew, D. T. (2001) Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci. Lett.*, *307*, 183–186.
- Wu, W.-P., Hao, J.-X., Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Koek, W. and Colpaert, F. C. (2003) The very-high-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, F 13640, preempts the development of allodynia-like behaviors in rats with spinal cord injury. *Eur. J. Pharmacol.*, *478*, 131–7.
- Wu, Y., Yao, X., Jiang, Y., He, X., Shao, X., Du, J., Shen, Z., He, Q. and Fang, J. (2017) Pain aversion and anxiety-like behavior occur at different times during the course of chronic inflammatory pain in rats. *J. Pain Res.*, *10*, 2585–2593.

## X

---

Xu, W. J., Zhao, Y., Huo, F. Q., Du, J. Q. and Tang, J. S. (2013) Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT 1-7 receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia. *Neuroscience*, 238, 252–257.

## Y

---

Yang, L., Gu, X., Zhang, W., Zhang, J. and Ma, Z. (2014) Cdk5 inhibitor roscovitine alleviates neuropathic pain in the dorsal root ganglia by downregulating N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A. *Neurol. Sci.*, 35, 1365–1371.

Yang, L., Xin, X., Zhang, J., Zhang, L., Dong, Y., Zhang, Y., Mao, J. and Xie, Z. (2014) Inflammatory pain may induce cognitive impairment through an Interlukin-6-dependent and postsynaptic density-95-associated mechanism. *Anesth. Analg.*, 119, 471–480.

Yang, Y. R., He, Y., Zhang, Y., Li, Y., Li, Y., Han, Y., Zhu, H. and Wang, Y. (2007) Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain*, 127, 109–120.

Yohn, C. N., Gergues, M. M. and Samuels, B. A. (2017) The role of 5-HT receptors in depression. *Mol. Brain*, 28.

Yoshimura, M., Hagimoto, M., Matsuura, T., Ohkubo, J., Ohno, M., Maruyama, T., Ishikura, T., Hashimoto, H., Kakuma, T., Yoshimatsu, H., Terawaki, K., Uezono, Y., Toyohira, Y., Yanagihara, N. and Ueta, Y. (2014) Effects of food deprivation on the hypothalamic feeding-regulating peptides gene expressions in serotonin depleted rats. *J. Physiol. Sci.*, 64, 97–104.

Yun, H.-M., Kim, S., Kim, H.-J., Kostenis, E., Il Kim, J., Young Seong, J., Baik, J.-H. and Rhim, H. (2007) The novel cellular mechanism of human 5-HT<sub>6</sub> receptor through an interaction with fyn. *J. Biol. Chem.*, 282, 5496–5505.

Yun, H.-M., Baik, J.-H., Kang, I., Jin, C. and Rhim, H. (2010) Physical Interaction of Jab1 with Human Serotonin 6 G-protein-coupled Receptor and Their Possible Roles in Cell Survival. *J. Biol. Chem.*, 285, 10016–10029.

Yun, H.-M., Park, K.-R., Kim, E.-C., Kim, S. and Hong, J. T. (2015) Serotonin 6 receptor controls alzheimer's disease and depression. *Oncotarget*, 6, 26716–26728.

Yun, H.-M. and Rhim, H. (2011) The Serotonin-6 Receptor as a Novel Therapeutic Target. *Exp. Neurobiol.*, 20, 159.

Yutsudo, N., Kamada, T., Kajitani, K., Nomaru, H., Katogi, A., Ohnishi, Y. H., Ohnishi, Y. N., Takase, K.

---

I., Sakumi, K., Shigeto, H. and Nakabeppu, Y. (2013) FosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology*, *38*, 895–906.

## Z

---

Zajdel, P., Marciniak, K., Satała, G., Canale, V., Kos, T., Partyka, A., Jastrzębska-Więsek, M., Wesołowska, A., Basińska-Ziobroń, A., Wójcikowski, J., Daniel, W. A., Bojarski, A. J. and Popik, P. (2016) N1-Azinylsulfonyl-1H-indoles: 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonists with Procognitive and Antidepressant-Like Properties. *ACS Med. Chem. Lett.*, *7*, 618–622.

Zeinyeh, W., Esvan, Y. J., Nauton, L., Loaëc, N., Meijer, L., Théry, V., Anizon, F., Giraud, F. and Moreau, P. (2016) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and preliminary in vitro kinase inhibition evaluation of new diversely substituted pyrido [ 3 , 4- g ] quinazoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *26*, 4327–4329.

Zhang, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C. and Tiberi, M. (2014) Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. *Adv. Pharmacol.*, *70*, 175–214.

Zhang, G. F., Wang, J., Han, J. F., Guo, J., Xie, Z. M., Pan, W., Yang, J. J. and Sun, K. J. (2016) Acute single dose of ketamine relieves mechanical allodynia and consequent depression-like behaviors in a rat model. *Neurosci. Lett.*, *631*, 7–12.

Zhang, H. H., Zhang, X. Q., Wang, W. Y., Xue, Q. S., Lu, H., Huang, J. L., Gui, T. and Yu, B. W. (2012) Increased Synaptophysin Is Involved in Inflammation-Induced Heat Hyperalgesia Mediated by Cyclin-Dependent Kinase 5 in Rats. *PLoS One*, *7*, e46666.

Zhang, J., Shen, C. P., Xiao, J. C., Lanza, T. J., Lin, L. S., Francis, B. E., Fong, T. M. and Chen, R. Z. (2006) Effects of mutations at conserved TM II residues on ligand binding and activation of mouse 5-HT<sub>6</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, *534*, 77–82.

Zhang, K., Pan, X., Wang, F., Ma, J., Su, G., Dong, Y., Yang, J. and Wu, C. (2016) Baicalin promotes hippocampal neurogenesis via SGK1- and FKBP5-mediated glucocorticoid receptor phosphorylation in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Sci. Rep.*, *6*, 30951.

Zhang, M.-Y., Hughes, Z. A., Kerns, E. H., Lin, Q. and Beyer, C. E. (2007) Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitation of acetylcholine and related neurotransmitters in brain microdialysis samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *44*, 586–93.

Zhang, R., Liu, Y., Zhang, J., Zheng, Y., Gu, X. and Ma, Z. (2012) Intrathecal administration of roscovitine attenuates cancer pain and inhibits the expression of NMDA receptor 2B subunit mRNA. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *102*, 139–145.

Zhang, W., Gardell, S., Zhang, D., Xie, J. Y., Agnes, R. S., Badghisi, H., Hrubby, V. J., Rance, N., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Porreca, F. and Lai, J. (2009) Neuropathic pain is maintained by brainstem neurons

co-expressing opioid and cholecystokinin receptors. *Brain*, *132*, 778–787.

Zhang, W., Sun, X.-F., Bo, J.-H., Zhang, J., Liu, X.-J., Wu, L.-P., Ma, Z.-L. and Gu, X.-P. (2013) Activation of mTOR in the spinal cord is required for pain hypersensitivity induced by chronic constriction injury in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *111*, 64–70.

Zhang, Y. M., Zhang, L., Wang, Y., Sun, Y. N., Guo, Y., Du, C. X., Zhang, J., Yao, L., Yu, S. Q. and Liu, J. (2016) Activation and blockade of prelimbic 5-HT<sub>6</sub> receptors produce different effects on depressive-like behaviors in unilateral 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. *Neuropharmacology*, *110*, 25–36.

Zhao, Z.-Q., Chiechio, S., Sun, Y.-G., Zhang, K.-H., Zhao, C.-S., Scott, M., Johnson, R. L., Deneris, E. S., Renner, K. J., Gereau, R. W. and Chen, Z.-F. (2007) Mice Lacking Central Serotonergic Neurons Show Enhanced Inflammatory Pain and an Impaired Analgesic Response to Antidepressant Drugs. *J. Neurosci.*, *27*, 6045–6053.

Zhou, H. and Huang, S. (2010) The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr. Protein Pept. Sci.*, *11*, 409–24.

Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H. J., Ackenheil, M. and Bondy, B. (2007) Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: A post-mortem study. *J. Psychiatr. Res.*, *41*, 168–173.

Zimering, J. H., Williams, M. R., Eiras, M. E., Fallon, B. A., Logigian, E. L. and Dworkin, R. H. (2014) Acute and chronic pain associated with Lyme borreliosis: Clinical characteristics and pathophysiologic mechanisms. *Pain*, 1435–1438.

Zychowska, M., Rojewska, E., Makuch, W., Przewlocka, B. and Mika, J. (2015) The influence of microglia activation on the efficacy of amitriptyline, doxepin, milnacipran, venlafaxine and fluoxetine in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, *749*, 115–123.

