



Le récepteur 5-ht6 de la sérotonine : caractérisation de son expression et de ses rôles neurodéveloppementaux

Vincent Dupuy

► To cite this version:

Vincent Dupuy. Le récepteur 5-ht6 de la sérotonine : caractérisation de son expression et de ses rôles neurodéveloppementaux. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. ⟨NNT : 2021MONTT026⟩. ⟨tel-03364108⟩

HAL Id: tel-03364108

<https://theses.hal.science/tel-03364108v1>

Submitted on 4 Oct 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.



HAL Authorization

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

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2

Unité de recherche Institut de Génomique Fonctionnelle

LE RECEPTEUR 5-HT₆ DE LA SEROTONINE : CARACTERISATION DE SON EXPRESSION ET DE SES ROLES NEURO-DEVELOPPEMENTAUX

Présentée par Vincent DUPUY

Le 02 Juillet 2021

Sous la direction de Séverine CHAUMONT-DUBEL

Devant le jury composé de

Christine METIN, Directrice de recherche, Institut du Fer à Moulin, Paris

Justine MASSON, Chargée de recherche, Institut du Fer à Moulin, Paris

Philippe DE DEURWAERDERE, Professeur des Universités, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Bordeaux

Susanne SCHMIDT, Chargée de Recherche, Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier, Montpellier

Philippe MARIN, Directeur de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Séverine CHAUMONT-DUBEL, Maître de Conférences, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Présidente

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

RESUME

La mise en place des circuits neuronaux est un processus complexe et finement régulé. Lorsque ce processus est altéré, des pathologies neuro-développementales telles que la schizophrénie ou les troubles du spectre de l'autisme apparaissent, dont la prise en charge thérapeutique est à ce jour insuffisante. Le récepteur 5-HT₆ de la sérotonine est une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des déficits cognitifs associés à ces pathologies. Cependant les mécanismes qui sous-tendent son rôle dans le neuro-développement ne sont pas complètement élucidés. En effet, l'étude des fonctions du récepteur 5-HT₆ *in vivo* est à ce jour compliquée, car sa localisation exacte dans le système nerveux central est encore mal connue. Cette méconnaissance résulte de l'absence d'anticorps spécifiques permettant de réaliser des études d'immunomarquage *in vivo*. Mon travail de thèse a permis de contourner ce problème et de réaliser une cartographie complète de l'expression du récepteur 5-HT₆ au cours du développement, grâce à l'utilisation d'un modèle murin de souris knock-in exprimant le récepteur 5-HT₆ portant une étiquette fluorescente (GFP). Cette étude a permis de mettre en évidence non seulement les structures mais également les types cellulaires qui expriment le récepteur. J'ai ainsi pu déterminer que le récepteur est exprimé très tôt dans le développement, et que son expression persiste à l'âge adulte. On le retrouve aussi bien dans les neurones de projection que dans les astrocytes, où il est localisé de façon prépondérante à la membrane du cil primaire, un organite impliqué dans divers phénomènes développementaux incluant la migration neuronale. Des animaux knock-out qui n'expriment plus le récepteur 5-HT₆ présentent des cils raccourcis, indiquant un rôle du récepteur dans les fonctions ciliaires. J'ai pu montrer que cette localisation subcellulaire, conforme à ce qui a été décrit dans la littérature, est étonnement modifiée pendant les 10 premiers jours post-nataux, où le récepteur se trouve majoritairement relocalisé dans le compartiment somato-dendritique. Cette relocalisation du récepteur au niveau du soma semble essentielle à son interaction avec certains de ses partenaires, comme GPRIN1. *In vitro*, le complexe formé par GPRIN1 et le récepteur promeut la complexification de l'arborisation dendritique. Mon travail a permis de mettre en évidence *in vivo* l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT₆ au niveau de la membrane du soma des neurones, dans des tranches de cerveau de souris au stade post-natal. Enfin, j'ai démontré que l'inhibition pharmacologique de l'activité constitutive du récepteur par des composés agonistes inverses durant la période post-natale induit des déficits comportementaux de sociabilité mesurés à l'adolescence. Cela suggère un rôle critique de l'activité constitutive du récepteur spécifiquement pendant les premiers jours du neuro-développement postnatal, lorsqu'il est localisé dans le compartiment somato-dendritique. Ainsi, mon travail de thèse a permis de caractériser précisément la localisation du récepteur au cours du développement, du stade embryonnaire à l'adulte. Une découverte majeure de mon travail est la relocalisation dynamique du récepteur du cil vers le compartiment somato-dendritique au cours de la période post-natale et le fait que l'inhibition de l'activité constitutive du récepteur durant cette période induit une altération du comportement social. Cette observation originale pourrait expliquer le rôle clé joué par le récepteur à cette période critique du développement neuronal. Cette étude forme une base solide pour de futures recherches sur les fonctions du récepteur 5-HT₆ au cours du développement et chez l'adulte et confirme son intérêt comme cible thérapeutique dans le cadre des pathologies neuro-développementales.

ABSTRACT

The establishment of neural circuits is a complex and finely regulated process. When this process is altered, neurodevelopmental pathologies such as schizophrenia or autism spectrum disorders can appear, for which efficient treatment is lacking. The serotonin 5-HT₆ receptor is an interesting therapeutic target for the treatment of cognitive deficits associated with these pathologies. However, the mechanisms underlying its role in neurodevelopment are not fully understood. Indeed, the study of the functions of the 5-HT₆ receptor *in vivo* is complicated because its exact location in the central nervous system is still poorly known. This lack of knowledge results from the absence of specific antibodies allowing to perform immunostaining studies *in vivo*. My work allowed to overcome this problem and to carry out a complete mapping of the expression of the 5-HT₆ receptor during development, thanks to the use of a knock-in mouse model expressing the 5-HT₆ receptor bearing a fluorescent tag (GFP). This study made it possible to identify not only the structures but also the cell types which express the receptor. I was able to determine that the receptor is expressed very early in development, and that its expression persists into adulthood. It is found in projection neurons as well as in astrocytes, where it is predominantly located in the primary cilium, an organelle involved in various developmental phenomena including neuronal migration. Knock-out animals that no longer express the 5-HT₆ receptor exhibit shortened cilia, suggesting a role of the receptor in ciliary functions. Interestingly, I was able to show that this subcellular localization is strongly modified during the first 10 postnatal days, where the receptor is mainly relocated in the somatodendritic compartment. This relocation of the receptor to the soma seems essential for its interaction with some of its partners, such as GPRIN1. *In vitro*, the complex formed by GPRIN1 and the receptor promotes the complexification of dendritic arborization. My work demonstrated *in vivo* the interaction between GPRIN1 and the 5-HT₆ receptor at the level of the somatic membrane of neurons, in postnatal mice brain slices. Eventually, I demonstrated that the pharmacological inhibition of the constitutive activity of the receptor by inverse agonist compounds during the postnatal period induces behavioral sociability deficits measured in adolescence. This suggests a critical role of the constitutive activity of the receptor specifically during the first days of postnatal neurodevelopment, when it is localized in the somatodendritic compartment. Thus, my thesis work made it possible to precisely characterize the location of the receptor during development, from the embryonic stage to adulthood. A major discovery of my work is the dynamic relocation of the receptor from the cilium to the somatodendritic compartment during the postnatal period and the fact that the inhibition of the constitutive activity of the receptor during this period induces an alteration in social behaviour. This original observation could explain the key role played by the receptor at this critical period of neuronal development. This study forms a solid basis for future research on the functions of the 5-HT₆ receptor during development and in adults and confirms its interest as a therapeutic target in the context of neurodevelopmental pathologies.

REMERCIEMENTS

C'est une sensation étrange que d'écrire ces lignes après 4 années remplies de profondes expériences professionnelles et humaines. Il y a énormément de personnes que j'aimerais remercier, pour leur aide, pour leur soutien, pour leur confiance, pour leur intelligence, leur gentillesse, leur humour et bien sûr leur temps.

J'aimerais particulièrement remercier les différents membres de mon jury : merci au Dr Justine Masson et au Pr Philippe De Deurwaerdere pour leur lecture approfondie de ce travail de thèse ainsi que leurs rapports détaillés. Merci au Dr Christine Métin pour avoir accepté de présider ce jury, et d'avoir participé en compagnie du Dr Susanne Schmidt à mes différents comités de suivi de thèse.

Un merci tout particulier revient bien sûr au Dr Séverine Chaumont-Dubel. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail. Merci de m'avoir accordé ta confiance, de m'avoir laissé la liberté de suivre mes propres pistes et d'explorer de nombreuses questions. Même si on a un peu dévié du projet initial, ce travail a permis d'ouvrir de nombreuses pistes vraiment intéressantes et je t'en remercie !

Merci également au Dr Philippe Marin. Merci de ton implication dans ce projet bien que tu doives gérer cette grande équipe, et même tout l'institut à présent. Plus important encore, merci pour ta bienveillance et ta volonté de faire ressortir le meilleur de nous-même.

Je remercie particulièrement le Dr Claire Meissirel, avec qui j'ai terminé mon master quand j'étais à Lyon, qui m'a accordé une grande confiance à l'époque où je ne savais pas quelle voie prendre, et qui m'a permis de confirmer mon goût pour la recherche.

Je tiens à remercier les nombreuses personnes à l'IGF qui permettent de nous faciliter grandement la vie par leurs différents rôles : le service administratif, le service informatique, le service technique et la laverie.

Un énorme merci aux ingénieurs de la plateforme d'imagerie MRI à l'IGH, notamment à Marie-Pierre et Julio. Merci pour votre profonde gentillesse et votre disponibilité incroyable.

Merci beaucoup à Quentin et à Elodie de la plateforme IExplore pour leur gestion des souris, et surtout pour leur sympathie quotidienne.

J'aimerais remercier 2 personnes qui m'ont particulièrement aidé pour la réalisation de ce travail : Camille Pujol, qui a soutenu sa thèse il y a 3 ans, et qui m'a grandement aidé à mettre le pied à l'étrier. Tu es d'une bienveillance sans faille et j'ai de la chance de t'avoir eue à mes côtés au début de ma thèse ! Un autre énorme merci pour Clara Margarido avec qui j'ai pu réaliser une grande partie de ce travail presque en binôme. Merci pour ta rigueur et ta sympathie (et ton écoute lorsque je me posais trop de questions !).

Pour finir, je ne vais pas les énumérer (principalement car je ne souhaite pas en oublier...) mais je souhaite remercier toutes ces personnes, de l'IGF ou d'ailleurs, qui ont été à mes côtés pendant tous ces moments parfois bouleversants pour moi. Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir fait rire, de m'avoir fait grandir, de m'avoir fait me remettre en question. En bref merci d'être des humains extraordinaires, j'espère pouvoir vous rendre la pareille.

« La clarté ne naît pas de ce qu'on imagine le clair, mais de ce qu'on prend conscience de l'obscur » Carl Gustav Jung

Table des matières

Résumé	2
Abstract	3
Introduction.....	10
Chapitre I : Neuro-développement.....	11
A) Etapes du neuro-développement.....	11
1) Formation du tube neural (neurulation)	11
2) Neurogénèse.....	13
3) Migration	14
4) Pousse axonale et dendritique	17
B) Le cil primaire, organite clé du neuro-développement.....	20
1) Découverte et caractéristiques générales	20
2) Identification de son rôle fonctionnel comme « antenne cellulaire »	22
3) Rôles développementaux du cil primaire.....	24
4) Rôles dans la signalisation du neurone adulte mature	27
5) Les ciliopathies.....	28
Chapitre 2 : Les récepteurs couplés aux protéines G	30
A) Généralités	30
B) Signalisation canonique (protéines G).....	31
C) Signalisation alternative ou non-canonique	33
Chapitre 3 : La sérotonine et ses récepteurs	36
A) La sérotonine.....	36
1) Découverte.....	36
2) Métabolisme de la sérotonine	36
3) La sérotonine dans le système nerveux central : zones de production et d'action	38
4) La sérotonine dans le système nerveux central : principales fonctions	39
B) Les récepteurs de la sérotonine	41
1) Découverte.....	41
2) Couplages aux protéines G et autre voies de signalisation.....	42
C) Le récepteur 5-HT ₆	46
1) Découverte.....	46
2) Localisation	46
3) Signalisation (protéine G et interactome)	51

4) Rôles du récepteur 5-HT ₆ dans la cognition	62
5) Cible thérapeutique	65
Objectifs.....	68
Matériel et méthodes	69
Résultats.....	77
I) Caractérisation de l'expression du récepteur 5-HT ₆ dans le système nerveux central de la souris adulte	77
A) Cartographie générale de l'expression du récepteur 5-HT ₆ dans le système nerveux central de la souris adulte	77
B) Etude de la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT ₆ dans différents types cellulaires.....	80
C) Rôle du récepteur 5-HT ₆ dans la morphologie du cil primaire.	88
II) Caractérisation de l'expression du récepteur 5-HT ₆ dans le système nerveux central embryonnaire et post-natal	91
A) Description spatiotemporelle de l'expression du récepteur 5-HT ₆ dans le cerveau de la souris pendant la période embryonnaire.....	91
B) Caractérisation spatiotemporelle de l'expression du récepteur 5-HT ₆ dans le cerveau de la souris pendant la période postnatale	93
III) Etude du rôle du récepteur 5-HT ₆ dans le développement lors de la période post-natale.....	98
A) Impact de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ pendant la période postnatale sur le comportement à l'adolescence	98
1) Impact de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ pendant la période post-natale sur le comportement général des souris à l'adolescence.	99
2) Impact de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ pendant la période post-natale sur l'anxiété des souris à l'adolescence.	101
3) Impact de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ pendant la période post-natale sur les capacités mnésiques des souris.	102
4) Impact de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ pendant la période post-natale sur le comportement social des souris à l'adolescence.....	103
B) Impact des traitements avec le SB271046 et le CPPQ sur la morphologie des neurones <i>in vivo</i>	108
Discussion & Perspectives	109
A) Le récepteur 5-HT ₆ à l'âge adulte.....	109
B) Rôle du récepteur 5-HT ₆ pendant le développement embryonnaire.....	112
C) Rôle du récepteur dans le développement postnatal.....	113
Bibliographie.....	116

Table des figures

Figure 1 : Formation du tube neural et des vésicules cérébrales	12
Figure 2 : Division et différenciation des cellules de la lignée neurale	13
Figure 3 : Migration radiale et tangentielle des progéniteurs neuronaux pour former le cortex.....	15
Figure 4 : Formation de la polarité des neurones corticaux <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	18
Figure 5 : Anatomie du cil primaire	21
Figure 6 : Schéma récapitulatif de l'activation de la voie de signalisation Hedgehog	23
Figure 7 : Classification des RCPG	30
Figure 8 : Voies de signalisation canoniques associées aux RCPG.....	31
Figure 9 : Métabolisme de la sérotonine, libération et recaptage	37
Figure 10 : Innervation du système nerveux central par les noyaux du raphé.....	38
Figure 11 : Evolution de la classification des récepteurs de la sérotonine.....	42
Figure 12 : Méthodes permettant l'identification des interactions entre les RCPG et les GIP.....	44
Figure 13 : Tableau récapitulatif des études de caractérisation de l'expression du récepteur 5-HT ₆	48
Figure 14 : Couplage du récepteur 5-HT ₆ à des voies de signalisation non-canoniques	53
Figure 15 : Modulation de l'activité de mTOR par le récepteur 5-HT ₆ , impact sur la cognition	55
Figure 16 : Le récepteur 5-HT ₆ interagit avec un réseau de protéines impliquées dans la fonction du cytosquelette d'actine	57
Figure 17 : Implication de la voie 5-HT ₆ - Cdk5 dans la migration radiale des neurones corticaux	58
Figure 18 : Contrôle de mécanismes neuro-développementaux par l'interaction successive entre le récepteur 5-HT ₆ , Cdk5 et GPRIN1	60
Figure 19 : Modèle expliquant les effets des ligands du récepteur 5-HT ₆ sur la transmission GABAergique et glutamatergique	65
Figure 20 : Test de l'arène surélevée en croix.....	73
Figure 21 : Test de reconnaissance d'un nouvel objet.....	74
Figure 22 : Test de préférence sociale	76
Figure 23 : Visualisation de l'expression du récepteur 5-HT ₆ par immunofluorescence dans le cerveau de souris adulte.	80
Figure 24 : Co-expression du récepteur 5-HT ₆ avec différents marqueurs du cil primaire dans différentes structures.	81
Figure 25 : Expression différentielle des marqueurs ciliaires AC3 et Arl13b par les neurones et les astrocytes.....	83
Figure 26 : Expression du récepteur 5-HT ₆ par différents types neuronaux	87
Figure 27 : Impact de l'inhibition ou l'activation pharmacologique du récepteur 5-HT ₆ sur la longueur des cils primaires dans des cultures primaires de neurones de striatum.....	88
Figure 28 : Impact de la délétion génétique du récepteur 5-HT ₆ sur la longueur des cils primaires.....	90

Figure 29 : Expression du récepteur 5-HT ₆ au niveau des cils primaires dans différentes structures du cerveau embryonnaire de souris.	92
Figure 30 : Changement transitoire de la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT ₆ au cours de la période post-natale.	94
Figure 31 : Impact d'une naissance par césarienne sur la relocalisation du récepteur 5-HT ₆	95
Figure 32 : Expression du récepteur 5-HT ₆ par des types neuronaux spécifiques pendant la période post-natale.	97
Figure 33 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ en période postnatale sur les comportements de locomotion et de toilettage des souris à l'adolescence.	100
Figure 34 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ en période postnatale sur le comportement anxieux des souris à l'adolescence.	101
Figure 35 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ en période postnatale sur les capacités de mémorisation d'objets des souris à l'adolescence.	103
Figure 36 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ en période postnatale sur la préférence sociale des souris à l'adolescence.	105
Figure 37 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT ₆ plus tardive sur la préférence sociale à l'adolescence.	106
Figure 38 : Effet de la délétion génétique constitutive du récepteur 5-HT ₆ sur la préférence sociale.	107
Figure 39 : Effet du traitement au SB271046 chez les souris 5-HT ₆ ^{KO/KO}	107

INTRODUCTION

Le neuro-développement comprend un ensemble de phénomènes complexes qui permettent la construction d'un cerveau mature et fonctionnel. De nombreuses pathologies cérébrales comme la schizophrénie, les troubles du spectre de l'autisme, ou différents retards mentaux résultent de l'altération de plusieurs étapes clés du neuro-développement. Il est donc important d'en connaître les mécanismes et leur régulation afin de comprendre la physiopathologie des maladies d'origine neuro-développementales.

Les travaux réalisés ces dernières années par plusieurs équipes, incluant mon laboratoire de thèse, ont permis d'identifier le récepteur 5-HT₆ de la sérotonine comme étant un acteur important du contrôle de différents processus neuro-développementaux. Ce récepteur a aussi été identifié comme une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des déficits cognitifs associés à certains troubles neuro-développementaux. Le récepteur 5-HT₆ fait partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, qui peuvent interagir avec des réseaux de protéines complexes et moduler des voies de signalisation variées. Les expériences menées précédemment par mon équipe ont permis d'identifier de nombreux partenaires protéiques du récepteur 5-HT₆. Ces études ont dévoilé l'implication du récepteur dans des voies de signalisation importantes pour divers processus développementaux. Cependant, ses fonctions restent encore peu étudiées. Notamment, son profil d'expression dans le cerveau, que ce soit à l'échelle de l'organe, cellulaire ou subcellulaire, reste mal connu et il est ainsi indispensable de réaliser un travail de cartographie de son expression pour mieux comprendre ses rôles dans le développement cérébral, ce qui a constitué le principal objectif de mon travail de thèse.

Avant de décrire les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail, ce manuscrit débutera par une introduction bibliographique constituée de 3 chapitres, consacrés dans l'ordre aux étapes du neuro-développement, aux récepteurs couplés aux protéines G et les voies de signalisation associées, et enfin à la sérotonine et au récepteur 5-HT₆.

CHAPITRE I : NEURO-DEVELOPPEMENT

A) ETAPES DU NEURO-DEVELOPPEMENT

Le développement du système nerveux central nécessite une succession de mécanismes complexes, très précisément régulés dans le temps. Il requiert non seulement la formation des structures cérébrales mais aussi la mise en place des réseaux qui leur permettent de communiquer entre elles. Il peut être décomposé en 4 étapes principales :

- La formation du tube neural
- La prolifération cellulaire et la neurogénèse
- La migration des cellules
- La formation des prolongements neuronaux et la formation des connexions synaptiques

1) FORMATION DU TUBE NEURAL (NEURULATION)

Le développement du système nerveux débute à la 3^{ème} semaine de gestation chez l'humain et au 7^{ème} jour (E7) chez la souris (la période de gestation chez la souris dure en moyenne 20 jours). A la gastrulation, l'embryon présente trois feuillets embryonnaires : l'endoderme (qui donnera les organes des systèmes digestif et respiratoire), le mésoderme (qui donnera le système circulatoire, les reins, les organes génitaux, les os, les muscles squelettiques, les tissus conjonctifs) et l'ectoderme (qui donnera l'épiderme et le système nerveux). La notochorde est une structure dérivée du mésoderme ayant une forme de tige le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (figure 1A représentant une vue transversale, la notochorde est représenté en bleu). C'est une structure qui a un rôle primordial dans la neurulation, car elle sécrète des facteurs morphogènes qui vont permettre de manière paracrine la différenciation des cellules de l'ectoderme situées à proximité. Elle sécrète notamment la chordine, la noggine et la follistatine, qui sont des inhibiteurs des *Bone Morphogenic proteins*

(BMP). Les BMP induisent la différenciation de l'ectoderme en épiderme, leur blocage permet donc la différenciation « par défaut » en plaque neurale. La plaque neurale donnera le système nerveux central. Elle est délimitée par les crêtes neurales, qui donneront le système nerveux périphérique. La plaque neurale s'invagine puis se referme au niveau des crêtes neurales pour former le tube neural (Figure 1A). La lumière du tube neural est délimitée au départ d'une seule couche cellulaire, le neuroépithélium.

Le tube neural se différencie selon l'axe antéro-postérieur pour donner les différentes

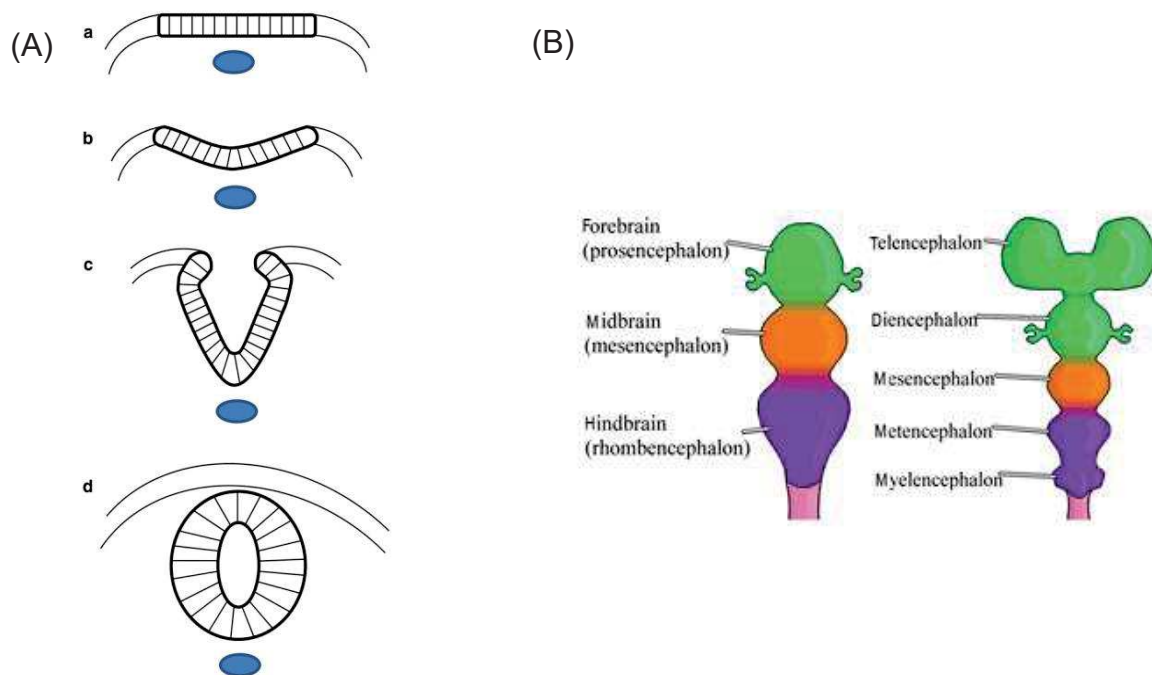


Figure 1 : Formation du tube neural et des vésicules cérébrales

(A) Vue transversale de la formation du tube neural. **(a)** sous l'effet de la notochorde (en bleu), les cellules de l'ectoderme à proximité commencent à proliférer et forment une structure épaisse : la plaque neurale. **(b)** Par un mécanisme d'invagination, la gouttière neurale se forme. **(c)** La gouttière neurale va se refermer au niveau des crêtes neurales, à la bordure de la plaque neurale. **(d)** Le tube neural se referme complètement et se retrouve entouré de structures mésodermiques. **(B)** Vue frontale de la formation des vésicules cérébrales. Au départ sous forme de 3 vésicules (à gauche) : le prosencéphale (vert), le mésencéphale (orange) et le rhombencéphale (violet). Le prosencéphale se divisera en deux vésicules : le télencéphale et le diencephale. Le mésencéphale reste une même vésicule, et le rhombencéphale se divisera en métencéphale et myélencéphale. Adapté de Cearns et al., 2016; Cuoco et al., 2016.

vésicules cérébrales (le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale) et la future moelle épinière (figure 1B). Le prosencéphale se fractionnera en deux

vésicules : le télencéphale et le diencéphale (comprenant le cortex, le striatum, l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus).

Le rhombencéphale se divisera pour donner le métencéphale (futur cervelet) et le myélocéphale (qui formera le pont et le bulbe rachidien). Le tube neural se différencie également d'un point de vue dorso-ventral, par l'action de la notochorde. Un acteur important de cette différenciation dorso-ventrale est sonic hedgehog (Shh), principal ligand de la voie de signalisation Hedgehog (Hh), un facteur morphogène sécrété par la notochorde. Shh va notamment provoquer la différenciation des cellules ventrales en motoneurones (postérieurement, au niveau de la future moelle épinière) et en interneurones produisant l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

2) NEUROGENESE

Les cellules du neuroépithélium, qui forment une couche unique au départ, commencent à se diviser. Deux types de division peuvent avoir lieu : des divisions symétriques, produisant des cellules filles identiques, ou asymétriques, produisant

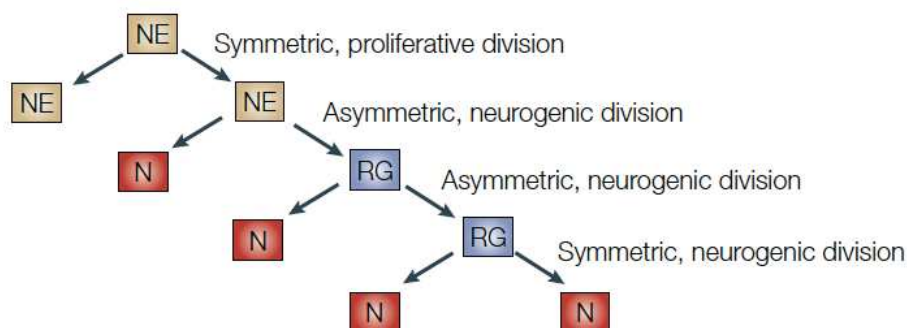


Figure 2 : Division et différenciation des cellules de la lignée neurale

Les cellules du neuroépithélium (NE) subissent d'abord des divisions symétriques afin de proliférer. Elles subissent ensuite des divisions asymétriques, afin de former des neuroblastes (N, les progéniteurs neuronaux) ou des cellules de la glie radiaire (RG) qui serviront d'échafaudage à la migration. Ces RG vont ensuite subir des divisions asymétriques ou symétriques afin de former les neuroblastes qui donneront la majorité des neurones du cerveau. Adapté de Götz and Huttner, 2005.

deux cellules différentes. Les premières divisions prolifératives sont symétriques,

généralant de nouvelles cellules neuroépithéliales (figure 2). Cette division proliférative permet la formation de plusieurs couches de cellules, la couche en contact avec la lumière du tube neural étant la zone ventriculaire (VZ). Les autres couches se formeront au fur et à mesure de l'épaississement du tissu, nous reviendrons sur elles plus tard. Ces cellules neuroépithéliales subissent ensuite des divisions asymétriques, appelées divisions neurogéniques, donnant naissance soit à des neuroblastes (les progéniteurs neuronaux), soit à des cellules de la glie radiaire. Les neuroblastes sont les cellules post-mitotiques qui, après migration dans une couche d'accueil prédéterminée, pourront se différencier en neurones. Les cellules de la glie radiaire sont des cellules qui peuvent continuer à se diviser de manière symétrique, ou bien de manière asymétrique pour donner des neuroblastes ou des cellules gliales comme des astrocytes ou des oligodendrocytes (Götz and Huttner, 2005). Les cellules de la glie radiaire ont un rôle primordial de guidage des neuroblastes lors de la migration radiale, dont nous parlerons juste après. La neurogénèse a lieu tout au long du neuro-développement et peut même continuer à l'âge adulte, dans certaines niches neurogéniques comme la zone sous-ventriculaire (qui produit des neurones qui migrent antérieurement jusqu'aux bulbes olfactifs) ou le gyrus denté de l'hippocampe. La neurogénèse adulte a un rôle démontré chez le rongeur dans l'apprentissage olfactif dépendant des bulbes olfactifs ou encore les fonctions mnésiques dépendantes de l'hippocampe comme la mémoire spatiale (Moreno et al., 2009).

3) MIGRATION

Comme indiqué précédemment, le tube neural est différencié sur l'axe dorso-ventral, ainsi différentes structures sur l'axe dorso-ventral sont responsables de la production de différents types de neurones. Par exemple les neurones pyramidaux du cortex sont produits dorsalement alors que les interneurones sont produits plus ventralement, au niveau de l'éminence ganglionnaire. Ainsi pour former le cortex, les neurones pyramidaux vont migrer simplement radialement alors que les interneurones doivent migrer d'abord tangentiellement (parallèlement à la surface du ventricule) pour

rejoindre le cortex, puis radialement pour rejoindre la couche corticale adéquat (figure 3).

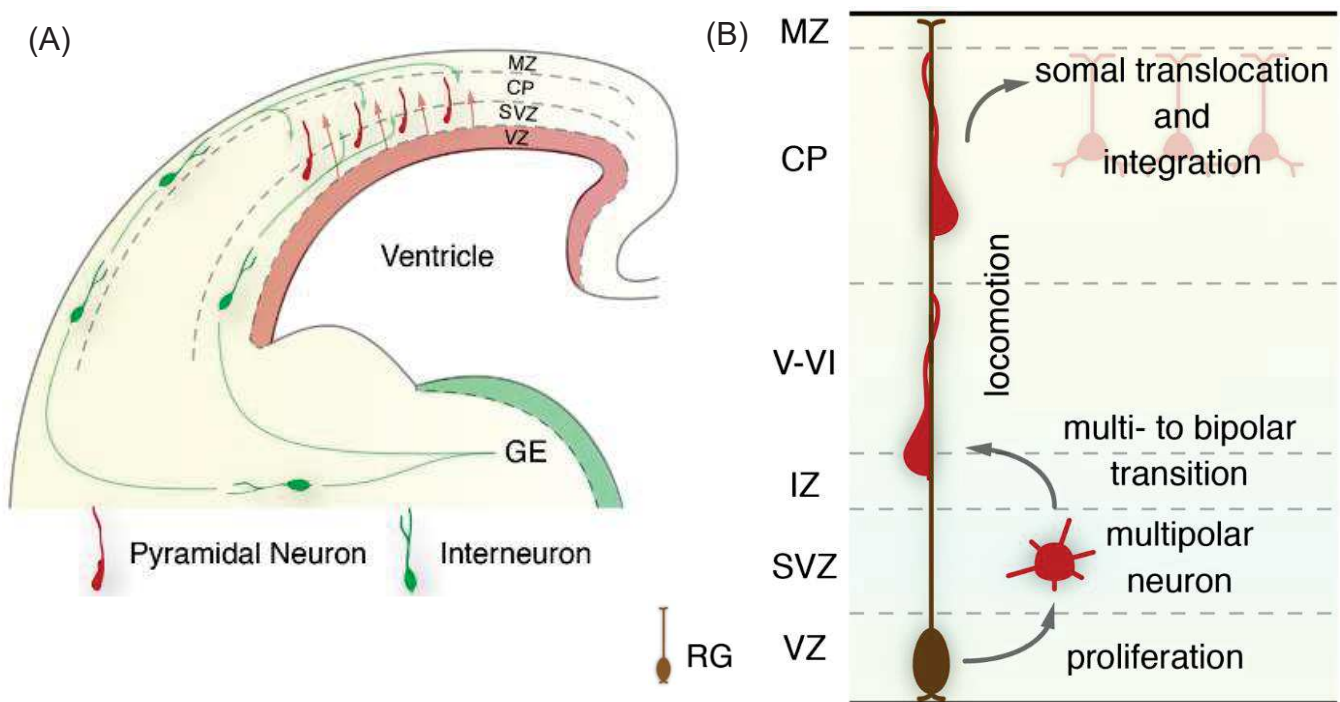


Figure 3 : Migration radiale et tangentielle des progéniteurs neuronaux pour former le cortex

(A) Représentation en coupe coronale d'un cerveau de souris en développement. La zone ventriculaire (VZ) dorsale est représentée en rouge. Les neurones principaux du cortex (les neurones de projection pyramidaux, en rouge) migrent radialement de la VZ jusqu'à la plaque corticale (CP) en passant par la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone intermédiaire (IZ). Les interneurones sont produits au niveau de la VZ ventrale (en vert) au niveau de l'éminence ganglionnaire (GE) et migrent tangentiellement jusqu'à la plaque corticale, en passant par différentes routes de migration, soit la SVZ, soit la zone médullaire (MZ). **(B)** Les neurones de projections corticales subissent des changements morphologiques pendant leur migration. D'abord multipolaires, ils deviennent bipolaires pour migrer le long de la glie radiale (en marron) avant d'intégrer les circuits au niveau de la plaque corticale. Adapté de Dayer et al., 2015.

Les cellules de la glie radiale permettent une migration correcte des neurones pyramidaux au niveau des couches corticales grâce à de longs prolongements qui partent du corps cellulaire au niveau de la VZ et vont jusqu'à la plaque corticale. Une fois produits, les neuroblastes, qui sont des cellules multipolaires (elles présentent plusieurs petits prolongements appelés neurites), subissent une transition morphologique, passant de multipolaires à bipolaires avec deux neurites principaux, dont un « de tête » qui pointe vers le sens de migration. Ils sont ensuite guidés jusqu'à

la plaque corticale par les cellules de la glie radiaire, et grâce à des molécules de guidance présentes dans le milieu extracellulaire et servant de signaux de guidage. Par ces mécanismes, les couches corticales se forment séquentiellement dans le temps, d'abord les couches profondes puis les couches plus superficielles. Les autres régions cérébrales présentant une structure laminaire, comme le cervelet ou l'hippocampe, suivent aussi un schéma de migration semblable. En revanche les neurones des structures non-laminaires, comme le striatum et ou le thalamus, suivent une migration tangentielle.

Les mécanismes moléculaires permettant de guider les neurones lors de leur migration sont complexes. Ils se basent essentiellement sur l'interaction de molécules de guidance, présentes dans le milieu extracellulaire selon des gradients de concentration, avec de nombreux récepteurs présents sur les neurones en migration. Les voies de signalisation déclenchées par ces molécules induisent des changements morphologiques qui favorisent ou inhibent la migration. La reeline par exemple est un facteur important dans ce processus. Elle est sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius dans la zone marginale (MZ, figure 3), la couche la plus superficielle du cortex. La reeline se lie aux récepteurs *Apolipoprotein E Receptor 2* (ApoER2) et *Very Low Density Lipoprotein receptor* (VLDLR), induisant la phosphorylation de Dab1 par les kinases Fyn et Src, ce qui active la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-Glycogène Synthase 3 β (GSK3 β). Cette voie inhibe la phosphorylation de Tau, une protéine associée aux microtubules. Ce mécanisme stabilise les microtubules au niveau du prolongement de tête des neurones bipolaires en migration, ce qui favorise leur migration (Beffert et al., 2004; Katsuyama and Terashima, 2009; Sekine et al., 2014). Des mutations du gène codant pour la reeline chez les souris *reeler* induisent de profondes perturbations développementales, entre autre une désorganisation des couches corticales (Katsuyama and Terashima, 2009).

Dans les progéniteurs neuronaux en migration, la translocation du noyau à la base du prolongement de tête, ou nucléokinèse, est une étape importante. Le prolongement de tête s'élargit d'abord à sa base, afin que le centrosome, centre organisateur des microtubules, puisse y migrer. Ce phénomène est suivi de la translocation du noyau, qui est relié au centrosome par un réseau de microtubules, au niveau du prolongement de tête (Marín et al., 2010). Ainsi l'ancrage du noyau aux microtubules est important pour ce phénomène. Chez l'homme, certaines pathologies sont issues de défauts de

migration neuronale, comme la lissencéphalie. Elle est caractérisée par un cortex non-stratifié et l'absence de circonvolutions. Deux gènes sont impliqués dans ces caractéristiques : LIS1 (lissencephaly-1) et DCX (Double-cortine lié à l'X). Une mutation de LIS1 cause une lissencéphalie autosomale dominante (Lo Nigro et al., 1997). Une mutation de DCX induit une lissencéphalie liée au chromosome X chez l'homme et un syndrome du « double-cortex » chez la femme, causé par un arrêt du processus de migration neuronale (Gleeson et al., 1998). Les protéines codées par ces gènes jouent un rôle important dans la nucléokinèse. La protéine Lis1 interagit avec les protéines NUDEL (Ndel1) et les complexes de dynéine, formant des complexes associés aux microtubules responsables du transport rétrograde (de l'extrémité du microtubule jusqu'au centrosome). Tsai et Gleeson suggèrent un modèle dans lequel le complexe Lis1-Ndel1-Dynéine au niveau de la membrane du noyau permet aux microtubules péri-nucléaires de capturer le noyau et de le déplacer jusqu'au centrosome via le transport rétrograde (Tsai and Gleeson, 2005).

La migration neuronale est donc orchestrée par un ensemble de phénomènes extracellulaires et intracellulaires qui agissent de concert.

4) POUSSE AXONALE ET DENDRITIQUE

Lors de la migration des neurones, les deux neurites du neurone bipolaire vont commencer à se différencier. Le neurite « de tête » formera la dendrite apicale, l'autre formera l'axone. L'axone est le prolongement le plus long et fin. Il présente un cône de croissance à son extrémité. Le cône de croissance est une structure extrêmement dynamique, très riche en actine qui permet des changements morphologiques rapides. Son rôle est de sonder le milieu extracellulaire, afin de guider l'axone jusqu'à sa cible, qui peut être un autre neurone. Une fois la cible atteinte, le cône de croissance se rétracte et l'axone pourra former une synapse.

L'arborisation dendritique se forme une fois que le neurone a terminé sa migration. En fonction du type neuronal, le neurone perd ou non sa morphologie bipolaire. Par exemple dans le cas des neurones pyramidaux, la dendrite apicale reste et se ramifie, mais d'autres dendrites apparaissent et se ramifient également, donnant à ces neurones leur aspect caractéristique (figure 4A, E17 et P21).

Les cultures primaires de neurones préparées à partir d'embryons de rat ou de souris sont des modèles très couramment utilisés pour étudier le développement de l'arborisation dendritique.

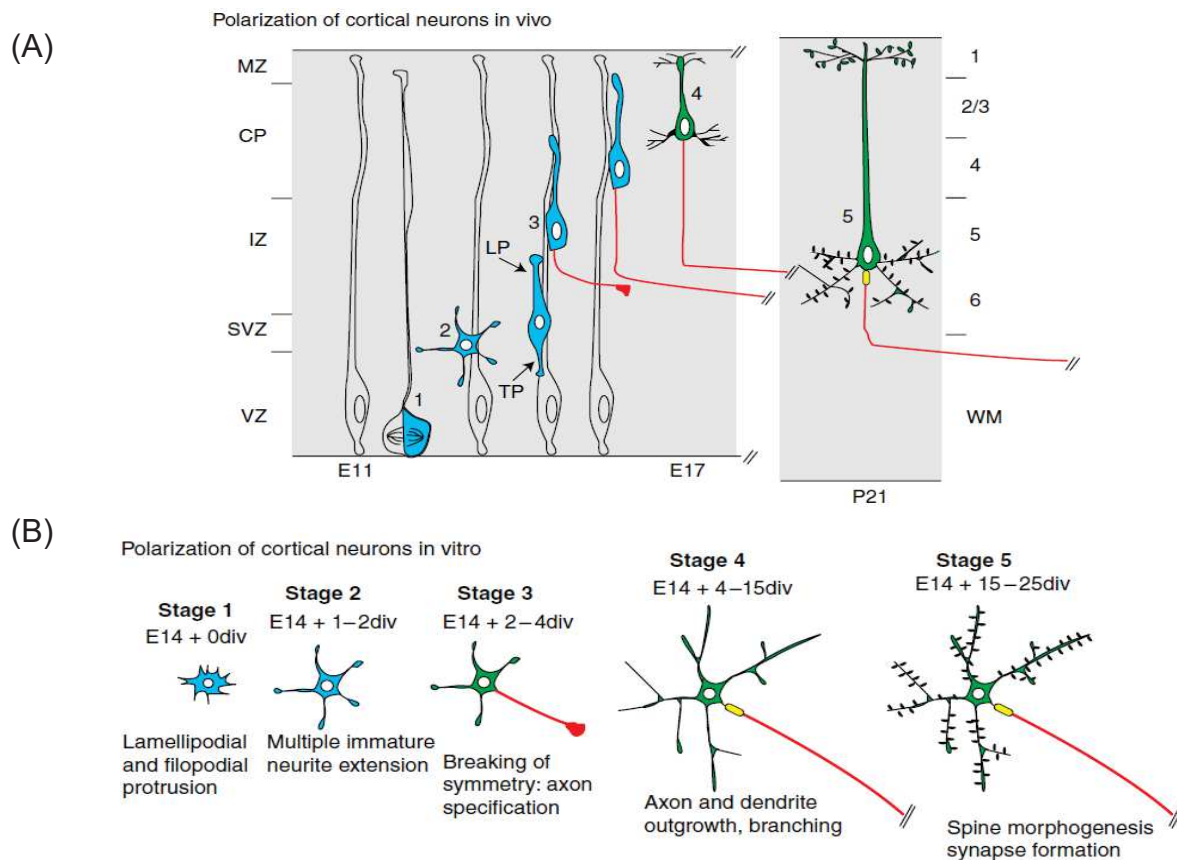


Figure 4 : Formation de la polarité des neurones corticaux *in vivo* et *in vitro*.

(A) *In vivo* (en haut), la polarisation commence pendant la phase de migration du neurone. Les neurones post-mitotiques (1) passent par un stade multipolaire (2) avant d'acquies une morphologie bipolaire (3). Se forment alors un neurite de tête (« leading process », LP) et le « trailing process » (TP) qui donneront respectivement la dendrite apicale et l'axone. Une fois la position des neurones dans la plaque corticale atteinte (4), les neurites continuent leur développement afin d'établir des contacts synaptiques (5). **(B) *In vitro*** (en bas). Au stade 1, les neurones émettent de multiples prolongements de type lamellipodes ou filopodes. Au stade 2, entre 24h et 48h de culture (1-2 DIV, Days In Vitro), ces prolongements donnent naissance à des neurites immatures. Au stade 3, entre 2 et 4 DIV, la polarisation neuronale débute, un neurite devient l'axone tandis que les autres prolongements formeront les dendrites. Durant le stade 4, à partir de 4 DIV, l'ensemble des prolongements pousse rapidement, tandis que l'arborisation dendritique commence à se complexifier. Au stade 5, après plus de 15 jours en culture, les neurones terminent leur différenciation, des épines dendritiques apparaissent et des synapses commencent à se former. Adapté de Polleux and Snider, 2010.

Dans ces modèles, on distingue 5 stades de développement qui récapitulent le développement du neurone *in vivo* (figure 4B). Lors du premier stade, la cellule adhère à son support et émet de petits lamellipodes. Pendant le stade 2, des neurites

commencent à apparaître. Lors du stade 3, un de ces neurites forme un cône de croissance et commence à s'allonger plus rapidement que les autres, il constituera l'axone. La formation de l'arborisation des autres neurites, qui formeront les dendrites, constitue le stade 4. Le dernier stade est la formation des épines dendritiques, des petites protubérances membranaires qui formeront la partie postsynaptique de la synapse en exprimant de nombreux récepteurs synaptique à leur surface (figure 4).

La formation des dendrites est dépendante de l'activité du cytosquelette d'actine et des microtubules, qui doivent exercer la force nécessaire à la déformation de la membrane et à la stabilisation des structures formées (da Silva and Dotti, 2002). Dans ces processus, les Rho-GTP(guanine triphosphate)ases ont un rôle majeur, notamment les protéines *cell division control protein 42* (Cdc42) et les Rac (Govek et al., 2005). Leur activation est en général dépendante de l'activation de récepteurs membranaires, comme les récepteurs tyrosine kinase (RTK) ou les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Par exemple l'activité de RTK comme TrkB, un récepteur du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), module l'activité des protéines Cdc42 et Rac1. Dans des cultures de neurones hippocampiques, la phosphorylation de TrkB par la Cyclin dépendant kinase (Cdk) 5 stimule la pousse neuritique par le biais de l'activation de Cdc42 (Cheung et al., 2007). De même l'activation de Rac1 et Cdc42 par le *nerve growth factor* (NGF) stimule la pousse neuritique dans des cellules de la lignée PC12 (Aoki et al., 2004).

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est aussi un messager important pour la pousse neuritique. L'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc favorise la pousse neuritique et la régénérescence axonale (Stiles et al., 2014). La régulation de la production d'AMPc dépend notamment de l'activité des RCPG couplés aux protéines Gas et Gai, dont nous parlerons plus tard en détail.

Ainsi encore une fois, l'interaction entre des facteurs extracellulaires, comme des facteurs de croissance, et des acteurs intracellulaires permet le développement de la morphologie neuronale.

Récemment, le cil primaire, un organe non-motile présent dans un grand nombre de types cellulaires, a été identifié comme étant un centre intégrateur important de signaux extracellulaires impliqués dans le neuro-développement.

B) LE CIL PRIMAIRE, ORGANITE CLE DU NEURO-DEVELOPPEMENT

1) DECOUVERTE ET CARACTERISTIQUES GENERALES

Le cil primaire est un organe non-motile présent dans un grand nombre de types cellulaires, comme les cellules issues de la lignée neurale (neurones, astrocytes et oligodendrocytes). Il constitue une protubérance membranaire qui émerge du corps cellulaire. Sa structure cytosquelettique interne est faite de 9 doublets de microtubules (figure 5, en vert), formant l'axonème. Sa base est caractérisée par la présence d'un corps basal, fait de 9 triplets de microtubules, lequel est relié au centrosome. Au niveau de la base du cil est aussi présente une zone de transition dont le rôle est notamment de réguler le trafic de protéines entre le cil et le reste de la cellule. Cette organisation le rapproche d'autres structures présentes dans différents types cellulaires : le cil motile et le flagelle, qui eux présentent 9 doublets de microtubules plus un doublet central qui permet leur motilité. La composition protéique du cil est notamment caractérisée, à l'instar des flagelles et des cils motiles, par un système de transport intraflagellaire (*intraflagellar transport*, IFT). Ce système permet notamment le trafic de protéines à l'intérieur du cil, par un transport antérograde (de la base du cil vers son extrémité) organisé par les kinésines et un transport rétrograde (de l'extrémité du cil vers sa base), réalisé par les dynéines (figure 5). Ce système IFT participe à la formation et la maintenance du cil mais aussi à ses fonctions, en régulant le trafic de différentes protéines, notamment des récepteurs présents à sa surface.

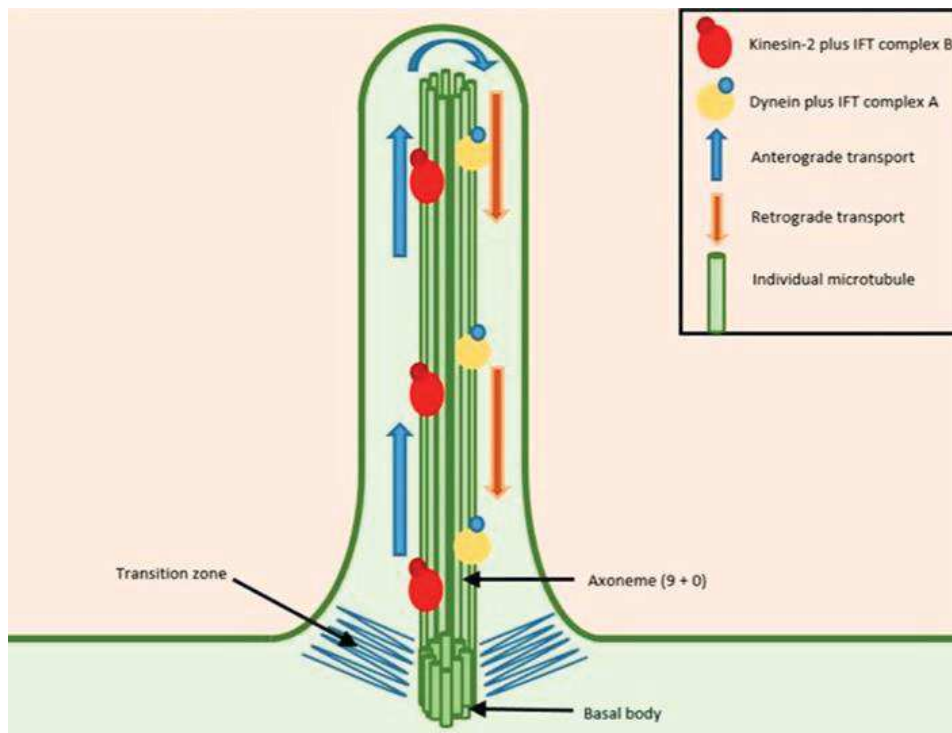


Figure 5 : Anatomie du cil primaire

Le cil primaire est un organite formant une protrusion de la membrane plasmique de nombreuses cellules. L'axonème, sa structure interne, est composé de 9 doublets de microtubules et sa base, le corps basal, de 9 triplets de microtubules (en vert) reliés au centrosome. La base est dotée d'une zone de transition, importante pour le trafic des protéines entre le cil et le reste de la cellule. Le transport des protéines en sein du cil est assuré par l'IFT. Le transport antérograde (flèches bleues) assure le transport des protéines ciliaires de la base du cil vers son extrémité ; le transport rétrograde (flèches oranges) de l'extrémité du cil jusqu'à la base. Par exemple la kinésine-2, une protéine motrice antérograde transporte les protéines ciliaires en formant un complexe avec le complexe IFT B (en rouge et orange), tandis que le complexe IFT A fait l'inverse en se liant à la dynéine 1b (en bleu et jaune) et achemine les protéines ciliaires du cil vers le corps cellulaire. Adapté de Higgins et al., 2019.

La caractéristique non-motile du cil primaire lui a d'abord valu la réputation de « vestige évolutif » dont les fonctions ne seraient pas particulièrement importantes, voire inexistantes. L'existence d'autres types de cils non-motiles, présents notamment au niveau de la muqueuse olfactive et au niveau de la rétine, et permettant respectivement la sensibilité aux odeurs et à la lumière, a amené à l'hypothèse que les cils primaires pourraient avoir un rôle de senseur du milieu extracellulaire. Tout au

long du 20^{ème} siècle, le cil primaire a pu être de mieux en mieux observé notamment grâce à l'émergence des différentes méthodes de microscopie, et différents rôles physiologiques ont pu lui être attribués.

2) IDENTIFICATION DE SON ROLE FONCTIONNEL COMME « ANTENNE CELLULAIRE »

Dès la fin des années 90, l'étude des rôles du cil primaire a pris un réel essor dans le cadre d'études sur le rein, notamment dans l'étude de la polykystose rénale (Pazour et al., 2000). Un modèle animal de cette maladie est la souris portant une mutation du gène *Tg737*, dont la fonction était alors inconnue. Cette étude a montré que le gène *Tg737* est homologue du gène *Ift88* présent chez le *Chlamydomonas*. *Ift88* code pour une protéine, IFT88 qui participe au système de l'IFT et à la formation des cils primaires. Les auteurs montrent que les cils primaires des cellules rénales chez les souris portant la mutation sont plus courts que la normale. Des études fonctionnelles dans des cellules rénales en culture ont permis de valider le rôle mécano-senseur du cil primaire et son implication dans l'élévation des niveaux de calcium intracellulaire suite à une stimulation mécanique (Praetorius and Spring, 2003, 2001). Ces études ont donc démontré que le cil primaire n'est pas un organite inerte, mais peut jouer un rôle dans la physiologie de la cellule et dans le développement de pathologies.

L'implication du cil primaire dans la voie de signalisation Hedgehog (Hh) est probablement la découverte majeure ayant permis de démontrer un rôle critique du cil primaire dans différents mécanismes de développement. En effet, une étude majeure publiée au début des années 2000 (Huangfu et al., 2003) a identifié que des mutations au niveau de gènes codant pour certaines protéines de l'IFT induisent des défauts neuro-développementaux rapidement létaux chez la souris. Ces défauts sont notamment caractérisés par une neurulation complètement altérée, avec une absence de la différenciation des cellules ventrales du tube neural, phénomène dépendant de Shh et de la voie Hh.

La voie Hh est une voie de signalisation complexe qui régule entre autre la différenciation des cellules ventrales du tube neural en agissant sur des facteurs de transcriptions : les protéines Gli. Ces facteurs vont pouvoir activer ou inhiber l'expression de certains gènes. La protéine Gli3 notamment est un répresseur de l'expression des gènes activés par Shh (figure 6).

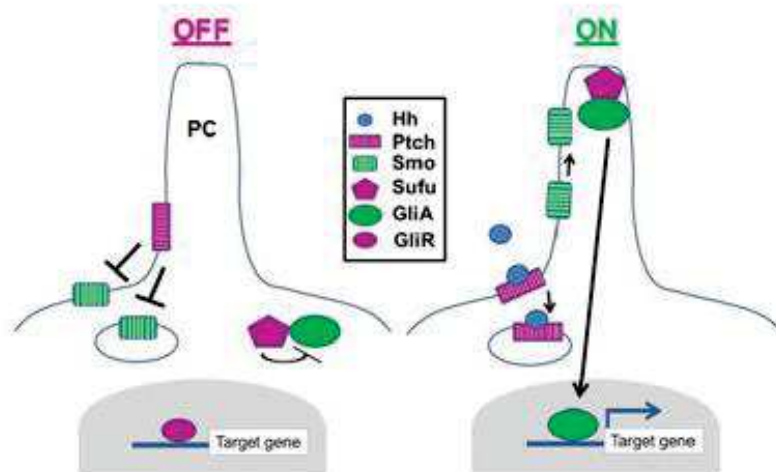


Figure 6 : Schéma récapitulatif de l'activation de la voie de signalisation Hedgehog

La voie principale Hh. En l'absence de ligand Hh (OFF, à gauche), le récepteur Patched 1 (Ptch, rectangle rose) se localise à la base du cil primaire (PC) et inhibe l'entrée ciliaire du récepteur Smo (rectangle vert). Sufu (pentagone rose) inhibe la Gli activatrice (ovale vert) tandis que la Gli répressive (ovale rose) inhibe la transcription des gènes cibles. La liaison du ligand Hh déclenche l'internalisation de Ptch, qui permet le trafic de Smo au niveau du cil où il signale à Sufu de libérer la Gli activatrice. La Gli activatrice se déplace ensuite vers le noyau pour activer l'expression des gènes cibles. Adapté de Arensdorf et al., 2016.

Chez des souris qui présentent une mutation de Shh entrainant des défauts de différenciation des neurones moteurs ventraux, une mutation perte de fonction de Gli3 restaure la différenciation. Dans cette étude, la mutation des gènes codant pour les protéines IFT88 et Kif3a (Kinésine intraflagellaire 3a), des protéines de l'IFT, induit des défauts développementaux semblables à ceux induits par la mutation de Shh. La double mutation de ces protéines et de Gli3 restaure la différenciation, démontrant que les protéines de l'IFT régulent la voie Hh. C'est plus tard que le mécanisme global de la transduction du signal Shh est décrit plus en détail. Dans son état inactivé, le récepteur Patched 1, récepteur de Shh, est localisé au niveau du cil primaire (Rohatgi et al., 2007), ce qui inhibe la translocation au niveau du cil du récepteur Smoothened (Smo), activateur de la voie Hh (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). La liaison de

Shh avec Patched 1 induit son internalisation, ce qui rend possible la translocation de Smo au niveau du cil primaire. Smo pourra ensuite réguler l'activité des facteurs de transcription Gli (Arensdorf et al., 2016; Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007) (figure 6).

Ainsi, ces données montrent que la voie Hh, une voie de signalisation majeure du neuro-développement, est reliée au cil primaire. L'importance de compartimenter cette voie au niveau du cil reste à expliquer. En effet chez les invertébrés comme la *Drosophile*, la voie Hh ne dépend pas d'un cil primaire (Arensdorf et al., 2016).

3) ROLES DEVELOPPEMENTAUX DU CIL PRIMAIRE

Le cil primaire possède au niveau de sa membrane de nombreux récepteurs, notamment des RCPG. Ainsi, il est impliqué dans de nombreuses voies de signalisations et participe à divers processus physiologiques.

a) Rôles dans la prolifération cellulaire et neurogénèse

L'importance du cil primaire pour la voie Hh implique que de nombreux mécanismes médiés par cette voie pourraient dépendre du cil primaire.

Différentes études, basées sur la mutation de gènes codant pour des protéines indispensables à la formation du cil, les protéines Stumpy et Kif3a, ont ainsi montré son importance majeure notamment dans la prolifération et la neurogénèse embryonnaire (Breunig et al., 2008) et adulte (Han et al., 2008) au niveau de l'hippocampe, ainsi qu'au niveau du cervelet (Spassky et al., 2008).

b) Rôles dans la migration neuronale

D'autres voies de signalisation ont ensuite été reliées au cil primaire dans des cellules non neuronales. C'est le cas de la migration des fibroblastes sous le contrôle de la signalisation médiée par le ligand *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) AA et son récepteur PDGFR α (Schneider et al., 2005). Ces cellules migrent dans certaines conditions, comme lors du développement ou d'une réparation tissulaire. Ce phénomène de migration est médié par un gradient de concentration croissante de PDGF-AA, ainsi que par l'expression de son récepteur PDGFR α au niveau du cil. Des fibroblastes dans lesquels la ciliogénèse a été altérée par la mutation Tg737 (la même

mutation que dans le modèle de polykystose rénale) ne répondent plus à ce gradient de PDGF-AA et ne migrent pas de façon correcte *in vitro* (Schneider et al., 2010). Ce rôle du cil dans la migration des fibroblastes a motivé des études sur un potentiel rôle du cil primaire dans la migration neuronale.

Deux études majeures publiées en 2012 démontrent que la migration tangentielle des interneurones, leur permettant de rejoindre le cortex pendant le développement embryonnaire, dépend du cil primaire (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012). Dans la première étude (Baudoin et al., 2012), les auteurs observent la formation d'un cil primaire dans les interneurones qui migrent tangentiellement, au moment où ils intègrent la plaque corticale. Lorsqu'une délétion conditionnelle de Kif3a et IFT88 est effectuée, produisant une ablation du cil dans ces neurones, leur capacité à se réorienter au niveau de la plaque corticale est altérée. L'inhibition de la voie Hh par un antagoniste du récepteur Smo induit les mêmes types de défauts, indiquant l'implication de la voie Hh dans la migration des interneurones.

Dans la deuxième étude (Higginbotham et al., 2012), une autre approche de délétion génétique est utilisée : la délétion de la protéine Arl13b (*ADP-ribosylation factor-like protein 13B*), une petite GTPase très enrichie au niveau du cil primaire. Les neurones dans lesquels Arl13b est déletée possèdent toujours un cil primaire mais deviennent incapables de réagir à certains signaux extracellulaires dont les récepteurs sont au niveau du cil (notamment les récepteurs Robo 1/2, TrkB et le récepteur 5-HT₆, sujet de cette thèse dont nous parlerons en détail plus tard). Ces récepteurs présentent notamment une dynamique membranaire ralentie, démontré par la technique de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP). Cette délétion d'Arl13b induit au final des défauts de migration des interneurones. Une autre étude de ce même groupe (Higginbotham et al., 2013) indique que les cellules de la glie radiaire possèdent un cil primaire. Une délétion d'Arl13b spécifiquement au niveau de ces cellules inverse leur polarité, indispensable à la migration correcte des neurones pyramidaux. Cette inversion altère la migration radiale de ces neurones, ce qui conduit à une désorganisation des couches corticales.

Plus récemment, une étude s'est intéressée au rôle du cil primaire dans la migration des neurones issus de la neurogénèse adulte au niveau de la SVZ, qui migrent dans le flux rostral migratoire pour rejoindre les bulbe olfactifs (Stoufflet et al., 2020). Cette

étude montre la présence d'une zone de concentration élevée d'AMPc au niveau du centrosome, à la base du cil primaire dans les neurones issus de la neurogenèse adulte. Cette augmentation localisée de la concentration d'AMPc, appelée point chaud, permet d'activer la Protéine Kinase A (PKA) au niveau du centrosome, déclenchant une dynamique centrosomale responsable de la nucléokinèse, phénomène important de la migration. L'ablation du cil primaire par une mutation du gène codant pour Kif3a empêche l'augmentation localisée de la concentration d'AMPc, altère la nucléokinèse et finalement altère la migration de ces neurones dans le flux rostral migratoire. Deux approches expérimentales ont permis de démontrer que ce mécanisme dépend bien de la voie AMPc-PKA. En effet la migration des neurones adultes est altérée 1) si on supprime le point chaud d'AMPc en inhibant l'expression de l'adénylate cyclase (AC) 3, présente de façon enrichie au niveau du cil et 2) si on exprime un mutant dominant négatif du gène codant la PKA dépourvue de son domaine d'ancrage au centrosome.

Ainsi le cil primaire semble être indispensable à la migration neuronale aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte, et ce dans plusieurs modèles de migration : la migration tangentielle des interneurones et la migration radiale des neurones de projections embryonnaires corticaux, ainsi que la migration dans le flux rostral migratoire des neurones des bulbes olfactifs au stade adulte.

L'implication du cil primaire semble dépendre de plusieurs voies de signalisations, notamment la voie Hh et l'AMPc/PKA, ici dépendantes du cil.

c) Rôle dans la connectivité des neurones

La présence de cils primaires dans les neurones après migration suggère qu'ils auraient également d'autres fonctions dans les neurones post-migratoires. A ce jour peu d'études ont été réalisées afin d'étudier ces rôles potentiels. On peut citer une étude publiée en 2012 (Kumamoto et al., 2012), qui a observé l'effet de l'ablation du cil primaire induite par l'expression d'une forme mutée dominante négative de Kif3a dans des neurones hippocampiques issus de la neurogenèse adulte. Dans ces neurones, la formation de l'arborisation dendritique est altérée, avec des dendrites plus courtes. Les auteurs observent également une réduction de l'intégration synaptique de ces neurones dans les circuits pré-existants. Une autre étude (Guo et al., 2017) montre que la délétion de la GTPase ciliaire Arl13b dans les interneurones du striatum

induit non seulement une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, mais aussi une altération morphologique de leur axone, avec des boutons axonaux (la partie présynaptique de l'axone) moins nombreux et plus petits. Ces caractéristiques morphologiques sont aussi associées à des altérations électrophysiologiques, ce qui est synonyme d'une mauvaise intégration dans les circuits neuronaux. Les résultats de cette étude montrent aussi que la délétion d'Arl13b induit une baisse de l'expression du récepteur de la somatostatine Sstr3 au niveau du cil. En sur-exprimant Sstr3 de façon à restaurer des niveaux ciliaires normaux chez les mutants Arl13b, un phénotype normal des neurones est restauré. Cela indique que la signalisation liée au récepteur Sstr3 ciliaire participe au développement morphologique des interneurons striataux et à leur intégration dans le circuit.

4) ROLES DANS LA SIGNALISATION DU NEURONE ADULTE MATURE

A ce jour, peu d'informations existent quant au rôle du cil primaire dans le neurone mature et déjà intégré dans les réseaux. Le neurone est une cellule fondamentalement plastique et sujette à différentes formes de plasticités tout au long de son existence, comme la plasticité synaptique. Ainsi, le cil primaire pourrait influencer la physiologie neuronale en participant à différentes formes de plasticité, ces phénomènes pouvant potentiellement être contrôlés par des récepteurs à différents ligands, comme la sérotonine ou la somatostatine, dont des récepteurs serraient ciliaires (notamment les récepteur (5-HT₆ et Sstr3). Par exemple la stimulation du récepteur Sstr3 par un agoniste favorise la potentialisation à long terme (long-term potentiation : LTP) des neurones du CA1 (corne d'Amon 1) de l'hippocampe dans des tranches *ex vivo* (Einstein et al., 2010). De plus les animaux qui présentent une délétion du gène codant pour Sstr3 montrent des problèmes mnésiques dans le test comportemental de reconnaissance d'un nouvel objet.

Le cil primaire pourrait donc rester impliqué dans la physiologie du neurone adulte en participant à la fonction de récepteurs et de voies de signalisation importantes pour la plasticité.

Les cils primaires peuvent donc être associés à de très nombreuses voies de signalisations, qui contrôlent des phénomènes très diversifiés liés particulièrement au neuro-développement. Dans les cas vus précédemment, la formation de l'arborisation dendritique semble dépendre du cil primaire, mais par le biais de différentes voies de signalisation selon que l'on étudie différents types de neurones, comme les interneurons du striatum ou bien les neurones hippocampiques issus de la neurogénèse adulte (Guo et al., 2017; Kumamoto et al., 2012). Il semble donc que, suivant le type cellulaire étudié, les fonctions ciliaires puissent varier. Ces fonctions pourraient par exemple dépendre des types de récepteurs exprimés à la membrane des cils.

5) LES CILIOPATHIES

Les ciliopathies désignent un ensemble de pathologies très variées ayant toutes pour origine des mutations diverses au niveau de gènes codant pour des protéines impliquées dans la fonction des cils motiles et des cils primaires.

Plusieurs sont associées à des troubles neurologiques et psychiatriques, comme le syndrome de Joubert (retard mental, ataxie, développement anormal du cervelet), le syndrome de Bardet-Biedl (dégénérescence rétinienne, troubles cognitifs, obésité) ou encore le syndrome de Meckel (encéphalocèle occipitale) (Hildebrandt et al., 2011). On estime que la mutation de 80 gènes codant pour des protéines ciliaires seraient associées à des ciliopathies chez l'humain. En accord avec les rôles identifiés du cil dans le développement du système nerveux, la très grande majorité de ces mutations induisent des troubles neurologiques et neuro-développementaux (Guo et al., 2015).

Encore à ce jour, de plus en plus de pathologies du neuro-développement sont identifiées comme résultant d'une altération ciliaire. C'est le cas de certaines malformations focales du développement cortical pouvant être liées à des mutations de la protéine mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreux processus comme la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire ou encore la transcription de gènes (Hay and Sonenberg, 2004). Une étude récente montre que ces mutations se traduisent par des altérations de la fonction de mTOR dans les processus d'autophagie. Ceci entraîne

l'accumulation de la protéine OFD1 (*oral-facial-digital syndrome 1*) au niveau des centrosomes et l'altération de la formation du cil, mesurée par une réduction de la proportion de cellules présentant un cil, et des cils raccourcis (Park et al., 2018).

Un autre exemple récent est l'établissement d'un lien entre les pathologies résultant d'une altération de la fonction de l'appareil de Golgi, les golgipathies, et le cil primaire (Diaz et al., 2020). Yif1b (YIP1 interacting factor homolog b) est une protéine régulant le trafic du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi. Cette étude identifie l'existence de mutations du gène codant pour Yif1b chez des patients affectés par des retards du neuro-développement postnatal. La délétion Yif1b chez la souris induit un phénotype semblable à celui rencontré chez ces patients, notamment des défauts visuels et locomoteurs, ainsi qu'une atrophie du cervelet. De plus, la délétion de Yif1b induit des altérations diverses au niveau des cils primaires. Les cils des cellules de Purkinje du cervelet sont plus longs que chez les animaux de type sauvage, et les cils des neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe présentent des altérations au niveau des structures basales : un corps basal raccourci et une distance accrue entre le corps basal et le centrosome. De plus les fibroblastes dérivés de la peau des souris mutantes ou des patients présentent des cils raccourcis. Les mutations du gène codant pour Yif1b pourraient donc participer à l'apparition des symptômes neuro-développementaux en induisant divers défauts ciliaires (Diaz et al., 2020).

Pour conclure, les cils primaires ont pendant longtemps été négligés, mais depuis une vingtaine d'année, leur fonction, qui semble être critique pour de nombreux phénomènes développementaux et physiologiques du système nerveux central, commence à être de mieux en mieux comprise. Il reste bien sûr de très nombreuses choses à élucider, car les cils primaires semblent hétérogènes, et le panel de RCPG exprimés à leur surface indique leur implication dans des voies de signalisation et fonctions qui restent à étudier.

CHAPITRE 2 : LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

A) GENERALITES

Les RCPG forment une famille majeure de récepteurs. On les trouve chez les eucaryotes ainsi que chez certains procaryotes. L'importance des RCPG dans le monde vivant se manifeste par leur immense diversité (environ un millier de gènes codant pour des RCPG ont été identifiés dans le génome humain). Les RCPG reconnaissent des signaux externes très variés comme les odeurs, la lumière, mais aussi des signaux internes comme les hormones et neurotransmetteurs.

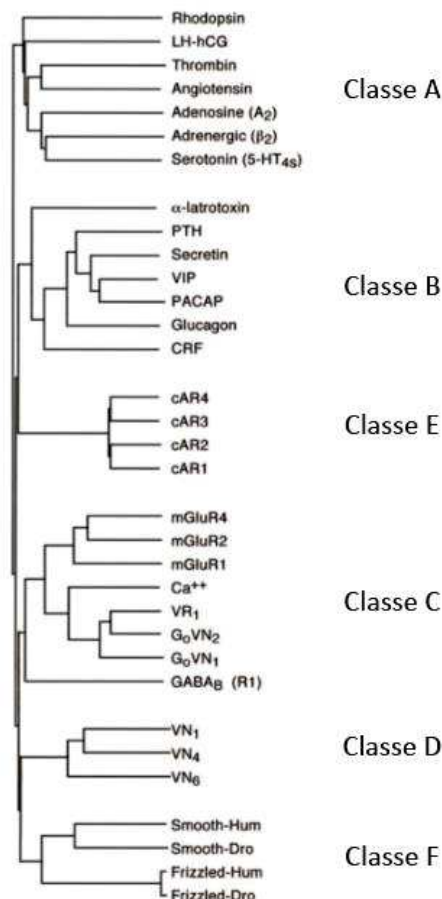


Figure 7 : Classification des RCPG

Classification et diversité des RCPG. Chaque classe présente de fortes homologues de séquence, qui n'existent pas entre les classes. Les récepteur métabotropiques de la sérotonine appartiennent à la classe A (rhodopsin-like). Adapté de Bockaert and Pin, 1999.

En plus de leur capacité à induire des cascades de signalisation intracellulaire en réponse à un signal extracellulaire, de nombreux RCPG possèdent une activité constitutive, indépendante de la présence du ligand extracellulaire (De Deurwaerdère et al., 2020; Seifert and Wenzel-Seifert, 2002). Les RCPG sont classés en 6 grandes

familles, ne montrant que très peu de similitudes de séquence entre elles : Les récepteurs de classe A (*rhodopsin-like*), B (*secretin receptors family*), C (*Glutamate family*), D, E et F (Frizzled/Smoothed) (figure 7). La classe A regroupe la grande majorité des RCPG. Bien que leurs fonctions soient très diverses, ils présentent tous une structure commune constituée de 7 domaines transmembranaires (de TM1 à TM7) reliés par 4 domaines extracellulaires (le domaine N-terminal et les domaines de e₁ à e₃) et 4 domaines intracellulaires (les domaines de i₁ à i₃ et le domaine C-terminal) (figure 8).

B) SIGNALISATION CANONIQUE (PROTEINES G)

Comme leur nom l'indique, les RCPG ont été originellement identifiés comme des récepteurs dont les fonctions sont médiées par leur couplage aux protéines G.

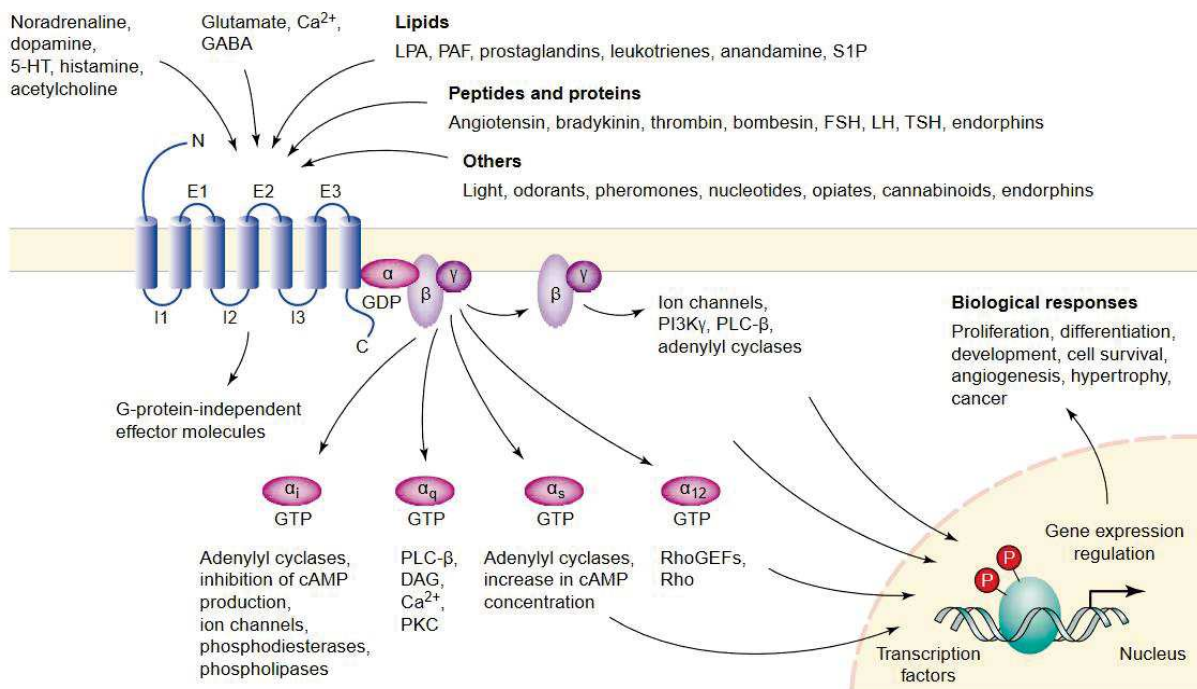


Figure 8 : Voies de signalisation canoniques associées aux RCPG

L'activation du RCPG induit des changements de conformation qui catalysent l'échange du GDP avec du GTP au niveau de la sous-unité α, ce qui provoque la dissociation de la sous-unité α du complexe βγ. Ces deux entités peuvent ensuite activer ou inhiber différentes voies de signalisation, qui elles-mêmes contrôlent de nombreux mécanismes. Adapté de Marinissen and Gutkind, 2001.

Les protéines G sont des hétérotrimères (sous-unités α , β et γ) liées aux RCPG dans leur forme inactive. L'activation du RCPG catalyse l'échange d'une molécule de guanosine diphosphate (GDP) par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) au niveau de la sous-unité α . Ceci induit la dissociation de la protéine G du récepteur et la dissociation de la sous-unité α des deux autres sous-unités (figure 8) (Goricanec et al., 2016).

Les protéines G sont classées en 4 familles principales selon la nature de la sous-unité α : Gai, Gas, Gaq et G α 12/13 (Syrovatkina et al., 2016). Chaque RCPG a un couplage préférentiel à un de ces types de protéines G, mais peut potentiellement être couplé à différentes protéines G (Lebon, 2020).

- La famille Gas est caractérisée par sa capacité à stimuler les adénylates cyclases (AC), les enzymes catalysant la transformation d'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc. La stimulation des AC induit une élévation des niveaux d'AMPc intracellulaire qui déclenche l'activation de différentes protéines comme la PKA, certains canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques, ainsi que le facteur d'échange directement activé par l'AMPc (ou exchange protein directly activated by cAMP, ou Epac) (Wettschureck and Offermanns, 2005).
- La famille Gai inhibe les AC et tous les effets associés.
- La famille Gaq active l'isoforme β de la phospholipase C (PLC), qui catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 induit l'ouverture de certains canaux calciques présents au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (ce qui induit l'élévation des niveaux de calcium cytosoliques), et le DAG active les protéines kinases C (PKC) (Wettschureck and Offermanns, 2005).
- La famille G α 12/13 induit l'activation de nombreuses protéines telles que les Rho GTPases ou les cadhérines (Syrovatkina et al., 2016).

Le rôle des sous-unités $\beta\gamma$ est moins connu, au départ vu comme un complexe protéique dont le seul rôle serait d'inhiber la sous-unité α , des études ont pu montrer qu'elles peuvent activer différentes protéines, comme les PLC, certains canaux calciques voltage-dépendants, la PI3K ou les *mitogen-associated protein kinases* (MAPK) (Khan et al., 2013).

C) SIGNALISATION ALTERNATIVE OU NON-CANONIQUE

Au-delà de ce modèle classique « RCPG $\rightarrow$ protéine G $\rightarrow$ second messagers », il est aujourd'hui bien établi que les RCPG peuvent interagir avec d'autres protéines que les protéines G (appelées « *GPCR interacting proteins* » ou « GIP ») (Bockaert et al., 2004). Les premières identifiées furent les kinases des RCPG (les GRK) (Benovic et al., 1986) et les β -arrestines (Kühn and Wilden, 1987), notamment les β -arrestines 1 et 2 (Attramadal et al., 1992), qui sont impliquées dans la désensibilisation des RCPG après activation. L'activation du RCPG par un ligand induit une modification de la conformation du RCPG, ce qui déclenche le recrutement de GRKs. Ces kinases phosphorylent en retour le récepteur, ce qui promeut le recrutement des β -arrestines. Les β -arrestines altèrent le couplage du récepteur aux protéines G et altèrent donc la transduction du signal. D'autres études ont montré que les β -arrestines peuvent aussi participer activement à l'endocytose de certains RCPG après leur activation en médiant le recrutement de la clathrine, une protéine structurelle clé de l'endocytose (Smith and Rajagopal, 2016). Enfin, plus récemment, mon laboratoire a montré que les β -arrestines sont aussi des protéines d'échafaudage essentielles pour le recrutement et l'activation des voies de signalisation liées aux kinases ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases* 1 et 2) (Cassier et al., 2017).

En plus des GRK et des β -arrestines, les RCPG peuvent interagir avec de nombreuses autres GIP qui régulent leur activité (Ritter and Hall, 2009) et leur trafic intracellulaire (Sauvageau et al., 2014). Les GIP peuvent même permettre aux RCPG de déclencher des voies de signalisation totalement indépendantes des protéines G. Par exemple le récepteur de l'angiotensine II AT1, canoniquement couplé à la protéine $G_{\alpha q}$, peut aussi recruter la *janus kinase 2* (Jak2) qui phosphoryle une protéine de la famille des STAT (*signal transducer and activator of transcription*). Cela permet l'activation de

mécanismes de transcription qui pourraient être à l'origine de l'effet de l'angiotensine II sur la croissance cellulaire (Godeny et al., 2007; Marrero et al., 1995). Un autre exemple est le recrutement du *Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor 1* (NHERF-1) au niveau du domaine C-terminal du récepteur adrénergique β_2 . Cette interaction permet au récepteur β_2 de contrôler les flux ioniques dans le rein de façon indépendante des protéines G (Hall et al., 1998).

Enfin, les RCPG eux-mêmes peuvent aussi être considérés comme des GIP. En effet de nombreuses études, majoritairement réalisées dans des systèmes de surexpression hétérologue *in vitro*, ont pu montrer que les RCPG peuvent former des complexes oligomériques, soit des homomères (complexes formés par le même récepteur), soit des hétéromères (complexes formés par des récepteurs différents) (Ferré et al., 2014). La fonction liée à un récepteur et son efficacité de transduction d'un signal peut changer selon qu'il soit sous forme monomérique, homomérique ou hétéromérique. Par exemple certains récepteurs métabotropiques du glutamate (les récepteurs mGlu) et du GABA (les récepteurs GABA_B) sont des dimères obligatoires, qui doivent être sous forme dimérique pour transduire correctement un signal (Pin and Bettler, 2016). Ils peuvent former des homodimères (les récepteurs mGlu₁ à mGlu₈) ou des hétérodimères (les dimères des récepteurs GABA_{B1A} et GABA_{B2} ou encore les dimères des récepteurs mGlu₂ et mGlu₄).

Ces oligomérisations peuvent aussi permettre des phénomènes de transactivation. Il existe plusieurs exemples de trans-phosphorylation de récepteur au sein d'un hétéromère. Parmi les études ayant démontré ce phénomène, on peut citer l'exemple de l'association du récepteur de la sérotonine 5-HT_{2A} avec le récepteur mGlu₂ (González-Maeso et al., 2008). L'activation du récepteur 5-HT_{2A} par la sérotonine favorise la phosphorylation du récepteur mGlu₂ sur son résidu sérine 843. Cette phosphorylation potentialise l'activation de la protéine Gai liée au récepteur mGlu₂ (Murat et al., 2019). Bien que ce concept d'oligomères de RCPG fut principalement étudié dans des systèmes d'expression hétérologue, aujourd'hui il existe des preuves de leur existence dans des systèmes natifs. En particulier, grâce à une caractérisation complète de son profil pharmacologique, l'hétéromère mGlu₂/mGlu₄ natif a pu être mis en évidence sur des tranches aigües d'hippocampe de souris (Moreno Delgado et al., 2017).

Les GIP peuvent être de natures très différentes et avoir des fonctions extrêmement variées, leur caractérisation est donc un enjeu aussi important que difficile. Les méthodes les plus puissantes à ce jour sont probablement celles qualifiées de « non-biaisées », comme la protéomique. Cette approche permet d'identifier un grand nombre de protéines dans un échantillon par spectrométrie de masse, sans *a priori* sur la nature de ces protéines.

Dans cette thèse, je me suis intéressé au récepteur de la sérotonine 5-HT₆, probablement un des RCPG dont les partenaires protéiques (qui composent son « interactome ») ont été le mieux caractérisés grâce à différentes approches de protéomique (Chaumont-Dubel et al., 2019; Duhr et al., 2014; Meffre et al., 2012). Ces approches ont permis d'identifier des partenaires encore inconnus du récepteur 5-HT₆, ainsi que de nouveaux rôles du récepteur que je vais décrire dans la prochaine partie.

CHAPITRE 3 : LA SÉROTONINE ET SES RECEPTEURS

A) LA SÉROTONINE

1) DECOUVERTE

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine qui a été isolée et identifiée pour la première fois au milieu du 20^{ième} siècle. En 1937, le groupe de Vittorio Erspamer de l'université de Pavie en Italie isole une molécule produite par les cellules entérochromaffines de la muqueuse gastrique du lapin (Vialli and Erspamer, 1937). Cette molécule provoque la contraction des intestins du rat et de la souris ainsi que de l'utérus du rat. Ils la nomment « entéramine ». En 1948, l'équipe d'Irvine Page, qui travaillait sur l'hypertension, isole à partir de sérum du sang de bœuf une molécule vasoconstrictrice. Il l'appellent sérotonine, pour son origine sérique et son effet tenseur des vaisseaux sanguins (Rapport et al., 1948a; Rapport et al., 1948b). L'année suivante, la structure chimique de la sérotonine est élucidée (Rapport, 1949). En 1952 l'identification de la structure de l'entéramine permet de déterminer que ces deux molécules sont en fait identiques. C'est le nom de sérotonine qui restera la seule alternative à celui de 5-HT (Erspamer and Asero, 1952).

La sérotonine fut ainsi découverte au niveau périphérique, mais son rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central du mammifère fut rapidement mis en évidence.

2) METABOLISME DE LA SÉROTONINE

La sérotonine est issue de deux réactions enzymatiques, impliquant dans l'ordre les Tryptophanes hydroxylases (TPH) et la L-Amino-acide aromatique Décarboxylase (AADC) (Figure 9). Il existe deux isoformes de TPH, notés TPH1 et TPH2. La TPH1 participe à la synthèse de la sérotonine au niveau périphérique et de la glande pinéale (laquelle utilise la sérotonine comme substrat de synthèse de la mélatonine). La TPH2, découverte plus tard, participe à la synthèse de la sérotonine au niveau des noyaux

du raphé dans le tronc cérébral, source majeure de la sérotonine au niveau central (Sugden, 2003; Walther et al., 2003; Walther and Bader, 2003).

La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel apporté par l'alimentation. Le tryptophane est hydroxylé par la TPH pour donner le 5-hydroxytryptophane (5-HTP). Ce dernier est finalement décarboxylé par l'AADC pour donner la 5-HT, la sérotonine (Figure 9, à gauche).

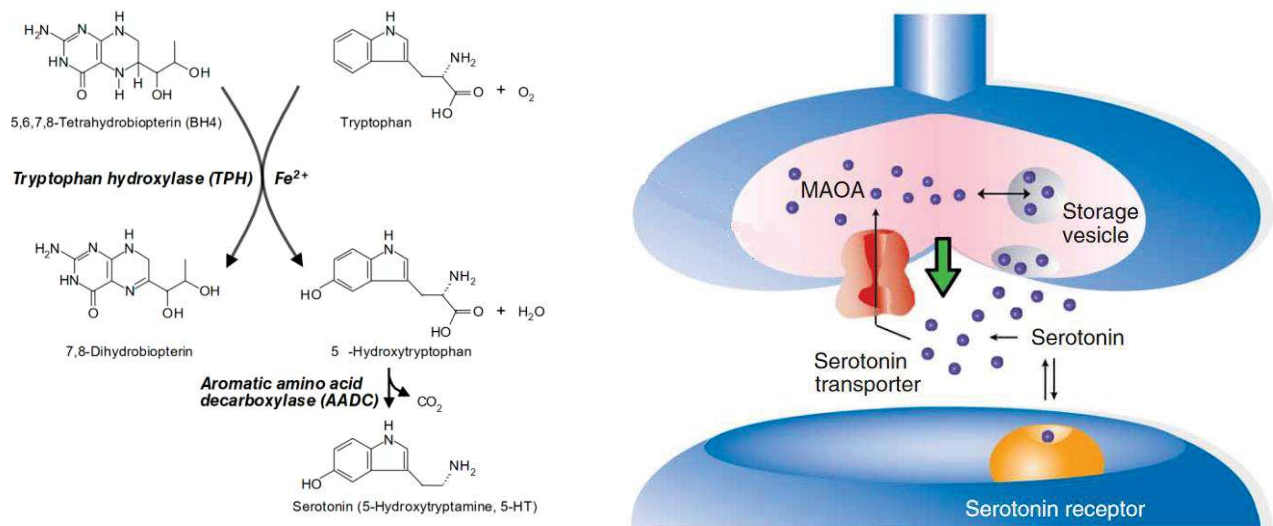


Figure 9 : Métabolisme de la sérotonine, libération et recaptage

Le tryptophane est hydroxylé au niveau du 5^{ème} carbone par les TPH pour donner le 5-HTP. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé pour donner la sérotonine. La sérotonine est stockée dans des vésicules avant d'être libérée dans l'espace extracellulaire. Elle peut alors se lier à ses différents récepteurs et/ou être recapturée par le transporteur SERT, puis est dégradée par les MAO. Adapté de Canli and Lesch, 2007 et Walther and Bader, 2003.

La sérotonine est stockée dans des vésicules via les transporteurs vésiculaires des monoamines (*Vesicular MonoAmine Transporters* ou VMAT), puis libérée dans le milieu extracellulaire. Une fois libérée, la sérotonine peut agir sur ses différents récepteurs. La sérotonine extracellulaire en excès est recapturée dans les cellules par le biais d'un transporteur spécifique, le transporteur de la sérotonine (*Serotonin Transporter* ou SERT). Elle peut ensuite être à nouveau stockée dans des vésicules ou bien être dégradée par des enzymes, les Monoamine Oxydases (MAO) A ou B qui

donnent comme produit de réaction enzymatique l'acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA).

Nous nous intéresserons ici uniquement à la sérotonine centrale produite par les noyaux du raphé.

3) LA SÉROTONINE DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL : ZONES DE PRODUCTION ET D'ACTION

Les neurones produisant la sérotonine centrale sont situés dans le tronc cérébral et s'étalent du bulbe rachidien jusqu'au mésencéphale en passant par le pont, en formant plusieurs noyaux nommés les noyaux du raphé (Dahlstroem et al., 1964; Hornung, 2003). Ils sont classiquement organisés sous forme de 9 noyaux (de B1 à B9) sur l'axe antéro-postérieur, le noyau B9 étant le plus antérieur et B1 le plus postérieur. Les noyaux les plus postérieurs (de B1 à B3) projettent leurs axones vers le tronc cérébral et la moelle épinière, le noyau B4 projette vers le cervelet, et les noyaux plus antérieurs (de B5 à B9) projettent dans tout le diencephale et le télencéphale, dans des régions aussi variées que le bulbe olfactif, le cortex cérébral, l'hippocampe, le striatum, le septum, l'amygdale, l'hypothalamus ou le thalamus. (Charnay and Léger, 2010; Pollak Dorocic et al., 2014) (Figure 10).

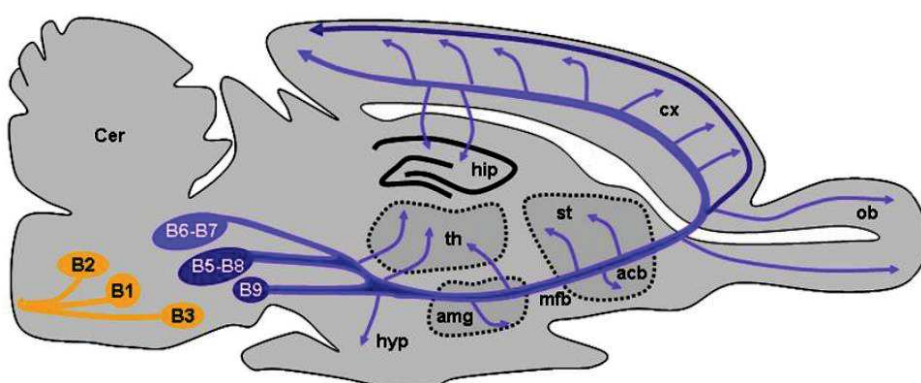


Figure 10 : Innervation du système nerveux central par les noyaux du raphé
Schéma de l'innervation sérotoninergique du cerveau murin mature. Les noyaux postérieurs (de B1 à B3) projettent dans le tronc cérébral et la moelle épinière, les noyaux antérieurs (de B5 à B9) projettent dans le diencephale (thalamus et hypothalamus) et le télencéphale (amygdale, striatum, hippocampe, cortex, bulbe olfactif). Adapté de Vitalis et al., 2013.

L'immense variété des cibles des noyaux du raphé illustre bien le rôle ubiquitaire que joue la sérotonine dans la physiologie du système nerveux central.

On détecte la présence de sérotonine dès le jour embryonnaire E10 chez la souris, E12 chez le rat et à partir du troisième trimestre de grossesse chez l'humain (Bonnin et al., 2011). Les neurones sérotoninergiques du raphé commencent à se différencier au même moment. L'innervation de leurs cibles se produira tout au long du développement, ainsi la sérotonine produite par les noyaux du raphé n'aura un impact qu'assez tardivement (à partir d'environ E16 chez le rat). Avant ce stade, c'est la sérotonine maternelle qui joue un rôle majeur dans le développement, avant que la barrière hémato-encéphalique se mette en place de manière définitive (Bonnin et al., 2011; Velasquez et al., 2013).

4) LA SEROTONINE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL : PRINCIPALES FONCTIONS

Plusieurs approches ont permis d'étudier les fonctions centrales de la sérotonine. Premièrement, la quantité disponible de l'acide aminé précurseur, le tryptophane, peut influencer les niveaux de synthèse de sérotonine. Des approches génétiques chez les modèles murins ont aussi été développées. L'invalidation des gènes des différentes TPH, de SERT, de transporteurs vésiculaires ou de ses récepteurs permettent d'influencer à plusieurs niveaux les actions de la sérotonine (Charnay and Léger, 2010; Göthert, 2013; Vitalis et al., 2013).

Souvent vue comme « l'hormone du bonheur » à cause de l'efficacité de certains inhibiteurs de sa recapture (les « Serotonin selective reuptake inhibitors, ou SSRI, qui inhibent SERT) dans le traitement de troubles dépressifs (Wong and Licinio, 2004), les rôles de la sérotonine sont néanmoins bien plus larges que son influence sur l'humeur.

Chez le mammifère adulte, elle est impliquée dans la régulation de phénomènes homéostatiques de base (comme la thermorégulation ou la respiration). Elle participe aussi à de nombreux mécanismes complexes liés à la cognition et au comportement, comme les mécanismes mnésiques, l'attention, le sommeil, les rythmes circadiens, la motricité, la récompense ou encore la sociabilité. La sérotonine n'a pas forcément un impact direct dans la régulation de ces fonctions, mais peut agir en tant que régulateur d'autres systèmes de neurotransmetteurs. Par exemple les noyaux du raphé

contrôlent la transmission dopaminergique dans plusieurs structures comme le cortex préfrontal, le striatum, l'amygdale ou l'aire tegmentaire ventrale (VTA) (Olvera-Cortés et al., 2008).

Diverses approches génétiques ont aussi permis d'identifier des rôles de la sérotonine lors du neuro-développement. Par exemple l'invalidation du gène codant pour la TPH2 chez la souris (TPH2^{-/-}), qui réduit à 95% les taux de sérotonine centrale, induit un retard de développement du cortex pendant la période postnatale (Narboux-Nême et al., 2013). Ce phénotype est aussi retrouvé chez des souris invalidées pour le gène codant pour VMAT2, le transporteur vésiculaire de la sérotonine, spécifiquement dans les neurones exprimant SERT. Notons que les souris sont totalement viables et que ce retard de développement est ensuite rattrapé, mais des altérations plus subtiles à étudier et à long terme peuvent tout de même être possibles. De même, il est possible que des comorbidités puissent impacter ce phénotype plus lourdement.

Si la diminution des taux de sérotonine centrale est délétère pour les processus neuro-développementaux, il en est de même pour l'élévation des taux de sérotonine centrale. Par exemple, des mutations de SERT qui altèrent sa fonction de recapture, et donc provoquent des taux de sérotonine extracellulaire élevés, induisent un ralentissement de la migration tangentielle des neurones GABAergiques (Riccio et al., 2009). Dans le même sens, une application de sérotonine sur des tranches *ex vivo* de cerveau en développement induit un ralentissement de la vitesse de migration radiale des neurones pyramidaux (Riccio et al., 2011). L'excès de sérotonine semble altérer d'autres phénomènes que la migration. Par exemple le blocage temporaire de SERT par la fluoxétine chez la souris pendant la période postnatale (entre P4 et P21) provoque des comportements anxieux à l'âge adulte (Karpova et al., 2009). Ainsi la sérotonine pourrait affecter plusieurs étapes neuro-développementales.

Les méthodes permettant de moduler les niveaux de sérotonine ne permettent cependant pas d'étudier le système sérotoninergique en détail. Ainsi, l'étude précise de ses récepteurs est indispensable.

B) LES RECEPTEURS DE LA SÉROTONINE

1) DECOUVERTE

L'histoire de la découverte des différents récepteurs de la sérotonine s'étale sur la seconde moitié du 20^{ème} siècle. Dans les années 1950, Gaddum et Picarelli décrivent que la contraction de l'intestin du cochon d'Inde induite par la sérotonine peut être inhibée totalement par la dibenzylamine, et partiellement par la morphine (Gaddum and Picarelli, 1957). Cela suggère l'existence d'au moins deux récepteurs de la sérotonine, qu'ils nomment les récepteurs D (ayant une affinité pour la dibenzylamine) et M (affinité pour la morphine). Plus tard des études utilisant des ligands marqués radioactivement ($[^3\text{H}]5\text{HT}$ et $[^3\text{H}]\text{LSD}$), ciblant avec des affinités différentes les récepteurs de la sérotonine, permettent de visualiser plusieurs d'entre eux (Peroutka and Snyder, 1979). Dans les années 1980, une classification en 3 familles de récepteurs est proposée : les récepteurs 5-HT₁-like, 5-HT₂ et 5-HT₃ (Bradley et al., 1986). Finalement, les grands progrès en biologie moléculaire des années 1980 et 1990 ont permis le clonage de tous les récepteurs de la sérotonine connus à ce jour.

Chez les mammifères, les récepteurs de la sérotonine sont aujourd'hui au nombre de 14, classés en 7 grandes familles (de 5-HT₁ à 5-HT₇) en fonction de leur séquence et des voies de signalisation qu'ils contrôlent. A l'exception du récepteur 5-HT₃, qui est un récepteur ionotrope, les récepteurs de la sérotonine sont tous des RCPG. Le récepteur 5-HT₆ fut l'un des derniers découverts par clonage en 1993 (Monsma et al., 1993; Ruat et al., 1993). L'historique de la découverte et la classification des différents récepteurs de la sérotonine est récapitulé dans la figure 11. Ces récepteurs sont exprimés dans des régions cérébrales différentes, au niveau de types cellulaires différents ou encore dans des compartiments cellulaires différents. Ils sont également

couplés à des voies de signalisation différentes. Ils permettent donc à une seule molécule, la sérotonine, de moduler une grande diversité de phénomènes.

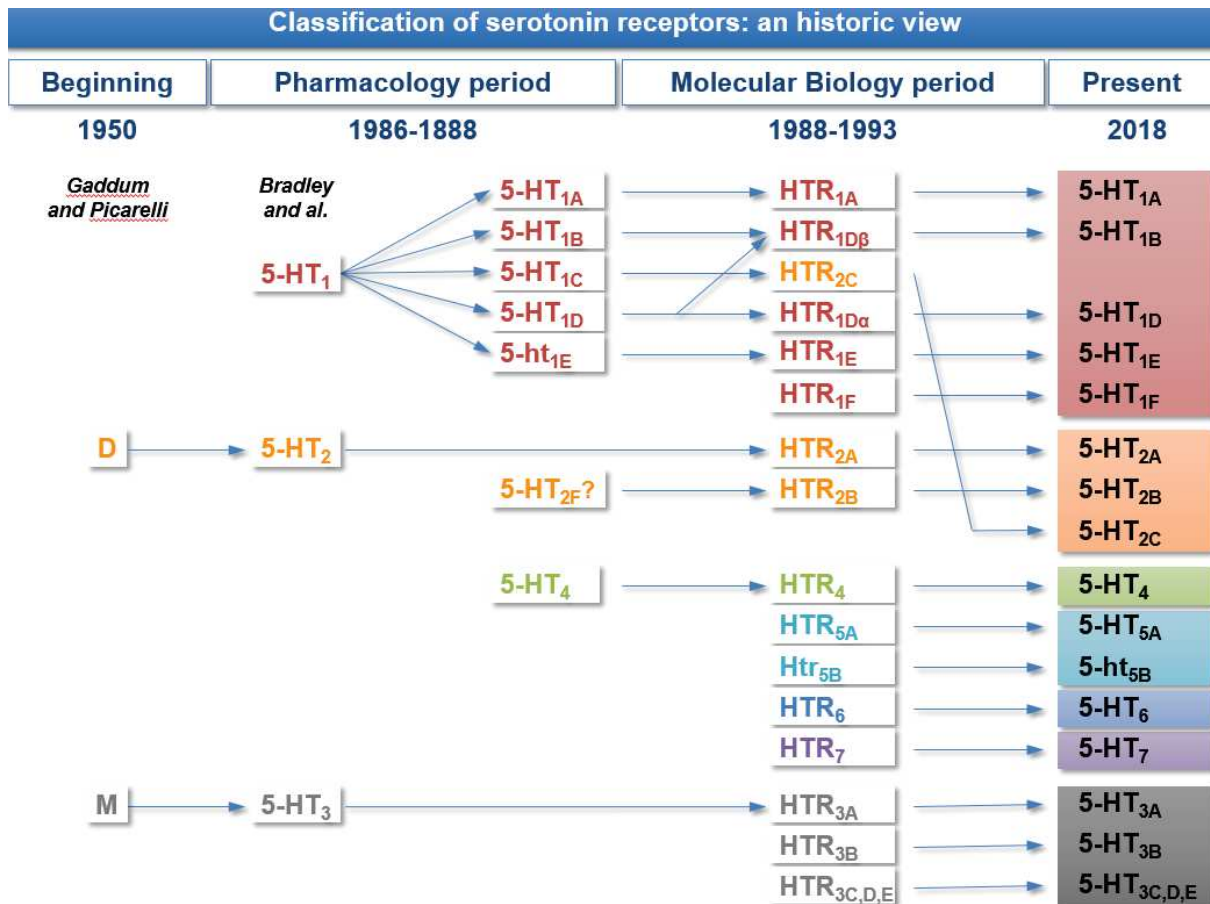


Figure 11 : Evolution de la classification des récepteurs de la sérotonine

Evolution de la classification des récepteurs de la sérotonine, de la première classification établie par Gaddum et Picarelli jusqu'au consensus aujourd'hui obtenu grâce au clonage des récepteurs. Adapté du "Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin, Volume 31 - 2nd Edition,".

2) COUPLAGES AUX PROTEINES G ET AUTRE VOIES DE SIGNALISATION

D'un point de vue du couplage aux protéines G, les 6 familles de RCPG (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇) peuvent être rassemblées en 3 groupes : classiquement, les récepteurs des familles 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}) et 5-HT₅

(5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}) sont couplés aux protéines Gai/o, les récepteurs de la famille 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}) sont couplés aux protéines Gαq, et les récepteurs des familles 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ sont couplés aux protéines Gαs (Figure 8). Ces couplages ne sont pas figés, et de nombreux exemples montrent une certaine flexibilité dans le couplage des récepteurs de la sérotonine aux protéines G. Par exemple le récepteur 5-HT_{2A}, canoniquement couplé aux protéines Gαq, peut aussi activer les protéines de la famille Gai/o quand il est stimulé par des ligands hallucinogènes comme l'acide lysergique diéthylamide (le LSD) (González-Maeso et al., 2007). Le récepteur 5-HT_{2C}, aussi couplé canoniquement aux protéines Gαq, peut aussi être couplé aux protéines Gα13 pour activer la phospholipase D (PLD) (McGrew et al., 2002). Le récepteur 5-HT₄ est couplé principalement aux protéines Gαs, mais des couplages aux protéines Gai/o et Gα13 ont aussi été décrits (Bockaert et al., 2006; Pindon et al., 2002; Ponimaskin et al., 2002). Enfin, le récepteur 5-HT₇, aussi couplé aux protéines Gαs, peut induire l'activation de protéines Gα12, ce qui induit des modifications de morphologie cellulaire médiés par les GTPases Rho-A et Cdc42 (Guseva et al., 2014; Kvachnina et al., 2005).

Au-delà de ces couplages aux protéines G, les récepteurs de la sérotonine, comme de nombreux autres RCPG, sont associés à des GIP qui forment des interactomes complexes. Ces GIP régulent la fonction des RCPG, et leur permettent de contrôler différentes voies de signalisation intracellulaires (Marin et al., 2012). Les deux principales approches expérimentales qui ont été utilisées afin d'identifier des interactions physiques entre les RCPG et leurs partenaires sont la technique de double-hybride chez la levure, et les approches de protéomique. La technique de double-hybride permet d'étudier l'interaction physique entre deux peptides de synthèse, elle suppose donc de choisir un ensemble de peptides à étudier. A l'inverse, les approches de protéomique sont considérées comme non-biaisées. Pour ces approches, on procède classiquement à la purification du récepteur et de ses interacteurs potentiels par co-immunoprécipitation. Les protéines purifiées sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Une limite de ces expériences est qu'on ne peut étudier le récepteur endogène qu'à la condition d'avoir un anticorps capable d'immunoprécipiter le récepteur à partir de tissus. En l'absence de tels outils, on peut utiliser des systèmes de surexpression hétérologue des récepteurs étiquetés *in vitro*. Cette approche permet d'étudier le récepteur dans son entièreté, mais

l'inconvénient est qu'on étudie dans ce cas le récepteur en dehors de son contexte physiologique, et à un taux d'expression en général supérieur à son expression physiologique. Pour pallier à ce problème, il est possible de combiner cette approche avec des expériences de GST (Gluthatione-S-Transferase) pull-down. Elles consistent à exprimer une protéine de fusion constituée d'une GST liée à un peptide de synthèse composé de la séquence protéique du domaine du récepteur pour laquelle on recherche des partenaires, qu'on appelle l'appât. Dans le cas des RCPG, c'est en général le domaine C-terminal intracellulaire (Bockaert et al., 2003).

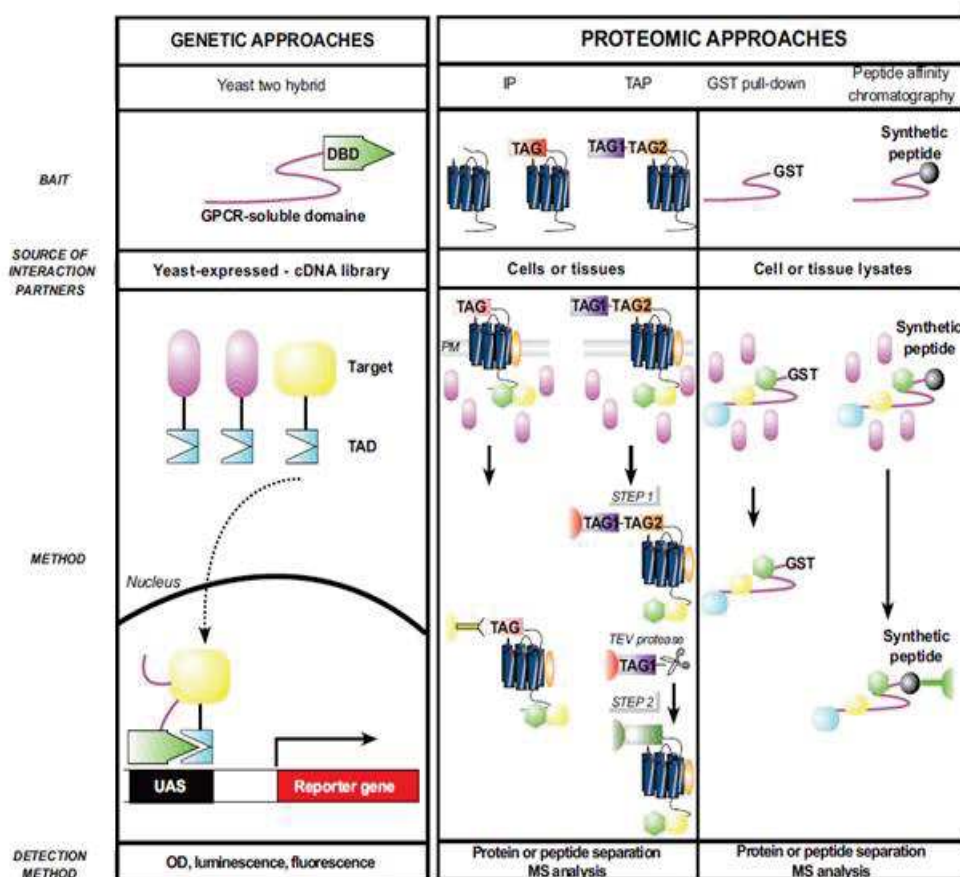


Figure 12 : Méthodes permettant l'identification des interactions entre les RCPG et les GIP

L'approche de double-hybride dans des levures (« Genetic approaches » à gauche) permet d'étudier l'interaction entre deux peptides de synthèse couplés à des protéines qui favorisent la transcription d'un gène rapporteur en cas d'interaction. Les approches de protéomique combinées à la spectrométrie de masse permettent d'étudier de manière non-biaisée des interactions avec un récepteur entier exprimé dans des systèmes d'expression hétérologue (au milieu) ou des interactions entre un peptide de synthèse et des protéines présentes dans un lysat (à droite). (Marin et al., 2012).

Le complexe formé par l'appât et les interacteurs peut ensuite être purifié et analysé par spectrométrie de masse (figure 12).

Par ces différentes méthodes, les interactomes de certains récepteurs de la sérotonine ont été étudiés en détail.

Les GIP associées aux récepteurs de la sérotonine, comme pour les autres RCPG, peuvent être de natures très différentes et avoir de nombreux rôles. Elles peuvent permettre par exemple de réguler le trafic intracellulaire de ces récepteurs. C'est le cas par exemple de l'interaction entre 5-HT_{1A} et Yif1B. La méthode de double hybride a permis d'identifier l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et la protéine Yif1B au niveau du domaine C-terminal du récepteur. Cette interaction a été validée par *GST pull down* à partir de lysats de cerveaux de rats. Yif1B fut ensuite identifiée comme étant indispensable à l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} au niveau des parties distales des dendrites de neurones hippocampiques en culture. (Carrel et al., 2008).

Plusieurs des récepteurs de la sérotonine possèdent des domaines de reconnaissance aux protéines contenant des domaines PSD-95/Disc large/Zonula occludens-1 (PDZ) au niveau de leur domaine C-terminal. C'est le cas des récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} et certains variants d'épissage du récepteur 5-HT₄. Ces domaines de liaisons permettent l'ancrage des récepteurs aux protéines PDZ qui peuvent assurer plusieurs rôles dont l'adressage et la compartimentalisation subcellulaire des récepteurs. Par exemple le récepteur 5-HT_{2A} interagit avec les protéines *Multi-PDZ protein 1* (MUPP1), *Post-synaptic density 95* (PSD-95), *Membrane-associated guanylate kinase with inverted domain structure2* (MAGI2), *synapse-associated protein* (SAP)97, *Channel PDZ interacting protein* (CIPP), *MAGUK p55 subfamily member 2* (MPP2) et 3 (MPP3) (Becamel et al., 2001; Becamel et al., 2004; Pichon et al., 2010). L'interaction du récepteur 5-HT_{2A} avec PSD-95 notamment est requise pour l'adressage du récepteur au niveau des dendrites (Allen et al., 2008; Xia et al., 2003).

Certaines GIP permettent aussi à ces récepteurs de contrôler de nombreuses voies de signalisation. La calmoduline par exemple peut interagir avec le récepteur 5-HT_{1A} au niveau de son domaine intracellulaire i₃. Cette interaction facilite l'internalisation du récepteur 5-HT_{1A}, promeut l'activation des voies de signalisations liées aux ERK1/2 ou encore module la phosphorylation du récepteur 5-HT_{1A} par la PKC (Della Rocca et al., 1999; Turner et al., 2004). Autre exemple, le récepteur 5-HT_{2C} interagit avec la

phosphatase and tensin homologue (PTEN) au niveau de son domaine i₃. PTEN est une phosphatase qui régule négativement la voie de signalisation Akt/PkB. L'interaction entre PTEN et le récepteur 5-HT_{2C} a été montrée dans la VTA, une région cérébrale impliquée dans la récompense et les phénomènes d'addiction. L'altération de l'interaction entre PTEN et le récepteur par des peptides interférant réduit la fréquence de décharge des neurones de la VTA et prévient l'effet récompensant du tetrahydrocannabinol (THC) et de la nicotine (Ji et al., 2006).

Depuis 2007, les approches de double-hybride et protéomique ont permis d'identifier plus de 120 partenaires potentiels du récepteur 5-HT₆ (Chaumont-Dubel et al., 2019). Cela fait du récepteur 5-HT₆ l'un des RCPG dont l'interactome a été le plus caractérisé. Nombreuses de ces interactions doivent encore être validées *in vivo* et leur rôle doit être étudié. Néanmoins, l'identification de ces partenaires a déjà permis de démontrer plusieurs rôles du récepteur 5-HT₆, notamment dans le neuro-développement. Par exemple le récepteur 5-HT₆ a pu être identifié comme un acteur important des phénomènes de migration radiale des neurones corticaux et d'initiation de la pousse neuritique médiés par la kinase Cdk5 (Duhr et al., 2014; Jacobshagen et al., 2014).

C) LE RECEPTEUR 5-HT₆

1) DECOUVERTE

Le récepteur 5-HT₆ est le dernier récepteur de la sérotonine identifié. Il a été découvert chez le rat par deux laboratoires en 1993 (Monsma et al., 1993; Ruat et al., 1993) à partir d'une banque d'ADN codant (ADNc) venant du striatum. Le récepteur humain a été séquencé en 1996 (Kohen et al., 1996), et le récepteur de souris en 2001 (Kohen et al., 2001).

2) LOCALISATION

a) Structures cérébrales exprimant le récepteur

En réalisant des expériences de Northern Blot à partir d'extraits de cerveaux de rats, Monsma et al. en 1993 ont observé une très forte abondance d'ARNm codant pour ce

récepteur dans le striatum du rat. Ils observent aussi la présence d'ARNm dans les tubercules olfactifs, le cortex cérébral et l'amygdale, mais ne détectent rien dans l'hippocampe et l'hypothalamus.

L'étude de Ruat et al publiée la même année, en utilisant des approches de Northern Blot et d'hybridation *in situ* (ISH) montre aussi une très forte expression du récepteur dans le striatum du rat. Ils observent également la présence d'ARNm dans le cortex cérébral et, contrairement à l'étude précédente, dans l'hippocampe et l'hypothalamus. A la périphérie, ils identifient aussi une faible expression de ce récepteur dans l'estomac. Chez le cochon d'Inde, ils observent un schéma d'expression légèrement différent : le récepteur est exprimé dans le striatum, les tubercules olfactifs et le cortex, mais aussi dans le cervelet, le tronc cérébral et les bulbes olfactifs.

L'équipe de Michel Hamon, en utilisant la RT-PCR sur des échantillons de cerveau de rat observent la présence d'ARNm codant pour le récepteur dans le striatum, les tubercules olfactifs, le cortex, l'hippocampe, la VTA, la substance noire et le cervelet (Gérard et al., 1996).

Yoshioka et al. en 1998 confirment par ISH la localisation du récepteur dans le striatum, les tubercules olfactif, l'hippocampe et le cortex chez le rat (Yoshioka et al., 1998).

Kohen et al. en 1996 identifient un schéma d'expression chez l'humain semblable à celui du rat, avec une expression majoritairement dans le striatum, puis dans l'hippocampe et l'amygdale, avec de faibles niveaux d'expression dans la substance noire, le thalamus et les noyaux sous-thalamiques, le cortex n'ayant pas été étudié (Kohen et al., 1996).

Ces approches permettant d'étudier l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT₆ donnent des résultats relativement cohérents entre les études, mais certaines divergences sont difficilement explicables. D'autres approches sont donc indispensables à l'étude du schéma d'expression du récepteur.

L'équipe de Michel Hamon est la première à produire un anticorps permettant de cibler directement le récepteur. Les expériences réalisées sur des coupes de cerveau de rat montrent un immunomarquage au niveau des tubercules olfactifs, du striatum, du cortex, de l'hippocampe et du cervelet (Gérard et al., 1997; Hamon et al., 1999). Ces

résultats correspondent globalement aux résultats obtenus précédemment par Northern Blot et ISH, à part au niveau du cervelet. En effet, cet anticorps révèle une quantité importante de récepteur dans le cervelet, alors que les études précédentes ont montré qu'il ne contient que très peu ou pas d'ARNm codant pour le récepteur, ce qui remet en cause sa spécificité.

Publication	Technique	Espèce	Cortex	Hippocampe	Striatum	Hypothalamus	Cervelet	Amygdale	Bulbe rachidien	Bulbes olfactifs	Tubercules olfactifs	Thalamus
(Monsma et al., 1993)	Northern Blot	Rat	+	-	+	-	Ø	+	-	-	+	-
(Ruat et al., 1993)	Northern Blot + Hybridation <i>in situ</i>	Rat	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	+	+	-
(Gérard et al., 1996)	RT-PCR	Rat	+	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
(Kohen et al., 1996)	Northern Blot	Humain	Ø	+	+	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	+
(Gérard et al., 1997)	Immunohistochimie	Rat	+	+	+	Ø	+	Ø	Ø	Ø	+	+
(Yoshioka et al., 1998)	Hybridation <i>in situ</i>	Rat	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø
(Hirst et al., 2003)	Ligand marqué radioactivement	Humain/rat	-	-	+	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	-
(Helboe, Egebjerg, et de Jong, 2015)	Hybridation <i>in situ</i>	Rat	+	+	+	+	-	+	Ø	Ø	+	+

Figure 13 : Tableau récapitulatif des études de caractérisation de l'expression du récepteur 5-HT₆
 Identification de l'expression du récepteur (+) ou non (-). Dans plusieurs études, certaines régions n'ont pas été étudiées (Ø).

Le récepteur 5-HT₆ semble donc exprimé de façon robuste dans le striatum, le cortex cérébral et l'hippocampe (figure 13). En revanche, son expression dans les autres structures reste à confirmer.

Ce schéma d'expression est intéressant car ces 3 structures sont toutes impliquées dans différents mécanismes cognitifs majeurs. Le striatum est une structure sous-corticale faisant partie des ganglions de la base, il est constitué de plusieurs sous-structures (le noyau caudé-putamen, le noyau accumbens), qui reçoivent des projections notamment dopaminergiques et glutamatergiques de nombreuses structures. Il est impliqué dans la motricité, la motivation, la récompense et le conditionnement de type Pavlovien.

L'hippocampe est une structure du système limbique responsable de nombreux phénomènes liés à la mémoire, que ce soit la mémoire épisodique ou la mémoire spatiale. C'est un centre d'intégration multisensorielle majeur permettant la formation des souvenirs et leur réactivation à long terme.

Enfin le cortex cérébral est probablement la structure du cerveau la plus complexe et diversifiée dans ses rôles. Il est organisé en 6 couches, chacune contenant des neurones ayant des morphologies et des fonctions différentes. Le cortex possède un ensemble d'aires servant de centres intégrateurs majeurs des informations sensorielles, qu'elles soient somatosensorielles, auditives ou visuelles par exemple. Il permet également le contrôle du mouvement volontaire (cortex moteur) et des fonctions cognitives que l'on qualifie de « supérieures », c'est à dire des fonctions cognitives en général volontaires et hautement complexes (cortex frontal et préfrontal). Parmi celles-ci, on trouve la planification, la prise de décision dans des environnements complexes (comme les interactions sociales), la mémoire de travail, ainsi que certaines formes d'expression (comme la parole). Ces dernières fonctions, bien que particulièrement évoluées chez les primates, qui ont un cortex préfrontal très développé, sont aussi présentes chez d'autres mammifères comme les rongeurs.

Le récepteur 5-HT₆ semble particulièrement exprimé dans ces différentes régions, ce qui indique un rôle potentiellement important dans le contrôle de certaines formes de cognitions.

Pour connaître plus en détail le rôle du récepteur 5-HT₆, il est indispensable de connaître les types cellulaires qui l'expriment, afin de savoir à quels niveaux des circuits neuronaux ce récepteur est impliqué. Il est par exemple important de déterminer précisément dans quelles structures cérébrales le récepteur se trouve, s'il est exprimé par des neurones excitateurs ou inhibiteurs, et dans quels compartiments subcellulaires il est localisé. Je vais décrire les différentes études réalisées à ce sujet.

b) Types cellulaires exprimant le récepteur

Concernant les différents types cellulaires exprimant le récepteur 5-HT₆, peu d'études ont été réalisées à ce jour. On peut néanmoins citer le travail récent réalisé par l'équipe du Dr Inge De Jong qui a utilisé une approche d'ISH permettant, en utilisant différents marqueurs spécifiques de différents types cellulaires, de décrire avec précision les cellules exprimant le récepteur 5-HT₆ chez le rat (Helboe et al., 2015). Premièrement

cette étude confirme l'expression du récepteur majoritairement dans le striatum, l'hippocampe et le cortex. Cette étude montre aussi que le récepteur est exprimé exclusivement dans les neurones, aucune expression n'étant détectable au niveau des astrocytes exprimant la *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Dans toutes les régions étudiées, les neurones exprimant le récepteur sont majoritairement des neurones de projection, mais il est également présent dans un faible pourcentage d'interneurones.

Dans le cortex et l'hippocampe, les neurones de projection sont des neurones excitateurs glutamatergiques, alors que dans le striatum, les neurones de projection sont des neurones inhibiteurs GABAergiques : les « medium spiny neurons » (MSN). Ainsi le récepteur 5-HT₆ pourrait agir directement sur différents systèmes de neurotransmetteur : les systèmes glutamatergique et GABAergique.

c) Localisation subcellulaire du récepteur

Du point de vue de la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT₆, les premières informations remontent aux études d'immunomarquages de l'équipe de Michel Hamon. Les marquages indiquent une localisation du récepteur dans les dendrites et particulièrement dans les épines dendritiques (Gérard et al., 1997). Divers anticorps dirigés contre le récepteur ont été commercialisés depuis, mais leur spécificité et leur sensibilité n'est pas suffisante pour permettre une cartographie précise du récepteur *in vivo*.

Les immunomarquages initiaux suggéraient également que le récepteur pourrait être localisé au niveau de structures ressemblant à des cils primaires, notamment dans le striatum (Brailov et al., 2000; Hamon et al., 1999). De nombreuses autres études ont permis d'observer une localisation ciliaire du récepteur 5-HT₆, par des méthodes de transfection de versions étiquetées du récepteur *in vitro* (Berbari et al., 2008a; Guadiana et al., 2013; Hu et al., 2017; Jiang et al., 2019; Kohli et al., 2017; Lesiak et al., 2018). Il est important de noter que pour observer une localisation uniquement ciliaire du récepteur, le niveau d'expression du récepteur doit être suffisamment faible. En effet, la surexpression du récepteur conduit à sa localisation au niveau de la membrane somato-dendritique (Duhr et al., 2014; Lesiak et al., 2018; Pujol et al., 2020). L'équipe du Dr. John F. Neumaier a pu démontrer par immunomarquage que le récepteur 5-HT₆ endogène était localisé majoritairement dans les cils primaires dans le striatum de souris (Brodsky et al., 2017). Il a pour cela validé la spécificité de

l'anticorps utilisé (sc-26668; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en utilisant une souche de souris Knock-Out (KO) pour le récepteur 5-HT₆. Cet anticorps n'est malheureusement plus disponible commercialement aujourd'hui, mais d'autres études l'ayant utilisé ont montré une localisation à la membrane du corps cellulaire, que ce soit au niveau du canal artériel fœtal chez la souris (Hooper et al., 2016), au niveau des neurones pyramidaux du cortex préfrontal chez l'humain adulte (Lorke et al., 2006), et, dans un contexte de recherche sur la maladie de Parkinson, dans des neurones dopaminergiques issus de cellules fœtales murines (rat), de cellules fœtales humaines, et de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) (Aldrin-Kirk et al., 2016). Ces dernières données sont surprenantes étant donné que l'anticorps utilisé est identique. Une source de divergence pourrait venir des protocoles d'immunomarquages différents. Ces études ne se sont en revanche pas intéressées à une possible localisation ciliaire du récepteur.

Nous avons donc une vision assez générale des régions d'expression du récepteur 5-HT₆, certaines informations restent contradictoires, notamment car il est impossible pour le moment de réaliser une étude sûre par immunomarquage pour visualiser directement le récepteur endogène. Cela permettrait de mieux caractériser les régions dans lesquelles le récepteur est exprimé, les types cellulaires qui l'expriment, ainsi que sa localisation subcellulaire. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouveaux outils permettant l'étude du récepteur endogène.

3) SIGNALISATION (PROTEINE G ET INTERACTOME)

a) Couplage aux protéines G

Les premières informations concernant les voies de signalisation liées au récepteur 5-HT₆ remontent à sa découverte en 1993. Dans l'étude de Ruat et al., en 1993, l'expression du récepteur de rat dans des cellules COS-7 provoque une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire suite à une stimulation par la sérotonine, indiquant un couplage positif à l'adénylate cyclase et donc aux protéines G_s. Ce couplage est confirmé dans des cultures de neurones de striatum venant d'embryons de souris, montrant que le récepteur endogène est aussi positivement couplé à l'adénylate cyclase (Sebben et al., 1994). Le récepteur 5-HT₆ de souris, exprimé dans des cellules

JEG-3 et COS-7 peut aussi induire la production d'AMPc. Ce couplage est également présent *in vivo* (Deraredj Nadim et al., 2016). Ces différentes études montrent aussi que le récepteur 5-HT₆ présente une activité constitutive, l'expression du récepteur provoquant l'augmentation du taux d'AMPc même en l'absence de ligand.

b) Couplage aux GIP

Les premières informations concernant les GIP associées au récepteur 5-HT₆ remontent à 2007. Le groupe de Hyewhon Rhim identifie, grâce à la technique de double-hybride en utilisant la partie C-terminale du récepteur, un nouveau partenaire potentiel du récepteur 5-HT₆ : la protéine Fyn (Yun et al., 2007). Fyn est une tyrosine kinase pouvant être impliquée dans de nombreux phénomènes dans le système nerveux central, comme la potentialisation à long-terme (LTP), la mémoire spatiale et le développement de l'hippocampe (Grant et al., 1992). Cette interaction a été validée dans des systèmes de surexpression hétérologue avec les protéines complètes, puis dans des lysats de cerveaux de souris grâce à la technique de *GST pull-down* en utilisant la partie C-terminale du récepteur comme appât. D'un point de vue fonctionnel, la stimulation du récepteur 5-HT₆ par la sérotonine promeut l'auto-phosphorylation de Fyn sur son résidu tyrosine 420. De plus, l'activation de Fyn par le récepteur 5-HT₆ induit l'activation des kinases ERK1/2. L'expression de Fyn augmente aussi l'activité du récepteur 5-HT₆ au niveau de la voie G α s, notamment en empêchant son internalisation. D'autres études montrent l'association du récepteur avec les protéines Jab1 (Yun et al., 2010), MAP1B (Kim et al., 2014), SNX14 (Ha et al., 2015) et Nova-1 (Kim et al., 2019) (figure 14).

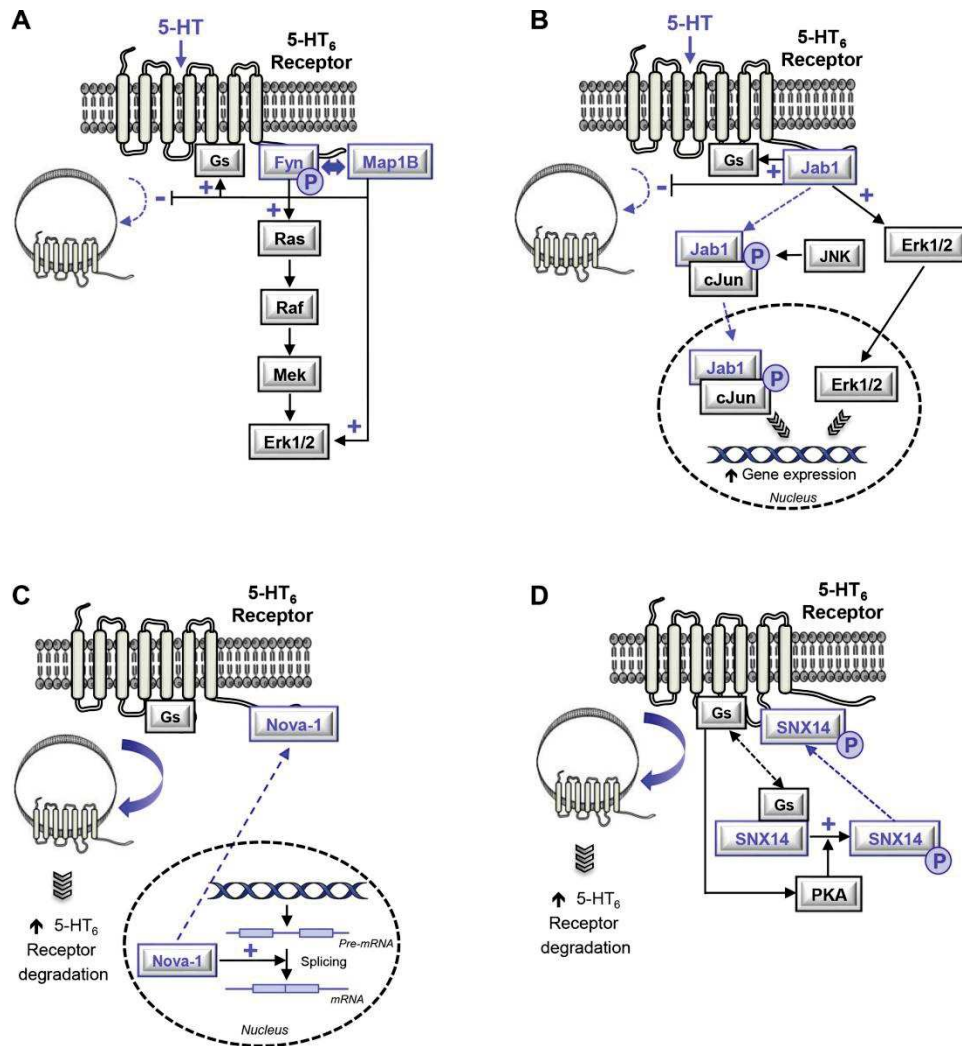


Figure 14 : Couplage du récepteur 5-HT₆ à des voies de signalisation non-canoniques

(A) L'association du récepteur 5-HT₆ avec Fyn et MAP1B inhibe l'internalisation du récepteur, promouvant ainsi la signalisation opérée par le récepteur (voies Gs et Erk1,2). L'association du récepteur avec Fyn est essentielle pour l'activation d'Erk1/2 dépendante du récepteur. Fyn peut phosphoryler MAP1B. **(B)** L'association du récepteur 5-HT₆ avec Jab1 inhibe également l'internalisation du récepteur. L'activation du récepteur 5-HT₆ conduit à la perturbation du complexe récepteur 5-HT₆-Jab1 et à l'association de Jab1 avec cJun phosphorylée. Le complexe Jab1-phospho-cJun est ensuite transféré vers le noyau où il promeut l'expression de gènes. **(C)** Le récepteur 5-HT₆ interagit avec Nova-1, un régulateur d'épissage. Nova-1 est transloquée vers le cytoplasme et s'associe au domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆, réduisant ainsi son activité d'épissage. Inversement, Nova-1 augmente l'internalisation et la dégradation du récepteur par le protéasome. **(D)** L'association du récepteur 5-HT₆ avec la *sorting nexin 14* (SNX14) régule négativement la signalisation médiée par le récepteur en 1) favorisant l'internalisation et la dégradation du récepteur et 2) en séquestrant les protéines Gas. La phosphorylation de SNX14 par la PKA induit la libération de Gas. Le SNX14 non phosphorylé est ensuite transféré vers la membrane où il se lie au domaine i₃ du récepteur. Adapté de Chaumont-Dubel et al., 2019.

Les recherches menées au sein de mon équipe ont permis d'identifier de nombreux autres partenaires du récepteur 5-HT₆ par des approches de protéomique.

- Couplage à mTOR

Le premier crible protéomique réalisé par mon équipe (Meffre et al., 2012) montre que le récepteur, surexprimé dans des cellules HEK293, interagit avec mTOR et des protéines du complexe mTORC1, comme Raptor ou encore la *G protein beta subunit-like* (GβL). Dans le système nerveux central, l'activation du récepteur 5-HT₆ par l'agoniste spécifique WAY-181187 induit l'activation de mTOR au niveau du cortex préfrontal et du striatum (Meffre et al., 2012). Dans des modèles murins développementaux de schizophrénie (élevage en isolement social ou traitement à la phéncyclidine (PCP) pendant la période post-natale), mTOR est suractivée de façon durable puisque bien que les traitements se fassent chez l'animal jeune (jour postnatal P7 à P11), la suractivation est détectable chez l'animal adulte (P60). Cette suractivation est responsable de déficits de sociabilité et de mémoire à l'âge adulte. Un traitement aigue avec de la rapamycine (inhibiteur de mTOR) 30 min avant les tests comportementaux permet de restaurer des capacités cognitives normales, de même qu'un traitement avec un antagoniste du récepteur 5-HT₆, le SB-258585 (Meffre et al., 2012) (figure 15).

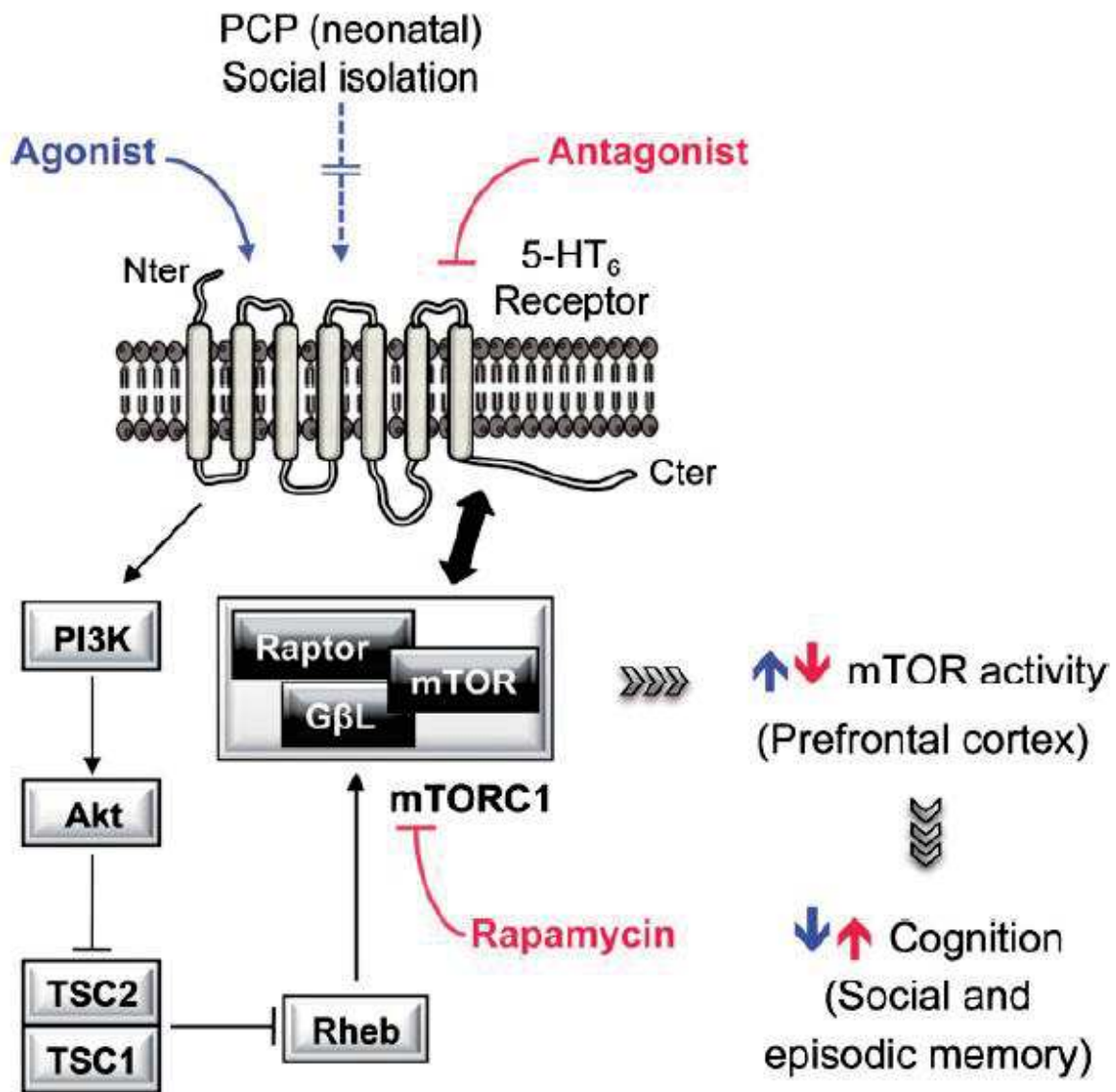


Figure 15 : Modulation de l'activité de mTOR par le récepteur 5-HT₆, impact sur la cognition

Le PCP, l'isolement sociale et les agonistes du récepteur 5-HT₆ activent mTOR. L'activation de mTOR par le récepteur 5-HT₆ se fait directement ou bien par la voie PI3K. L'activation chronique de mTOR provoque des déficits cognitifs à l'âge adulte, qui peuvent être temporairement prévenus par un traitement aigue avec des antagonistes du récepteur 5-HT₆ pendant l'adolescence. (Meffre et al., 2012).

Une étude plus récente de mon équipe montre aussi cette suractivation de mTOR après traitement chronique avec du THC pendant l'adolescence. Cette suractivation est aussi associée à des déficits cognitifs, et de la même manière, inhiber mTOR ou le récepteur 5-HT₆ prévient l'apparition des déficits (Berthoux et al., 2020). Une autre

étude montre que les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la mémoire sont médiés par une baisse de l'activation de mTOR, ce qui est causé par une baisse de l'activation du récepteur 5-HT₆, elle-même induite par un apport alimentaire réduit en tryptophane, le précurseur de la sérotonine (Teng et al., 2019).

Ces résultats montrent ainsi un lien entre le récepteur 5-HT₆ et la voie mTOR, qui semble globalement être délétère pour la cognition en cas d'activation aberrante.

- Couplage à la Neurofibromine

Mon équipe a mis en évidence la présence de la Neurofibromine 1 (Nf1) dans l'interactome du récepteur (Meffre et al., 2012). La neurofibromine 1 est une protéine activatrice des Ras-GAP (*Ras GTPase activating proteins*), dont des mutations peuvent provoquer la neurofibromatose de type 1, une pathologie entre autre caractérisée par des déficits cognitifs et des tumeurs. En collaboration avec l'équipe du Dr Séverine Morisset-Lopez, mon équipe a pu montrer que l'activité constitutive du récepteur 5-HT₆ au niveau de la voie Gas est fortement réduite dans des cellules HeLa déficientes en Nf1 (Nf1^{-/-}). De même, une forte diminution de l'activité constitutive du récepteur est observée lorsqu'on traite des cellules exprimant le récepteur et Nf1 avec un peptide qui interfère avec leur interaction. Cela suggère que l'activité constitutive du récepteur requiert son interaction avec Nf1. La perturbation de l'association entre le récepteur et le domaine *Pleckstrin Homology* (PH) de la neurofibromine inhibe aussi l'activité constitutive du récepteur, alors que la surexpression du domaine PH dans des cellules déficientes en neurofibromine restaure l'activité constitutive. Ce domaine PH est muté chez les patients atteints de la neurofibromatose de type 1, indiquant qu'un défaut de l'activité du récepteur 5-HT₆ pourrait participer à l'apparition des symptômes cognitifs.

In vivo, dans un modèle de neurofibromatose (souris Nf1^{+/-}), l'activité constitutive du récepteur est diminuée. Chez ces animaux, on observe également une diminution du niveau basal de phosphorylation de CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*), un facteur de transcription activé par l'AMPc. Contrairement à ce qu'on observe chez des animaux de type sauvage, la phosphorylation de CREB n'est pas diminuée par l'application de SB-271046, un agoniste inverse spécifique du récepteur 5-HT₆. L'ensemble de ces données suggère donc que, *in vivo*, l'activité constitutive du

récepteur dépend de son interaction avec Nf1, et que la production d'AMPc liée à cette activité constitutive régule la phosphorylation de CREB (Deraredj Nadim et al., 2016).

- Interaction avec Cdk5

Le deuxième crible protéomique a été réalisé par *GST pull down* sur des lysats de cerveaux de souris, avec comme appât le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆. Parmi les protéines interagissant avec le récepteur, nous avons identifié un réseau de protéines participant à la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (Duhr et al., 2014) (figure 16).

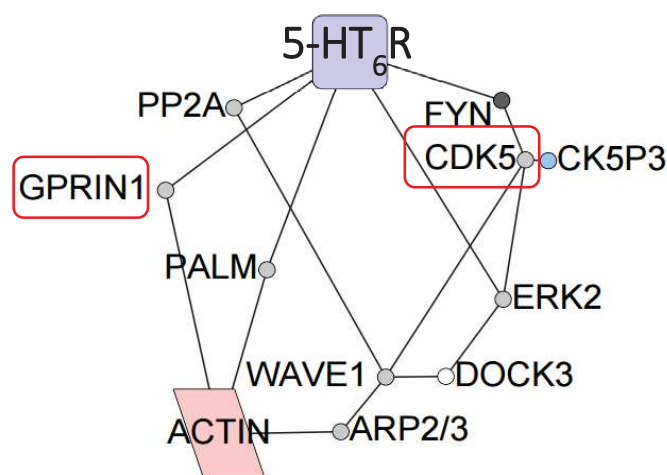


Figure 16 : Le récepteur 5-HT₆ interagit avec un réseau de protéines impliquées dans la fonction du cytosquelette d'actine

Réseau de protéines liées à l'actine interagissant avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆. Les interactions entre le récepteur et les protéines Cdk5 et GPRIN1 (entourées en rouge) ont un rôle démontré dans différents phénomènes développementaux, comme la migration neuronale et la construction de l'arborisation dendritique. Adapté de Duhr et al., 2014.

Parmi ces protéines mon équipe s'est particulièrement intéressée à la protéine Cyclin-dépendant kinase 5 (Cdk5). Cette protéine est connue pour son implication dans de nombreux processus neuro-développementaux (Kawauchi, 2014) et en particulier la migration neuronale. En collaboration avec l'équipe du Dr Alexandre Dayer, mon équipe a montré que l'inhibition de l'expression du récepteur 5-HT₆ par des shRNA empêche la migration correcte des neurones pyramidaux du cortex. Pour migrer, ces neurones doivent d'abord passer d'une morphologie multipolaire à une morphologie bipolaire. Ils vont ensuite pouvoir se déplacer de la SVZ vers les couches externes du cortex. Lorsque l'expression du récepteur 5-HT₆ est diminuée, la transition

morphologique et la migration des neurones sont fortement inhibées. Dans ce contexte de « knock-down » du récepteur, la surexpression d'un récepteur résistant au shRNA, ou de la kinase Cdk5 activée par son cofacteur p35, permet de rétablir une migration normale des neurones pyramidaux corticaux, suggérant un contrôle de la migration par le complexe 5-HT₆-Cdk5 (figure 17).

Ce mécanisme est indépendant de l'activité Gas du récepteur car un phénotype normal peut aussi être rétabli par l'expression d'une version mutée du récepteur qui n'est plus capable d'interagir avec les protéines Gas (mutation « *Gas-dead* ») (Harris et al., 2010).

Cette régulation a été confirmée par l'étude de la phosphorylation de deux cibles de la kinase Cdk5. Lorsqu'elles sont phosphorylées par Cdk5, les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase) et DCX participent au contrôle de la migration neuronale en régulant l'organisation des microtubules. Lorsque l'expression du récepteur 5-HT₆ est inhibée, la phosphorylation Cdk5-dépendante de FAK et DCX est fortement diminuée.

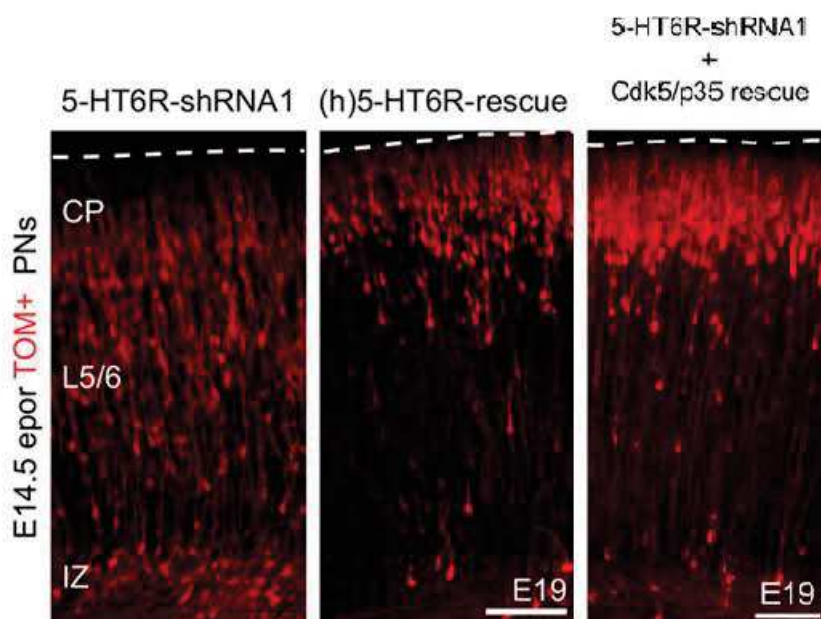


Figure 17 : Implication de la voie 5-HT₆ - Cdk5 dans la migration radiale des neurones corticaux

L'inhibition de l'expression du récepteur 5-HT₆ par un shRNA ralentit la migration radiale des neurones pyramidaux du cortex (en rouge, à gauche), ce qui est rétabli par une restauration de l'expression du récepteur (au milieu). Une surexpression de Cdk5 et de son cofacteur p35 permet aussi le rétablissement d'une migration normale (à droite). Adapté de Jacobshagen et al., 2014.

En revanche, la surexpression du récepteur 5-HT₆ augmente la phosphorylation de FAK et DCX. L'ensemble de ces résultats démontre que la migration des neurones pyramidaux corticaux est contrôlée par le complexe 5-HT₆-Cdk5 via la phosphorylation par Cdk5 de diverses cibles.

En plus de son rôle bien connu dans la migration neuronale, Cdk5 est également un acteur clé de la différenciation neuronale (Kawauchi, 2014). L'expression du récepteur 5-HT₆ dans des cellules de neuroglioblastome NG108-15 promeut l'apparition de neurites 24h après transfection. Ces changements morphologiques s'accompagnent de changements physiologiques classiquement associés à la différenciation de ces cellules, comme l'apparition à la membrane plasmique de canaux calciques voltage-dépendants, ce qui suggère que l'expression du récepteur 5-HT₆ dans les cellules NG108-15 induit leur différenciation neuronale. Cette différenciation est indépendante de la présence d'un agoniste et ne dépend pas de la voie Gas puisqu'elle est observée également après transfection du récepteur *Gas-dead*. L'équipe a donc cherché à voir si l'interaction entre le récepteur et Cdk5 pouvait jouer un rôle dans la différenciation induite par l'expression du récepteur. L'inhibition de Cdk5 soit par une approche pharmacologique, soit en surexprimant un mutant dominant-négatif de cette kinase résulte en la perte de la différenciation induite par l'expression du récepteur, ce qui suggère qu'en effet, la fonction de Cdk5 est requise pour induire la différenciation des cellules. Il est connu que Cdk5 peut phosphoryler les récepteurs avec lesquels elle interagit, comme par exemple le récepteur TrkB du BDNF. Une recherche en protéomique des sites phosphorylés sur le récepteur 5-HT₆ a mis en évidence une phosphorylation du récepteur dépendante de Cdk5 sur le résidu Sérine 350 (Duhr et al., 2014). Cette phosphorylation est nécessaire à l'induction de la différenciation neuronale par Cdk5 puisque l'expression d'une version du récepteur 5-HT₆ pour laquelle la sérine 350 est mutée en alanine n'induit pas cette différenciation. La phosphorylation du récepteur va ensuite permettre l'activation de Cdc42, qui est responsable de l'initiation de la pousse neuritique.

- Interaction avec GPRIN1

Parmi les partenaires du récepteur présentés en figure 16 on trouve la *G Protein Regulated Inducer Of Neurite Outgrowth 1* (GPRIN1). GPRIN1 est une protéine capable de se lier aux protéines G activées et d'induire la pousse neuritique (Ge et al.,

2009; Nordman and Kabbani, 2012). Pendant ma thèse, j'ai participé à une étude (Pujol et al., 2020, en annexe) qui a montré que la complexification de l'arborisation dendritique dans les cellules NG108-15, 48h après transfection du récepteur 5-HT₆, requiert l'interaction du récepteur avec GPRIN1. GPRIN1 interagit avec le domaine C-terminal du récepteur, ainsi qu'avec la protéine Gs. Cette interaction est indépendante de la présence d'agonistes, mais est dépendante de l'activité constitutive du récepteur au niveau de la voie Gas. En retour, le recrutement de GPRIN1 promeut l'activation de la voie Gas et induit la complexification de l'arborisation dendritique de façon dépendante de l'AMPC et de la PKA (figure 18)

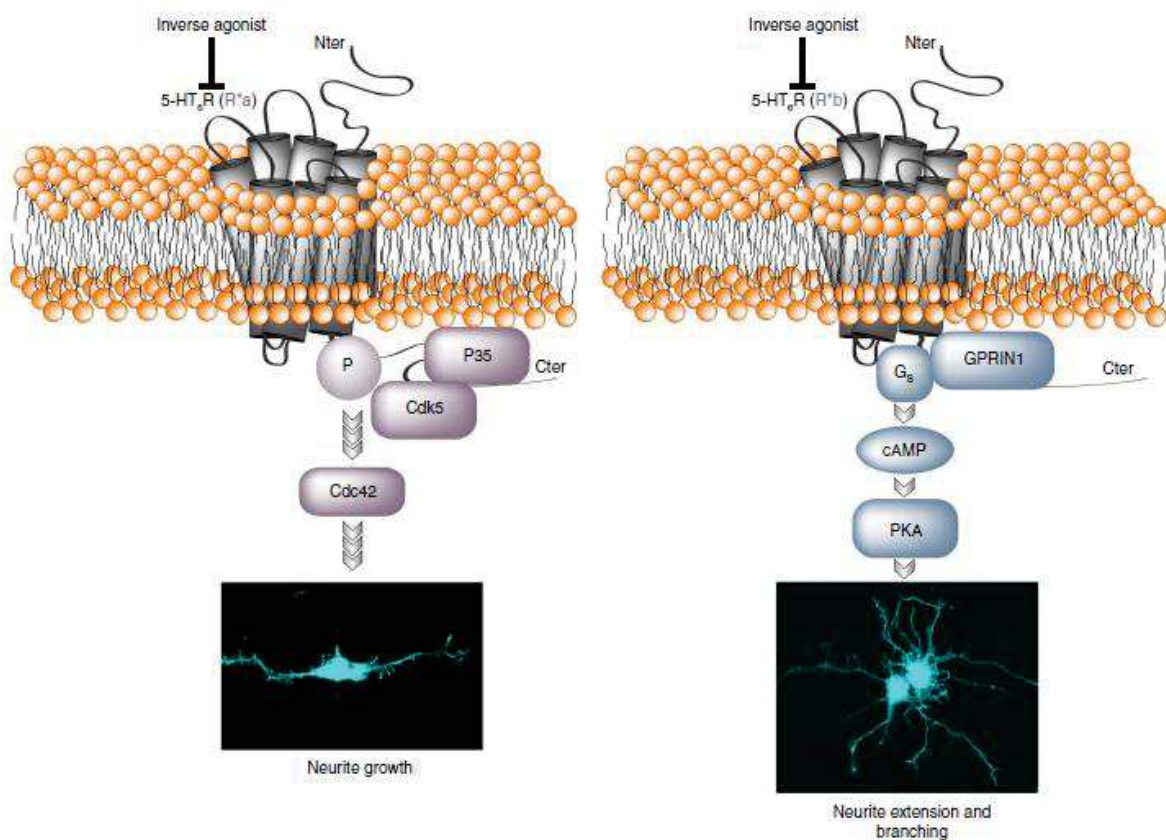


Figure 18 : Contrôle de mécanismes neuro-développementaux par l'interaction successive entre le récepteur 5-HT₆, Cdk5 et GPRIN1

Cdk5 phosphoryle le récepteur 5-HT₆, ce qui induit l'activation de Cdc42 par le récepteur et l'initiation de la pousse neuritique (à gauche). Plus tardivement GPRIN1 interagit avec le récepteur ce qui promeut la complexification de l'arborisation dendritique par un mécanisme lié à l'activation de la PKA. Adapté de Pujol et al., 2020.

Ces études démontrent que le récepteur 5-HT₆ peut interagir de façon séquentielle avec différents partenaires de façon à moduler plusieurs mécanismes neuro-

développementaux, de la migration neuronale, à l'induction de la pousse neuritique, et jusqu'à la morphogenèse de l'arbre dendritique. Ces résultats mettent en évidence les propriétés allostériques des RCPG, qui peuvent adopter de nombreuses conformations actives et physiologiquement pertinentes, certaines d'entre elles étant stabilisées lors de l'interaction avec les GIP en l'absence d'agonistes (figure 18).

c) Impact de la localisation du récepteur sur ses partenaires

Le récepteur 5-HT₆ semble être localisé dans plusieurs compartiments cellulaires *in vivo*, notamment la membrane du compartiment somato-dendritique (Gérard et al., 1997) et la membrane du cil primaire (Brodsky et al., 2017).

Une étude relativement récente utilisant une approche de protéomique a décrit l'interactome du récepteur exprimé au niveau du cil primaire dans des cellules NIH3T3 (Kohli et al., 2017). Cet interactome est particulièrement enrichi en protéines ayant un rôle dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Par exemple, le complexe Arp2/3 (*actin related proteins 2/3*), déjà identifié dans le crible protéomique de l'étude Duhr et al. (figure 16) est aussi retrouvé dans cette étude. Dans le contexte du cil primaire, l'actine peut avoir différents rôles, comme la formation/élongation/rétraction/excision du cil.

Ainsi un rôle du récepteur 5-HT₆ dans la dynamique de l'actine ciliaire peut-être envisagé. L'équipe de John Neumaier montre que l'inhibition du récepteur 5-HT₆ par le SB-399885 induit une réduction de la taille des cils dans des cultures de neurones de striatum (Brodsky et al., 2017), ce phénomène pourrait être médié par une modification de la dynamique de l'actine.

Le récepteur 5-HT₆ serait donc capable d'influencer de très nombreuses voies de signalisation. Cependant les phénomènes qui déterminent ces interactions sont encore largement inconnus. *In vivo*, le récepteur est exprimé dans des types cellulaires différents et pourrait ainsi être en contact avec des partenaires exprimés différemment dans ces types cellulaires. L'exemple de l'interaction séquentielle entre le récepteur, Cdk5 et GPRIN1 suggère aussi que le stade développemental est déterminant pour l'association du récepteur avec des partenaires différents. Enfin, la localisation subcellulaire du récepteur pourrait aussi être un facteur influençant son couplage. Un exemple récent montre, par l'utilisation d'une sonde FRET permettant

de mesurer les niveaux d'AMPC dans des cellules mIMCD3, que la sérotonine n'induit pas d'élévation des niveaux d'AMPC quand le récepteur 5-HT₆ n'est présent qu'au niveau du cil primaire. En revanche, les niveaux d'AMPC augmentent quand le récepteur est localisé au niveau somatique (Jiang et al., 2019).

Le récepteur 5-HT₆ est exprimé spécifiquement dans certaines régions cérébrales impliquées dans des fonctions cognitives majeures, dans lesquels il pourrait être impliqué dans la modulation de la balance inhibitrice/excitatrice. Cependant, les rôles du récepteur 5-HT₆ sont probablement bien plus complexes. De nombreuses études récentes ont mis en lumière des interactions avec différents complexes protéiques, contrôlant différentes fonctions physiopathologiques du récepteur. Par exemple la suractivation de mTOR dans un contexte pathologique comme la schizophrénie, ou bien l'interaction séquentielle du récepteur avec deux partenaires différents (Cdk5 puis GPRIN1), qui régule différentes étapes du développement neuronal.

4) ROLES DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LA COGNITION

La présence du récepteur 5-HT₆ dans des régions contrôlant des fonctions cognitives importantes a conduit de nombreux chercheurs à réaliser des études cherchant à évaluer son impact sur la cognition. Deux approches ont principalement été utilisées. Premièrement, des approches génétiques modulant l'expression du récepteur. Deuxièmement, la méthode la plus utilisée, des approches pharmacologiques modulant l'activité du récepteur. L'émergence du récepteur 5-HT₆ comme cible thérapeutique prometteuse dans le cadre des troubles cognitifs liés aux pathologies neuro-développementales a motivé l'industrie pharmaceutique à développer une pharmacopée très conséquente de ligands spécifiques du récepteur. Ces ligands peuvent être des agonistes (activateurs), des antagonistes neutres (qui inhibent l'activité induite par la sérotonine), ou bien agonistes inverses (qui inhibent l'activité constitutive du récepteur, en absence d'agoniste). Le récepteur 5-HT₆ possède une activité constitutive *in vitro* (Kohen et al., 2001) et *in vivo* (Deraredj Nadim et al., 2016), c'est-à-dire un niveau d'activation basale indépendant de la présence de sérotonine. Les antagonistes neutres n'ont pas d'effet sur cette activité constitutive, alors que les agonistes inverses l'inhibent.

a) Impacts du récepteur sur le comportement

Les premières études cherchant à comprendre le rôle du récepteur 5-HT₆ ont été réalisées chez le rat et se basent sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens afin d'inhiber l'expression du récepteur (Bourson et al., 1995; Sleight et al., 1998, 1996). Ces injections induisent pendant plusieurs jours un panel de comportements anormaux, difficiles à interpréter : des bâillements, des étirements et une mastication fréquente anormale. Une observation particulièrement intéressante est que le traitement de ces animaux à l'atropine, un antagoniste cholinergique muscarinique, permet d'annuler ces effets. Cela indique que le récepteur 5-HT₆ pourrait être un inhibiteur du système cholinergique. Il apparaît aussi que l'inhibition du récepteur 5-HT₆ par différents antagonistes permet de corriger les pertes de capacité mnésiques provoquées par une altération de la transmission cholinergique, induite expérimentalement par la scopolamine, un antagoniste cholinergique (Foley et al., 2004; Woolley et al., 2003). Cela corrobore les résultats mentionnés précédemment, indiquant que l'inhibition du récepteur favorise la transmission cholinergique.

Les régions exprimant le récepteur 5-HT₆ suggèrent un rôle du récepteur dans la mémoire, qui est de plus une fonction cognitive relativement aisée à mesurer chez le rongeur grâce à différents tests. Deux études menées en parallèle publiées en 2001 (Rogers and Hagan, 2001; Woolley et al., 2001) ont montré chez le rat que l'inhibition de la fonction du récepteur, soit par injection systémique d'oligonucléotides antisens, soit pharmacologiquement par injection d'antagonistes spécifiques du récepteur 5-HT₆, le SB-271046 et le SB-357134, améliore la rétention d'une tâche de mémoire spatiale (test de la piscine de Morris). Toujours chez le rat, une autre étude a montré que l'inhibition du récepteur 5-HT₆ par le SB-271046 ou le Ro 04-6790 améliore la rétention mnésique dans une tâche de reconnaissance d'un nouvel objet (King et al., 2004). L'inhibition du récepteur par deux autres antagonistes, le SB-357134 et le SB-399885 a aussi été associée à une meilleure consolidation d'une tâche de conditionnement pavlovien chez le rat (Perez-García and Meneses, 2005). Cela suggère donc un effet pro-mnésique des antagonistes du récepteur. D'autres études ont montré que l'inhibition du récepteur chez le rat peut favoriser la flexibilité cognitive, comme montré dans un test de changement de tâche attentionnel. (Hatcher et al., 2005).

b) Impacts du récepteur sur la neurotransmission

Plusieurs études basées sur la microdialyse après administration d'antagonistes ou agonistes du récepteur 5-HT₆ ont décrit certains rôles que peut avoir le récepteur 5-HT₆ sur la sécrétion de neurotransmetteurs. Ainsi dès le début des années 2000 (Dawson et al., 2001, 2000), il est établi que l'inhibition du récepteur 5-HT₆ par le SB271046 n'induit pas de changements dans les niveaux de sérotonine, de dopamine ou de noradrénaline dans le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe, alors qu'elle induit l'élévation du taux de glutamate dans le cortex frontal et l'hippocampe, mais pas le striatum. Cela indiquerait que le récepteur peut inhiber la transmission glutamatergique excitatrice, inhibition qui serait levée par l'application d'antagonistes. Cette stimulation de la transmission glutamatergique par les antagonistes est tout à fait cohérente avec leur effet pro-mnésique.

Concernant la transmission cholinergique, l'inhibition du récepteur 5-HT₆ induit une augmentation de la libération d'acétylcholine (Riemer et al., 2003), ce qui est en accord avec les résultats comportementaux précédemment cités.

De façon assez cohérente, on observe que l'administration d'agonistes du récepteur stimulent la libération de GABA dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum (Schechter et al., 2008). Ainsi l'activation du récepteur augmenterait la transmission GABAergique inhibitrice, ce qui pourrait être responsable de son potentiel rôle inhibiteur de la transmission glutamatergique.

c) Effet des agonistes du récepteur 5-HT₆

De façon surprenante, si les antagonistes ont des effets comportementaux clairs, il n'en est pas de même pour les agonistes. Sur certains comportements, les agonistes produisent les mêmes effets que les antagonistes. Une explication répandue est que, une partie du récepteur étant localisée dans des structures cérébrales et des types cellulaires différents, les antagonistes et les agonistes cibleraient préférentiellement des réseaux de neurones différents, ce qui aurait pour résultat des effets comportementaux semblables (l'activation du récepteur dans certains neurones de certaines structures et l'inhibition du même récepteur dans d'autres neurones/d'autres structures pourraient résulter dans des effets comportementaux semblables). Dans ce sens, un modèle imaginé par King et al., 2008 propose que les antagonistes inhibent

le récepteur présent au niveau de neurones GABAergiques inhibiteurs, ce qui lèverait l'inhibition induite par ces neurones sur les neurones glutamatergiques (figure 19). Parallèlement, certains agonistes pourraient activer spécifiquement le récepteur présent au niveau de neurones glutamatergiques excitateurs.

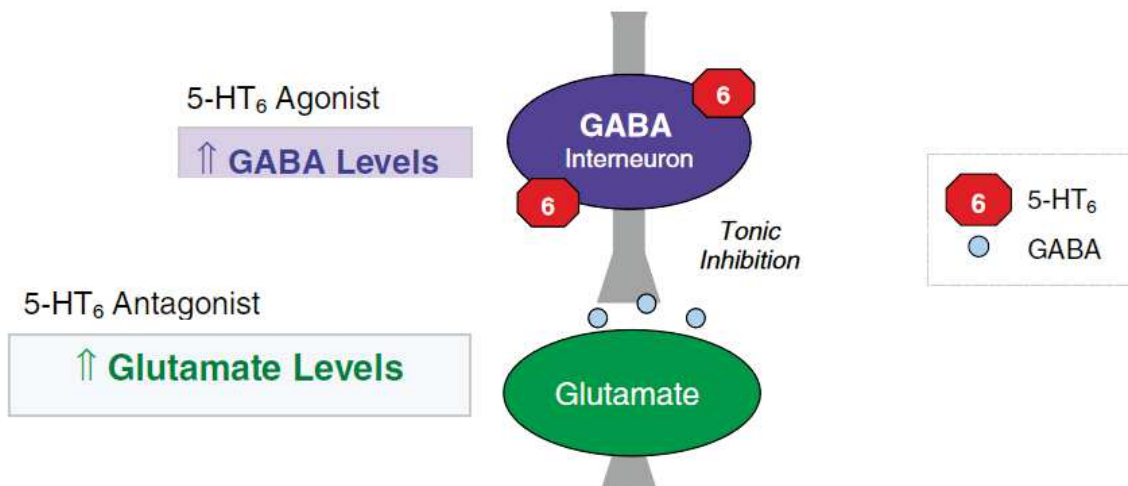


Figure 19 : Modèle expliquant les effets des ligands du récepteur 5-HT₆ sur la transmission GABAergique et glutamatergique

Les antagonistes du récepteur 5-HT₆ inhiberaient préférentiellement le récepteur situé à la membrane des interneurons GABAergiques. Cela induirait une levée de l'inhibition tonique des interneurons GABAergiques sur les neurones glutamatergiques, provoquant l'élévation des taux de glutamate extracellulaire, facilitant certains mécanismes cognitifs. Adapté de Schechter et al., 2008.

5) CIBLE THERAPEUTIQUE

Les propriétés pro-cognitives des antagonistes et de certains agonistes du récepteur 5-HT₆, notamment par rapport aux capacités mnésiques, ont conduit au lancement d'études cliniques afin de vérifier leur efficacité pour le traitement des troubles cognitifs dans diverses pathologies neuropsychiatriques comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie ou encore l'épilepsie. Malheureusement, à ce jour, les résultats de ces études cliniques ne sont pas probants.

- Maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par un déclin cognitif progressif se terminant par une démence généralisée. Il n'existe à ce jour pas de traitement curatif de la maladie, mais différentes approches sont envisagées pour ralentir l'avancée des symptômes et faciliter la vie des patients. Parmi ces traitements, différents inhibiteurs de l'AChE sont utilisés, car ils permettent pendant un certain temps de compenser la baisse de production d'ACh induite par la dégénérescence des noyaux cholinergique observée dans la MA. Ainsi, connaissant les effets des antagonistes du récepteur 5-HT₆ sur la transmission cholinergique et globalement leurs effets bénéfiques sur la cognition, de nombreuses études ont testé ces antagonistes dans le contexte de la MA. Malheureusement, les résultats actuels obtenus en phase II et III des essais cliniques chez l'humain ne montrent pas de résultats positifs (Khoury et al., 2018).

- Schizophrénie :

La schizophrénie est une pathologie neuropsychiatrique d'origine neuro-développementale apparaissant chez le jeune adulte et caractérisée par plusieurs types de symptômes : les symptômes « positifs » (hallucinations, délires), les symptômes « négatifs » (anhédonie, retrait social) et des troubles cognitifs (altérations des fonctions exécutives, de l'attention, de la mémoire). Ces derniers sont particulièrement handicapants et il n'existe pas de traitement permettant de les soulager, ce qui fait du récepteur 5-HT₆ une cible particulièrement intéressante. Plusieurs études conduites chez le rongeur, sur des modèles comportementaux récapitulant ces symptômes, ont montré que les antagonistes du récepteur 5-HT₆ peuvent rétablir des performances cognitives normales (Meffre et al., 2012). A ce jour, aucune étude clinique n'a encore été effectuée chez l'homme.

- Epilepsie

Une augmentation de l'activité de mTOR a lieu dans l'hippocampe et le cortex de rats traités avec de la pilocarpine, un modèle expérimental d'épilepsie temporale. Cette suractivation de mTOR est corrélée à une augmentation de l'expression du récepteur 5-HT₆ (Wang et al., 2015). Des prétraitements des rats avec l'antagoniste SB399885 prévient la suractivation de mTOR induite par le traitement à la pilocarpine, suggérant

que le récepteur est impliqué dans cette suractivation de mTOR rencontrée dans l'épilepsie, et qu'il forme une cible thérapeutique intéressante pour cette pathologie.

- Troubles du spectre de l'autisme

Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) sont un ensemble de troubles comportementaux d'origine neuro-développementale caractérisés par des déficits de communication et d'interaction sociale, ainsi que des stéréotypies motrices et des formes d'inflexibilité cognitive. Des données préliminaires de l'équipe montrent que le SB258585, un antagoniste du récepteur 5-HT₆, permet de restaurer certains de ces déficits chez des souris qui présentent une délétion génétique du récepteur μ aux opioïdes, qui est un modèle couramment utilisé pour étudier les altérations comportementales liées aux TSA.

Malgré l'intérêt thérapeutique important qui concerne le récepteur 5-HT₆, son rôle physiologique dans le système nerveux adulte reste encore très peu compris.

OBJECTIFS

Le récepteur 5-HT₆ est un RCPG qui semble être impliqué dans de nombreux phénomènes mécanismes physiologiques à l'âge adulte et pendant le développement. Classiquement couplé aux protéines Gas, des études récentes ont permis d'entrevoir les nombreuses voies de signalisations liées à ce récepteur. Ces interactions sont potentiellement nombreuses, et leur rôle est encore à déterminer. Les rôles du récepteur 5-HT₆ sont donc encore mal décrits. Actuellement, la méconnaissance de la localisation exacte du récepteur 5-HT₆ dans le cerveau et dans la cellule, due à l'absence d'anticorps spécifiques permettant des études d'immunomarquage, ne permet pas de comprendre totalement ses rôles. Dans ce travail de thèse, j'ai entrepris une caractérisation de l'expression du récepteur 5-HT₆ dans le cerveau de souris adulte et en développement en utilisant une souche de souris « knock-in » (KI) exprimant le récepteur 5-HT₆ étiqueté avec une protéine fluorescente (GFP). J'ai ainsi pu décrire les structures dans lesquelles le récepteur est exprimé, les types cellulaires qui l'expriment ainsi que sa localisation subcellulaire. Ce travail a donné des résultats particulièrement intéressants, notamment pendant la période post-natale, où le récepteur semble avoir un rôle particulier. J'ai ensuite entrepris un travail visant à étudier le rôle du récepteur 5-HT₆ pendant cette période post-natale, sur le développement *in vivo* du comportement de la souris.

MATERIEL ET METHODES

Animaux :

Nous avons utilisé deux souches de souris (sur la base de souris C57BL/6) génétiquement modifiées. Une qui présente un récepteur 5-HT₆ tagué avec une GFP au niveau de la partie C-terminale intracellulaire du récepteur(5-HT₆^{GFP/GFP}), et une qui a subi une délétion de la séquence codante pour le récepteur 5-HT₆ (5-HT₆^{KO/KO}). Ces souris ont été générées par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch-Graffenstaden, France, <http://www.ics-mci.fr/fr/>). La présence d'une GFP au niveau C-terminal du récepteur chez les souris 5-HT₆^{GFP/GFP} ne semble pas affecter l'adressage à la membrane du récepteur ni son couplage fonctionnel à la protéine Gs et à d'autres interacteurs *in vitro* (Duhr et al., 2014; Pujol et al., 2020). Les souris ont été hébergées avec nourriture et boisson *ad libitum*, avec un cycle « jour/nuit » de 12h/12h. Toutes les expérimentations ont été réalisées pendant la phase de jour.

Les procédures ont été réalisées dans le strict respect des directives d'utilisation et de soin des animaux de l'Université de Montpellier.

Immunohistofluorescence :

Préparation des coupes :

Souris de P15 à P60 : Les souris ont été euthanasiées avec une dose létale d'Euthasol Vet puis perfusées en intracardiaque avec une solution de liquide cérébrospinal artificiel (Artificial Cerebro-Spinal Fluid : ACSF) froide afin de rincer les vaisseaux sanguins. Nous avons choisi une perfusion avec de l'ACSF car le marquage de la GFP est de meilleure qualité avec ce protocole, comparé à d'autres protocoles avec perfusion de PFA ou de PBS. Les cerveaux ont ensuite été fixés pendant 24h dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% poids/volume (p/v) dans du tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline : PBS) (Sigma) à 4°C. Après rinçages dans une solution PBS, les cerveaux ont été coupés (coupes de 30µm) avec un vibratome (Leica). Les tranches ont ensuite été conservées à -20°C dans une solution de cryoconservation (30% Etylène Glycol, 30% Glycérol, 25% PBS, 15% eau pure) jusqu'à usage. Avant utilisation, les coupes ont été rincées dans du PBS puis immunomarquées (protocole décrit plus bas).

Pour les immunomarquages réalisés afin de mesurer les cils primaires et comparer leur taille entre les différents génotypes (WT et 5-HT₆^{KO/KO}), les perfusions ont été réalisées avec du PFA 4% (p/v) dilué dans du PBS, car nous avons remarqué que la morphologie des cils était mieux conservée par rapport à une perfusion avec l'ACSF. Souris de P1 à P10 : Le protocole de préparation des coupes reste globalement le même hormis quelques différences. Les souris ont ici été anesthésiées sur de la glace, puis perfusées avec de l'ACSF. Après fixation, les cerveaux ont été incubés dans une solution de PBS avec 30% de sucrose en poids/volume (p/v) pour être cryo-protégés. Les cerveaux ont ensuite été séchés, inclus dans un milieu OCT (VWR), puis congelés à -80°C jusqu'à usage. Les cerveaux ont été coupés (coupes de 16µm) avec un cryostat (Leica), puis les coupes ont été montées directement sur lame de verre (ThermoScientific) et conservées à -80°C jusqu'à usage.

Cette différence de protocole de coupe est justifiée par la consistance des cerveaux des jeunes souris qui rend impossible leur coupe avec un vibratome.

Souris de E13,5 et E17,5 : Les embryons de souris n'ont ici pas été perfusés. Les cerveaux ont été directement disséqués dans du PBS froid, fixés, puis traités de la même manière que pour les souris de P1 à P10.

Immunomarquages :

Pour tous les protocoles de fixation et de coupe, les coupes ont été rincées avec du PBS, incubées dans une solution de blocage composée de PBS, BSA 3% p/v (Sigma), Triton X-100 0,2 % v/v (Sigma) pendant 2 heures à température ambiante (TA), puis incubées dans la solution d'anticorps primaires composée de PBS, BSA 1% p/v et Triton X-100 0,2% v/v sur la nuit à 4°C. Les anticorps primaires et leur concentration sont détaillés dans le tableau suivant :

Immunoreactivity	Species	Concentration	Ref
GFP	Chicken	1/500	Invitrogen A10262
	Rabbit	1/1000	Chromotek PABG1
AC3	Rabbit	1/5000	EnCor Biotech RPCA-ACIII-AP
Arl13b	Mouse	1/1000	NIH NeuroMab 75-287
S100Beta	Mouse	1/500	Abcam AB11178
GFAP	Rabbit	1/1000	DAKO Z0334
NeuN	Mouse	1/500	EMD Millipore MAB337
GABA	Rabbit	1/1000	Sigma A2052
DARPP-32	Rabbit	1/1000	Cell signaling 2306S

Après des rinçages avec du PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires coulés à des fluorophores (Invitrogen molecular probes) dans une solution de même composition que la solution de l'anticorps primaire pendant 2h à TA. Les coupes ont ensuite été rincées montées dans un milieu de montage adapté à la fluorescence (Dako).

Césariennes :

Les césariennes ont été réalisées au stade embryonnaire E18,5, environ 24h avant la mise-bas estimée. Les mères gestantes ont été euthanasiées par dislocation cervicale puis les embryons rapidement extraits. Les souris nouveau-nées ont ensuite été placées sur une plaque chauffante (37°C) revêtue d'un papier absorbant humidifié. Ensuite, pendant plusieurs minutes, leur respiration a été stimulée par de très légères pressions sur le thorax, jusqu'à ce qu'elle soit autonome. Les nouveau-nés ont ensuite été donnés à une mère adoptive ayant mis bas au plus tard 24h avant la procédure.

Cultures cellulaires :

Les cultures primaires de neurones striataux ont été préparées à partir d'embryons de souris 5-HT₆^{GFP/GFP}. Elles ont été réalisées à partir d'embryons au stade embryonnaire E15,5. Les structures ont été disséqués dans du milieu Hibernate-A (Thermofisher), puis les neurones dissociés enzymatiquement avec de la trypsine et mécaniquement par des allers-retours de pipette. Les neurones ont été ensemencés dans des puits de 12mm de diamètre sur lamelles de verre préalablement revêtues de Poly-L-ornithine et de Laminine (Sigma-Aldrich). Le milieu de culture est composé de Neurobasal-A (Thermofisher) supplémenté de 2% v/v de B27 (Thermofisher), de 0,5% v/v de GlutaMax (thermofisher) et d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Les neurones ont été maintenus à 37°C et 5% de CO₂ dans un incubateur humidifié. Au 10ème jour *in vitro* (DIV 10), les cultures ont été traitées avec une solution contrôle (DMSO) ou avec 1µM de SB271046 ou avec 1µM de WAY181187. 24h après le traitement, les cultures ont été fixées puis préparées pour immunocytofluorescence.

Immunocytofluorescence :

Pour fixation, le milieu des neurones est entièrement retiré et les neurones ont été incubés dans une solution de PFA 4% (p/v) dans du PBS à 37°C pendant 10min. Les

neurones ont ensuite été rincés 3x 10min dans du PBS, puis ont été incubés dans une solution de blocage (la même que pour l'immunohistofluorescence) pendant 30min à TA.

Imagerie :

L'acquisition des images a été réalisée grâce à un microscope confocal (Leica SP8) équipé d'objectifs à immersion dans l'huile et de lasers de 488nm, 561nm et 633nm.

Traitement des animaux et tests comportementaux :

Les souris (souches sauvage, 5-HT₆^{KO/KO} et WT) ont été traitées par injections sous-cutanées quotidiennement pendant 5 jours de la période néo-natale, selon deux fenêtres de traitement (certains de P1 à P5 et d'autres de P5 à P9 inclus). Pour chaque fenêtre de traitement, il y a 3 groupes expérimentaux :

Traitement avec des agonistes inverses du récepteur 5-HT₆ : SB271046, (3mg/kg).

Traitement avec un antagoniste neutre du récepteur 5-HT₆ : CPPQ (3mg/kg).

Traitement avec la solution véhicule seule : sérum physiologique (eau + 0,9% NaCl) + 5% DMSO (Sigma) + 5% Tween-80 (Sigma).

Les animaux ont ensuite passé différents tests comportementaux pendant l'adolescence (entre P30 et P40).

Le choix de réaliser deux fenêtres de traitements différentes vient de l'âge jeune des animaux. L'idée initiale était de traiter quotidiennement les animaux pendant 10 jours d'affilés, mais nous avons voulu éviter de faire subir quotidiennement pendant 10 jours des injections sous-cutanées à des souris en période néo-natale.

Test en arène ouverte :

Matériel :

- Arène en plexiglas blanche 50x50x50 cm
- Lumière (environ 20 lux au centre)

Déroulement du test : Chaque jour, les animaux sont habitués à la pièce d'expérimentation durant 30min avant le début des tests. Les souris sont placées individuellement dans l'arène. Les animaux explorent alors librement le dispositif

durant 10min puis sont replacées dans leur cage d'hébergement. On mesure *a posteriori* le nombre de redressements, le nombre et la durée totale de toilettage, la vitesse moyenne et la distance totale.

Test de l'arène en croix surélevée (dit test « elevated plus maze) Elevated Plus Maze (EPM) :

Matériel :

- Dispositif en plexiglas d'une hauteur de 50cm, avec 4 bras de 30x5cm dont 2 bras ouverts et 2 bras fermés (par des parois de 15cm).
- Lumière (entre 200 et 300 lux)

Déroulement du test : Les animaux sont préalablement habitués à la salle d'expérimentation 30min avant le début des tests.



Figure 20 : Test de l'arène surélevée en croix

Chaque souris est placée individuellement au centre du dispositif avec la tête orientée vers un bras ouvert. L'animal explore alors librement durant 5min puis est replacé dans sa cage d'hébergement. On mesure *a posteriori* le temps passé dans chaque bras. Un animal est considéré comme sorti ou entré dans un bras lorsque les 4 pattes sont dans la zone.

Test de reconnaissance d'un nouvel objet :

Matériel :

- Arène en plexiglas blanche 50x50x50
- Paires d'objets identiques (10x5cm)
- Objets de même taille mais textures/formes/couleurs différentes
- Lumière (au centre de l'arène : 37-57lux)

Déroulement du test : Chaque jour, les animaux sont au préalable habitués à la pièce d'expérimentation durant 30min avant le début des tests.

JOUR 1 : HABITUATION : Les souris sont placées individuellement dans l'arène sans objet, et explorent alors librement le dispositif durant 10min puis sont replacées dans leur cage d'hébergement.

JOUR 2 : FAMILIARISATION : Deux objets identiques sont placés dans l'arène à 15cm des parois et environ 15cm l'un de l'autre. Les souris sont replacées dans l'arène. Les animaux explorent alors librement durant 10min puis sont replacées dans leur cage d'hébergement. On mesure *a posteriori* le temps d'exploration de chaque objet qui correspond au moment où l'animal a le museau orienté vers l'objet (<2cm) en excluant les moments où l'animal grimpe sur l'objet

JOUR 3 : TEST : Un des deux objets est remplacé par un nouvel objet de taille similaire mais de texture/forme/couleurs différentes. Les animaux explorent alors librement durant 10min puis sont replacées dans leur cage d'hébergement. On mesure à posteriori le temps de d'exploration de chaque objet (nouvel objet et objet familier).

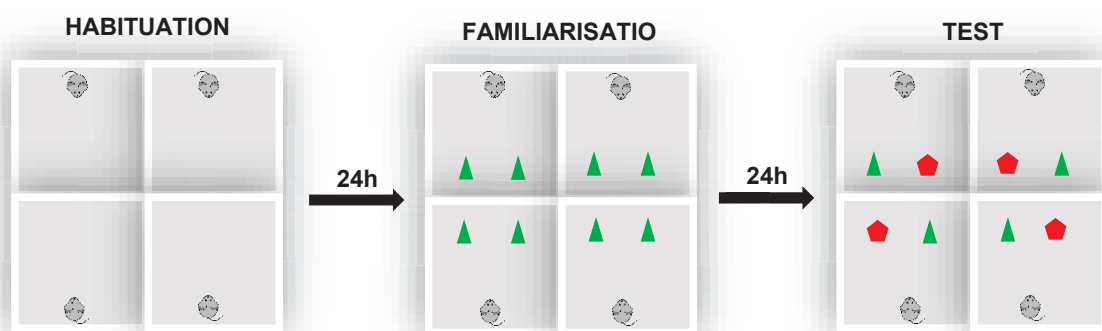


Figure 21 : Test de reconnaissance d'un nouvel objet

Test de sociabilité à 3 chambres (ou « test de Crawley ») :

Matériel :

- Arène transparente en plexiglas divisée en trois chambres de tailles égales (40 x 20 x 22,5 cm), disposant de deux portes coulissantes (8 x 5 cm) permettant la circulation entre les chambres.
- Des cages grillagées, métalliques et de forme cylindriques (18 x 9 cm)
- Objets de taille similaire à une souris.
- Panneaux LED (Arène : 30-40 lux)
- Souris interactrices non familières, de même sexe et même âge que les souris à tester.

Déroulement du test : Les animaux interacteurs sont habitués au confinement dans les cages grillagées pendant les 2 jours précédant le test (20 minutes / jour).

Les animaux sont préalablement habitués à la salle d'expérimentation 30 min avant le début des tests.

HABITUATION : Les souris sont placées individuellement dans la chambre centrale avec les portes coulissantes relevées et les cages vides. Elles explorent alors librement le dispositif durant 10min. A la fin de ces 10min, les animaux sont ramenés dans la chambre centrale et les portes coulissantes sont rabattues.

TEST DE PREFERENCE SOCIALE : Pendant que la souris est dans la chambre centrale, une souris non familière est introduite dans une cage métallique d'une des chambres latérales et un objet est introduit dans la seconde cage métallique comme témoin de la nouveauté. Les portes coulissantes sont alors relevées et la souris est libre d'explorer le dispositif durant 10min à nouveau. Le nombre d'entrées dans chaque compartiment, le temps passé dans chaque chambre et le nombre et la durée des contacts du nez avec la souris interactrice ou l'objet sont analysés *a posteriori* à partir des enregistrements vidéo. A la fin des 10min, les animaux sont ramenés dans la chambre centrale.

TEST DE PERERENCE

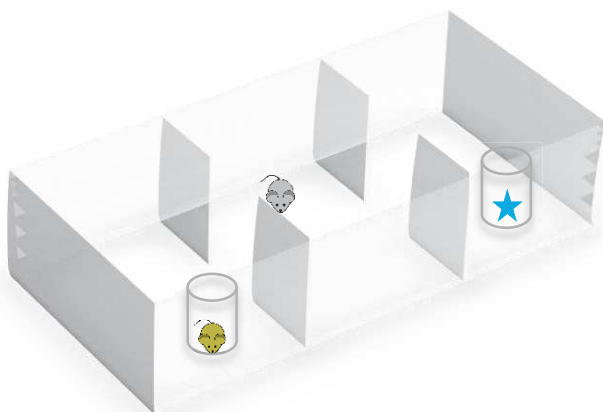


Figure 22 : Test de préférence sociale

Analyses statistiques :

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Tous les tests statistiques réalisés sont indiqués au niveau des résultats correspondants.

RESULTATS

Malgré de nombreuses études, le schéma d'expression exact du récepteur 5-HT₆ reste mal connu. La majorité des techniques utilisées ont permis de mesurer les quantités d'ARNm codant pour le récepteur, et les quelques études d'immunohistochimie ont utilisé des anticorps dont la spécificité est douteuse. Une cartographie claire de l'expression du récepteur est donc indispensable.

Ce travail de thèse se base sur l'utilisation d'une souche de souris génétiquement modifiée « knock-in » (KI) (5-HT₆^{GFP/GFP}) qui exprime une version du récepteur 5-HT₆ (5-HT₆-GFP) directement couplée à une protéine fluorescente verte (GFP), ce qui permet de cartographier de façon détaillée l'expression du récepteur 5-HT₆ dans le système nerveux central de la souris par immunomarquage contre la GFP. Pour les expériences fonctionnelles j'ai également utilisé une souche de souris knock-out pour le récepteur 5-HT₆ (5-HT₆^{KO/KO}). Il s'agit d'un KO constitutif, généré par délétion de l'exon 3 et 4 du récepteur par une approche Crispr-Cas9.

Etant donné les rôles divers que semble avoir le récepteur lors du développement et à l'âge adulte, j'ai réalisé une cartographie de l'expression du récepteur à différents stades développementaux et à l'âge adulte qui est de 2 mois (60 jours) chez la souris. Dans un premier temps, je vais décrire ce travail de caractérisation chez la souris adulte.

I) CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE LA SOURIS ADULTE

A) CARTOGRAPHIE GENERALE DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE LA SOURIS ADULTE

J'ai utilisé la souche de souris 5-HT₆^{GFP/GFP} afin de cartographier les différentes régions exprimant le récepteur 5-HT₆ dans des tranches de cerveau et de moelle épinière de souris adulte (figure 23A). J'ai réalisé l'immunomarquage de la GFP couplée au récepteur, et acquis les images en microscopie confocale.

Au niveau frontal du cerveau (Figure 23B.a), nous observons la présence du récepteur au niveau de couches corticales externes (Figure 23B.a.1) et internes (Figure 23B.a.2). Le récepteur est aussi exprimé dans les bulbes olfactifs (Figure 23B.a.3).

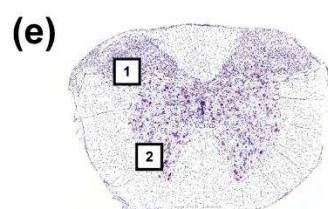
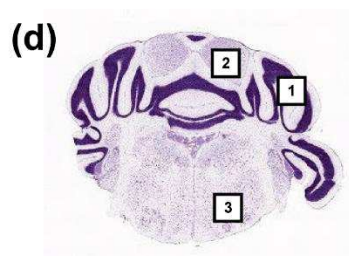
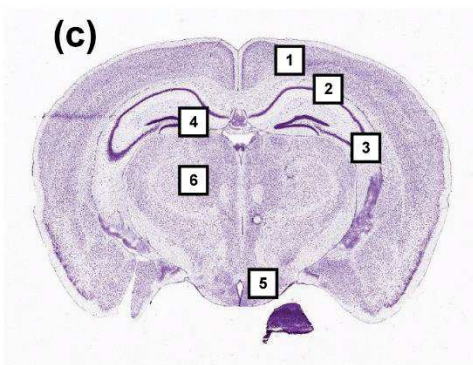
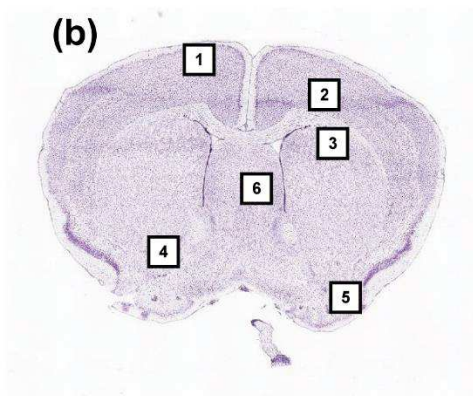
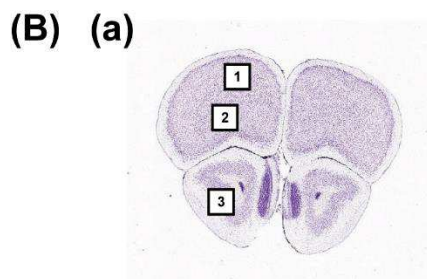
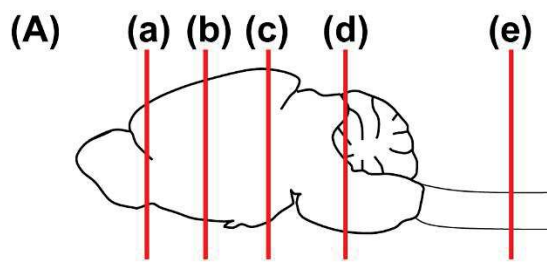
Plus postérieurement, le récepteur est encore exprimé dans différentes couches corticales, ici dans le cortex moteur et somatosensoriel. (Figure 23B.b.1 et 2). Nous observons un signal très fort dans différentes sous-structures du striatum : les noyaux caudé-putamen (Figure 23B.b.3), le noyau accumbens (Figure 23B.b.4) et les tubercules olfactifs (Figure 23B.b.5). Une expression plus faible est aussi visible au niveau du septum (Figure 23B.b.6).

A un niveau encore plus postérieur, le récepteur est toujours exprimé au niveau du cortex, ici le cortex pariétal associatif (Figure 23B.c.1). Le récepteur est aussi présent au niveau de l'hippocampe : CA1 (Figure 23B.c.2), CA3 (Figure 23B.c.3) et gyrus denté (Figure 23B.c.4). Nous identifions aussi la présence du récepteur au niveau de l'hypothalamus (Figure 23B.c.5). En revanche les différents noyaux appartenant au thalamus ne semblent pas exprimer le récepteur 5-HT₆ (Figure 23B.c.6).

Nous n'observons pas d'expression du récepteur dans le cervelet ni dans le bulbe rachidien (Figure 23B.d.1 et 3) mais une forte expression dans le mésencéphale, ici le colliculus (Figure 23B.d.2).

Enfin, nous identifions une expression du récepteur 5-HT₆ au niveau de la moelle épinière (ici au niveau thoracique), dans la corne dorsale (Figure 23B.e.1) et la corne ventrale (Figure 23B.e.2).

L'expression du récepteur 5-HT₆ est donc retrouvée dans de nombreuses structures aux rôles très divers. Comme déjà décrit dans la littérature, l'expression du récepteur est la plus forte dans des régions impliquées dans la régulation de fonctions cognitives supérieures, notamment le cortex, l'hippocampe et le striatum. Nous nous focaliserons spécifiquement sur ces structures.



5-HT₆R-GFP

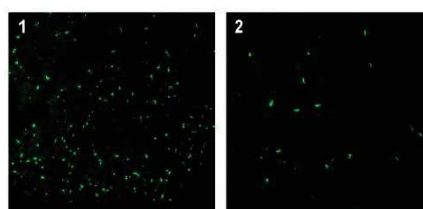
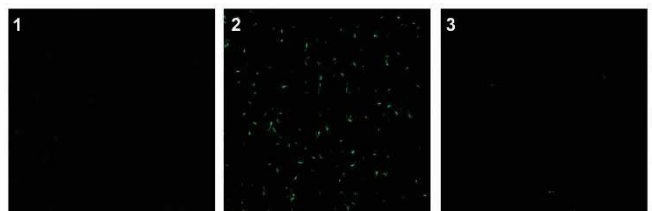
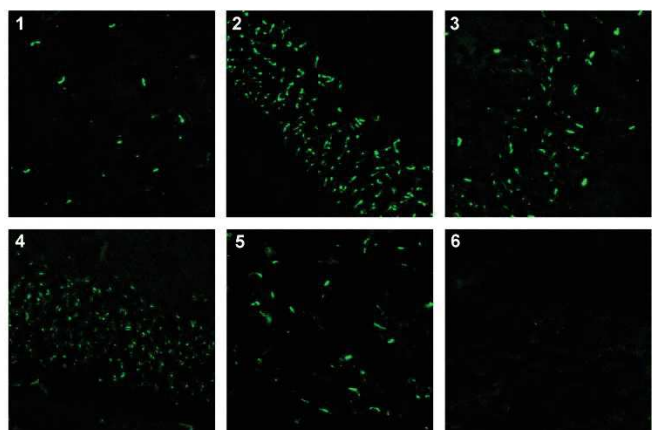
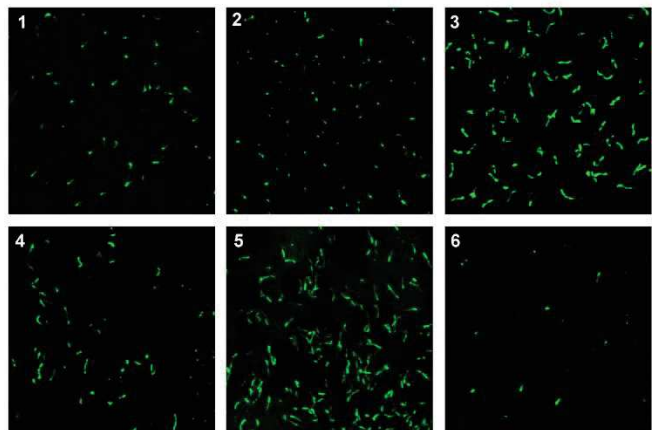
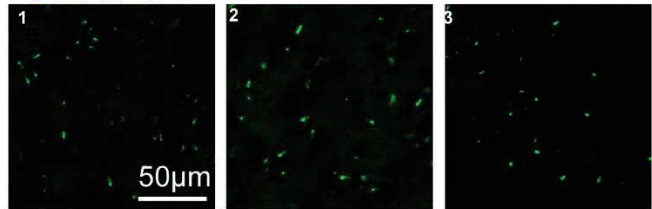


Figure 23 : Visualisation de l'expression du récepteur 5-HT₆ par immunofluorescence dans le cerveau de souris adulte.

(A) Représentation en vue sagittale d'un cerveau de souris adulte. Les lignes rouges et classées de (a) à (e) indiquent les niveaux de coupes présentées en (B). **(B)** Images de coupes coronales (à gauche) traitées par coloration de Nissl (tirées du Mouse Brain Atlas <https://mouse.brain-map.org/>) aux niveaux où les immunomarquages (présentés à droite) ont été réalisés. Sur chaque image, les encadrés blancs numérotés représentent les zones d'où les marquages présentés à droite sont issus. **(a.1)** couches externes du cortex préfrontal. **(a.2)** couches internes du cortex préfrontal. **(a.3)** bulbe olfactif. **(b.1)** couches externes du cortex moteur. **(b.2)** couches internes du cortex moteur. **(b.3)** noyau caudé-putamen. **(b.4)** noyau accumbens. **(b.5)** tubercule olfactif. **(b.6)** septum. **(c.1)** cortex pariétal. **(b.2)** CA1 de l'hippocampe. **(c.3)** CA3 de l'hippocampe. **(c.4)** DG de l'hippocampe. **(c.5)** hypothalamus. **(c.6)** thalamus. **(d.1)** cervelet. **(d.2)** mésencéphale. **(d.3)** bulbe rachidien. **(e.1)** corne dorsale de la moelle épinière. **(e.2)** corne ventrale de la moelle épinière. Le marquage du récepteur 5-HT₆ est présenté en vert.

B) ETUDE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES

La localisation subcellulaire du récepteur 5-HT₆ est encore une question ouverte, certaines études ayant montré sa localisation dans les dendrites (Gérard et al., 1997) ou dans les cils primaires (Brailov et al., 2000). Seulement les anticorps utilisés dans ces études montrent l'expression du récepteur 5-HT₆ dans le cervelet, or les marquages effectués sur nos souris 5-HT₆^{GFP/GFP} ne montrent aucun marquage dans le cervelet, de façon cohérente avec une étude récente utilisant la méthode d'ISH (Helboe et al., 2015), remettant fortement en cause la spécificité de ces anticorps. La caractérisation des régions exprimant le récepteur que j'ai réalisée (figure 23) montre que le récepteur est localisé dans des structures cellulaires fines et allongées ressemblant à des cils. J'ai tiré profit de l'enrichissement dans les cils de plusieurs protéines, considérées comme des marqueurs de cil primaire, pour réaliser des co-marquages et valider cette localisation ciliaire. Dans cette étude les marqueurs sont l'adénylate cyclase 3 (AC3) et la GTPase ciliaire Arl13b. Les co-marquages AC3/Arl13b/GFP montrent que toutes les structures cellulaires dans lesquelles le récepteur 5-HT₆ est exprimé sont des cils primaires (Figure 24A).

La figure 24 présente le résultat de ces immunomarquages dans les trois structures exprimant fortement le récepteur et impliquées dans des fonctions cognitives

supérieures : le cortex, l'hippocampe et le striatum. Nous remarquons que l'expression de ces deux marqueurs dans les cils est exclusive, les cils exprimant fortement AC3 (en rouge) n'expriment pas la protéine Arl13b (en cyan) et inversement.

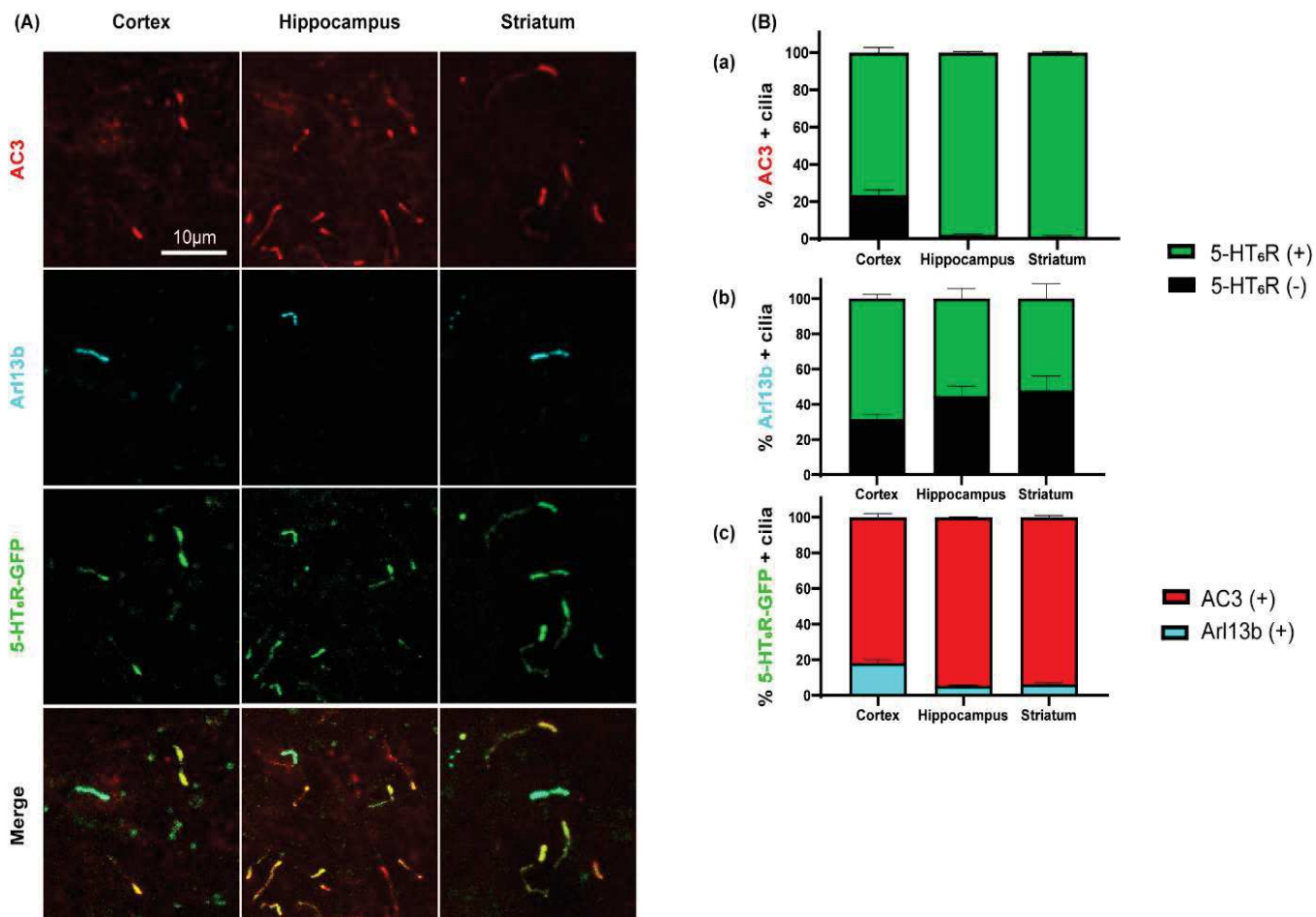


Figure 24 : Co-expression du récepteur 5-HT₆ avec différents marqueurs du cil primaire dans différentes structures.

(A) Immunomarquages des protéines ciliaires AC3 (en rouge) et Arl13b (en cyan), et du récepteur 5-HT₆-GFP (en vert) dans la couche V du cortex moteur (à gauche), le CA1 de l'hippocampe (au milieu) et le noyau caudé-putamen du striatum (à droite). **(B)** Quantification des cils primaires co-exprimant les marqueurs ciliaires et le récepteur 5-HT₆. **(a)** Pourcentage des cils exprimant AC3 qui co-expriment le récepteur 5-HT₆ (en vert) (cortex : n=813 cils AC3+ chez 4 animaux ; hippocampe : n=580 cils AC3+ chez 3 animaux ; striatum : n=3110 cils AC3+ chez 10 animaux). **(b)** Pourcentage des cils exprimant Arl13b qui co-expriment le récepteur 5-HT₆ (en vert) (cortex : n=197 cils Arl13b+ chez 4 animaux ; hippocampe : n=58 cils Arl13b+ chez 3 animaux ; striatum : n=451 cils Arl13b+ chez 10 animaux). **(c)** Pourcentage des cils exprimant le récepteur 5-HT₆ qui co-expriment AC3 (en rouge) et Arl13b (en cyan) (cortex : n=765 cils 5-HT₆+ chez 4 animaux ; hippocampe : n=600 cils 5-HT₆+ chez 3 animaux ; striatum : n=3273 cils 5-HT₆+ chez 10 animaux). Les moyennes des pourcentages de chaque animal sont représentées +/- sem.

J'ai quantifié la proportion des cils exprimant AC3 qui co-expriment le récepteur (figure 24B.a) et la proportion des cils exprimant Arl13b qui co-expriment le récepteur (figure 24B.b).

J'ai aussi quantifié la proportion des cils qui expriment le récepteur 5-HT₆ et qui co-expriment AC3 ou Arl13b (figure 24B.c). Ces résultats sont discutés un peu plus bas. Dans la littérature, deux études suggèrent que le marqueur exprimé dans un cil donné pourrait dépendre du type cellulaire. En effet, en réalisant différents immunomarquages les auteurs de ces études ont déterminé que les cils neuronaux sont enrichis en AC3, alors que les cils astrocytaires expriment fortement la protéine Arl13b (Sipos et al., 2018; Sterpka and Chen, 2018). J'ai donc voulu déterminer si dans nos conditions, les cils marqués par AC3 pourraient être des cils neuronaux, alors que ceux marqués par Arl13b appartiendraient à des astrocytes. Pour cela, j'ai réalisé des co-marquages d'AC3 ou Arl13b avec différents marqueurs de types cellulaires dans les différentes structures d'intérêt. Pour identifier les neurones, j'ai réalisé des marquages de la protéine nucléaire neuronale NeuN, largement utilisé comme marqueur neuronal ubiquitaire (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015). Pour identifier les astrocytes, dans l'hippocampe, j'ai réalisé des marquages de la *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Ce marqueur astrocytaire est fortement exprimé dans l'hippocampe mais son niveau d'expression est faible dans les autres structures. Dans le cortex et le striatum, j'ai donc marqué la S100 calcium-binding protein β (S100 β), un marqueur astrocytaire fortement exprimé dans ces structures (Hinkle et al., 1997). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 25, où le marqueur ciliaire apparaît en cyan et le marqueur de type cellulaire est représenté en rouge. Dans les trois structures, nous observons que la totalité des cils exprimant un niveau élevé de la protéine AC3 sont associés à des neurones. En revanche, les cils exprimant un niveau élevé d'Arl13b sont associés à des astrocytes. Nos résultats confirment donc que des cils appartenant à des types cellulaires différents ont un profil moléculaire différent, en particulier quant au marqueur qui permet de les identifier.

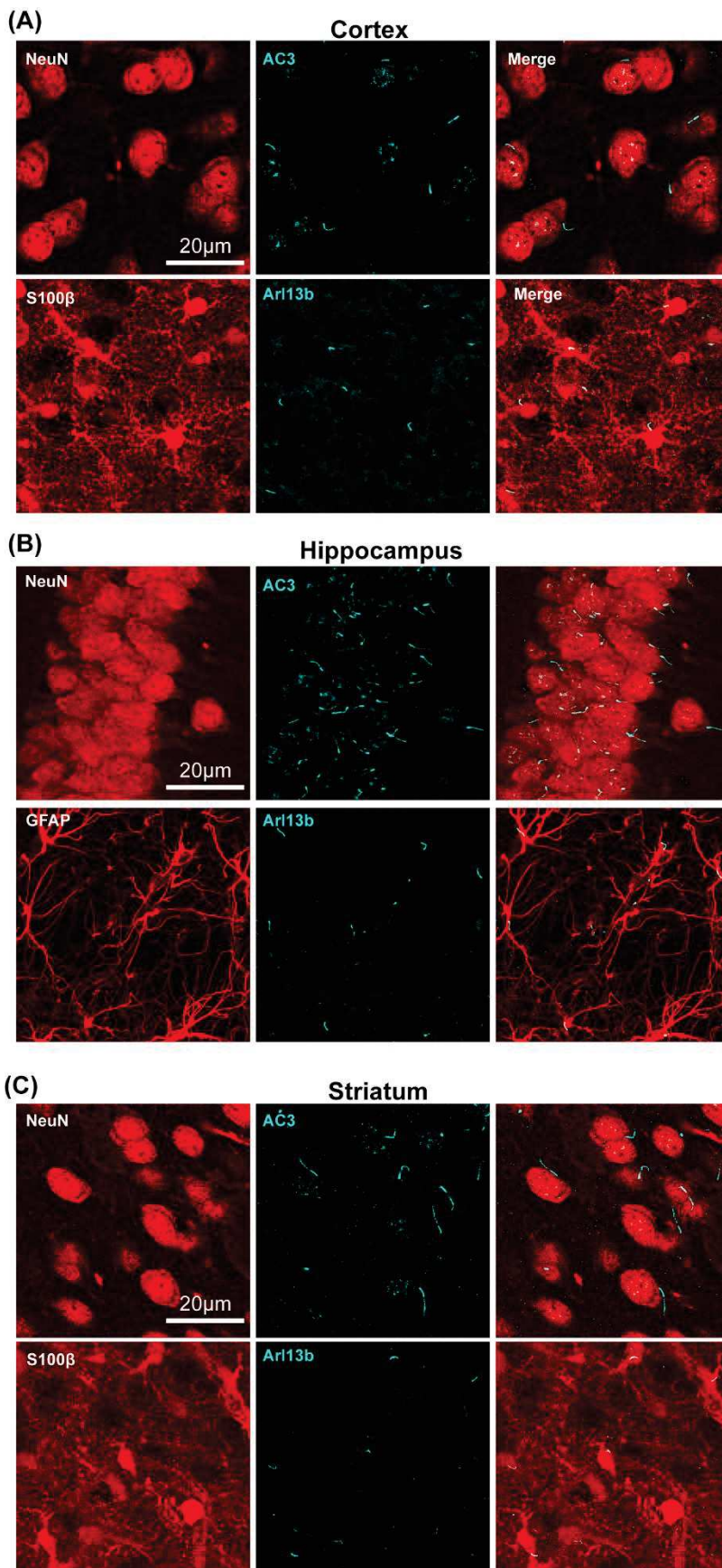


Figure 25 : Expression différentielle des marqueurs ciliaires AC3 et Arl13b par les neurones et les astrocytes.

Imagerie confocale de différents marqueurs de types cellulaires et ciliaires. **(A)** Immunomarquages en rouge de NeuN, une protéine neuronale (en haut), et de S100β, une protéine astrocytaire (en bas) dans le cortex. Les co-marquages avec AC3 ou Arl13b (en cyan) montrent l'association des cils AC3+ avec les neurones et l'association des cils Arl13b+ avec les astrocytes. **(B)** Immunomarquages dans l'hippocampe de NeuN (en haut) et de GFAP, une protéine astrocytaire hippocampique (en bas). Les co-marquages avec les marqueurs ciliaires montrent l'association des cils AC3+ avec les neurones et Arl13b+ avec les astrocytes. **(C)** Immunomarquages dans le striatum, même observation que dans le cortex en (A).

Ces résultats nous permettent maintenant d'identifier de façon claire les cils neuronaux et les cils astrocytaires. Les résultats présentés en figure 24B permettent donc de quantifier la proportion de neurones et d'astrocytes exprimant le récepteur 5-HT₆ dans les différentes structures. En effet, jusqu'à maintenant le récepteur 5-HT₆ a toujours été décrit comme un récepteur uniquement neuronal. L'étude récente réalisée chez le rat par ISH (Helboe et al., 2015) ne parvient pas à identifier la présence d'ARNm codant pour le récepteur dans les astrocytes, or nous observons bien la présence du récepteur dans ces cellules. Dans la figure 24B, l'histogramme (a) représente en vert la proportion de cils neuronaux (AC3 positifs) exprimant le récepteur 5-HT₆. En moyenne 76% des cils neuronaux corticaux expriment le récepteur 5-HT₆, et ce pourcentage atteint 98% dans l'hippocampe et le striatum. Ceci démontre donc une très forte expression du récepteur dans les neurones. L'histogramme (b) quantifie en vert la proportion de cils astrocytaires (Arl13b positifs) exprimant le récepteur. Nous observons que 68% des cils astrocytaires corticaux expriment le récepteur 5-HT₆. Ce pourcentage est de 55% dans l'hippocampe et 52% dans le striatum. Ce résultat démontrant que plus de la moitié des astrocytes expriment le récepteur 5-HT₆ est très intéressant car, comme dit auparavant, cette localisation astrocytaire n'a pas été décrite dans la littérature. Le rôle et la structure du récepteur dans les astrocytes restent donc à élucider. Enfin, l'histogramme (c) représente la proportion de neurones (en rouge) et d'astrocytes (en cyan) parmi les cellules exprimant le récepteur 5-HT₆. Dans le cortex, 82% des cellules qui expriment le récepteur sont des neurones et 18% sont des astrocytes. Cette proportion est très différente dans le striatum et l'hippocampe, où environ 95% des cellules exprimant le récepteur sont des neurones et seulement 5% sont des astrocytes.

L'étude de Helboe et al., 2015, identifie que la majorité des cellules exprimant le récepteur 5-HT₆ dans nos 3 structures d'intérêt sont les neurones de projection plutôt que les interneurones. J'ai donc voulu vérifier quels types de neurones expriment le récepteur dans mon modèle d'étude. Pour cela, j'ai réalisé des immunomarquages des différents types neuronaux afin de déterminer lesquels expriment le récepteur. Dans le cortex (ici le cortex moteur), j'ai mis en évidence la population d'interneurones GABAergiques inhibiteurs en marquant le GABA (en rouge), principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. J'ai réalisé des co-marquages avec un anticorps anti-GFP pour visualiser le récepteur 5-HT₆-GFP au

niveau de ces neurones (en vert) (figure 26A). J'ai pu ainsi quantifier la proportion d'interneurones GABAergiques exprimant le récepteur 5-HT₆, représentée par la proportion de neurones marqués en rouge et possédant un cil vert (figure 26A, histogramme de gauche). En moyenne seuls 9% des interneurones GABAergiques du cortex moteur expriment le récepteur. L'histogramme de droite représente en noir la proportion de neurones exprimant le récepteur et exprimant le GABA. Nos résultats montrent que les interneurones GABAergiques représentent moins de 1% de la totalité des cellules exprimant le récepteur 5-HT₆ dans le cortex. Dans l'hippocampe, j'ai réalisé les mêmes marquages (figure 26B), cependant la forte densité neuronale rend impossible d'identifier globalement à quelle cellule est rattaché un cil, rendant une quantification précise impossible. Néanmoins, même sans quantification précise, nous observons facilement que le récepteur 5-HT₆ est très majoritairement exprimé par des cellules qui ne sont pas des interneurones GABAergiques, indiquant un schéma d'expression semblable au cortex. Des interneurones GABAergiques hippocampiques exprimant le récepteur sont cependant parfois identifiables, comme illustré dans la figure 26B. Dans le striatum, les neurones principaux sont les neurones épineux moyens (*medium spiny neurons* : MSN). Ces neurones représentent environ 95% des neurones du striatum et sont des neurones GABAergiques inhibiteurs. Cette caractéristique ne permet donc pas de marquer les interneurones GABAergiques du striatum afin de les différencier des MSN. Les MSN expriment cependant spécifiquement la *Dopamine and cAMP Regulated neuronal PhosphoProtein* (DARPP-32), une protéine qui régule la plasticité synaptique des MSN médiée par la dopamine (Yagishita et al., 2014). J'ai ainsi réalisé des co-marquages contre la DARPP-32 afin de visualiser les MSN (en rouge) et le récepteur 5-HT₆-GFP (en vert) (figure 26C). Nous pouvons voir que la très grande majorité des cils primaires exprimant le récepteur 5-HT₆ sont associés aux MSN dans le striatum.

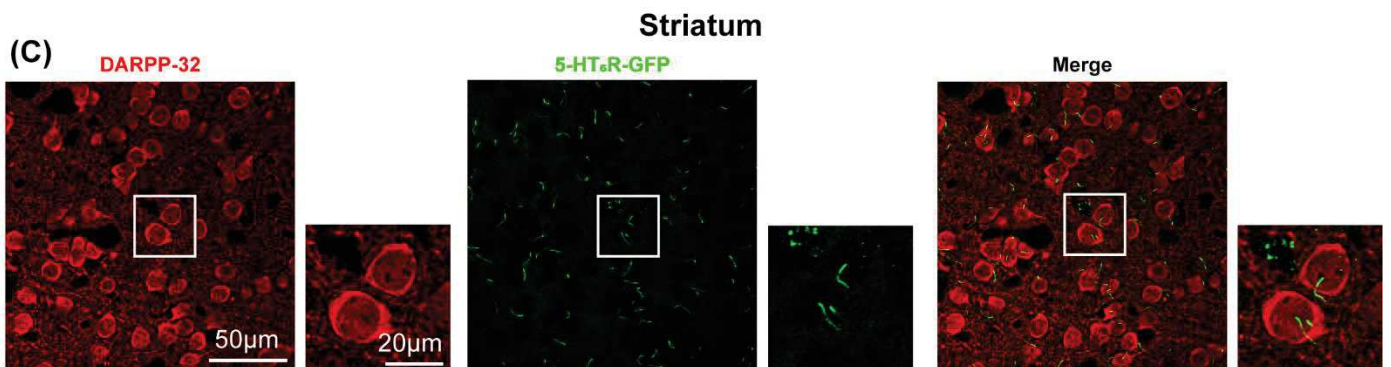
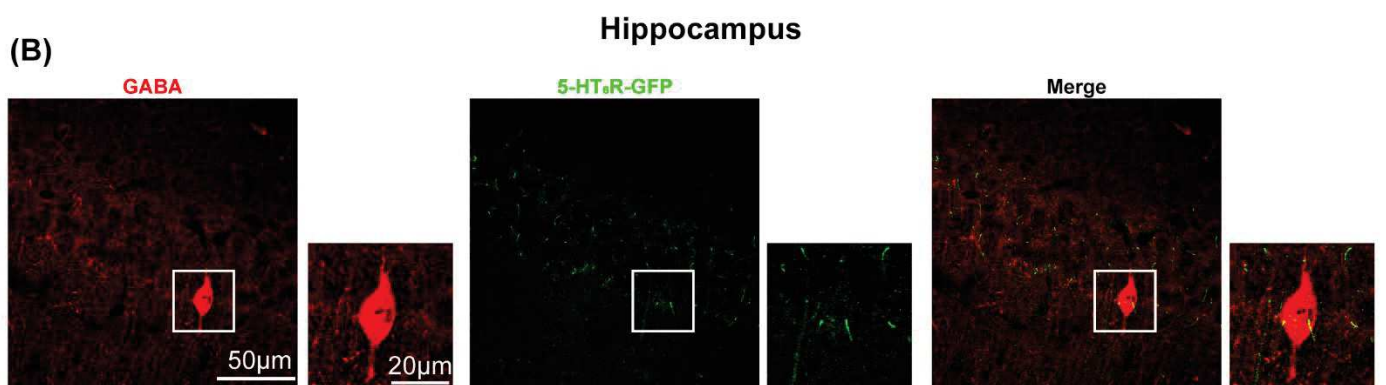
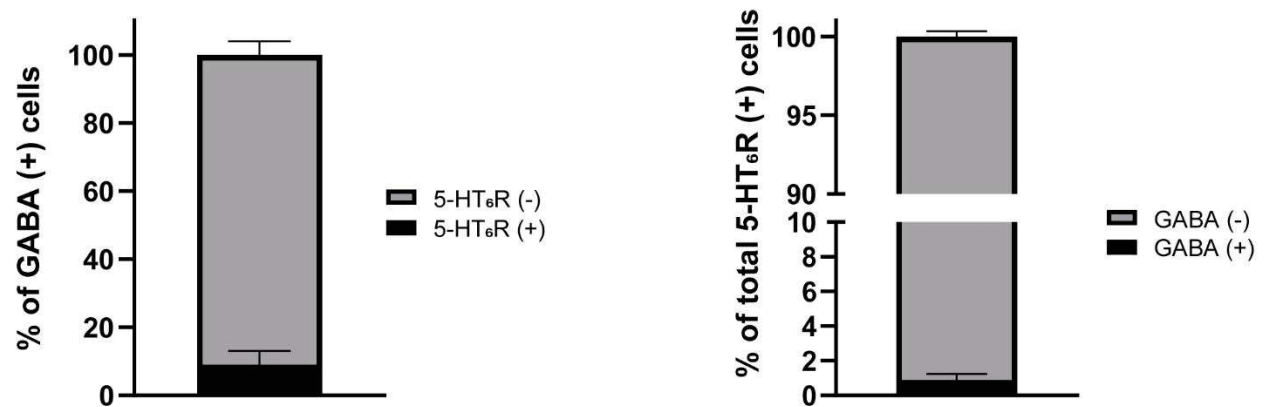
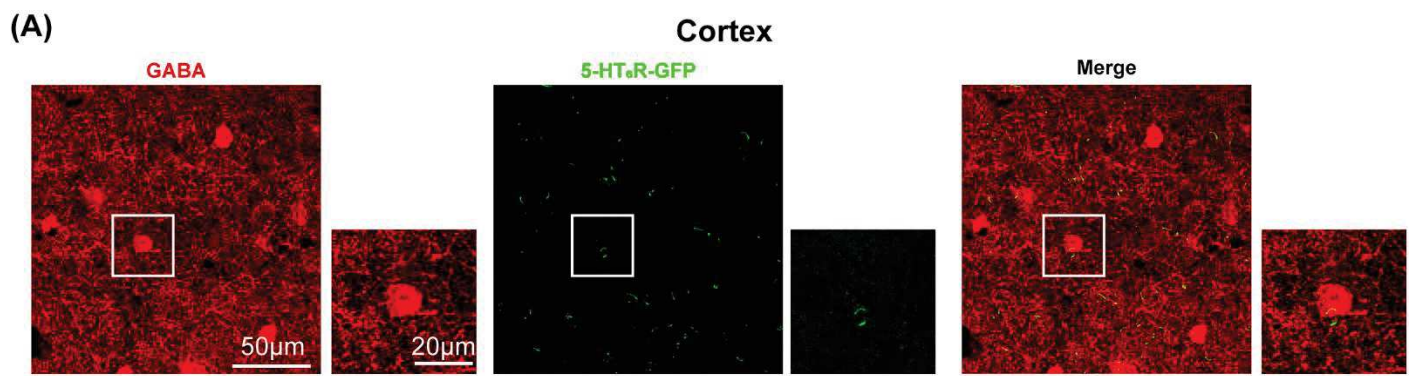


Figure 26 : Expression du récepteur 5-HT₆ par différents types neuronaux

Imagerie en microscopie confocale de co-marquages du récepteur 5-HT₆-GFP avec différents marqueurs neuronaux. **(A)** Immunomarquages des interneurones GABAergiques (GABA en rouge) et du récepteur 5-HT₆ (en vert) dans le cortex. L'histogramme de gauche représente le pourcentage d'interneurones GABAergiques associés à un cil primaire exprimant le récepteur 5-HT₆ (en noir) (n=115 neurones GABAergiques chez 6 animaux). L'histogramme de droite représente le pourcentage de cils primaires exprimant le récepteur 5-HT₆ associés à des interneurones GABAergiques (en noir) (n=726 cils primaires exprimant le récepteur 5-HT₆ chez 6 animaux). Les moyennes des pourcentages de chaque animal sont représentées +/- sem. **(B)** Immunomarquages des interneurones GABAergiques (GABA en rouge) et du récepteur 5-HT₆ (en vert) dans l'hippocampe. **(C)** Immunomarquages des MSN (DARPP-32 en rouge) et du récepteur 5-HT₆ (en vert) dans le cortex.

Le récepteur est présent très majoritairement dans les neurones de projection dans les différentes structures étudiées, avec une faible proportion d'interneurones exprimant aussi le récepteur. Ce résultat est cohérent avec la dernière étude publiée à ce sujet (Helboe et al., 2015), en revanche nous identifions que les astrocytes expriment aussi le récepteur 5-HT₆.

Notre étude de caractérisation montre donc que, chez la souris adulte, la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT₆ semble restreinte aux cils primaires.

C)ROLE DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LA MORPHOLOGIE DU CIL PRIMAIRE.

Certaines études qui ont décrit la présence du récepteur 5-HT₆ dans les cils primaires ont aussi rapporté que la surexpression du récepteur (Guadiana et al., 2013; Hu et al., 2017) pouvait allonger la taille des cils, voir provoquer des cils ramifiés. Inversement, l'équipe de John Neumaier a montré qu'un traitement aigu de cultures de neurones embryonnaires de striatum avec un antagoniste du récepteur (le SB399885) induisait une forte réduction (de moitié) de la taille des cils primaire après 24h. J'ai voulu reproduire ces résultats pour en étudier les mécanismes plus en détail. Pour cela j'ai réalisé des cultures primaires de striatum à partir d'embryons de souris 5-HT₆^{GFP/GFP} au stade E15,5, que j'ai traitées avec un agoniste inverse du récepteur (le SB271046) ou un agoniste (le WAY181187) au 10^{ème} jour *in vitro* (DIV10) et fixées après 24h.

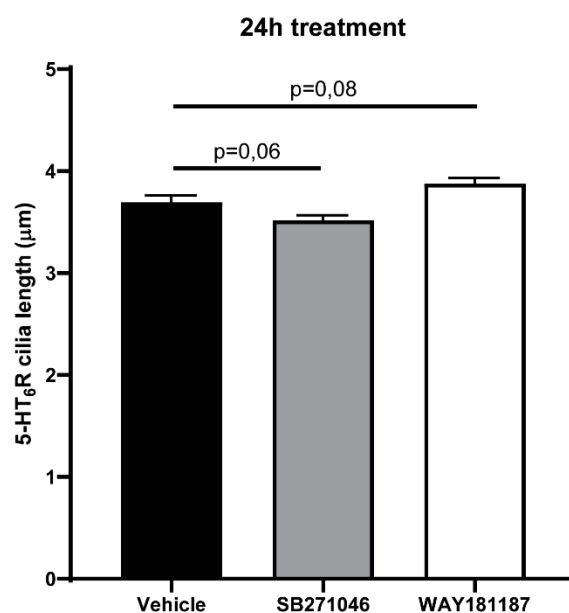


Figure 27 : Impact de l'inhibition ou l'activation pharmacologique du récepteur 5-HT₆ sur la longueur des cils primaires dans des cultures primaires de neurones de striatum.

Les cultures primaires de neurones de striatum venant d'embryons 5-HT₆^{GFP/GFP} ont été traitées à DIV10 avec du SB271046 (agoniste inverse) ou du WAY181187 (agoniste) et fixées après 24h. La longueur des cils a été mesurée après immunomarquage du récepteur 5-HT₆-GFP (vehicle n = 536 ; SB271046 n = 894 ; WAY181187 n = 778).

La figure 27 montre qu'il n'y a pas de différence significative de taille des cils primaires entre les différentes conditions de traitement, bien qu'une tendance apparaisse (à la

baisse pour le SB271046 et à la hausse pour le WAY181187), mais les différences sont très faibles.

Pour étudier le rôle potentiel du récepteur dans la morphologie des cils dans un contexte *in vivo* j'ai comparé la longueur des cils sur des coupes de cerveau préparées à partir de souris WT ou bien à partir de souris KO constitutives pour le gène codant pour le récepteur 5-HT₆ (5-HT₆^{KO/KO}). Les images présentées dans la figure 28 montrent les cils neuronaux, marqués avec des anticorps dirigés contre la protéine AC3, dans nos 3 structures d'intérêt, chez les souris WT (en haut) ou KO (en bas). Les histogrammes présentent la quantification de la longueur de ces cils, réalisées grâce au plug-in *Simple neurite tracer* du logiciel Image J (n > 231 cils pour chaque structure et génotype). Nous pouvons ici faire deux observations. Que ce soit chez les souris WT ou KO, la taille des cils varie suivant la structure considérée. On peut voir que les cils sont plus courts dans le cortex (7,99 +/- 0,12µm chez les WT et 7,23 +/- 0,1µm chez les 5-HT₆^{KO/KO}), alors qu'ils sont le plus long au niveau du striatum (14,55 +/- 0,25µm chez les WT et 11,81 +/- 0,14µm 5-HT₆^{KO/KO}). Dans l'hippocampe, la taille des cils est intermédiaire (9,89 +/- 0,15µm chez les WT et 9,39 +/- 0,09µm chez les 5-HT₆^{KO/KO}). Nous observons également que les cils primaires sont significativement plus petits chez les souris 5-HT₆^{KO/KO} que chez les souris WT dans le cortex et le striatum. Nous observons une tendance également à la diminution de la taille des cils dans l'hippocampe mais la significativité n'est pas atteinte, malgré un effectif élevé (p=0,07). L'influence du récepteur sur la taille des cils hippocampique pourrait être plus faible que dans les autres structures, demandant un effectif encore plus élevé pour la mettre en évidence.

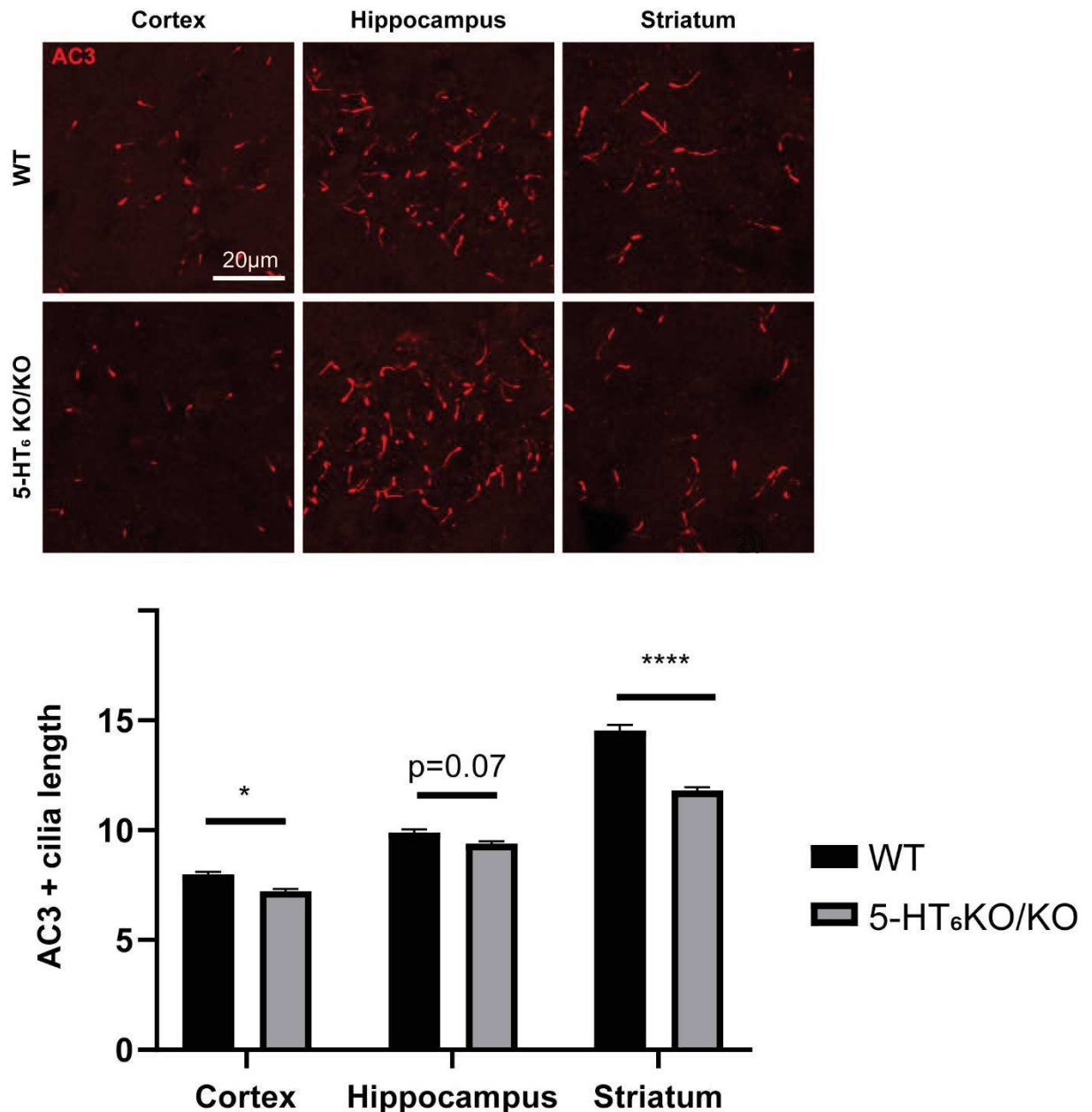


Figure 28 : Impact de la délétion génétique du récepteur 5-HT₆ sur la longueur des cils primaires.

(A) Immunomarquages de la protéine AC3 dans le cortex, l'hippocampe et le striatum chez des animaux de type sauvage (WT) et des animaux 5-HT₆^{KO/KO}. (B) Histogrammes présentant la longueur moyenne des cils dans les différentes structures et suivant le génotype (WT en noir et 5-HT₆^{KO/KO} en gris), mesurée à l'aide du logiciel Image J. Résultats analysés par un test de Kruskal-Wallis (n > 231 cils par génotype et par structure chez 3 animaux ; *p < 0,05 ; ****p < 0,0001).

Ces résultats suggèrent que le récepteur 5-HT₆ a bien une influence sur la taille du cil. Toutefois, la taille observée dépend aussi de la structure cérébrale étudiée. Ceci pourrait être dû simplement à un taux d'expression différent du récepteur dans les

différentes structures, ou cela pourrait mettre en jeu d'autres facteurs tels que des interactions avec différentes voies de signalisation.

II) CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL EMBRYONNAIRE ET POST-NATAL

Le récepteur 5-HT₆ est un acteur important du développement neuronal. Nous avons vu en introduction qu'il participe en particulier à la migration neuronale, phénomène ayant lieu principalement pendant la deuxième moitié du développement embryonnaire. Il est donc important de déterminer son expression pendant cette période. Or, aucune étude ne décrit de façon exhaustive l'expression spatio-temporelle du récepteur 5-HT₆ au cours du développement embryonnaire et pendant la période post-natale. Nous avons donc tiré avantage de notre modèle de souris KI GFP pour réaliser précisément cette caractérisation.

A) DESCRIPTION SPATIOTEMPORELLE DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE CERVEAU DE LA SOURIS PENDANT LA PERIODE EMBRYONNAIRE

Nous avons tout d'abord déterminé le stade embryonnaire auquel le récepteur apparaît. Pour cela, nous avons réalisé des immunomarquages ciblant le récepteur 5-HT₆-GFP sur des coupes d'embryons de souris 5-HT₆^{GFP/GFP}. Comme présenté dans la figure 29, nous détectons la présence du récepteur dès le stade embryonnaire E13,5 (figure 29A). Nous observons à ce stade l'expression du récepteur à différents endroits. Son expression est retrouvée dans quelques cellules au niveau de la plaque corticale et dans le striatum. On détecte également un marquage plus intense, avec un nombre de cellules marquées plus important au niveau de la VZ et la SVZ. Au cours du développement embryonnaire, les régions exprimant le récepteur 5-HT₆ restent les

mêmes. En revanche, comme le montrent les images obtenues sur des coupes venant d'embryons à E17,5 (figure 29B) la densité de marquage augmente très

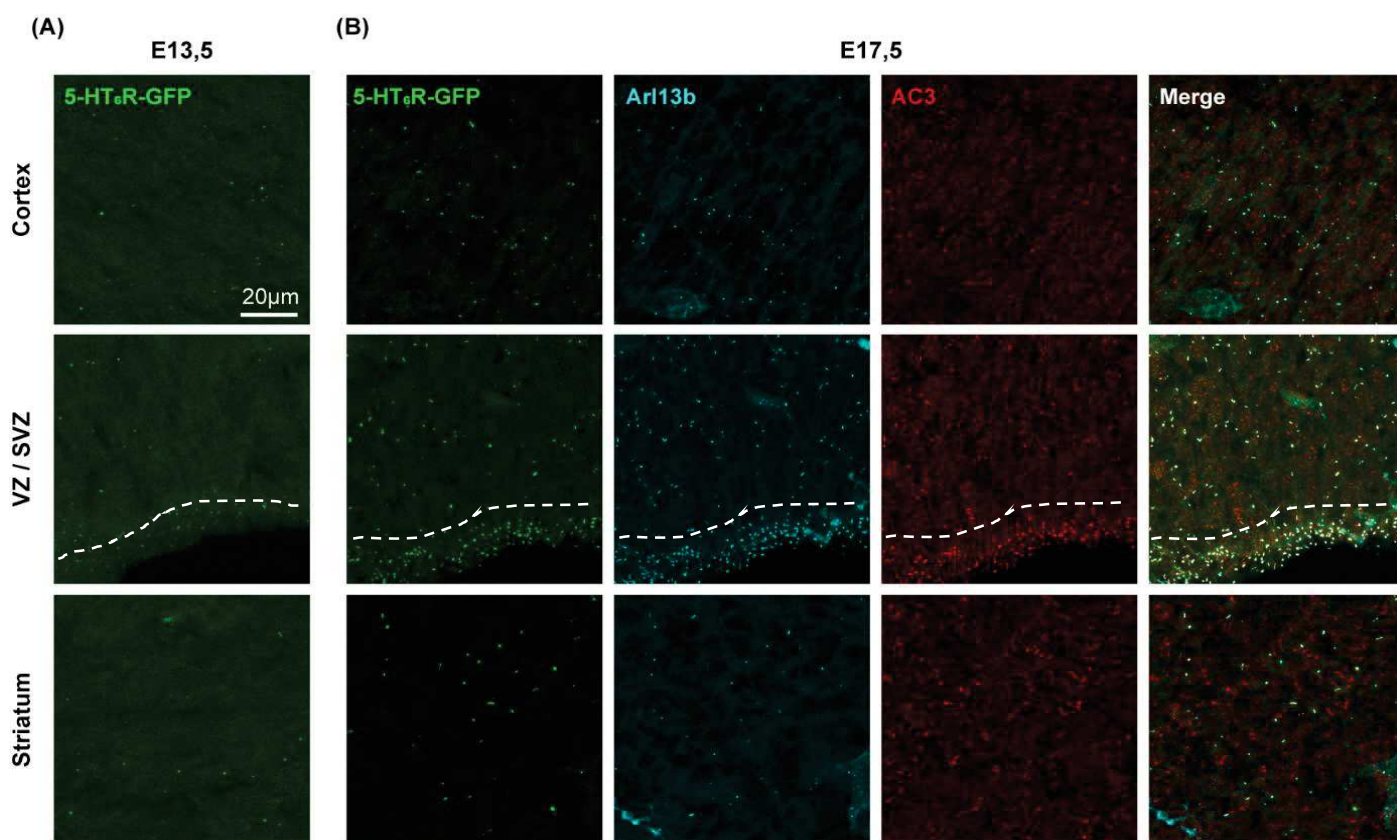


Figure 29 : Expression du récepteur 5-HT₆ au niveau des cils primaires dans différentes structures du cerveau embryonnaire de souris.

(A) Immunomarquages du récepteur 5-HT₆-GFP (en vert) au stade embryonnaire E13,5 au niveau du cortex, des VZ et SVZ (séparées par une ligne pointillée), et du striatum. Le récepteur 5-HT₆ est visible dans des structures ponctiformes. (B) Immunomarquages du récepteur 5-HT₆-GFP (en vert), Arl13b (cyan) et AC3 (rouge) au stade embryonnaire E17,5 au niveau du cortex, SVZ et VZ, et du striatum.

significativement, suggérant une augmentation du nombre de cellules exprimant le récepteur au cours du temps. On observe ici, comme à l'âge adulte, une expression ciliaire du récepteur 5-HT₆, comme montré par les comarquages contre le récepteur 5-HT₆-GFP, Arl13b et AC3. La colocalisation du récepteur 5-HT₆ et Arl13b est facilement observable, en revanche la colocalisation entre le récepteur 5-HT₆ et AC3 est ici difficile à voir, le marquage AC3 ne montrant apparemment pas spécifiquement de cils primaires, excepté au niveau de la VZ et SVZ. Cela pourrait être dû au fait qu'à ce stade développemental, les cils ne sont pas entièrement formés, et peuvent être qualifiés de « proto-cils », n'exprimant pas fortement AC3 (Arellano et al., 2012). La

forte densité de marquage au niveau de cils présents dans la VZ et la SVZ est cohérente avec le rôle du récepteur 5-HT₆ dans les phénomènes ayant lieu dans cette zone, comme la migration des neuroblastes, et suggère un potentiel rôle dans d'autres phénomènes comme la prolifération.

B) CARACTERISATION SPATIOTEMPORELLE DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE CERVEAU DE LA SOURIS PENDANT LA PERIODE POSTNATALE

Le développement postnatal est un stade de développement primordial pour la formation des circuits neuronaux. Il est notamment caractérisé par une élongation et complexification des différentes neurites des neurones (dendrites et axones). Comme nous l'avons décrit en introduction et présenté dans l'étude en annexe, le récepteur 5-HT₆, via son interaction avec ses partenaires Cdk5 et GPRIN1, participe aux différentes étapes du développement neuronal *in vitro*, il est donc important de caractériser son expression au cours du développement postnatal.

Comme le montre la figure 30, au stade post-natal, le récepteur est retrouvé dans les mêmes structures que chez l'adulte. Le récepteur est exprimé au niveau du cortex, de l'hippocampe, du striatum, du septum et des tubercules olfactifs. Cependant, nous pouvons ici faire une observation extrêmement intéressante. Au cours du temps, la localisation subcellulaire du récepteur évolue. En effet, la figure 30A montre l'évolution de la localisation subcellulaire du récepteur entre P0 et P30 dans le striatum. On remarque qu'entre P0 et jusqu'à P7-P10 la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT₆ n'est plus limitée au cil primaire mais s'étend jusqu'au compartiment somato-dendritique. Ceci est illustré au niveau du striatum (figure 30A), mais comme indiqué dans la figure 30B, qui montre l'expression du récepteur à P5, nous observons cette relocalisation dans presque toutes les régions exprimant le récepteur, à l'exception les couches corticales les plus externes.

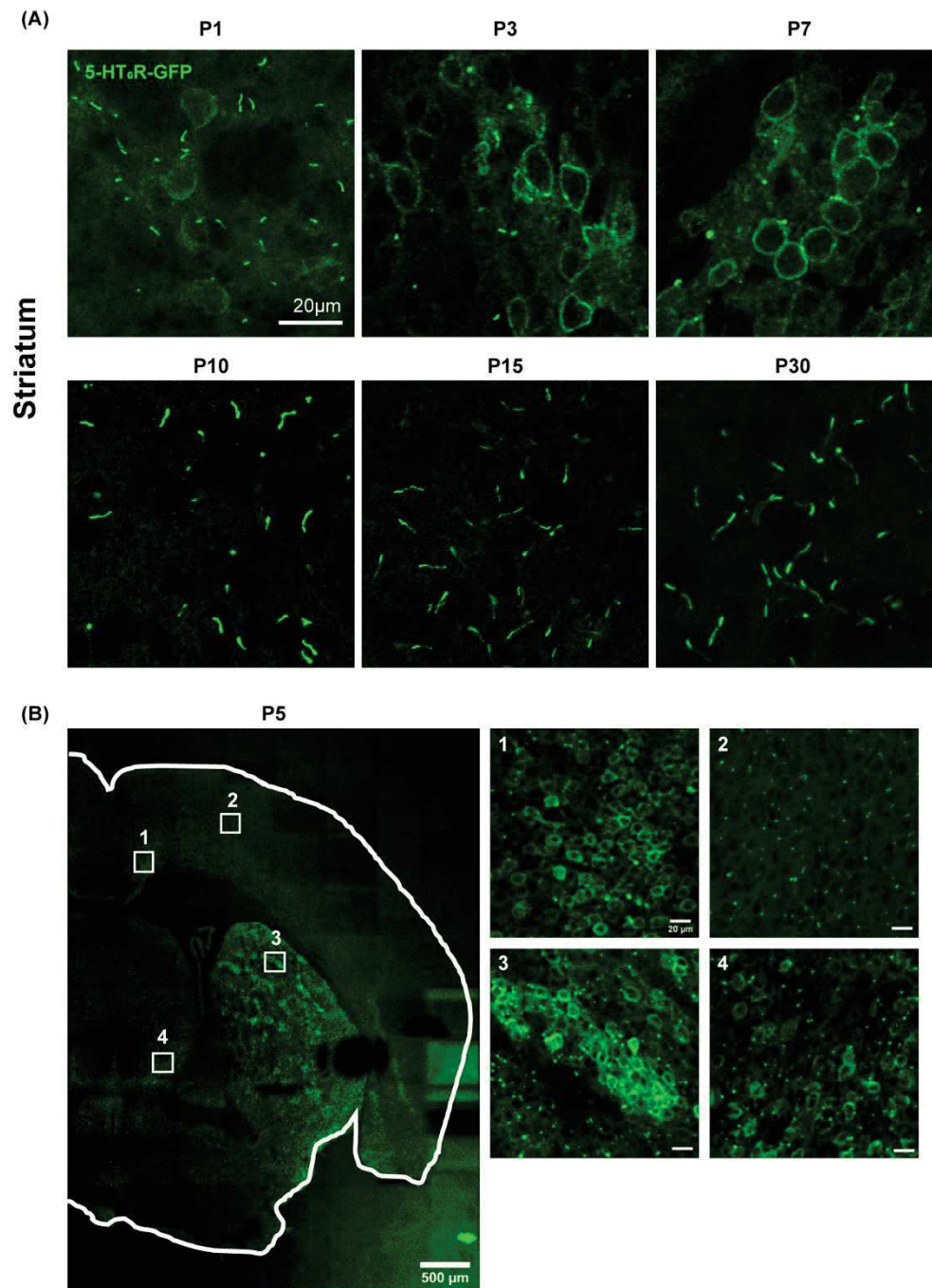


Figure 30 : Changement transitoire de la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT₆ au cours de la période post-natale.

(A) Immunomarquages dirigés contre le récepteur 5-HT₆-GFP (en vert) à différents stades de développement après la naissance dans le striatum, de P1 à P30. La relocalisation transitoire du récepteur 5-HT₆ est observable de P1 à P7 ici. (B) Illustration d'une coupe de cerveau à P5 immunmarquée contre le récepteur 5-HT₆-GFP (en vert). Une relocalisation est observable dans (1) les couches internes du cortex mais pas les couches plus externes (2). Relocalisation aussi observable dans le striatum (3) et le septum (4).

La littérature (Lesiak et al., 2018) et nos expériences *in vitro* suggèrent que la

localisation subcellulaire du récepteur dépend de son niveau d'expression. Lorsque le récepteur est exprimé à un faible niveau, on le trouve uniquement dans le cil primaire. En revanche, lorsque le récepteur est surexprimé, il est retrouvé également au niveau membranaire, aussi bien dans des lignées cellulaires que dans des neurones en culture. Cela pourrait ici suggérer qu'entre P0 et P10, l'expression du récepteur est fortement augmentée. Nous avons initié des expériences de qPCR et de RNAscope pour confirmer cette hypothèse. Le fait que ce changement de localisation transitoire apparaisse à la naissance indique que des changements concomitants à la mise bas (comme des changements hormonaux chez la mère par exemple) impactent l'expression du récepteur. Pour tester l'influence de la naissance par voie naturelle sur la relocalisation transitoire du récepteur 5-HT₆, j'ai réalisé des césariennes chez des mères gestantes environ 24h avant la mise-bas, à E18,5.

J'ai ainsi comparé la localisation du récepteur 5-HT₆ entre des animaux 2 jours après la césarienne ou 2 jours après la mise-bas naturelle (figure 31). Nous observons toujours une relocalisation du récepteur 5-HT₆, indiquant que la naissance, peu importe par quelle voie, est impliquée dans ce phénomène.

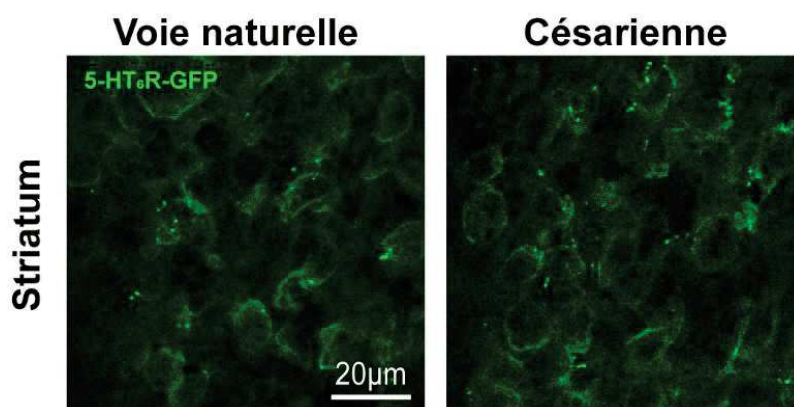


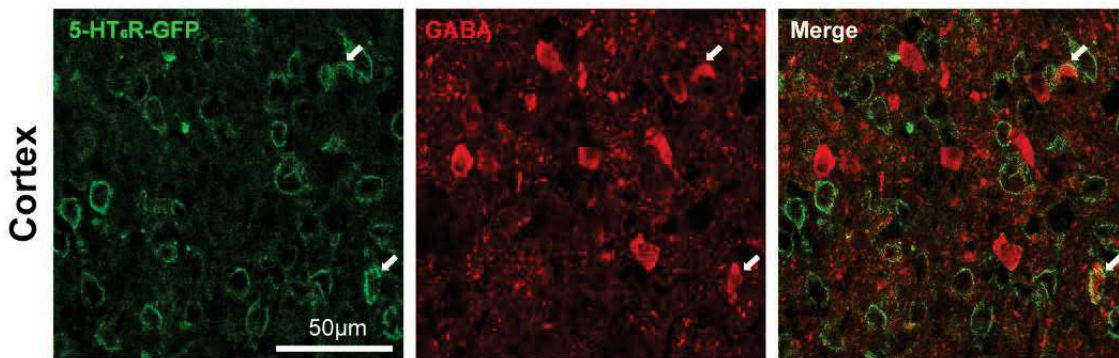
Figure 31 : Impact d'une naissance par césarienne sur la relocalisation du récepteur 5-HT₆. Immunomarquage dirigé contre le récepteur 5-HT₆-GFP (en vert) dans le striatum à P2 après mise bas par voie naturelle (à gauche) ou après césarienne (à droite).

Nous avons montré dans la partie précédente que chez l'adulte le récepteur est exprimé majoritairement dans les neurones de projection dans différentes structures. Nous avons donc voulu voir si ce sont les mêmes types neuronaux qui l'expriment

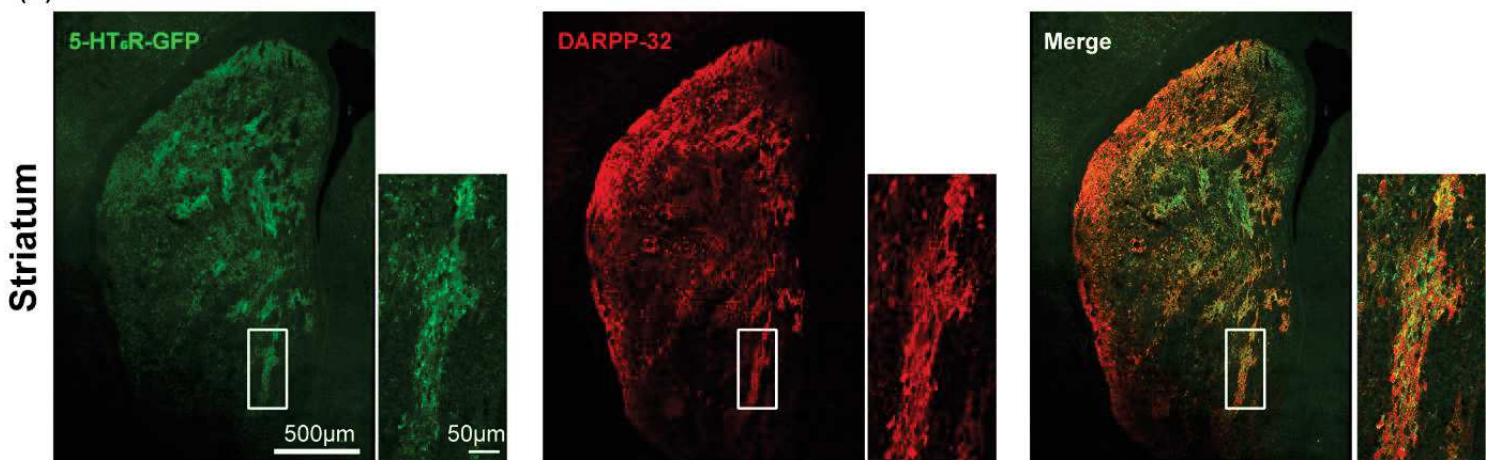
pendant la période post-natale. Pour cela, nous avons réalisé des co-marquages GFP/GABA au niveau du cortex sur des coupes issus d'animaux à P5. La figure 32A présente le résultat de ces marquages, avec le GABA représenté en rouge et le récepteur en vert. On remarque la présence de quelques neurones GABAergiques exprimant le récepteur, indiqués par des flèches blanches. Cependant, comme illustré par la superposition des marquages, la grande majorité des cellules exprimant le récepteur n'expriment pas le GABA. Comme chez l'adulte, cela suggère que le récepteur se trouve en grande partie dans les neurones de projections (figure 32A).

Dans le striatum, il apparaît que l'expression du récepteur 5-HT₆ est répartie de façon non-homogène (figure 30B et 32B). Le striatum est une structure organisée en mosaïque comprenant deux types de structures : les striosomes (ou patches) et la matrice, qui diffèrent par les afférences qu'ils reçoivent et leurs projections (Gerfen, 1989; Smith et al., 2016) (voir figure 32C) ainsi que par leur dynamique développementale (Tinterri et al., 2018). A ce stade, le marqueur DARPP-32 est préférentiellement exprimés dans les neurones des striosomes (Tinterri et al., 2018). Pour vérifier l'hypothèse que le récepteur 5-HT₆ pouvait être exprimé préférentiellement dans une de ces structures, j'ai réalisé des co-marquages du récepteur 5-HT₆ (en vert) et de DARPP-32 (en rouge) sur des coupes d'animaux à P5, illustré en figure 32B. Nous pouvons observer que l'expression du récepteur est très localisée au niveau de ces striosomes pendant la période néonatale (figure 32B).

(A)



(B)



(C)

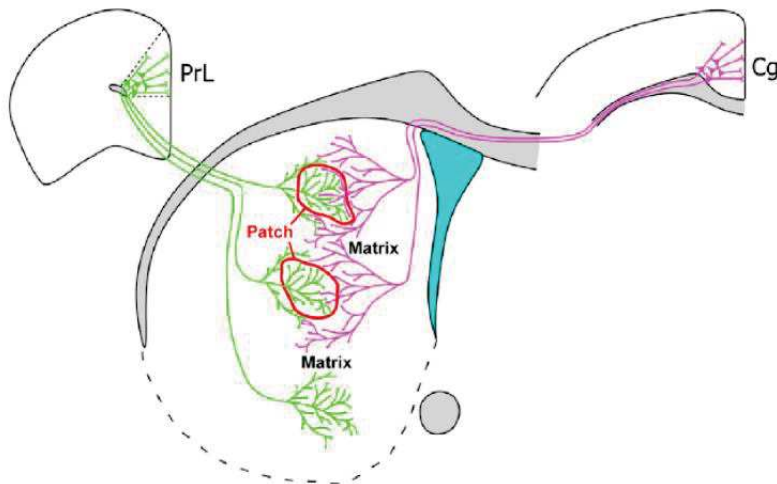


Figure 32 : Expression du récepteur 5-HT₆ par des types neuronaux spécifiques pendant la période post-natale.

(A) Immunomarquages du récepteur 5-HT₆-GFP (vert) et du GABA (en rouge) dans le cortex. Les flèches blanches indiquent les cellules qui co-expriment le récepteur et le GABA. (B) Immunomarquages du récepteur 5-HT₆-GFP (vert) et de DARPP-32 (en rouge) dans le striatum. Les zones encadrées en blanc sont agrandies à droite de chaque image. (C) Schéma montrant un exemple d'afférences spécifiques des striosomes (ou patches) et de la matrice. Les striosomes reçoivent surtout des afférences du cortex pré-limbique (PrL) alors que la matrice reçoit des afférences du cortex PrL et du cortex cingulaire (Cg).

Ce changement transitoire de localisation subcellulaire du récepteur semble important pour le développement neuronal. Dans l'étude de Pujol et al., 2020, j'ai notamment pu identifier que cette relocalisation permettrait au récepteur d'entrer en interaction avec GPRIN1, interaction qui promeut la complexification de l'arborisation dendritique par un mécanisme ligand-indépendant, et AMPc-PKA-dépendant (voir article en annexe). Une hypothèse intéressante serait que ce changement de localisation du récepteur lui permettrait d'entrer en interaction avec de nombreux autres partenaires pendant la période post-natale. Afin d'étudier cette hypothèse, des études d'interactomique sont en cours afin d'identifier les partenaires du récepteur lorsqu'il est exprimé dans le cil primaire uniquement, et lorsqu'il est également présent dans le compartiment somato-dendritique.

III) ETUDE DU ROLE DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE DEVELOPPEMENT LORS DE LA PERIODE POST-NATALE

A) IMPACT DE L'INHIBITION DU RECEPTEUR 5-HT₆ PENDANT LA PERIODE POSTNATALE SUR LE COMPORTEMENT A L'ADOLESCENCE

Le récepteur 5-HT₆ est donc exprimé dès le développement embryonnaire dans des régions cérébrales liées aux fonctions cognitives. De plus sa localisation, la plupart du temps au niveau du cil primaire, change de façon transitoire pendant plusieurs jours après la naissance. Cela suggère un rôle du récepteur dans la mise en place de circuits neuronaux important pour la cognition pendant la période post-natale. Afin d'étudier le rôle du récepteur 5-HT₆ pendant cette période, j'ai réalisé des injections sous-cutanées quotidiennes de l'agoniste inverse SB271046 (3mg/kg) chez des souris nouveau-nées, soit de P1 à P5, soit de P5 à P9. Les souris ont ensuite passé une batterie de tests comportementaux à l'adolescence (de P30 à P40) afin d'étudier la cognition. Ces tests comportementaux ont été réalisés avec l'aide de Clara Margarido, une ingénieure de l'équipe.

Les différents tests comportementaux nous ont permis d'évaluer chez ces souris :

- Le comportement global et la motricité (dans une arène ouverte simple)
- L'anxiété (arène surélevée en croix)
- Les capacités mnésiques (test de reconnaissance d'un nouvel objet)
- La sociabilité (test de Crawley, dit test de sociabilité à 3 chambres).

1) IMPACT DE L'INHIBITION DU RECEPTEUR 5-HT₆ PENDANT LA PERIODE POST-NATALE SUR LE COMPORTEMENT GENERAL DES SOURIS A L'ADOLESCENCE.

Dans le test de l'arène ouverte, nous avons mesuré plusieurs comportements chez les souris. La motricité globale en mesurant la distance parcourue, le nombre de fois où les souris se lèvent sur leurs pattes arrières, ainsi que le comportement de toilettage, en mesurant le nombre et la durée totale des toilettages. Les animaux traités avec le SB271046 entre P1 et P5 (figure 33A) ou P5 et P9 (figure 33B) ne montrent pas de différence comparé aux animaux traités avec la solution contrôle au niveau des différents paramètres mesurés : la distance parcourue (figure 33A.a et 33B.a), le nombre d'élévations sur les pattes arrières (figure 33A.b et 33B.b), le nombre (figure 33A.c et 33B.c) et le temps de toilettage (figure 33A.d et 33B.d).

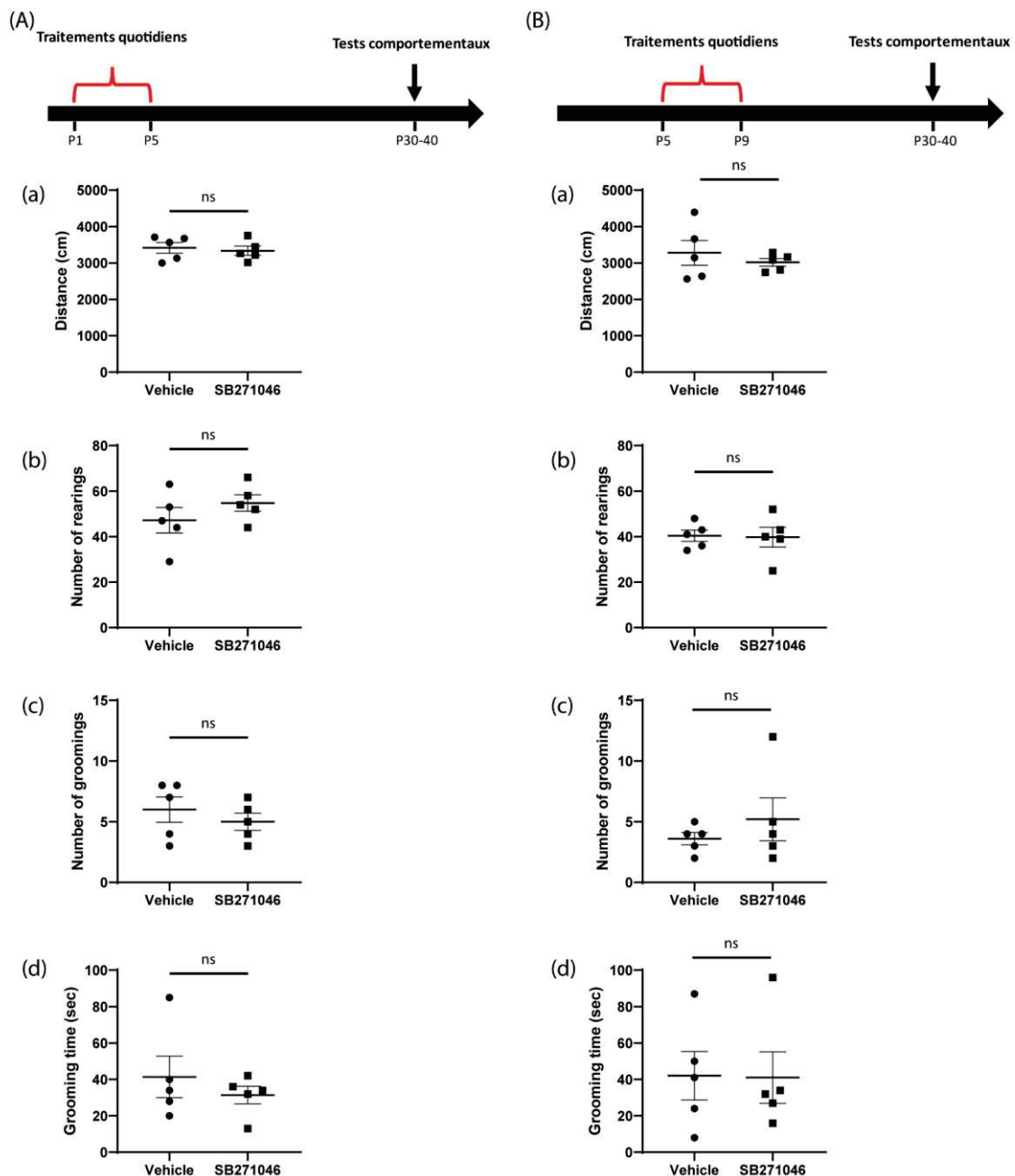


Figure 33 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT₆ en période postnatale sur les comportements de locomotion et de toilette des souris à l'adolescence.

Les souris ont été traitées quotidiennement de (A) P1 à P5 ou de (B) P5 à P9 avec l'agoniste inverse SB271046 ou la solution véhicule et ont passé un test en arène ouverte où plusieurs paramètres ont été mesurés. (a) la distance parcourue par les souris (b) le nombre d'élévation des souris sur leurs pattes arrières (c) le nombre de toilettes (d) temps total de toilette. (ns : $p > 0,05$, test de Mann-Whitney, chaque point représente une souris).

2) IMPACT DE L'INHIBITION DU RECEPTEUR 5-HT₆ PENDANT LA PERIODE POST-NATALE SUR L'ANXIETE DES SOURIS A L'ADOLESCENCE.

Le test de l'arène surélevée en croix se base sur un comportement normal de souris de ne pas vouloir s'exposer dans un environnement trop ouvert. Ainsi les souris auront naturellement tendance à passer plus de temps au niveau des bras fermés de l'arène (80% du temps environ). Dans ce test, un comportement anxieux se traduira par une augmentation du temps passé dans les bras fermés. Les souris traitées avec le SB271046 passent autant de temps dans le bras ouvert que les souris traitées avec la solution véhicule peu importe la fenêtre de traitement, de P1 à P5 (figure 34A) ou de P5 à P9 (figure 34B). Cela indique que par comparaison aux souris contrôles, les souris traitées au SB271046 ne présentent pas de comportements anxieux particuliers.

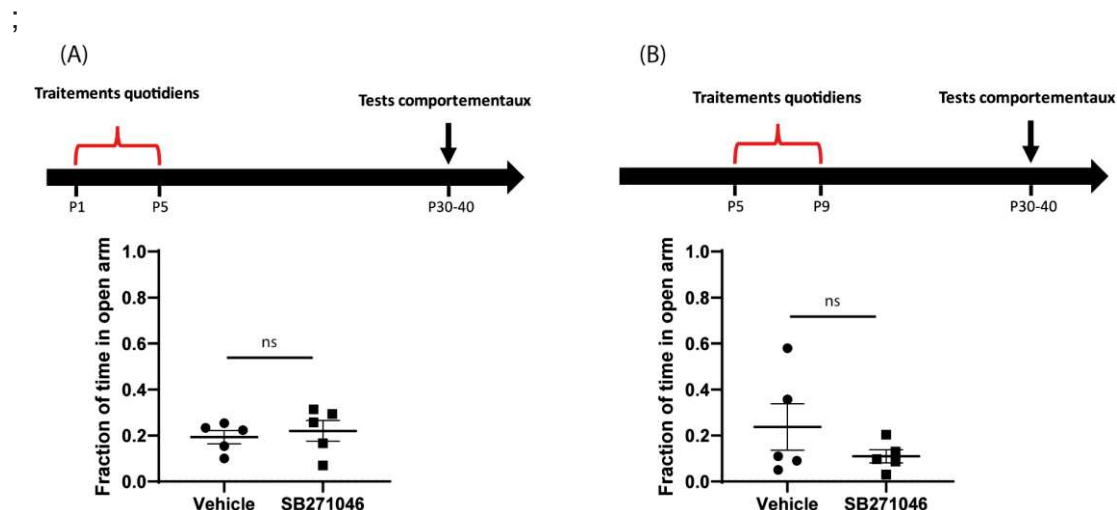


Figure 34 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT₆ en période postnatale sur le comportement anxieux des souris à l'adolescence.

Les souris ont été traitées quotidiennement entre P1 et P5 (A) ou entre P5 et P9 (B) avec l'agoniste inverse SB271046 ou la solution véhicule. Elles ont ensuite passé à l'adolescence le test de l'arène surélevée en croix. Les graphiques représentent la proportion de temps passé par les souris dans le bras ouvert de l'arène. Plus ce temps est court, plus les souris sont anxieuses. (ns : $p > 0,05$, test de Mann-Whitney, chaque point représente une souris).

3) IMPACT DE L'INHIBITION DU RECEPTEUR 5-HT₆ PENDANT LA PERIODE POST-NATALE SUR LES CAPACITES MNESIQUES DES SOURIS.

Pour mesurer les capacités mnésiques, les souris ont passé un test de reconnaissance d'un nouvel objet. Les souris sont d'abord mises en contact avec deux objets différents pendant 10min. Durant cette session de familiarisation, les souris vont explorer deux objets, qu'elles vont mémoriser. Après 24h les souris sont remises en contact avec deux objets, un objet familier rencontré lors de la session de familiarisation, et un nouvel objet. Si les souris ont bien mémorisé l'objet familier, elles passeront plus de temps à explorer le nouvel objet. On peut donc calculer un index de discrimination de l'objet, prenant en compte le temps passé à explorer le nouvel objet par rapport au temps d'exploration de l'objet familier suivant la formule suivante : $(\text{temps exploration nouvel objet} - \text{temps exploration objet familier}) / (\text{temps exploration nouvel objet} + \text{temps exploration objet familier})$. Un indice égal à 0 indique une exploration égale du nouvel objet et de l'objet familier, montrant une absence de mémorisation de l'objet familier. Un indice supérieur à 0 indique que l'objet familier a été mémorisé. Ici, les traitements de P1 à P5 (figure 35A) et de P5 à P9 (figure 35B) avec le SB271046 n'induisent pas de changement significatif de la valeur de l'indice par rapport aux animaux traités avec la solution véhicule. Ainsi l'inhibition du récepteur 5-HT₆ pendant la période post-natale ne semble pas induire d'altérations mnésiques à l'adolescence.

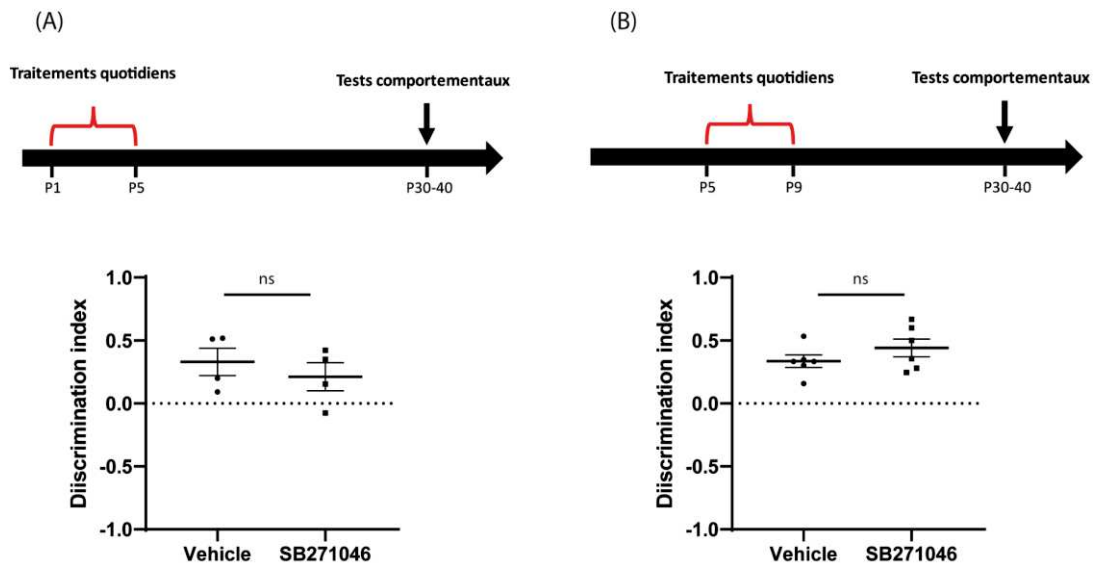


Figure 35 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT₆ en période postnatale sur les capacités de mémorisation d'objets des souris à l'adolescence.

Les souris ont été traitées quotidiennement entre P1 et P5 (A) ou entre P5 et P9 (B) avec l'agoniste inverse SB271046 ou la solution véhicule. Elles ont ensuite passé à l'adolescence un test de reconnaissance du nouvel objet. Les souris sont d'abord mises en contact avec deux objets différents pendant 10min. Après 24h les souris sont mises en contact avec deux objets, l'un étant le même que la session de la veille, et un nouvel objet. L'index de discrimination représente la différence de temps passé à explorer les deux objets sur le temps total d'exploration des deux objets lors de la deuxième session. La valeur 0 (ligne pointillée) représente une situation où les souris explorent autant le nouvel objet que l'ancien. Une valeur supérieure à 0 indique que les souris explorent plus le nouvel objet que l'objet familier, indiquant une mémorisation de l'objet familier (ns : $p > 0,05$, test de Mann-Whitney, chaque point représente une souris).

4) IMPACT DE L'INHIBITION DU RECEPTEUR 5-HT₆ PENDANT LA PERIODE POST-NATALE SUR LE COMPORTEMENT SOCIAL DES SOURIS A L'ADOLESCENCE.

Pour tester la sociabilité des souris, on utilise un indicateur qui est la préférence d'une souris à explorer un congénère inconnu plutôt qu'un objet inconnu. Les souris explorent une arène à 3 chambres : 1 chambre centrale vide, 1 chambre contenant un objet inconnu et 1 chambre contenant une souris inconnue dans une petite cage. Un score de préférence sociale est calculé de la même manière que pour la reconnaissance d'un nouvel objet : (temps exploration souris inconnue – temps

exploration objet inconnu) / (temps exploration souris inconnu + temps exploration objet inconnu). Un indice égal à 0 indique une exploration égale de la souris et de l'objet, indiquant une absence de préférence sociale. Un indice supérieur à 0 indique une préférence sociale. Ici, les traitements de P1 à P5 (figure 36A) et de P5 à P9 (figure 36B) avec le SB271046 induisent une baisse significative de la préférence sociale à l'adolescence. Ces résultats suggèrent que, pendant la période post-natale, le récepteur 5-HT₆ a un rôle dans le développement des circuits sous-tendant la préférence sociale. A partir de ces résultats, nous avons voulu vérifier trois choses : 1) le SB271046 est un agoniste inverse du récepteur 5-HT₆, nous avons réalisé des traitements avec un antagoniste neutre, le CPPQ, pour évaluer l'importance de l'activité constitutive du récepteur sur le développement post-natal ; 2) que cet effet du SB271046 est spécifique de la période post-natale P1-P9 ; 3) que l'effet du SB271046 est bien dépendant du récepteur 5-HT₆ et n'engage pas d'autre récepteur. Premièrement, les traitements avec le CPPQ de P1 à P5 (figure 36A) ou de P5 à P9 (figure 36B) n'induisent pas de déficits significatifs de préférence sociale à l'adolescence comparés au traitement contrôle. Cependant nous n'observons pas non plus de différence significative entre les animaux traités avec le CPPQ et le SB271046. Un effectif plus grand d'animaux est requis pour pouvoir conclure de manière sûre sur ces résultats, cependant ils suggèrent que l'inhibition de l'activité constitutive et de l'activité induite par la sérotonine du récepteur induit un effet sur la sociabilité, ce qui ne semble pas être le cas quand uniquement l'activité induite par la sérotonine est inhibée par le CPPQ.

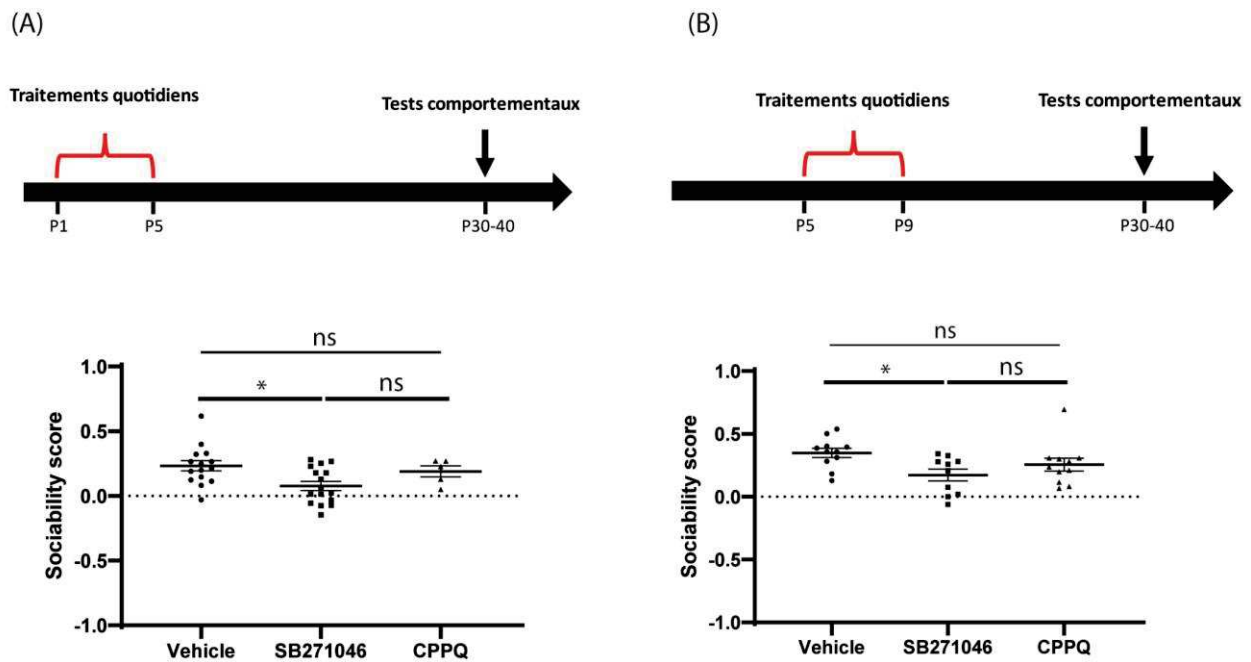


Figure 36 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT₆ en période postnatale sur la préférence sociale des souris à l'adolescence.

Les souris ont été traitées quotidiennement de (A) P1 à P5, de (B) P5 à P9 avec l'agoniste inverse SB271046, l'antagoniste neutre CPPQ ou la solution véhicule et ont passé un test de préférence sociale à l'adolescence. Les souris explorent une arène à 3 chambres pendant 10min : 1 chambre centrale vide, 1 chambre contenant un objet et 1 chambre contenant une souris inconnue dans une petite cage pendant 10min. Le score de sociabilité représente la différence de temps passé à explorer la souris inconnue et l'objet sur le temps total d'exploration de la souris et l'objet. La valeur 0 (ligne pointillée) est une valeur abstraite qui représente une situation où les souris explorent autant l'objet que la souris inconnue. Une valeur supérieure à 0 indique que les souris explorent plus la souris que l'objet, indiquant une préférence sociale (ns : $p > 0,05$; * $p < 0,05$ test de Kruskal-Wallis comparant les 3 conditions. Chaque point représente une souris).

Ensuite, pour évaluer l'importance de la période P1-P9 sur le développement du comportement social, nous avons inhibé l'activité du récepteur 5-HT₆ avec le SB271046 juste après cette fenêtre temporelle, de P11 à P15 (figure 37), période où le récepteur a repris une localisation majoritairement ciliaire. Ces traitements n'induisent pas de déficit de préférence sociale à l'adolescence, ce qui indique que

l'activité du récepteur 5-HT₆ est importante spécifiquement pendant la période P1-P9 pour le développement du comportement social.

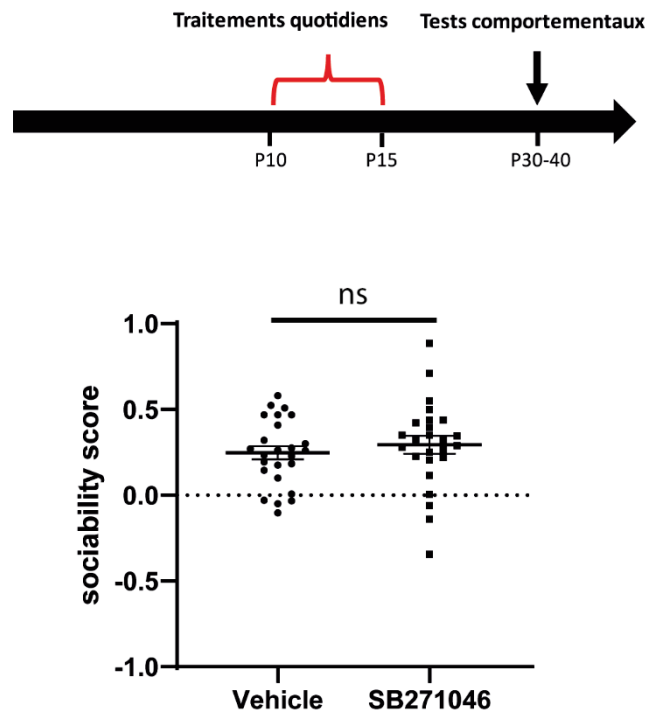


Figure 37 : Effet de l'inhibition du récepteur 5-HT₆ plus tardive sur la préférence sociale à l'adolescence

Les souris ont été traitées quotidiennement de P11 à P15 avec l'agoniste inverse SB271046 ou la solution véhicule et ont passé un test de préférence sociale à l'adolescence. (ns : $p > 0,05$ test T de student. Chaque point représente une souris).

Enfin, nous avons voulu vérifier la spécificité du SB271046 sur l'activité du récepteur 5-HT₆. Pour cela nous avons réalisé un traitement au SB271046 sur des animaux 5-HT₆^{KO/KO}. Dans un premier temps, nous avons mesuré la préférence sociale chez ces animaux 5-HT₆^{KO/KO} comparé aux animaux WT (figure 38). Aucun déficit de préférence sociale n'est observé chez les animaux KO. Ce résultat est surprenant compte-tenu des déficits de sociabilité observés chez les animaux dont le récepteur est inhibé par le SB271046 entre P1 et P9. De possibles mécanismes de compensation peuvent expliquer ces résultats. Cependant cette préférence sociale inaltérée nous a permis de tester l'absence d'effets du SB271046 sur ces animaux.

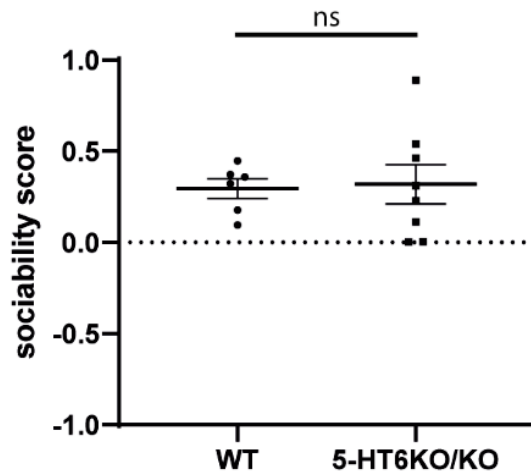


Figure 38 : Effet de la délétion génétique constitutive du récepteur 5-HT₆ sur la préférence sociale

Des souris WT et 5-HT₆^{KO/KO} ont passé le test de préférence sociale à l'adolescence. (ns : $p > 0,05$ test de Mann-Whitney, chaque point représente une souris).

Malgré un effectif encore faible, nous n'observons aucune différence significative de préférence sociale entre les animaux KO qui ont été traités entre P1 et P5 (figure 39A) ou entre P5 et P9 (figure 39B) avec le SB271046, suggérant que les effets observés chez les animaux WT sont spécifiques du récepteur 5-HT₆.

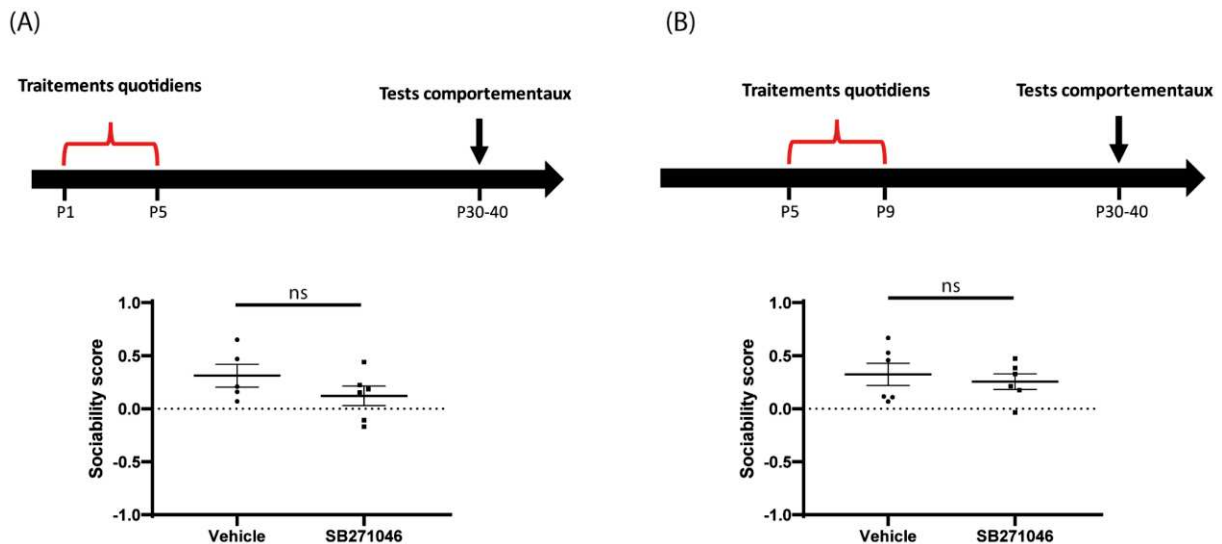


Figure 39 : Effet du traitement au SB271046 chez les souris 5-HT₆^{KO/KO}.

Les souris 5-HT6KO/KO ont été traitées quotidiennement de (A) P1 à P5 ou de (B) P5 à P9 avec l'agoniste inverse SB271046 et ont passé le test de préférence sociale à l'adolescence (ns : $p > 0,05$ test de Mann-Whitney, chaque point représente une souris).

Pour conclure, nos résultats montrent que l'inhibition du récepteur 5-HT₆ pendant la période post-natale P1-P9 induit des déficits spécifiquement du comportement social à l'adolescence. Nos données suggèrent également que cet effet est induit par une inhibition spécifiquement de l'activité constitutive du récepteur 5-HT₆. Initialement, les expériences ont été réalisées avec deux fenêtres de traitement (P1-P5 et P5-P9) pour éviter d'imposer un stress trop important à des souris nouveau-nées en traitant pendant 10 jours d'affilés. Nous avons finalement décidé d'initier des traitements de P1 à P10, les résultats sont en cours d'analyse et nous donnerons peut-être des informations plus tranchées. Nous avons aussi initié des expérimentations afin de savoir si les déficits de préférence sociale observés à l'adolescence persistent à l'âge adulte (à partir de P60).

B) IMPACT DES TRAITEMENTS AVEC LE SB271046 ET LE CPPQ SUR LA MORPHOLOGIE DES NEURONES *IN VIVO*

Les corrélats biologiques de ces déficits de préférence sociale induits par le traitement au SB271046 sont encore à étudier. Nous avons montré *in vitro* que le récepteur 5-HT₆ était un acteur important du développement de l'arborisation dendritique des neurones, et que son action dépend de son interaction avec plusieurs partenaires. Son rôle *in vivo* dans le développement du neurone est encore à établir. Le comportement social résulte d'un ensemble de fonctions cognitives complexes, dont un centre intégrateur important est le cortex préfrontal. Ainsi il est possible que les déficits de sociabilité observés à l'adolescence après inhibition du récepteur 5-HT₆ en période post-natale résultent d'altérations au niveau du cortex préfrontal. J'ai initié des expérimentations sur des souris venant d'une souche exprimant une protéine fluorescente (YFP) sous le contrôle du promoteur de la protéine Thy-1 (souche Thy1-YFP), une protéine exprimée par de nombreux neurones de projection, notamment au niveau des couches pyramidales du cortex. Ces neurones expriment donc la protéine YFP cytosolique, qui permettra une analyse précise de leur morphologie, notamment de leur arborisation dendritique et de leurs épines dendritiques. Ces souris sont traitées avec le SB271046 et le CPPQ pendant les mêmes fenêtres temporelles que pour les études comportementales, puis la morphologie de leurs neurones au niveau du cortex préfrontal sera étudiée par microscopie confocale à fluorescence.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le récepteur 5-HT₆ de la sérotonine, découvert il y a maintenant presque 30 ans, est un récepteur dont les propriétés restent mal connues. Il est cependant d'un fort intérêt en clinique, car il constitue une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de pathologies neuropsychiatriques comme la MA, la schizophrénie, les troubles du spectre de l'autisme ou l'épilepsie. Plus récemment, il a été identifié comme un acteur important du neuro-développement. Au cours de la dernière décennie, mon équipe a réalisé deux études de protéomique qui ont permis de mettre en évidence un interactome complexe du récepteur 5-HT₆. Certains partenaires du récepteur, notamment Cdk5 et GPRIN1, sont impliqués dans divers phénomènes neuro-développementaux, comme la migration des neurones au niveau du cortex ou encore la formation de l'arborisation dendritique. Cependant, les rôles du récepteur 5-HT₆ dans le développement cérébral sont encore peu étudiés, et son rôle à l'âge adulte est encore mal compris. Dans ce travail de thèse, j'ai tiré profit d'une lignée de souris 5-HT₆^{GFP/GFP} pour effectuer une cartographie de l'expression du récepteur 5-HT₆ dans le cerveau de souris adulte et en développement, travail qui n'avait pas pu être réalisé avec la même fiabilité jusqu'à présent, faute d'anticorps spécifiques, qui ont montré jusqu'à présent des contradictions avec les études de l'ARNm codant pour le récepteur. Cette caractérisation a permis de mettre en évidence le profil d'expression du récepteur à plusieurs échelles : à l'échelle des structures du cerveau, des types cellulaires, et des compartiments subcellulaires. J'ai pu réaliser ce travail à différents stades : embryonnaire, nouveau-né, jeune et adulte.

A) LE RECEPTEUR 5-HT₆ A L'AGE ADULTE

Chez la souris adulte, j'ai mis en évidence les structures dans lesquelles le récepteur est exprimé. En accord avec différentes études déjà publiées, l'expression du récepteur semble particulièrement forte dans le cortex, l'hippocampe et le striatum. En revanche, nous pouvons maintenant affirmer son expression dans le septum, l'hypothalamus, le mésencéphale et la moelle épinière, et son absence du cervelet et du thalamus. Ainsi, ce récepteur est présent dans de nombreuses structures dont les

rôles diffèrent fortement, suggérant une implication dans de multiples fonctions, et pas seulement les fonctions cognitives supérieures. Une étude récente a par exemple montré le rôle du récepteur 5-HT₆ exprimé dans la moelle épinière et de son interaction avec mTOR dans les douleurs neuropathiques (Martin et al., 2020).

Clairement, le récepteur 5-HT₆ semble être le plus exprimé dans le cortex, l'hippocampe et le striatum, où il est localisé au niveau des cils primaires neuronaux et astrocytaires. Dans ces 3 structures, il est très préférentiellement exprimé par les neurones de projections (neurones pyramidaux du cortex et de l'hippocampe et MSN du striatum). Egalement dans ces 3 structures, plus de la moitié des astrocytes expriment le récepteur, alors qu'apparemment une minorité d'interneurones l'expriment, environ 10% des interneurones dans le cortex. L'expression du récepteur par une large majorité des MSN du striatum (98%) indique un rôle important dans cette structure. Des approches de surexpression du récepteur 5-HT₆ au niveau du striatum ont été employées dans plusieurs études réalisées par l'équipe de John Neumaier (Brodsky et al., 2016; Eskenazi et al., 2015; Eskenazi and Neumaier, 2011a, 2011b; Ferguson et al., 2008). Ces surexpressions ont ciblé les zones dorsales (caudé-putamen) ou ventrales (noyau accumbens) du striatum, parfois dans tous les MSN, parfois dans les MSN exprimant spécifiquement les récepteur D₁ ou D₂ de la dopamine. De façon intéressante, la surexpression du récepteur 5-HT₆ dans les MSN exprimant le récepteur D₂ induit une réduction de la quantité de cocaïne auto-administrée par des rats, ce qui n'est pas le cas quand le récepteur 5-HT₆ est surexprimé dans les MSN exprimant le récepteur D₁ (Brodsky et al., 2016). Ceci indique un rôle du récepteur 5-HT₆ dans la récompense, qui dépend du type de MSN dans lequel il est exprimé. Bien que les effets de la surexpression d'un récepteur *in vivo* puissent être discutables, ce type d'approches visant à influencer la fonction du récepteur de manière cellule-spécifique semble être un bon moyen de mieux étudier le rôle du récepteur *in vivo*, et pourrait être appliqué à d'autres structures comme les différentes couches corticales ou hippocampiques. On peut ainsi imaginer des approches visant à inhiber l'expression du récepteur dans certains types cellulaires spécifiquement. De même, la restauration de l'expression du récepteur dans des types cellulaires spécifiques chez des animaux 5-HT₆^{-/-} pourrait apporter des informations importantes concernant le rôle du récepteur dans des circuits spécifiques. Notamment, il serait intéressant d'étudier avec précision le rôle du récepteur 5-HT₆ dans les

interneurones GABAergiques et les neurones pyramidaux glutamatergiques. En effet comme présenté en introduction (figure 18), les effets pharmacologiques des antagonistes s'expliquent par une action préférentielle sur les récepteurs exprimés à la membrane des interneurones GABAergiques. Or, nos observations montrent une expression du récepteur bien plus importante par les neurones glutamatergiques comparés aux interneurones GABAergiques dans le cortex cérébral ou l'hippocampe.

Enfin, le rôle du récepteur 5-HT₆ au niveau des astrocytes est encore totalement inconnu. Le cil primaire est un organite impliqué dans la prolifération cellulaire. Bien que les neurones matures ne prolifèrent plus, les astrocytes en sont encore capables. Il serait intéressant d'étudier le rôle du récepteur sur la prolifération astrocytaire.

La signalisation liée aux protéines G du récepteur 5-HT₆ est classiquement assurée par la protéine G_{αs}, qui induit une augmentation des niveaux d'AMPc. La localisation ciliaire du récepteur 5-HT₆ semble fortement remettre en question ce couplage à la protéine G_{αs}. L'étude de Jiang et al., 2019, montre, grâce à des biosenseurs FRET compartiment-spécifiques permettant de visualiser avec une grande résolution spatiale la concentration d'AMPc, que le récepteur 5-HT₆ induit la production d'AMPc quand il est exprimé à la membrane somatique de cellules mIMCD3, mais que cette activation de l'adénylate cyclase n'est pas présente quand le récepteur se trouve uniquement au niveau du cil. D'autres RCPG ont déjà été identifiés comme modifiant leur couplage aux protéines G quand ils avaient une localisation ciliaire (Hilgendorf et al., 2019; Masyuk et al., 2013). Jiang et al. (2019) apportent toutefois une nuance. En effet l'activation du récepteur Smo (impliqué dans la voie Hh) par son agoniste SAG restaure la capacité du récepteur 5-HT₆ à activer G_{αs}. Il semblerait donc qu'il y ait une influence d'autres voies de signalisation sur le couplage aux protéines G du récepteur 5-HT₆. Nous collaborons actuellement avec l'équipe du Dr David Clapham afin de caractériser les mécanismes de signalisation liés aux protéines G contrôlés par le récepteur 5-HT₆ au niveau du cil primaire.

J'ai également pu montrer que l'absence de récepteur 5-HT₆ chez les souris 5-HT₆^{KO/KO} induisait une réduction de la taille ciliaire, notamment dans le cortex et surtout le striatum. Ainsi le récepteur serait impliqué dans la formation ou la maintenance du cil. Au niveau du cil, le récepteur semble interagir avec de nombreuses protéines associées à l'actine (Kohli et al., 2017). Ces interactions pourraient permettre au

récepteur de contrôler la polymérisation de l'actine et influencer la construction de l'axonème d'une manière encore inconnue. L'inhibition ou l'activation du récepteur 5-HT₆ dans des neurones en culture respectivement par le SB271046 et le WAY181187 ne semble pas en revanche modifier la longueur des cils, indiquant que ce rôle du récepteur pourrait être indépendant des ligands. Ce résultat est contradictoire avec une étude montrant que l'inhibition du récepteur par le SB399885 *in vitro* réduit de moitié la taille des cils (Brodsky et al., 2017). Différents antagonistes, bien que permettant d'inhiber l'activation de la voie Gas par le récepteur, pourraient en revanche avoir des effets contrastés sur les couplages du récepteur à différentes voies de signalisation, comme le couplage aux protéines liées à l'actine par exemple.

B) RÔLE DU RECEPTEUR 5-HT₆ PENDANT LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Pendant le développement embryonnaire, j'ai pu identifier que le récepteur 5-HT₆ est co-localisé avec la protéine ciliaire Arl13b dans différentes structures comme le striatum et la plaque corticale, ainsi que dans des structures embryonnaires comme la VZ et la SVZ. Une colocalisation avec la protéine ciliaire AC3 est aussi identifiable au niveau de la VZ et de la SVZ. Les marquages montrent des structures plutôt ponctiformes ou très courtes, ne ressemblant pas encore à des cils primaires. Une étude (Arellano et al., 2012) montre que ces structures peuvent être qualifiées de « proto-cils », ne contenant pas encore un axonème mature, mais présentant tout de même un corps basal formé par le centrosome qui s'ancre à la membrane, et une extension membranaire. Ces résultats suggèrent que récepteur 5-HT₆ contribue activement à la construction du cil primaire pendant le développement embryonnaire. Ainsi, il aurait une influence indirecte dans globalement tous les mécanismes impliquant les cils, comme la migration ou la formation des réseaux. En revanche, il aurait aussi une influence directe sur ces mécanismes, *via* son interaction avec Cdk5 et GPRIN1 suggérant des effets pléiotropes sur le développement cérébral impliquant des mécanismes variés dépendant ou non de sa localisation dans le cil primaire.

C)ROLE DU RECEPTEUR DANS LE DEVELOPPEMENT POSTNATAL

Un des résultats les plus intrigants de ce travail de thèse est l'identification d'un changement de localisation subcellulaire transitoire du récepteur 5-HT₆, qui n'est plus localisé uniquement à la membrane ciliaire, mais aussi à la membrane du compartiment somato-dendritique. Ce changement a lieu pendant quelques jours après la naissance des souris (jusqu'à P10 environ), et a lieu dans globalement toutes les structures où le récepteur est présent. Les causes de ce changement de localisation du récepteur peuvent être nombreuses. La plus probable serait l'augmentation de l'expression du récepteur, puisqu'on peut voir dans divers modèles cellulaires *in vitro* que la surexpression du récepteur induit sa localisation au niveau de la membrane somato-dendritique (Duhr et al., 2014; Lesiak et al., 2018; Pujol et al., 2020). Nous sommes actuellement en train de réaliser des expériences visant à montrer cette augmentation de l'expression pendant la période post-natale. Comme ce changement de localisation apparaît au moment de la naissance, j'ai testé l'hypothèse selon laquelle des phénomènes concomitants à la mise bas (comme des changements hormonaux par exemple) pouvaient en être la cause. La réalisation de césariennes n'induit aucune altération de ce changement de localisation transitoire, suggérant que la naissance, qu'elle qu'en soit la voie, est suffisante à déclencher ce phénomène. Au niveau génétique, il serait intéressant d'étudier le promoteur du gène codant pour le récepteur 5-HT₆ afin d'identifier de potentiels modulateurs de transcription, et d'évaluer son activation au cours du développement. Ce changement potentiel d'expression pourrait aussi s'accompagner de modifications de la machinerie de trafic intracellulaire. Le trafic du récepteur 5-HT₆ au niveau du cil a été étudié par l'équipe de Kirk Mykytyn, qui a montré que le récepteur était doté de séquences d'adressage au cil (*ciliary targeting sequences*, CTS) reconnues par TULP3 et RABL2 (Barbeito et al., 2021; Berbari et al., 2008b). On peut formuler l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'expression du récepteur conduirait à une saturation de ces protéines et à la non-prise en charge du récepteur qui irait à la membrane selon un mécanisme par défaut. Une autre hypothèse serait des changements de la disponibilité ou de l'activité de ces protéines pendant la période post-natale.

Ce changement de localisation subcellulaire du récepteur 5-HT₆ pourrait avoir une forte influence sur ses fonctions. Comme énoncé plus haut, une des premières conséquences d'un tel changement de localisation au niveau somatique serait un couplage plus fort à la voie G α s et donc une augmentation accrue de la production d'AMPc (Jiang et al., 2019). Il serait intéressant de pouvoir mesurer en temps réel avec des sondes FRET la production d'AMPc dans un contexte plus proche de la physiologie que des cellules en culture, par exemple sur des tranches *ex vivo* de cerveau de souris en période post-natale, comme il a été possible de le faire dans une étude sur le rôle du cil primaire et de l'AMPc dans la migration des neurones au niveau du flux rostral migratoire (Stoufflet et al., 2020). Avec de telles approches, nous pourrions observer la production d'AMPc induite par l'activation du récepteur par des ligands, dans des cellules où il est localisé à la membrane du soma ou la membrane ciliaire.

Un autre impact de ce changement de localisation est qu'il pourrait favoriser l'interaction entre le récepteur 5-HT₆ et des partenaires non présents au niveau du cil primaire. Parmi tous les partenaires du récepteur identifiés à ce jour, il n'existe que peu d'information concernant une possible localisation ciliaire. Dans une étude récente, nous avons pu identifier que GPRIN1, une protéine impliquée dans le développement de l'arborisation dendritique, peut interagir avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆, interaction qui favorise la complexification de l'arborisation dendritique (article en annexe). GPRIN1 n'est pas présente au niveau du cil, et est co-localisée avec le récepteur au niveau de la membrane somato-dendritique pendant la période post-natale. Il est tentant d'imaginer que cette relocalisation transitoire du récepteur pourrait conduire à des modifications importantes de son interactome, lui donnant des fonctions encore peu connues.

Des expériences sont ainsi en cours pour identifier en quoi la localisation subcellulaire du récepteur influence l'interaction avec ses partenaires. La lignée de souris 5-HT₆-GFP générée au laboratoire constitue un atout majeur pour ces expériences du fait de la faible densité de récepteur dans le cerveau et de l'absence d'anticorps spécifiques permettant son immunoprécipitation avec de bon rendements, compatibles avec l'identification de partenaires par spectrométrie de masse. En effet elle permettra d'immunoprécipiter le récepteur *in situ* et ses partenaires, puis de mener des

expériences de protéomique. Il sera ainsi possible de comparer l'interactome du récepteur quand celui-ci est uniquement au niveau du cil primaire (chez la souris adulte par exemple) ou quand il est aussi présent à la membrane somatique.

Parmi les partenaires connus du récepteur, ceux qui sont liés au neuro-développement seront bien sûr d'un intérêt tout particulier. Par exemple, la protéine WAVE1, identifiée dans le deuxième crible protéomique (Duhr et al., 2014), peut être phosphorylée par Cdk5 et est connue comme étant importante pour la régulation de la polymérisation de l'actine en régulant l'activité du complexe Arp2/3. Localisé au niveau des épines dendritiques, WAVE1 est impliqué dans leur morphogénèse, et donc dans la formation des connexions synaptiques. Il est ainsi possible que le récepteur 5-HT₆ module la formation des connexions synaptiques par des mécanismes qui restent à décrire.

Enfin, la période post-natale pendant laquelle le récepteur change de localisation semble être importante pour l'action du récepteur sur le développement normal du comportement social des animaux. Ce type de comportement étant très dépendant du cortex préfrontal, il sera important d'analyser les possibles modifications dendritiques induites par l'inhibition post-natale du récepteur dans cette région. Etant donné que la relocalisation du récepteur se produit dans de nombreuses structures, il est étonnant que nous n'observions qu'un changement de comportement social chez les animaux traités avec un agoniste inverse lors de la période post-natale. D'autres tests plus fins sont requis, comme des tests d'apprentissage moteur (comme le rotarod) ou des tests de conditionnements opérants liés à la motivation pour étudier la fonction striatale par exemple.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de cartographier précisément l'expression du récepteur 5-HT₆ à plusieurs échelles : à l'échelle du système nerveux central, à l'échelle des types cellulaires, et à l'échelle des compartiments subcellulaires. Les informations obtenues permettent une meilleure compréhension du rôle du récepteur 5-HT₆ en condition physiologique. De plus, le récepteur 5-HT₆ apparaît comme un récepteur dont la localisation est dynamique lors du développement post-natal. Cette caractéristique peut lui donner la capacité de déclencher des voies de signalisation différentes lors du développement cérébral, le plaçant comme un acteur dont de nombreuses fonctions potentielles restent à étudier.

BIBLIOGRAPHIE

- ALDRIN-KIRK, P., HEUER, A., WANG, G., MATTSSON, B., LUNDBLAD, M., PARMAR, M., BJÖRKLUND, T., 2016. DREADD MODULATION OF TRANSPLANTED DA NEURONS REVEALS A NOVEL PARKINSONIAN DYSKINESIA MECHANISM MEDIATED BY THE SEROTONIN 5-HT₆ RECEPTOR. NEURON 90, 955–968. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2016.04.017](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.017)
- ALLEN, J.A., YADAV, P.N., ROTH, B.L., 2008. INSIGHTS INTO THE REGULATION OF 5-HT_{2A} SEROTONIN RECEPTORS BY SCAFFOLDING PROTEINS AND KINASES. NEUROPHARMACOLOGY 55, 961–968. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.06.048](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.048)
- AOKI, K., NAKAMURA, T., MATSUDA, M., 2004. SPATIO-TEMPORAL REGULATION OF RAC1 AND CDC42 ACTIVITY DURING NERVE GROWTH FACTOR-INDUCED NEURITE OUTGROWTH IN PC12 CELLS. J BIOL CHEM 279, 713–719. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M306382200](https://doi.org/10.1074/jbc.M306382200)
- ARELLANO, J.I., GUADIANA, S.M., BREUNIG, J.J., RAKIC, P., SARKISIAN, M.R., 2012. DEVELOPMENT AND DISTRIBUTION OF NEURONAL CILIA IN MOUSE NEOCORTEX. J COMP NEUROL 520, 848–873. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/CNE.22793](https://doi.org/10.1002/cne.22793)
- ARENSDORF, A.M., MARADA, S., OGDEN, S.K., 2016. SMOOTHENED REGULATION: A TALE OF TWO SIGNALS. TRENDS PHARMACOL SCI 37, 62–72. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.TIPS.2015.09.001](https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.09.001)
- ATTRAMADAL, H., ARRIZA, J.L., AOKI, C., DAWSON, T.M., CODINA, J., KWATRA, M.M., SNYDER, S.H., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., 1992. BETA-ARRESTIN2, A NOVEL MEMBER OF THE ARRESTIN/BETA-ARRESTIN GENE FAMILY. J BIOL CHEM 267, 17882–17890.
- BARBEITO, P., TACHIBANA, Y., MARTIN-MORALES, R., MORENO, P., MYKYTYN, K., KOBAYASHI, T., GARCIA-GONZALO, F.R., 2021. HTR6 AND SSTR3 CILIARY TARGETING RELIES ON BOTH IC3 LOOPS AND C-TERMINAL TAILS. LIFE SCI ALLIANCE 4. [HTTPS://DOI.ORG/10.26508/LSA.202000746](https://doi.org/10.26508/LSA.202000746)
- BAUDOIN, J.-P., VIOU, L., LAUNAY, P.-S., LUCCARDINI, C., ESPESO GIL, S., KIYASOVA, V., IRINOPOULOU, T., ALVAREZ, C., RIO, J.-P., BOUDIER, T., LECHAIRE, J.-P., KESSARIS, N., SPASSKY, N., MÉTIN, C., 2012. TANGENTIALLY MIGRATING NEURONS ASSEMBLE A PRIMARY CILIUM THAT PROMOTES THEIR REORIENTATION TO THE CORTICAL PLATE. NEURON 76, 1108–1122. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2012.10.027](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.027)
- BECAMEL, C., FIGGE, A., POLIAK, S., DUMUIS, A., PELES, E., BOCKAERT, J., LUBBERT, H., ULLMER, C., 2001. INTERACTION OF SEROTONIN 5-HYDROXYTRYPTAMINE TYPE 2C RECEPTORS WITH PDZ10 OF THE MULTI-PDZ DOMAIN PROTEIN MUPP1. J BIOL CHEM 276, 12974–12982. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M008089200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008089200)

- BÉCAMEL, C., GAVARINI, S., CHANRION, B., ALONSO, G., GALÉOTTI, N., DUMUIS, A., BOCKAERT, J., MARIN, P., 2004. THE SEROTONIN 5-HT_{2A} AND 5-HT_{2C} RECEPTORS INTERACT WITH SPECIFIC SETS OF PDZ PROTEINS. *J BIOL CHEM* 279, 20257–20266.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M312106200](https://doi.org/10.1074/JBC.M312106200)
- BEFFERT, U., WEEBER, E.J., MORFINI, G., KO, J., BRADY, S.T., TSAI, L.-H., SWEATT, J.D., HERZ, J., 2004. REELIN AND CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5-DEPENDENT SIGNALS COOPERATE IN REGULATING NEURONAL MIGRATION AND SYNAPTIC TRANSMISSION. *J NEUROSCI* 24, 1897–1906. [HTTPS://DOI.ORG/10.1523/JNEUROSCI.4084-03.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4084-03.2004)
- BENOVIC, J.L., STRASSER, R.H., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., 1986. BETA-ADRENERGIC RECEPTOR KINASE: IDENTIFICATION OF A NOVEL PROTEIN KINASE THAT PHOSPHORYLATES THE AGONIST-OCCUPIED FORM OF THE RECEPTOR. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 83, 2797–2801.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.83.9.2797](https://doi.org/10.1073/PNAS.83.9.2797)
- BERBARI, N.F., JOHNSON, A.D., LEWIS, J.S., ASKWITH, C.C., MYKYTYN, K., 2008A. IDENTIFICATION OF CILIARY LOCALIZATION SEQUENCES WITHIN THE THIRD INTRACELLULAR LOOP OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *MOL BIOL CELL* 19, 1540–1547. [HTTPS://DOI.ORG/10.1091/MBC.E07-09-0942](https://doi.org/10.1091/MBC.E07-09-0942)
- BERBARI, N.F., LEWIS, J.S., BISHOP, G.A., ASKWITH, C.C., MYKYTYN, K., 2008B. BARDET-BIEDL SYNDROME PROTEINS ARE REQUIRED FOR THE LOCALIZATION OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS TO PRIMARY CILIA. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.* 105, 4242–4246.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.0711027105](https://doi.org/10.1073/PNAS.0711027105)
- BERTHOUX, C., HAMIEH, A.M., ROGLIARDO, A., DOUCET, E.L., COUDERT, C., ANGO, F., GRYCHOWSKA, K., CHAUMONT-DUBEL, S., ZAJDEL, P., MALDONADO, R., BOCKAERT, J., MARIN, P., BÉCAMEL, C., 2020. EARLY 5-HT₆ RECEPTOR BLOCKADE PREVENTS SYMPTOM ONSET IN A MODEL OF ADOLESCENT CANNABIS ABUSE. *EMBO MOL MED* 12.
[HTTPS://DOI.ORG/10.15252/EMMM.201910605](https://doi.org/10.15252/EMMM.201910605)
- BOCKAERT, J., CLAEYSEN, S., BÉCAMEL, C., DUMUIS, A., MARIN, P., 2006. NEURONAL 5-HT METABOTROPIC RECEPTORS: FINE-TUNING OF THEIR STRUCTURE, SIGNALING, AND ROLES IN SYNAPTIC MODULATION. *CELL TISSUE RES* 326, 553–572. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00441-006-0286-1](https://doi.org/10.1007/S00441-006-0286-1)
- BOCKAERT, J., FAGNI, L., DUMUIS, A., MARIN, P., 2004. GPCR INTERACTING PROTEINS (GIP). *PHARMACOL THER* 103, 203–221. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PHARMTHERA.2004.06.004](https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2004.06.004)
- BONNIN, A., GOEDEN, N., CHEN, K., WILSON, M.L., KING, J., SHIH, J.C., BLAKELY, R.D., DENERIS, E.S., LEVITT, P., 2011. A TRANSIENT PLACENTAL SOURCE OF SEROTONIN FOR THE FETAL FOREBRAIN. *NATURE* 472, 347–350. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE09972](https://doi.org/10.1038/NATURE09972)

- BOURSON, A., BORRONI, E., AUSTIN, R.H., MONSMA, F.J., SLEIGHT, A.J., 1995. DETERMINATION OF THE ROLE OF THE 5-HT₆ RECEPTOR IN THE RAT BRAIN: A STUDY USING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES. *J. PHARMACOL. EXP. THER.* 274, 173–180.
- BRADLEY, P.B., ENGEL, G., FENIUK, W., FOZARD, J.R., HUMPHREY, P.P., MIDDLEMISS, D.N., MYLECHARANE, E.J., RICHARDSON, B.P., SAXENA, P.R., 1986. PROPOSALS FOR THE CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF FUNCTIONAL RECEPTORS FOR 5-HYDROXYTRYPTAMINE. *NEUROPHARMACOLOGY* 25, 563–576.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/0028-3908\(86\)90207-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90207-8)
- BRAILOV, I., BANCILA, M., BRISORGUEIL, M.-J., MIQUEL, M.-C., HAMON, M., VERGE, D., 2000. LOCALIZATION OF 5-HT₆ RECEPTORS AT THE PLASMA MEMBRANE OF NEURONAL CILIA IN THE RAT BRAIN. *BRAIN RESEARCH* 872, 271–275. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0006-8993\(00\)02519-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02519-1)
- BREUNIG, J.J., SARKISIAN, M.R., ARELLANO, J.I., MOROZOV, Y.M., AYOUB, A.E., SOJITRA, S., WANG, B., FLAVELL, R.A., RAKIC, P., TOWN, T., 2008. PRIMARY CILIA REGULATE HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS BY MEDIATING SONIC HEDGEHOG SIGNALING. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 105, 13127–13132. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.0804558105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804558105)
- BRODSKY, M., GIBSON, A.W., SMIRNOV, D., NAIR, S.G., NEUMAIER, J.F., 2016. STRIATAL 5-HT₆ RECEPTORS REGULATE COCAINE REINFORCEMENT IN A PATHWAY-SELECTIVE MANNER. *NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY* 41, 2377–2387. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NPP.2016.45](https://doi.org/10.1038/NPP.2016.45)
- BRODSKY, M., LESIAK, A.J., CROICU, A., COHENCA, N., SULLIVAN, J.M., NEUMAIER, J.F., 2017. 5-HT₆ RECEPTOR BLOCKADE REGULATES PRIMARY CILIA MORPHOLOGY IN STRIATAL NEURONS. *BRAIN RES.* 1660, 10–19. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.BRAINRES.2017.01.010](https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2017.01.010)
- CARREL, D., MASSON, J., AWABDH, S.A., CAPRA, C.B., LENKEI, Z., HAMON, M., EMERIT, M.B., DARMON, M., 2008. TARGETING OF THE 5-HT_{1A} SEROTONIN RECEPTOR TO NEURONAL DENDRITES IS MEDIATED BY YIF1B. *J. NEUROSCI.* 28, 8063–8073.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1523/JNEUROSCI.4487-07.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4487-07.2008)
- CASSIER, E., GALLAY, N., BOURQUARD, T., CLAEYSEN, S., BOCKAERT, J., CRÉPIEUX, P., POUPON, A., REITER, E., MARIN, P., VANDERMOERE, F., 2017. PHOSPHORYLATION OF B-ARRESTIN2 AT THR383 BY MEK UNDERLIES B-ARRESTIN-DEPENDENT ACTIVATION OF ERK1/2 BY GPCRS. *ELIFE* 6, E23777. [HTTPS://DOI.ORG/10.7554/ELIFE.23777](https://doi.org/10.7554/ELIFE.23777)
- CHARNAY, Y., LÉGER, L., 2010. BRAIN SEROTONERGIC CIRCUITRIES. *DIALOGUES CLIN NEUROSCI* 12, 471–487.
- CHAUMONT-DUBEL, S., DUPUY, V., BOCKAERT, J., BÉCAMEL, C., MARIN, P., 2019. THE 5-HT₆ RECEPTOR INTERACTOME: NEW INSIGHT IN RECEPTOR SIGNALING AND ITS IMPACT ON

- BRAIN PHYSIOLOGY AND PATHOLOGIES. NEUROPHARMACOLOGY 107839.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.107839](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107839)
- CHEUNG, Z.H., CHIN, W.H., CHEN, Y., NG, Y.P., IP, N.Y., 2007. CDK5 IS INVOLVED IN BDNF-STIMULATED DENDRITIC GROWTH IN HIPPOCAMPAL NEURONS. PLOS BIOLOGY 5, E63.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PBIO.0050063](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0050063)
- CORBIT, K.C., AANSTAD, P., SINGLA, V., NORMAN, A.R., STAINIER, D.Y.R., REITER, J.F., 2005. VERTEBRATE SMOOTHENED FUNCTIONS AT THE PRIMARY CILIUM. NATURE 437, 1018–1021.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE04117](https://doi.org/10.1038/NATURE04117)
- DA SILVA, J.S., DOTTI, C.G., 2002. BREAKING THE NEURONAL SPHERE: REGULATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON IN NEURITOGENESIS. NAT REV NEUROSCI 3, 694–704.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRN918](https://doi.org/10.1038/NRN918)
- DAHLSTROEM, A., FUXE, K., OLSON, L., UNGERSTEDT, U., 1964. ASCENDING SYSTEMS OF CATECHOLAMINE NEURONS FROM THE LOWER BRAIN STEM. ACTA PHYSIOL SCAND 62, 485–486. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1748-1716.1964.TB10446.X](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1964.tb10446.x)
- DAWSON, L.A., NGUYEN, H.Q., LI, P., 2001. THE 5-HT(6) RECEPTOR ANTAGONIST SB-271046 SELECTIVELY ENHANCES EXCITATORY NEUROTRANSMISSION IN THE RAT FRONTAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY: OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN COLLEGE OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 25, 662–668.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0893-133X\(01\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00265-2)
- DAWSON, L.A., NGUYEN, H.Q., LI, P., 2000. IN VIVO EFFECTS OF THE 5-HT6 ANTAGONIST SB-271046 ON STRIATAL AND FRONTAL CORTEX EXTRACELLULAR CONCENTRATIONS OF NORADRENALINE, DOPAMINE, 5-HT, GLUTAMATE AND ASPARTATE. BR J PHARMACOL 130, 23–26. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/SJ.BJP.0703288](https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703288)
- DE DEURWAERDÈRE, P., BHARATIYA, R., CHAGRAOUI, A., DI GIOVANNI, G., 2020. CONSTITUTIVE ACTIVITY OF 5-HT RECEPTORS: FACTUAL ANALYSIS. NEUROPHARMACOLOGY 168, 107967.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.107967](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107967)
- DELLA ROCCA, G.J., MUKHIN, Y.V., GARNOVSKAYA, M.N., DAAKA, Y., CLARK, G.J., LUTTRELL, L.M., LEFKOWITZ, R.J., RAYMOND, J.R., 1999. SEROTONIN 5-HT1A RECEPTOR-MEDIATED ERK ACTIVATION REQUIRES CALCIUM/CALMODULIN-DEPENDENT RECEPTOR ENDOCYTOSIS. J BIOL CHEM 274, 4749–4753. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.274.8.4749](https://doi.org/10.1074/JBC.274.8.4749)
- DERAREDJ NADIM, W., CHAUMONT-DUBEL, S., MADOURI, F., COBRET, L., DE TAUZIA, M.-L., ZAJDEL, P., BÉNÉDETTI, H., MARIN, P., MORISSET-LOPEZ, S., 2016. PHYSICAL INTERACTION BETWEEN NEUROFIBROMIN AND SEROTONIN 5-HT6 RECEPTOR PROMOTES RECEPTOR CONSTITUTIVE

- ACTIVITY. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 113, 12310–12315.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.1600914113](https://doi.org/10.1073/pnas.1600914113)
- DIAZ, J., GÉRARD, X., EMERIT, M.-B., AREIAS, J., GENY, D., DÉGARDIN, J., SIMONUTTI, M., GUERQUIN, M.-J., COLLIN, T., VIOLLET, C., BILLARD, J.-M., MÉTIN, C., HUBERT, L., LARTI, F., KAHRIZI, K., JOBLING, R., AGOLINI, E., SHAHEEN, R., ZIGLER, A., ROUILLER-FABRE, V., ROZET, J.-M., PICAUD, S., NOVELLI, A., ALAMEER, S., NAJMABADI, H., COHN, R., MUNNICH, A., BARTH, M., LUGLI, L., ALKURAYA, F.S., BLASER, S., GASHLAN, M., BESMOND, C., DARMON, M., MASSON, J., 2020. YIF1B MUTATIONS CAUSE A POST-NATAL NEURODEVELOPMENTAL SYNDROME ASSOCIATED WITH GOLGI AND PRIMARY CILIUM ALTERATIONS. BRAIN 143, 2911–2928.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1093/BRAIN/AWAA235](https://doi.org/10.1093/brain/awaa235)
- DUHR, F., DÉLÉRIS, P., RAYNAUD, F., SÉVENO, M., MORISSET-LOPEZ, S., MANNOURY LA COUR, C., MILLAN, M.J., BOCKAERT, J., MARIN, P., CHAUMONT-DUBEL, S., 2014. CDK5 INDUCES CONSTITUTIVE ACTIVATION OF 5-HT₆ RECEPTORS TO PROMOTE NEURITE GROWTH. NAT. CHEM. BIOL. 10, 590–597. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NCHEMBIO.1547](https://doi.org/10.1038/nchembio.1547)
- EINSTEIN, E.B., PATTERSON, C.A., HON, B.J., REGAN, K.A., REDDI, J., MELNIKOFF, D.E., MATEER, M.J., SCHULZ, S., JOHNSON, B.N., TALLENT, M.K., 2010. SOMATOSTATIN SIGNALING IN NEURONAL CILIA IS CRITICAL FOR OBJECT RECOGNITION MEMORY. J NEUROSCI 30, 4306–4314.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1523/JNEUROSCI.5295-09.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5295-09.2010)
- ERSPAMER, V., ASERO, B., 1952. IDENTIFICATION OF ENTERAMINE, THE SPECIFIC HORMONE OF THE ENTEROCHROMAFFIN CELL SYSTEM, AS 5-HYDROXYTRYPTAMINE. NATURE 169, 800–801.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/169800B0](https://doi.org/10.1038/169800B0)
- ESKENAZI, D., BRODSKY, M., NEUMAIER, J.F., 2015. DECONSTRUCTING 5-HT₆ RECEPTOR EFFECTS ON STRIATAL CIRCUIT FUNCTION. NEUROSCIENCE 299, 97–106.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.04.046](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.046)
- ESKENAZI, D., NEUMAIER, J.F., 2011A. INCREASED EXPRESSION OF THE 5-HT₆ RECEPTOR BY VIRAL MEDIATED GENE TRANSFER INTO POSTERIOR BUT NOT ANTERIOR DORSOMEDIAL STRIATUM INTERFERES WITH ACQUISITION OF A DISCRETE ACTION-OUTCOME TASK. J PSYCHOPHARMACOL 25, 944–951. [HTTPS://DOI.ORG/10.1177/0269881110388330](https://doi.org/10.1177/0269881110388330)
- ESKENAZI, D., NEUMAIER, J.F., 2011B. INCREASED EXPRESSION OF 5-HT₆ RECEPTORS IN DORSOLATERAL STRIATUM DECREASES HABITUAL LEVER PRESSING, BUT DOES NOT AFFECT LEARNING ACQUISITION OF SIMPLE OPERANT TASKS IN RATS. EUR J NEUROSCI 34, 343–351.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1460-9568.2011.07756.X](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07756.x)
- FERGUSON, S.M., MITCHELL, E.S., NEUMAIER, J.F., 2008. INCREASED EXPRESSION OF 5-HT₆ RECEPTORS IN THE NUCLEUS ACCUMBENS BLOCKS THE REWARDING BUT NOT

- PSYCHOMOTOR ACTIVATING PROPERTIES OF COCAINE. *BIOL PSYCHIATRY* 63, 207–213.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.BIOPSYCH.2007.02.018](https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.02.018)
- FERRÉ, S., CASADÓ, V., DEVI, L.A., FILIZOLA, M., JOCKERS, R., LOHSE, M.J., MILLIGAN, G., PIN, J.-P., GUITART, X., 2014. G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR OLIGOMERIZATION REVISITED: FUNCTIONAL AND PHARMACOLOGICAL PERSPECTIVES. *PHARMACOL REV* 66, 413–434.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1124/PR.113.008052](https://doi.org/10.1124/PR.113.008052)
- FOLEY, A.G., MURPHY, K.J., HIRST, W.D., GALLAGHER, H.C., HAGAN, J.J., UPTON, N., WALSH, F.S., REGAN, C.M., 2004. THE 5-HT(6) 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. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/SJ.NPP.1300332](https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1300332)
- GADDUM, J.H., PICARELLI, Z.P., 1957. TWO KINDS OF TRYPTAMINE RECEPTOR. *BR J PHARMACOL CHEMOTHER* 12, 323–328. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1476-5381.1957.TB00142.X](https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1957.TB00142.X)
- GE, X., QIU, Y., LOH, H.H., LAW, P.-Y., 2009. GRIN1 REGULATES M-OPIOID RECEPTOR ACTIVITIES BY TETHERING THE RECEPTOR AND G PROTEIN IN THE LIPID RAFT. *J BIOL CHEM* 284, 36521–36534. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M109.024109](https://doi.org/10.1074/JBC.M109.024109)
- GÉRARD, C., EL MESTIKAWY, S., LEBRAND, C., ADRIEN, J., RUAT, M., TRAIFFORT, E., HAMON, M., MARTRES, M.P., 1996. QUANTITATIVE RT-PCR DISTRIBUTION OF SEROTONIN 5-HT6 RECEPTOR MRNA IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF CONTROL OR 5,7-DIHYDROXYTRYPTAMINE-TREATED RATS. *SYNAPSE* 23, 164–173.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199607\)23:3<164::AID-SYN5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199607)23:3<164::AID-SYN5>3.0.CO;2-6)
- GÉRARD, C., MARTRES, M.P., LEFÈVRE, K., MIQUEL, M.C., VERGÉ, D., LANFUMEY, L., DOUCET, E., HAMON, M., EL MESTIKAWY, S., 1997. IMMUNO-LOCALIZATION OF SEROTONIN 5-HT6 RECEPTOR-LIKE MATERIAL IN THE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *BRAIN RES.* 746, 207–219.
- GERFEN, C.R., 1989. THE NEOSTRIATAL MOSAIC: STRIATAL PATCH-MATRIX ORGANIZATION IS RELATED TO CORTICAL LAMINATION. *SCIENCE* 246, 385–388.
- GLEESON, J.G., ALLEN, K.M., FOX, J.W., LAMPERTI, E.D., BERKOVIC, S., SCHEFFER, I., COOPER, E.C., DOBYNS, W.B., MINNERATH, S.R., ROSS, M.E., WALSH, C.A., 1998. DOUBLECORTIN, A BRAIN-SPECIFIC GENE MUTATED IN HUMAN X-LINKED LISSENCEPHALY AND DOUBLE CORTEX SYNDROME, ENCODES A PUTATIVE SIGNALING PROTEIN. *CELL* 92, 63–72.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0092-8674\(00\)80899-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80899-5)
- GODENY, M.D., SAYYAH, J., VONDERLINDEN, D., JOHNS, M., OSTROV, D.A., CALDWELL-BUSBY, J., SAYESKI, P.P., 2007. THE N-TERMINAL SH2 DOMAIN OF THE TYROSINE PHOSPHATASE, SHP-2,

IS ESSENTIAL FOR JAK2-DEPENDENT SIGNALING VIA THE ANGIOTENSIN II TYPE AT1 RECEPTOR. *CELL SIGNAL* 19, 600–609. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CELLSIG.2006.08.010](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.010)

GONZÁLEZ-MAESO, J., ANG, R.L., YUEN, T., CHAN, P., WEISSTAUB, N.V., LÓPEZ-GIMÉNEZ, J.F., ZHOU, M., OKAWA, Y., CALLADO, L.F., MILLIGAN, G., GINGRICH, J.A., FILIZOLA, M., MEANA, J.J., SEALFON, S.C., 2008. IDENTIFICATION OF A SEROTONIN/GLUTAMATE RECEPTOR COMPLEX IMPLICATED IN PSYCHOSIS. *NATURE* 452, 93–97. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE06612](https://doi.org/10.1038/NATURE06612)

GONZÁLEZ-MAESO, J., WEISSTAUB, N.V., ZHOU, M., CHAN, P., IVIC, L., ANG, R., LIRA, A., BRADLEY-MOORE, M., GE, Y., ZHOU, Q., SEALFON, S.C., GINGRICH, J.A., 2007. HALLUCINOGENS RECRUIT SPECIFIC CORTICAL 5-HT(2A) RECEPTOR-MEDIATED SIGNALING PATHWAYS TO AFFECT BEHAVIOR. *NEURON* 53, 439–452. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2007.01.008](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.008)

GORICANEC, D., STEHLE, R., EGLOFF, P., GRIGORIU, S., PLÜCKTHUN, A., WAGNER, G., HAGN, F., 2016. CONFORMATIONAL DYNAMICS OF A G-PROTEIN A SUBUNIT IS TIGHTLY REGULATED BY NUCLEOTIDE BINDING. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 113, E3629-3638. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.1604125113](https://doi.org/10.1073/pnas.1604125113)

GÖTHERT, M., 2013. SEROTONIN DISCOVERY AND STEPWISE DISCLOSURE OF 5-HT RECEPTOR COMPLEXITY OVER FOUR DECADES. PART I. GENERAL BACKGROUND AND DISCOVERY OF SEROTONIN AS A BASIS FOR 5-HT RECEPTOR IDENTIFICATION. *PHARMACOL REP* 65, 771–786. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1734-1140\(13\)71059-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71059-4)

GÖTZ, M., HUTTNER, W.B., 2005. THE CELL BIOLOGY OF NEUROGENESIS. *NAT REV MOL CELL BIOL* 6, 777–788. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRM1739](https://doi.org/10.1038/NRM1739)

GOVEK, E.-E., NEWWEY, S.E., AELST, L.V., 2005. THE ROLE OF THE RHO GTPASES IN NEURONAL DEVELOPMENT. *GENES DEV.* 19, 1–49. [HTTPS://DOI.ORG/10.1101/GAD.1256405](https://doi.org/10.1101/GAD.1256405)

GRANT, S.G., O'DELL, T.J., KARL, K.A., STEIN, P.L., SORIANO, P., KANDEL, E.R., 1992. IMPAIRED LONG-TERM POTENTIATION, SPATIAL LEARNING, AND HIPPOCAMPAL DEVELOPMENT IN FYN MUTANT MICE. *SCIENCE* 258, 1903–1910. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.1361685](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1361685)

GUADIANA, S.M., SEMPLE-ROWLAND, S., DAROSZEWSKI, D., MADORSKY, I., BREUNIG, J.J., MYKYTYN, K., SARKISIAN, M.R., 2013. ARBORIZATION OF DENDRITES BY DEVELOPING NEOCORTICAL NEURONS IS DEPENDENT ON PRIMARY CILIA AND TYPE 3 ADENYLYL CYCLASE. *J. NEUROSCI.* 33, 2626–2638. [HTTPS://DOI.ORG/10.1523/JNEUROSCI.2906-12.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-12.2013)

GUO, J., HIGGINBOTHAM, H., LI, J., NICHOLS, J., HIRT, J., GHUKASYAN, V., ANTON, E.S., 2015. DEVELOPMENTAL DISRUPTIONS UNDERLYING BRAIN ABNORMALITIES IN CILIOPATHIES. *NATURE COMMUNICATIONS* 6, 7857. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NCOMMS8857](https://doi.org/10.1038/NCOMMS8857)

- GUO, J., OTIS, J.M., HIGGINBOTHAM, H., MONCKTON, C., CHENG, J., ASOKAN, A., MYKYTYN, K., CASPARY, T., STUBER, G.D., ANTON, E.S., 2017. PRIMARY CILIA SIGNALING SHAPES THE DEVELOPMENT OF INTERNEURONAL CONNECTIVITY. *DEV. CELL* 42, 286-300.E4.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.DEVCEL.2017.07.010](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.010)
- GUSEL'NIKOVA, V.V., KORZHEVSKIY, D.E., 2015. NEUN AS A NEURONAL NUCLEAR ANTIGEN AND NEURON DIFFERENTIATION MARKER. *ACTA NATURAE* 7, 42–47.
- GUSEVA, D., WIRTH, A., PONIMASKIN, E., 2014. CELLULAR MECHANISMS OF THE 5-HT7 RECEPTOR-MEDIATED SIGNALING. *FRONT BEHAV NEUROSCI* 8.
[HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FNBEH.2014.00306](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00306)
- HA, C.M., PARK, D., KIM, Y., NA, M., PANDA, S., WON, S., KIM, H., RYU, H., PARK, Z.Y., RASENICK, M.M., CHANG, S., 2015. SNX14 IS A BIFUNCTIONAL NEGATIVE REGULATOR FOR NEURONAL 5-HT6 RECEPTOR SIGNALING. *J. CELL. SCI.* 128, 1848–1861.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1242/JCS.169581](https://doi.org/10.1242/jcs.169581)
- HALL, R.A., PREMONT, R.T., CHOW, C.-W., BLITZER, J.T., PITCHER, J.A., CLAING, A., STOFFEL, R.H., BARAK, L.S., SHENOLIKAR, S., WEINMAN, E.J., GRINSTEIN, S., LEFKOWITZ, R.J., 1998. THE B 2 -ADRENERGIC RECEPTOR INTERACTS WITH THE NA + /H + -EXCHANGER REGULATORY FACTOR TO CONTROL NA + /H + EXCHANGE. *NATURE* 392, 626–630.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/33458](https://doi.org/10.1038/33458)
- HAMON, M., DOUCET, E., LEFEVRE, K., MIQUEL, M.C., LANFUMEY, L., INSAUSTI, R., FRECHILLA, D., DEL RIO, J., VERGE, D., 1999. ANTIBODIES AND ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE FOR PROBING THE DISTRIBUTION AND PUTATIVE FUNCTIONS OF CENTRAL 5-HT6 RECEPTORS. *NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY* 21, 68S-76S. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0893-133X\(99\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00044-5)
- HAN, Y.-G., SPASSKY, N., ROMAGUERA-ROS, M., GARCIA-VERDUGO, J.-M., AGUILAR, A., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., ALVAREZ-BUYLLA, A., 2008. HEDGEHOG SIGNALING AND PRIMARY CILIA ARE REQUIRED FOR THE FORMATION OF ADULT NEURAL STEM CELLS. *NAT NEUROSCI* 11, 277–284. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NN2059](https://doi.org/10.1038/nn2059)
- HARRIS, R.N., STABLER, R.S., REPKE, D.B., KRESS, J.M., WALKER, K.A., MARTIN, R.S., BROTHERS, J.M., ILNICKA, M., LEE, S.W., MIRZADEGAN, T., 2010. HIGHLY POTENT, NON-BASIC 5-HT6 LIGANDS. SITE MUTAGENESIS EVIDENCE FOR A SECOND BINDING MODE AT 5-HT6 FOR ANTAGONISM. *BIOORG MED CHEM LETT* 20, 3436–3440. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.BMCL.2010.03.110](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.03.110)
- HATCHER, P.D., BROWN, V.J., TAIT, D.S., BATE, S., OVEREND, P., HAGAN, J.J., JONES, D.N.C., 2005. 5-HT6 RECEPTOR ANTAGONISTS IMPROVE PERFORMANCE IN AN ATTENTIONAL SET SHIFTING

- TASK IN RATS. PSYCHOPHARMACOLOGY (BERL) 181, 253–259.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00213-005-2261-Z](https://doi.org/10.1007/S00213-005-2261-Z)
- HAY, N., SONENBERG, N., 2004. UPSTREAM AND DOWNSTREAM OF MTOR. GENES DEV 18, 1926–1945. [HTTPS://DOI.ORG/10.1101/GAD.1212704](https://doi.org/10.1101/GAD.1212704)
- HELBOE, L., EGEJERG, J., DE JONG, I.E.M., 2015. DISTRIBUTION OF SEROTONIN RECEPTOR 5-HT6 MRNA IN RAT NEURONAL SUBPOPULATIONS: A DOUBLE IN SITU HYBRIDIZATION STUDY. NEUROSCIENCE 310, 442–454. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.09.064](https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.09.064)
- HIGGINBOTHAM, H., EOM, T.-Y., MARIANI, L.E., BACHLEDA, A., HIRT, J., GUKASSYAN, V., CUSACK, C.L., LAI, C., CASPARY, T., ANTON, E.S., 2012. ARL13B IN PRIMARY CILIA REGULATES THE MIGRATION AND PLACEMENT OF INTERNEURONS IN THE DEVELOPING CEREBRAL CORTEX. DEV. CELL 23, 925–938. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.DEVCEL.2012.09.019](https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2012.09.019)
- HIGGINBOTHAM, H., GUO, J., YOKOTA, Y., UMBERGER, N.L., SU, C.-Y., LI, J., VERMA, N., HIRT, J., GHUKASYAN, V., CASPARY, T., ANTON, E.S., 2013. ARL13B-REGULATED CILIA ACTIVITIES ARE ESSENTIAL FOR POLARIZED RADIAL GLIAL SCAFFOLD FORMATION. NATURE NEUROSCIENCE 16, 1000–1007. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NN.3451](https://doi.org/10.1038/NN.3451)
- HILDEBRANDT, F., BENZING, T., KATSANIS, N., 2011. CILIOPATHIES. N ENGL J MED 364, 1533–1543. [HTTPS://DOI.ORG/10.1056/NEJMRA1010172](https://doi.org/10.1056/NEJMRA1010172)
- HILGENDORF, K.I., JOHNSON, C.T., MEZGER, A., RICE, S.L., NORRIS, A.M., DEMETER, J., GREENLEAF, W.J., REITER, J.F., KOPINKE, D., JACKSON, P.K., 2019. OMEGA-3 FATTY ACIDS ACTIVATE CILIARY FFAR4 TO CONTROL ADIPOGENESIS. CELL 179, 1289-1305.E21. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CELL.2019.11.005](https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.11.005)
- HINKLE, D.A., BALDWIN, S.A., SCHEFF, S.W., WISE, P.M., 1997. GFAP AND S100BETA EXPRESSION IN THE CORTEX AND HIPPOCAMPUS IN RESPONSE TO MILD CORTICAL CONTUSION. J NEUROTRAUMA 14, 729–738. [HTTPS://DOI.ORG/10.1089/NEU.1997.14.729](https://doi.org/10.1089/NEU.1997.14.729)
- HOOPER, C.W., DELANEY, C., STREETER, T., YARBORO, M.T., POOLE, S., BROWN, N., SLAUGHTER, J.C., COTTON, R.B., REESE, J., SHELTON, E.L., 2016. SELECTIVE SEROTONIN REUPTAKE INHIBITOR EXPOSURE CONSTRICTS THE MOUSE DUCTUS ARTERIOSUS IN UTERO. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 311, H572–H581. [HTTPS://DOI.ORG/10.1152/AJPHEART.00822.2015](https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00822.2015)
- HORNUNG, J.-P., 2003. THE HUMAN RAPHE NUCLEI AND THE SEROTONERGIC SYSTEM. JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY 26, 331–343. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JCHEMNEU.2003.10.002](https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2003.10.002)

- HU, L., WANG, B., ZHANG, Y., 2017. SEROTONIN 5-HT₆ RECEPTORS AFFECT COGNITION IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE BY REGULATING CILIA FUNCTION. *ALZHEIMERS RES* 9, 76. [HTTPS://DOI.ORG/10.1186/S13195-017-0304-4](https://doi.org/10.1186/S13195-017-0304-4)
- HUANGFU, D., LIU, A., RAKEMAN, A.S., MURCIA, N.S., NISWANDER, L., ANDERSON, K.V., 2003. HEDGEHOG SIGNALLING IN THE MOUSE REQUIRES INTRAFLAGELLAR TRANSPORT PROTEINS. *NATURE* 426, 83–87. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE02061](https://doi.org/10.1038/NATURE02061)
- JACOBSSHAGEN, M., NIQUILLE, M., CHAUMONT-DUBEL, S., MARIN, P., DAYER, A., 2014. THE SEROTONIN 6 RECEPTOR CONTROLS NEURONAL MIGRATION DURING CORTICOGENESIS VIA A LIGAND-INDEPENDENT CDK5-DEPENDENT MECHANISM. *DEVELOPMENT* 141, 3370–3377. [HTTPS://DOI.ORG/10.1242/DEV.108043](https://doi.org/10.1242/DEV.108043)
- JI, S.-P., ZHANG, Y., VAN CLEEMPUT, J., JIANG, W., LIAO, M., LI, L., WAN, Q., BACKSTROM, J.R., ZHANG, X., 2006. DISRUPTION OF PTEN COUPLING WITH 5-HT_{2C} RECEPTORS SUPPRESSES BEHAVIORAL RESPONSES INDUCED BY DRUGS OF ABUSE. *NATURE MEDICINE* 12, 324–329. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NM1349](https://doi.org/10.1038/NM1349)
- JIANG, J.Y., FALCONE, J.L., CURCI, S., HOFER, A.M., 2019. DIRECT VISUALIZATION OF CAMP SIGNALING IN PRIMARY CILIA REVEALS UP-REGULATION OF CILIARY GPCR ACTIVITY FOLLOWING HEDGEHOG ACTIVATION. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.* [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.1819730116](https://doi.org/10.1073/PNAS.1819730116)
- KARPOVA, N.N., LINDHOLM, J., PRUUNSILD, P., TIMMUSK, T., CASTRÉN, E., 2009. LONG-LASTING BEHAVIOURAL AND MOLECULAR ALTERATIONS INDUCED BY EARLY POSTNATAL FLUOXETINE EXPOSURE ARE RESTORED BY CHRONIC FLUOXETINE TREATMENT IN ADULT MICE. *EUR NEUROPSYCHOPHARMACOL* 19, 97–108. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.EURONEURO.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2008.09.002)
- KATSUYAMA, Y., TERASHIMA, T., 2009. DEVELOPMENTAL ANATOMY OF REELER MUTANT MOUSE. *DEV GROWTH DIFFER* 51, 271–286. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1440-169X.2009.01102.X](https://doi.org/10.1111/J.1440-169X.2009.01102.X)
- KAWAUCHI, T., 2014. CDK5 REGULATES MULTIPLE CELLULAR EVENTS IN NEURAL DEVELOPMENT, FUNCTION AND DISEASE. *DEV GROWTH DIFFER* 56, 335–348. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/DGD.12138](https://doi.org/10.1111/DGD.12138)
- KHAN, S.M., SLENO, R., GORA, S., ZYLBERGOLD, P., LAVERDURE, J.-P., LABBÉ, J.-C., MILLER, G.J., HÉBERT, T.E., 2013. THE EXPANDING ROLES OF GBF SUBUNITS IN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR SIGNALING AND DRUG ACTION. *PHARMACOL REV* 65, 545–577. [HTTPS://DOI.ORG/10.1124/PR.111.005603](https://doi.org/10.1124/PR.111.005603)

- KHOURY, R., GRYSMAN, N., GOLD, J., PATEL, K., GROSSBERG, G.T., 2018. THE ROLE OF 5-HT₆-RECEPTOR ANTAGONISTS IN ALZHEIMER'S DISEASE: AN UPDATE. EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS 27, 523–533. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/13543784.2018.1483334](https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1483334)
- KIM, S.-H., KIM, D.H., LEE, K.H., IM, S.-K., HUR, E.-M., CHUNG, K.C., RHIM, H., 2014. DIRECT INTERACTION AND FUNCTIONAL COUPLING BETWEEN HUMAN 5-HT₆ RECEPTOR AND THE LIGHT CHAIN 1 SUBUNIT OF THE MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1B (MAP1B-LC1). PLOS ONE 9, E91402. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PONE.0091402](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0091402)
- KIM, S.-H., SEO, M., HWANG, H., MOON, D.-M., SON, G.H., KIM, K., RHIM, H., 2019. PHYSICAL AND FUNCTIONAL INTERACTION BETWEEN 5-HT₆ RECEPTOR AND NOVA-1. EXP NEUROBIOL 28, 17–29. [HTTPS://DOI.ORG/10.5607/EN.2019.28.1.17](https://doi.org/10.5607/EN.2019.28.1.17)
- KING, M., MARSDEN, C., FONE, K., 2008. A ROLE FOR THE 5-HT_{1A}, 5-HT₄ AND 5-HT₆ RECEPTORS IN LEARNING AND MEMORY. TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES 29, 482–492. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.TIPS.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2008.07.001)
- KING, M.V., SLEIGHT, A.J., WOOLLEY, M.L., TOPHAM, I.A., MARSDEN, C.A., FONE, K.C.F., 2004. 5-HT₆ RECEPTOR ANTAGONISTS REVERSE DELAY-DEPENDENT DEFICITS IN NOVEL OBJECT DISCRIMINATION BY ENHANCING CONSOLIDATION--AN EFFECT SENSITIVE TO NMDA RECEPTOR ANTAGONISM. NEUROPHARMACOLOGY 47, 195–204. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEUROPHARM.2004.03.012](https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2004.03.012)
- KOHEN, R., FASHINGBAUER, L.A., HEIDMANN, D.E., GUTHRIE, C.R., HAMBLIN, M.W., 2001. CLONING OF THE MOUSE 5-HT₆ SEROTONIN RECEPTOR AND MUTAGENESIS STUDIES OF THE THIRD CYTOPLASMIC LOOP. BRAIN RES. MOL. BRAIN RES. 90, 110–117.
- KOHEN, R., METCALF, M.A., KHAN, N., DRUCK, T., HUEBNER, K., LACHOWICZ, J.E., MELTZER, H.Y., SIBLEY, D.R., ROTH, B.L., HAMBLIN, M.W., 1996. CLONING, CHARACTERIZATION, AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF A HUMAN 5-HT₆ SEROTONIN RECEPTOR. J. NEUROCHEM. 66, 47–56.
- KOHLI, P., HÖHNE, M., JÜNGST, C., BERTSCH, S., EBERT, L.K., SCHAUSS, A.C., BENZING, T., RINSCHEN, M.M., SCHERMER, B., 2017. THE CILIARY MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEOME REVEALS ACTIN-BINDING PROTEINS AS KEY COMPONENTS OF CILIA. EMBO REP. 18, 1521–1535. [HTTPS://DOI.ORG/10.15252/EMBR.201643846](https://doi.org/10.15252/EMBR.201643846)
- KÜHN, H., WILDEN, U., 1987. DEACTIVATION OF PHOTOACTIVATED RHODOPSIN BY RHODOPSIN-KINASE AND ARRESTIN. J RECEPT RES 7, 283–298. [HTTPS://DOI.ORG/10.3109/10799898709054990](https://doi.org/10.3109/10799898709054990)

- KUMAMOTO, N., GU, Y., WANG, J., JANOSCHKA, S., TAKEMARU, K.-I., LEVINE, J., GE, S., 2012. A ROLE FOR PRIMARY CILIA IN GLUTAMATERGIC SYNAPTIC INTEGRATION OF ADULT-BORN NEURONS. *NAT NEUROSCI* 15, 399–405. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NN.3042](https://doi.org/10.1038/NN.3042)
- KVACHNINA, E., LIU, G., DITYATEV, A., RENNER, U., DUMUIS, A., RICHTER, D.W., DITYATEVA, G., SCHACHNER, M., VOYNO-YASENETSKAYA, T.A., PONIMASKIN, E.G., 2005. 5-HT₇ RECEPTOR IS COUPLED TO G ALPHA SUBUNITS OF HETEROTRIMERIC G₁₂-PROTEIN TO REGULATE GENE TRANSCRIPTION AND NEURONAL MORPHOLOGY. *J NEUROSCI* 25, 7821–7830. [HTTPS://DOI.ORG/10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005)
- LEBON, G., 2020. FINE-TUNING RECEPTOR–G PROTEIN ACTIVATION AND SIGNALING. *SCIENCE* 369, 507–508. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.ABC9291](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC9291)
- LESIAK, A.J., BRODSKY, M., COHENCA, N., CROICU, A.G., NEUMAIER, J.F., 2018. RESTORATION OF PHYSIOLOGICAL EXPRESSION OF 5-HT₆ RECEPTOR INTO THE PRIMARY CILIA OF NULL MUTANT NEURONS LENGTHENS BOTH PRIMARY CILIA AND DENDRITES. *MOL. PHARMACOL.* 94, 731–742. [HTTPS://DOI.ORG/10.1124/MOL.117.111583](https://doi.org/10.1124/MOL.117.111583)
- LO NIGRO, C., CHONG, C.S., SMITH, A.C., DOBYNS, W.B., CARROZZO, R., LEDBETTER, D.H., 1997. POINT MUTATIONS AND AN INTRAGENIC DELETION IN LIS1, THE LISSENCEPHALY CAUSATIVE GENE IN ISOLATED LISSENCEPHALY SEQUENCE AND MILLER-DIEKER SYNDROME. *HUM MOL GENET* 6, 157–164. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HMG/6.2.157](https://doi.org/10.1093/HMG/6.2.157)
- LORKE, D.E., LU, G., CHO, E., YEW, D.T., 2006. SEROTONIN 5-HT_{2A} AND 5-HT₆ RECEPTORS IN THE PREFRONTAL CORTEX OF ALZHEIMER AND NORMAL AGING PATIENTS. *BMC NEUROSCI* 7, 36. [HTTPS://DOI.ORG/10.1186/1471-2202-7-36](https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-36)
- MARIN, O., VALIENTE, M., GE, X., TSAI, L.-H., 2010. GUIDING NEURONAL CELL MIGRATIONS. *COLD SPRING HARB PERSPECT BIOL* 2, A001834. [HTTPS://DOI.ORG/10.1101/CSHPERSPECT.A001834](https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001834)
- MARIN, P., BECAMEL, C., DUMUIS, A., BOCKAERT, J., 2012. 5-HT RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN NETWORKS: NEW TARGETS FOR DRUG DISCOVERY IN PSYCHIATRIC DISORDERS? *CURR DRUG TARGETS* 13, 28–52. [HTTPS://DOI.ORG/10.2174/138945012798868498](https://doi.org/10.2174/138945012798868498)
- MARRERO, M.B., SCHIEFFER, B., PAXTON, W.G., HEERDT, L., BERK, B.C., DELAFONTAINE, P., BERNSTEIN, K.E., 1995. DIRECT STIMULATION OF JAK/STAT PATHWAY BY THE ANGIOTENSIN II AT 1 RECEPTOR. *NATURE* 375, 247–250. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/375247A0](https://doi.org/10.1038/375247A0)
- MARTIN, P.-Y., DOLY, S., HAMIEH, A.M., CHAPUY, E., CANALE, V., DROP, M., CHAUMONT-DUBEL, S., BANTREIL, X., LAMATY, F., BOJARSKI, A.J., ZAJDEL, P., ESCHALIER, A., MARIN, P., COURTEIX, C., 2020. MTOR ACTIVATION BY CONSTITUTIVELY ACTIVE SEROTONIN₆ RECEPTORS AS NEW

- PARADIGM IN NEUROPATHIC PAIN AND ITS TREATMENT. PROGRESS IN NEUROBIOLOGY 193, 101846. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PNEUROBIO.2020.101846](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101846)
- MASYUK, A.I., HUANG, B.Q., RADTKE, B.N., GAJDOS, G.B., SPLINTER, P.L., MASYUK, T.V., GRADILONE, S.A., LARUSSO, N.F., 2013. CILIARY SUBCELLULAR LOCALIZATION OF TGR5 DETERMINES THE CHOLANGIOCYTE FUNCTIONAL RESPONSE TO BILE ACID SIGNALING. AM J PHYSIOL GASTROINTEST LIVER PHYSIOL 304, G1013-1024. [HTTPS://DOI.ORG/10.1152/AJPGI.00383.2012](https://doi.org/10.1152/AJPGI.00383.2012)
- MCGREW, L., CHANG, M.S.S., SANDERS-BUSH, E., 2002. PHOSPHOLIPASE D ACTIVATION BY ENDOGENOUS 5-HYDROXYTRYPTAMINE 2C RECEPTORS IS MEDIATED BY GALPHA13 AND PERTUSSIS TOXIN-INSENSITIVE GBETAGAMMA SUBUNITS. MOL PHARMACOL 62, 1339–1343. [HTTPS://DOI.ORG/10.1124/MOL.62.6.1339](https://doi.org/10.1124/MOL.62.6.1339)
- 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., MARIN, P., 2012. 5-HT6 RECEPTOR RECRUITMENT OF MTOR AS A MECHANISM FOR PERTURBED COGNITION IN SCHIZOPHRENIA. EMBO MOL MED 4, 1043–1056. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/EMMM.201201410](https://doi.org/10.1002/EMMM.201201410)
- MONSMA, F.J., SHEN, Y., WARD, R.P., HAMBLIN, M.W., SIBLEY, D.R., 1993. CLONING AND EXPRESSION OF A NOVEL SEROTONIN RECEPTOR WITH HIGH AFFINITY FOR TRICYCLIC PSYCHOTROPIC DRUGS. MOL PHARMACOL 43, 320–327.
- MORENO DELGADO, D., MØLLER, T.C., STER, J., GIRALDO, J., MAUREL, D., ROVIRA, X., SCHOLLER, P., ZWIER, J.M., PERROY, J., DURROUX, T., TRINQUET, E., PREZEAU, L., RONDARD, P., PIN, J.-P., 2017. PHARMACOLOGICAL EVIDENCE FOR A METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR HETERODIMER IN NEURONAL CELLS. ELIFE 6. [HTTPS://DOI.ORG/10.7554/ELIFE.25233](https://doi.org/10.7554/ELIFE.25233)
- MORENO, M.M., LINSTER, C., ESCANILLA, O., SACQUET, J., DIDIER, A., MANDAIRON, N., 2009. OLFACTORY PERCEPTUAL LEARNING REQUIRES ADULT NEUROGENESIS. PROC NATL ACAD SCI U S A 106, 17980–17985. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.0907063106](https://doi.org/10.1073/PNAS.0907063106)
- MURAT, S., BIGOT, M., CHAPRON, J., KÖNIG, G.M., KOSTENIS, E., BATTAGLIA, G., NICOLETTI, F., BOURINET, E., BOCKAERT, J., MARIN, P., VANDERMOERE, F., 2019. 5-HT2A RECEPTOR-DEPENDENT PHOSPHORYLATION OF MGLU2 RECEPTOR AT SERINE 843 PROMOTES MGLU2 RECEPTOR-OPERATED GI/O SIGNALING. MOL PSYCHIATRY 24, 1610–1626. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41380-018-0069-6](https://doi.org/10.1038/S41380-018-0069-6)
- NARBOUX-NÊME, N., ANGENARD, G., MOSIENKO, V., KLEMPIN, F., PITYCHOUTIS, P.M., DENERIS, E., BADER, M., GIROS, B., ALENINA, N., GASPAR, P., 2013. POSTNATAL GROWTH DEFECTS IN

- MICE WITH CONSTITUTIVE DEPLETION OF CENTRAL SEROTONIN. ACS CHEM NEUROSCI 4, 171–181. [HTTPS://DOI.ORG/10.1021/CN300165X](https://doi.org/10.1021/CN300165X)
- NORDMAN, J.C., KABBANI, N., 2012. AN INTERACTION BETWEEN A7 NICOTINIC RECEPTORS AND A G-PROTEIN PATHWAY COMPLEX REGULATES NEURITE GROWTH IN NEURAL CELLS. J CELL SCI 125, 5502–5513. [HTTPS://DOI.ORG/10.1242/JCS.110379](https://doi.org/10.1242/JCS.110379)
- OLVERA-CORTÉS, M.E., ANGUIANO-RODRÍGUEZ, P., LÓPEZ-VÁZQUEZ, M.A., ALFARO, J.M.C., 2008. SEROTONIN/DOPAMINE INTERACTION IN LEARNING. PROG BRAIN RES 172, 567–602. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0079-6123\(08\)00927-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00927-8)
- PARK, S.M., LIM, J.S., RAMAKRISHNA, S., KIM, S.H., KIM, W.K., LEE, J., KANG, H.-C., REITER, J.F., KIM, D.S., KIM, H.H., LEE, J.H., 2018. BRAIN SOMATIC MUTATIONS IN MTOR DISRUPT NEURONAL CILIOGENESIS, LEADING TO FOCAL CORTICAL DYSLAMINATION. NEURON 99, 83-97.E7. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2018.05.039](https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.05.039)
- PAZOUR, G.J., DICKERT, B.L., VUCICA, Y., SEELEY, E.S., ROSENBAUM, J.L., WITMAN, G.B., COLE, D.G., 2000. CHLAMYDOMONAS IFT88 AND ITS MOUSE HOMOLOGUE, POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE GENE TG737, ARE REQUIRED FOR ASSEMBLY OF CILIA AND FLAGELLA. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 151, 709–718. [HTTPS://DOI.ORG/10.1083/JCB.151.3.709](https://doi.org/10.1083/JCB.151.3.709)
- PEREZ-GARCÍA, G., MENESES, A., 2005. ORAL ADMINISTRATION OF THE 5-HT₆ RECEPTOR ANTAGONISTS SB-357134 AND SB-399885 IMPROVES MEMORY FORMATION IN AN AUTOSHAPING LEARNING TASK. PHARMACOL. BIOCHEM. BEHAV. 81, 673–682. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PBB.2005.05.005](https://doi.org/10.1016/J.PBB.2005.05.005)
- PEROUTKA, S.J., SNYDER, S.H., 1979. MULTIPLE SEROTONIN RECEPTORS: DIFFERENTIAL BINDING OF [3H]5-HYDROXYTRYPTAMINE, [3H]LYSERGIC ACID DIETHYLAMIDE AND [3H]SPIROPERIDOL. MOL PHARMACOL 16, 687–699.
- PICHON, X., WATTIEZ, A.S., BECAMEL, C., EHRLICH, I., BOCKAERT, J., ESCHALIER, A., MARIN, P., COURTEIX, C., 2010. DISRUPTING 5-HT_{2A} RECEPTOR/PDZ PROTEIN INTERACTIONS REDUCES HYPERALGESIA AND ENHANCES SSRI EFFICACY IN NEUROPATHIC PAIN. MOL THER 18, 1462–1470. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/MT.2010.101](https://doi.org/10.1038/MT.2010.101)
- PIN, J.-P., BETTLER, B., 2016. ORGANIZATION AND FUNCTIONS OF MGLU AND GABAB RECEPTOR COMPLEXES. NATURE 540, 60–68. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE20566](https://doi.org/10.1038/NATURE20566)
- PINDON, A., HECKE, G. VAN, GOMPEL, P. VAN, LESAGE, A.S., LEYSEN, J.E., JURZAK, M., 2002. DIFFERENCES IN SIGNAL TRANSDUCTION OF TWO 5-HT₄RECEPTOR SPLICE VARIANTS: COMPOUND SPECIFICITY AND DUAL COUPLING WITH GAS- AND GAI/O-PROTEINS. MOL PHARMACOL 61, 85–96. [HTTPS://DOI.ORG/10.1124/MOL.61.1.85](https://doi.org/10.1124/MOL.61.1.85)

- POLLAK DOROCIC, I., FÜRTH, D., XUAN, Y., JOHANSSON, Y., POZZI, L., SILBERBERG, G., CARLÉN, M., MELETIS, K., 2014. A WHOLE-BRAIN ATLAS OF INPUTS TO SEROTONERGIC NEURONS OF THE DORSAL AND MEDIAN RAPHE NUCLEI. *NEURON* 83, 663–678.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2014.07.002](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.002)
- PONIMASKIN, E.G., PROFIROVIC, J., VAISKUNAITE, R., RICHTER, D.W., VOYNO-YASENETSKAYA, T.A., 2002. 5-HYDROXYTRYPTAMINE 4(A) RECEPTOR IS COUPLED TO THE GALPHA SUBUNIT OF HETEROTRIMERIC G13 PROTEIN. *J BIOL CHEM* 277, 20812–20819.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M112216200](https://doi.org/10.1074/jbc.M112216200)
- PRAETORIUS, H.A., SPRING, K.R., 2003. REMOVAL OF THE MDCK CELL PRIMARY CILIUM ABOLISHES FLOW SENSING. *J MEMBR BIOL* 191, 69–76. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00232-002-1042-4](https://doi.org/10.1007/S00232-002-1042-4)
- PRAETORIUS, H.A., SPRING, K.R., 2001. BENDING THE MDCK CELL PRIMARY CILIUM INCREASES INTRACELLULAR CALCIUM. *J MEMBR BIOL* 184, 71–79. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00232-001-0075-4](https://doi.org/10.1007/S00232-001-0075-4)
- PUJOL, C.N., DUPUY, V., SÉVENO, M., RUNTZ, L., BOCKAERT, J., MARIN, P., CHAUMONT-DUBEL, S., 2020. DYNAMIC INTERACTIONS OF THE 5-HT₆ RECEPTOR WITH PROTEIN PARTNERS CONTROL DENDRITIC TREE MORPHOGENESIS. *SCI. SIGNAL.* 13, EAAX9520.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCISIGNAL.AAX9520](https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.AAX9520)
- RAPPORT, M.M., 1949. SERUM VASOCONSTRICTOR (SEROTONIN): V. THE PRESENCE OF CREATININE IN THE COMPLEX. A PROPOSED STRUCTURE OF THE VASOCONSTRICTOR PRINCIPLE. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 180, 961–969. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0021-9258\(19\)51208-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51208-X)
- RAPPORT, M. M., GREEN, A.A., PAGE, I.H., 1948. CRYSTALLINE SEROTONIN. *SCIENCE* 108, 329–330.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.108.2804.329](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.108.2804.329)
- RAPPORT, MAURICE M., GREEN, ARDA.ALDEN., PAGE, I.H., 1948. PARTIAL PURIFICATION OF THE VASOCONSTRICTOR IN BEEF SERUM. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 174, 735–741.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0021-9258\(18\)57355-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57355-5)
- RICCIO, O., JACOBSHAGEN, M., GOLDING, B., VUTSKITS, L., JABAUDON, D., HORNING, J.P., DAYER, A.G., 2011. EXCESS OF SEROTONIN AFFECTS NEOCORTICAL PYRAMIDAL NEURON MIGRATION. *TRANSL PSYCHIATRY* 1, E47. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/TP.2011.49](https://doi.org/10.1038/TP.2011.49)
- RICCIO, O., POTTER, G., WALZER, C., VALLET, P., SZABÓ, G., VUTSKITS, L., KISS, J.Z., DAYER, A.G., 2009. EXCESS OF SEROTONIN AFFECTS EMBRYONIC INTERNEURON MIGRATION THROUGH ACTIVATION OF THE SEROTONIN RECEPTOR 6. *MOL. PSYCHIATRY* 14, 280–290.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/MP.2008.89](https://doi.org/10.1038/MP.2008.89)

- RIEMER, C., BORRONI, E., LEVET-TRAFIT, B., MARTIN, J.R., POLI, S., PORTER, R.H.P., BÖS, M., 2003. INFLUENCE OF THE 5-HT₆ RECEPTOR ON ACETYLCHOLINE RELEASE IN THE CORTEX: PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF 4-(2-BROMO-6-PYRROLIDIN-1-YLPYRIDINE-4-SULFONYL)PHENYLAMINE, A POTENT AND SELECTIVE 5-HT₆ RECEPTOR ANTAGONIST. *J. MED. CHEM.* 46, 1273–1276. [HTTPS://DOI.ORG/10.1021/JM021085C](https://doi.org/10.1021/JM021085C)
- RITTER, S.L., HALL, R.A., 2009. FINE-TUNING OF GPCR ACTIVITY BY RECEPTOR-INTERACTING PROTEINS. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY* 10, 819–830. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRM2803](https://doi.org/10.1038/NRM2803)
- ROGERS, D.C., HAGAN, J.J., 2001. 5-HT₆ RECEPTOR ANTAGONISTS ENHANCE RETENTION OF A WATER MAZE TASK IN THE RAT. *PSYCHOPHARMACOLOGY (BERL.)* 158, 114–119. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S002130100840](https://doi.org/10.1007/S002130100840)
- ROHATGI, R., MILENKOVIC, L., SCOTT, M.P., 2007. PATCHED1 REGULATES HEDGEHOG SIGNALING AT THE PRIMARY CILIUM. *SCIENCE* 317, 372–376. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.1139740](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1139740)
- RUAT, M., TRAIFFORT, E., ARRANG, J.M., TARDIVEL-LACOMBE, J., DIAZ, J., LEURS, R., SCHWARTZ, J.C., 1993. A NOVEL RAT SEROTONIN (5-HT₆) RECEPTOR: MOLECULAR CLONING, LOCALIZATION AND STIMULATION OF CAMP ACCUMULATION. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 193, 268–276.
- SAUVAGEAU, E., ROCHDI, M.D., OUESLATI, M., HAMDAN, F.F., PERCHERANCIER, Y., SIMPSON, J.C., PEPPERKOK, R., BOUVIER, M., 2014. CNIH4 INTERACTS WITH NEWLY SYNTHESIZED GPCR AND CONTROLS THEIR EXPORT FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *TRAFFIC* 15, 383–400. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/TRA.12148](https://doi.org/10.1111/TRA.12148)
- 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., BEYER, C.E., 2008. NEUROPHARMACOLOGICAL PROFILE OF NOVEL AND SELECTIVE 5-HT₆ RECEPTOR AGONISTS: WAY-181187 AND WAY-208466. *NEUROPSYCHOPHARMACOL* 33, 1323–1335. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/SJ.NPP.1301503](https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1301503)
- SCHNEIDER, L., CAMMER, M., LEHMAN, J., NIELSEN, S.K., GUERRA, C.F., VELAND, I.R., STOCK, C., HOFFMANN, E.K., YODER, B.K., SCHWAB, A., SATIR, P., CHRISTENSEN, S.T., 2010. DIRECTIONAL CELL MIGRATION AND CHEMOTAXIS IN WOUND HEALING RESPONSE TO PDGF-AA ARE COORDINATED BY THE PRIMARY CILIUM IN FIBROBLASTS. *CELL PHYSIOL BIOCHEM* 25, 279–292. [HTTPS://DOI.ORG/10.1159/000276562](https://doi.org/10.1159/000276562)
- SCHNEIDER, L., CLEMENT, C.A., TEILMANN, S.C., PAZOUR, G.J., HOFFMANN, E.K., SATIR, P., CHRISTENSEN, S.T., 2005. PDGFR α SIGNALING IS REGULATED THROUGH THE

- PRIMARY CILIUM IN FIBROBLASTS. *CURR BIOL* 15, 1861–1866.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CUB.2005.09.012](https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.09.012)
- SEBBEN, M., ANSANAY, H., BOCKAERT, J., DUMUIS, A., 1994. 5-HT₆ RECEPTORS POSITIVELY COUPLED TO ADENYLYL CYCLASE IN STRIATAL NEURONES IN CULTURE. *NEUROREPORT* 5, 2553–2557.
- SEIFERT, R., WENZEL-SEIFERT, K., 2002. CONSTITUTIVE ACTIVITY OF G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS: CAUSE OF DISEASE AND COMMON PROPERTY OF WILD-TYPE RECEPTORS. *NAUNYN SCHMIEDEBERGS ARCH PHARMACOL* 366, 381–416.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00210-002-0588-0](https://doi.org/10.1007/S00210-002-0588-0)
- SEKINE, K., KUBO, K., NAKAJIMA, K., 2014. HOW DOES REELIN CONTROL NEURONAL MIGRATION AND LAYER FORMATION IN THE DEVELOPING MAMMALIAN NEOCORTEX? *NEUROSCI RES* 86, 50–58. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURES.2014.06.004](https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2014.06.004)
- SIPOS, É., KOMOLY, S., ÁCS, P., 2018. QUANTITATIVE COMPARISON OF PRIMARY CILIA MARKER EXPRESSION AND LENGTH IN THE MOUSE BRAIN. *J. MOL. NEUROSCI.* 64, 397–409.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S12031-018-1036-Z](https://doi.org/10.1007/S12031-018-1036-Z)
- SLEIGHT, A.J., BOESS, F.G., BÖS, M., BOURSON, A., 1998. THE PUTATIVE 5-HT₆ RECEPTOR: LOCALIZATION AND FUNCTION. *ANN. N. Y. ACAD. SCI.* 861, 91–96.
- SLEIGHT, A.J., MONSMA, F.J., BORRONI, E., AUSTIN, R.H., BOURSON, A., 1996. EFFECTS OF ALTERED 5-HT₆ EXPRESSION IN THE RAT: FUNCTIONAL STUDIES USING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES. *BEHAV. BRAIN RES.* 73, 245–248.
- SMITH, J.B., KLUG, J.R., ROSS, D.L., HOWARD, C.D., HOLLON, N.G., KO, V.I., HOFFMAN, H., CALLAWAY, E.M., GERFEN, C.R., JIN, X., 2016. GENETIC-BASED DISSECTION UNVEILS THE INPUTS AND OUTPUTS OF STRIATAL PATCH AND MATRIX COMPARTMENTS. *NEURON* 91, 1069–1084.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2016.07.046](https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.07.046)
- SMITH, J.S., RAJAGOPAL, S., 2016. THE B-ARRESTINS: MULTIFUNCTIONAL REGULATORS OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *J BIOL CHEM* 291, 8969–8977.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.R115.713313](https://doi.org/10.1074/JBC.R115.713313)
- SPASSKY, N., HAN, Y.-G., AGUILAR, A., STREHL, L., BESSE, L., LACLEF, C., ROS, M.R., GARCIA-VERDUGO, J.M., ALVAREZ-BUYLLA, A., 2008. PRIMARY CILIA ARE REQUIRED FOR CEREBELLAR DEVELOPMENT AND SHH-DEPENDENT EXPANSION OF PROGENITOR POOL. *DEV BIOL* 317, 246–259. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.YDBIO.2008.02.026](https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2008.02.026)
- STERPKA, A., CHEN, X., 2018. NEURONAL AND ASTROCYTIC PRIMARY CILIA IN THE MATURE BRAIN. *PHARMACOL. RES.* 137, 114–121. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PHRS.2018.10.002](https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.10.002)

- STILES, T.L., KAPILOFF, M.S., GOLDBERG, J.L., 2014. THE ROLE OF SOLUBLE ADENYLYL CYCLASE IN NEURITE OUTGROWTH. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1842, 2561–2568.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.BBADIS.2014.07.012](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.012)
- STOUFFLET, J., CHAULET, M., DOULAZMI, M., FOUQUET, C., DUBACQ, C., MÉTIN, C., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., TREMBLEAU, A., CAILLÉ, I., VINCENT, P., 2020. PRIMARY CILIUM-DEPENDENT CAMP/PKA SIGNALING AT THE CENTROSOME REGULATES NEURONAL MIGRATION. *SCIENCE ADVANCES* 6. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIADV.ABA3992](https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3992)
- SUGDEN, D., 2003. COMPARISON OF CIRCADIAN EXPRESSION OF TRYPTOPHAN HYDROXYLASE ISOFORM MRNAS IN THE RAT PINEAL GLAND USING REAL-TIME PCR: PINEAL TRYPTOPHAN HYDROXYLASE ISOFORMS. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* 86, 1308–1311.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1046/J.1471-4159.2003.01959.X](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01959.x)
- SYROVATKINA, V., ALEGRE, K.O., DEY, R., HUANG, X.-Y., 2016. REGULATION, SIGNALING AND PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF G-PROTEINS. *J MOL BIOL* 428, 3850–3868.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JMB.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002)
- TENG, L.-L., LU, G.-L., CHIOU, L.-C., LIN, W.-S., CHENG, Y.-Y., HSUEH, T.-E., HUANG, Y.-C., HWANG, N.-H., YEH, J.-W., LIAO, R.-M., FAN, S.-Z., YEN, J.-H., FU, T.-F., TSAI, T.-F., WU, M.-S., WANG, P.-Y., 2019. SEROTONIN RECEPTOR HTR6-MEDIATED MTORC1 SIGNALING REGULATES DIETARY RESTRICTION-INDUCED MEMORY ENHANCEMENT. *PLOS BIOL.* 17, E2007097.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PBIO.2007097](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2007097)
- TINTERRI, A., MENARDY, F., DIANA, M.A., LOKMANE, L., KEITA, M., COULPIER, F., LEMOINE, S., MAILHES, C., MATHIEU, B., MERCHAN-SALA, P., CAMPBELL, K., GYORY, I., GROSSCHEDL, R., POPA, D., GAREL, S., 2018. ACTIVE INTERMIXING OF INDIRECT AND DIRECT NEURONS BUILDS THE STRIATAL MOSAIC. *NATURE COMMUNICATIONS* 9. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41467-018-07171-4](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07171-4)
- TSAI, L.-H., GLEESON, J.G., 2005. NUCLEOKINESIS IN NEURONAL MIGRATION. *NEURON* 46, 383–388.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.NEURON.2005.04.013](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.013)
- TURNER, J.H., GELASCO, A.K., RAYMOND, J.R., 2004. CALMODULIN INTERACTS WITH THE THIRD INTRACELLULAR LOOP OF THE SEROTONIN 5-HYDROXYTRYPTAMINE1A RECEPTOR AT TWO DISTINCT SITES: PUTATIVE ROLE IN RECEPTOR PHOSPHORYLATION BY PROTEIN KINASE C. *J BIOL CHEM* 279, 17027–17037. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M313919200](https://doi.org/10.1074/jbc.M313919200)
- VELASQUEZ, J.C., GOEDEN, N., BONNIN, A., 2013. PLACENTAL SEROTONIN: IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENTAL EFFECTS OF SSRIS AND MATERNAL DEPRESSION. *FRONT CELL NEUROSCI* 7. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FNCEL.2013.00047](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00047)

- VIALI, M., ERSPAMER, V., 1937. RICERCHE SUL SECRETO DELLE CELLULE ENTEROCROMAFFINI: NOTA VII OSSERVAZIONI CRITICHE SU ALCUNI PROBLEMI INERENTI ALLA ISTOCIMICA DELLE ENTEROCROMAFFINI. Z. F. ZELLFORSCHUNG U. MIKR. ANATOMIE. 27, 81–99.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/BF00391792](https://doi.org/10.1007/BF00391792)
- VITALIS, T., ANSORGE, M.S., DAYER, A.G., 2013. SEROTONIN HOMEOSTASIS AND SEROTONIN RECEPTORS AS ACTORS OF CORTICAL CONSTRUCTION: SPECIAL ATTENTION TO THE 5-HT3A AND 5-HT6 RECEPTOR SUBTYPES. FRONT CELL NEUROSCI 7.
[HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FNCEL.2013.00093](https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00093)
- WALTHER, D.J., BADER, M., 2003. A UNIQUE CENTRAL TRYPTOPHAN HYDROXYLASE ISOFORM. BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY 66, 1673–1680. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0006-2952\(03\)00556-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00556-2)
- WALTHER, D.J., PETER, J.-U., BASHAMMAKH, S., HÖRTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H., BADER, M., 2003. SYNTHESIS OF SEROTONIN BY A SECOND TRYPTOPHAN HYDROXYLASE ISOFORM. SCIENCE 299, 76. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.1078197](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078197)
- WANG, L., LV, Y., DENG, W., PENG, X., XIAO, Z., XI, Z., CHEN, G., WANG, X., 2015. 5-HT6 RECEPTOR RECRUITMENT OF MTOR MODULATES SEIZURE ACTIVITY IN EPILEPSY. MOL NEUROBIOL 51, 1292–1299. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S12035-014-8806-6](https://doi.org/10.1007/S12035-014-8806-6)
- WETTSCHURECK, N., OFFERMANN, S., 2005. MAMMALIAN G PROTEINS AND THEIR CELL TYPE SPECIFIC FUNCTIONS. PHYSIOL REV 85, 1159–1204.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1152/PHYSREV.00003.2005](https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00003.2005)
- WONG, M.-L., LICINIO, J., 2004. FROM MONOAMINES TO GENOMIC TARGETS: A PARADIGM SHIFT FOR DRUG DISCOVERY IN DEPRESSION. NAT REV DRUG DISCOV 3, 136–151.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRD1303](https://doi.org/10.1038/NRD1303)
- WOOLLEY, M.L., BENTLEY, J.C., SLEIGHT, A.J., MARSDEN, C.A., FONE, K.C., 2001. A ROLE FOR 5-HT6 RECEPTORS IN RETENTION OF SPATIAL LEARNING IN THE MORRIS WATER MAZE. NEUROPHARMACOLOGY 41, 210–219.
- WOOLLEY, M.L., MARSDEN, C.A., SLEIGHT, A.J., FONE, K.C.F., 2003. REVERSAL OF A CHOLINERGIC-INDUCED DEFICIT IN A RODENT MODEL OF RECOGNITION MEMORY BY THE SELECTIVE 5-HT6 RECEPTOR ANTAGONIST, RO 04-6790. PSYCHOPHARMACOLOGY (BERL.) 170, 358–367.
[HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00213-003-1552-5](https://doi.org/10.1007/S00213-003-1552-5)
- XIA, Z., HUFSEIN, S.J., GRAY, J.A., ROTH, B.L., 2003. THE PDZ-BINDING DOMAIN IS ESSENTIAL FOR THE DENDRITIC TARGETING OF 5-HT2A SEROTONIN RECEPTORS IN CORTICAL PYRAMIDAL NEURONS IN VITRO. NEUROSCIENCE 122, 907–920. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0306-4522\(03\)00589-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00589-X)

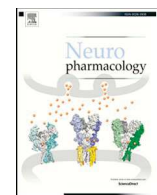
YAGISHITA, S., HAYASHI-TAKAGI, A., ELLIS-DAVIES, G.C.R., URAKUBO, H., ISHII, S., KASAI, H., 2014. A CRITICAL TIME WINDOW FOR DOPAMINE ACTIONS ON THE STRUCTURAL PLASTICITY OF DENDRITIC SPINES. SCIENCE 345, 1616–1620. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.1255514](https://doi.org/10.1126/science.1255514)

YOSHIOKA, M., MATSUMOTO, M., TOGASHI, H., MORI, K., 1998. CENTRAL DISTRIBUTION AND FUNCTION OF 5-HT₆ RECEPTOR SUBTYPE IN THE RAT BRAIN. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 861, 244.

YUN, H.-M., BAIK, J.-H., KANG, I., JIN, C., 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. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M109.068759](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068759)

YUN, H.-M., KIM, S., KIM, H.-J., KOSTENIS, E., KIM, J.I., SEONG, J.Y., BAIK, J.-H., RHIM, H., 2007. THE NOVEL CELLULAR MECHANISM OF HUMAN 5-HT₆ RECEPTOR THROUGH AN INTERACTION WITH FYN. J. BIOL. CHEM. 282, 5496–5505. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M606215200](https://doi.org/10.1074/jbc.M606215200)

ANNEXES



Invited review

The 5-HT₆ receptor interactome: New insight in receptor signaling and its impact on brain physiology and pathologies

Séverine Chaumont-Dubel, Vincent Dupuy, Joël Bockaert, Carine Bécamel, Philippe Marin*

IGF, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

HIGHLIGHTS

- Interactomics screens identified 125 candidate partners of the 5-HT₆ receptor.
- 5-HT₆ receptor interacting proteins modulate receptor trafficking.
- 5-HT₆ receptor partners modulate receptor constitutive activity.
- 5-HT₆ receptors control cognition through recruitment and activation of mTORC1.
- 5-HT₆ receptors control migration and neurite growth through recruitment and activation of Cdk5.

ARTICLE INFO

Keywords:

Serotonin
5-HT₆ receptor
Interactome
Constitutive activity
Cognition
Neurodevelopment

ABSTRACT

The serotonin (5-HT)₆ receptor is a Gs-coupled receptor exclusively expressed in the central nervous system. Highest receptor densities are found in brain regions implicated in mnemonic functions where the receptor is primarily but not exclusively located in the primary cilium of neurons. The 5-HT₆ receptor continues to raise particular interest for neuropharmacologists, given the pro-cognitive effects of antagonists in a wide range of cognitive impairment paradigms in rodents and human. The 5-HT₆ receptor also finely controls key neurodevelopmental processes including neuron migration and differentiation. However, its influence upon neurodevelopment and cognition is not solely mediated by its coupling to the Gs-adenylyl cyclase pathway, suggesting alternative signal transduction mechanisms. This prompted studies aimed at characterizing the receptor interactome that identified 125 candidate receptor partners, making the 5-HT₆ receptor one of the G protein-coupled receptors with the most extensively characterized interactome. These studies showed that the receptor localization at the plasma membrane and, consequently, its signal transduction, are finely modulated by several receptor partners. They demonstrated that prefrontal 5-HT₆ receptors engage the mTOR pathway to compromise cognition in neurodevelopmental models of schizophrenia, and a role of the 5-HT₆-mTOR pathway in temporal epilepsy. Finally, they revealed that the receptor activates Cdk5 signaling in an agonist-independent manner through a mechanism involving receptor phosphorylation by the associated Cdk5 and highlighted its key role in the migration of neurons and neurite growth. These new receptor-operated signaling mechanisms should be considered in the future development of drugs acting on 5-HT₆ receptors.

This article is part of the special issue entitled 'Serotonin Research: Crossing Scales and Boundaries'.

1. Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is certainly one of the most popular neurotransmitters in the world. There are likely two reasons behind this popularity: 1) the positive influence upon mood of serotonin that is often considered as a major contributor of wellbeing and happiness; 2) widely prescribed antidepressants, such as the famous serotonin reuptake inhibitor fluoxetine (Prozac[™]), target the

serotonergic system. This popularity of serotonin has recently been illustrated in France by the success of the short story entitled "Serotonin" published by one of the most "à la mode" French authors, which describes the depressing and decadent life of a French farmer (Houellebecq, 2019).

From the neuropharmacologist point of view, 5-HT continues to raise a great interest, because it provides numerous possibilities of clinical interventions, mainly but not exclusively in the central nervous

* Corresponding author. Institut de Génétique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, F-34094, Montpellier Cedex 5, France.

E-mail address: philippe.marin@igf.cnrs.fr (P. Marin).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107839>

Received 23 August 2019; Received in revised form 29 October 2019; Accepted 31 October 2019

Available online 01 November 2019

0028-3908/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Non-standard abbreviations used

AD	Alzheimer's disease
ASD	Autism spectrum disorder
AIS	Axonal Initial Segment
Cdk	Cyclin-dependent kinase
DR	dietary restriction
GPCR	G protein-coupled receptor
GPRIN1	G Protein-Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 1
Jab1	Jun activation domain-binding protein-1

MAP1B-LC1	light chain 1 subunit of MAP1B protein
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
NF1	Neurofibromatosis type 1
Nova-1	Neuro-oncological ventral antigen 1
PCP	phencyclidine
Rheb	Ras homolog enriched in brain
SNX14	Sorting Nexin 14
TLE	Temporal lobe epilepsy

system. Though the number of serotonergic neurons is rather small (350,000 in human) (Hornung, 2003), serotonin is implicated in numerous physiological functions such as eating, thermoregulation, cardiovascular functions, locomotion, reproduction, sleep, pain, learning and memory, cognition, aggressiveness, response to stress, emotions, reward and mood. Deregulation of those functions leads to major pathologies such as anxiety (Kahn et al., 1988), depression (Nemeroff and Owens, 2009), anorexia (Jean et al., 2007), headache (Goadsby, 2007), insomnia (Thase, 1999), schizophrenia (Bleich et al., 1988; Meffre et al., 2012; Rasmussen et al., 2011), Alzheimer's disease (Cirrito et al., 2011; Claeysen et al., 2015) and cognitive dysfunction associated with the majority of these disorders. The wide impact of serotonin on brain functions has been attributed to the extensively branched serotonergic axons that innervate almost all brain nuclei (Charnay and Leger, 2010) and its ability to activate a plethora of receptors: 14 subtypes belonging to seven families (5-HT₁-5-HT₇) have been identified in human (Bockaert et al., 2010a; Millan et al., 2008). All but the 5-HT₃ receptor belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. The diversity of functions modulated by each 5-HT GPCR subtype not only reflects its capabilities to engage different signal transduction mechanism (Millan et al., 2008), but also its propensity to form complexes with additional proteins, including proteins involved in non-conventional (G-independent) signaling (Marin et al., 2012).

Among the different 5-HT receptor subtypes, the 5-HT₆ receptor has emerged as one particularly promising target for the treatment of cognitive deficits of various neuropsychiatric diseases such as Alzheimer's disease and schizophrenia, consistent with its highest expression in regions involved in cognitive functions (Codony et al., 2011; de Bruin and Kruse, 2015; de Jong and Mork, 2017). 5-HT₆ receptor antagonists improve cognition in a wide range of preclinical models of cognitive impairment and preliminary clinical studies demonstrated pro-cognitive effects in human. The beneficial effect of antagonists is generally attributed to the blockade of 5-HT₆ receptors located on GABAergic neurons and the relief of GABAergic inhibition of glutamatergic and cholinergic transmissions (Codony et al., 2011; de Jong and Mork, 2017). The presence of 5-HT₆ receptors on glutamatergic neurons introduced a more complex picture (de Jong and Mork, 2017; Helboe et al., 2015), and suggests that 5-HT₆ receptor ligands might affect the excitatory/inhibitory balance within local networks. 5-HT₆ receptors also raise particular interest for the treatment of anxiety and depression as well as eating disorders, but why both agonists and antagonists exert anxiolytic- and antidepressant-like effects and reduce food intake remains to be elucidated. Another important feature of the 5-HT₆ receptor is its early expression during brain development and data suggest that 5-HT₆ receptors mediate defects in brain development induced by an excess of serotonin (Dayer et al., 2015; Riccio et al., 2009). In fact, several studies revealed that the receptor controls key cellular events involved in neural circuit formation such as neuronal migration and neurite growth (Duhr et al., 2014; Jacobshagen et al., 2014).

Characterizing 5-HT₆ receptor-operated signal transduction is prerequisite to fully understand their pathophysiological roles and the therapeutic effects of 5-HT₆ receptor ligands. The 5-HT₆ receptor is

canonically coupled to the Gs-adenylyl cyclase pathway (Sebben et al., 1994). As for many GPCRs, 5-HT₆ receptor stimulation also induces activation of the Erk1,2 MAP kinase pathway (Yun et al., 2007). As these pathways generally have a positive influence upon cognition, it is unlikely that their inhibition by 5-HT₆ receptor antagonists would account for the pro-cognitive effects of these drugs. Likewise, activation of the Gs-adenylyl cyclase pathway only partially accounted for the receptor effects upon neuronal migration (Riccio et al., 2009). Collectively, these observations suggested the existence of alternative coupling mechanisms and prompted several studies based on two-hybrid screens or affinity purification coupled to mass spectrometry (AP-MS) proteomic strategies aimed at characterizing receptor interacting proteins. This review will describe the current knowledge on the 5-HT₆ receptor interactome and its role in receptor signal transduction and associated pathophysiological processes.

2. The 5-HT₆ receptor interactome: one of the most-extensively characterized GPCR interactomes

The Src family non-receptor protein tyrosine kinase Fyn was the first 5-HT₆ receptor interacting protein discovered by the laboratory of Hyewhon Rhim in 2006 thanks to a yeast two-hybrid screen using the receptor's C-terminal domain as bait (Yun et al., 2007). The interaction between full-length Fyn and 5-HT₆ receptor was further demonstrated in transfected cells and rat brain by co-immunoprecipitation.

Using a similar strategy, the same group of investigators then demonstrated an association of the receptor with Jun activation domain-binding protein-1 (Jab1) (Yun et al., 2010), the light chain 1 (LC1) subunit of MAP1B protein (MAP1B-LC1), a microtubule-associated protein highly expressed in the brain (Kim et al., 2014) and, more recently, Neuro-oncological ventral antigen 1 (Nova-1), a neuron-specific RNA binding protein that regulates RNA splicing (Kim et al., 2019) (Table 1). All three proteins were found to co-immunoprecipitate with native receptors expressed in the brain and to interact with the receptor C-terminal domain, suggesting that 5-HT₆ receptors might recruit a number of protein partners in a dynamic manner. Corroborating this hypothesis, AP-MS proteomics screens aimed at identifying 5-HT₆ receptor interacting proteins in a more global manner identified several dozens of putative partners (Duhr et al., 2014; Ha et al., 2015; Meffre et al., 2012). Due to the lack of 5-HT₆ receptor antibody providing immunoprecipitation yields compatible with the identification of co-immunoprecipitated proteins, these studies were based on immunoprecipitation of recombinant, epitope-tagged receptors expressed in cell lines or pull-downs performed with the C-terminal domain or the intracellular loop (i)3 of the receptor as baits, in line with previous work that identified these domains as critical sites for the recruitment of GPCR interacting proteins and their coupling to G proteins, respectively. Globally, they demonstrated that the receptor recruits several proteins of the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) pathway, a network of protein including the Cyclin-dependent kinase (Cdk)5 and some of its regulators and substrates known to control the dynamics of actin cytoskeleton, and Sorting Nexin 14 (SNX14), a member of the sorting nexin family involved in protein sorting and vesicular

Table 1

List of 5-HT₆ receptor interacting proteins identified. For each protein, the Uniprot ID, gene name, method of purification, functional impact of its interaction with 5-HT₆ receptor (whenever available) and reference are indicated.

Protein name	Uniprot ID	Gene name	Identification	Function	Reference
3-ketoacyl-CoA thiolase A	Q921H8	Acaa1a	Pull-down		Duhr et al.
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Q99J99	Mpst	Pull-down		Duhr et al.
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P63038	Hspd1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin related protein 2/3 complex subunit 3	Q9JM76	Arpc3	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin related protein 2/3 complex subunit 4	P59999	Arpc4	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin related protein 2/3 complex subunit 5	Q9CPW4	Arpc5	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Q9D898	Arpc5l	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin-Binding LIM protein 1	E9Q9C7	Ablim1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin, aortic smooth muscle	P62737	Acta2	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Actin, cytoplasmic 2	P63260	Actg1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Aldehyde dehydrogenase X	Q6UB35	Mthfd11	Pull-down		Duhr et al.
Alpha-actinin 4	E9Q2W9	Actn4	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Ankyrin	Q9EP71	Rai14	Co-IP (cilia)		Ha et al.
Amphiphysin	Q7TQF7	Amph	Pull-down		Kohli et al.
AP-2 complex subunit alpha-1	P17426	Ap2a1	Pull-down		Ha et al.
AP-2 complex subunit alpha-2	P17427	Ap2a2	Pull-down		Ha et al.
AP-2 complex subunit beta	Q9DBG3	Ap2b1	Pull-down		Ha et al.
AP-3 complex subunit mu-2	Q8R2R9	Ap3m2	Pull-down		Duhr et al.
Apoptosis inducing factor 1	Q9Z0X1	Aifm1	Pull-down		Duhr et al.
Asparaginyl-tRNA synthetase	Q8BP47	Nars	Pull-down		Duhr et al.
Ataxin-10	P28658	Atxn10	Co-IP		Meffre et al.
Caldesmon 1	Q8VCQ8	Cald1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Calumenin	Q6XLQ8	Calu	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
cAMP dependant protein kinase type 1	Q9DBC7	Prkar1a	Pull-down		Duhr et al.
CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	Q99LM2	Cdk5rap3	Co-IP		Meffre et al.
Clathrin coat assembly protein AP180	Q61548	Snap91	Pull-down		Ha et al.
Clathrin heavy chain 1	Q68FD5	Cltc	Co-IP		Meffre et al.
Coatomer subunit gamma-2	Q9QXK3	Copg2	Co-IP		Meffre et al.
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	Q8CI04	Cog3	Co-IP		Meffre et al.
Coronin 1B	Q9WUM3	Coro1b	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Coronin 1C	Q9WUM4	Coro1c	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 2	Q6ZQ73	Cand2	Co-IP		Meffre et al.
Cyclin-dependent kinase 5	P49615	Cdk5	Co-IP, GST pull-down	Neuronal migration, neurite outgrowth, receptor constitutive activity	Meffre et al., Duhr et al.
Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Q9CQ69	Uqcrc	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
DCC-interacting protein 13-alpha	Q8K3H0	App1	Pull-down		Ha et al.
DnaJ protein homolog 2	P63037	Dnaja1	Pull-down		Duhr et al.
Dynamin-1	P39053	Dnm1	Pull-down		Ha et al.
Dynamin-1-like protein	Q8K1M6	Dnm1l	Pull-down		Ha et al.
Dynamin-2	P39054	Dnm2	Co-IP		Meffre et al.
Dynamin-3	Q8BZ98	Dnm3	Pull-down		Ha et al.
Dynamin-like 120 kDa protein	P58281	Opa1	Pull-down		Duhr et al.
Elongation Factor Tu	Q8BFR5	Tufm	Pull-down		Duhr et al.
Ermin	Q5EBJ4	Ernm	Pull-down		Duhr et al.
Epsin-3	Q91W69	Epn3	Pull-down		Ha et al.
Exocyst complex component 2	Q9D4H1	Exoc2	Co-IP		Meffre et al.
Exportin-4	Q9ESJ0	Xpo4	Co-IP		Meffre et al.
Exportin-T	Q9CRT8	Xpot	Co-IP		Meffre et al.
F-actin-capping protein subunit alpha-1	Q5RKN9	Capza1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Flotilin 1	O08917	Flot1	Pull-down		Duhr et al.
Fyn kinase	P39688	Fyn	Y2H	Receptor trafficking, Erk signaling	Yun et al.
G alpha 11	P21278	Gna11	Pull-down		Duhr et al.
G protein Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 1	Q3UNH4	Gprin1	Pull-down		Duhr et al.
Gamma glutamyl transferase 7	Q99JP7	Ggt7	Pull-down		Duhr et al.
Gelsolin	P13020	Gsn	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Heat shock protein HSP 90-beta	P11499	Hsp90ab1	Pull-down		Ha et al.
Importin-8	Q7TMY7	Ipo8	Co-IP		Meffre et al.
Imprinted and ancient gene protein (IMPACT)	O55091	Impact	Pull-down		Duhr et al.
JAB1(CSN5)	O35864	Cops5	Y2H	Receptor expression, c-jun signaling in the nucleus	Yun et al.
Kelch repeat and BTB domain protein	Q8BNW9	Kbtbd11	Pull-down		Duhr et al.
Leucine-rich repeat flightless interacting protein	E9QN52	Lrrrip2	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
LIM domain and actin-binding protein 1	Q9ERG0	Lima1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	P21174	dnaN	Pull-down		Duhr et al.
Lymphocyte-specific protein 1	A2A6J4	Lsp1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Microtubule associated protein 1B	P14873	Map1b	Y2H	Receptor trafficking, modulation of receptor signaling	Kim et al.
Mitogen-activated protein kinase 1	P63085	Mapk1	Pull-down		Duhr et al.
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase	Q3V3R1	Mthfd11	Co-IP		Meffre et al.
Myosin Light Chain 12A	Q6ZWQ9	Myl12a	Co-IP (cilia)		Kohli et al.

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Protein name	Uniprot ID	Gene name	Identification	Function	Reference
Myosin Light Chain 6B	Q8CI43	Myl6b	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Myosin phosphatase rho-interacting protein	P97434	Mprip	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Myosin regulatory light polypeptide 9	Q9CQ19	Myl9	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
NADP-dependant malic enzyme	Q8BMF3	Me3	Pull-down		Duhr et al.
Neurabin-2	Q6R891	Ppp1r9b	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Neurochondrin	Q9Z0E0	Ncdn	Co-IP		Meffre et al.
Neurofibromin	Q04690	Nf1	Co-IP	Receptor constitutive activity	Meffre et al. Deraredj-Nadim et al.
Nexilin	Q7TPW1	Nexn	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Obg-like ATPase 1	Q9CZ30	Ola1	Pull-down		Duhr et al.
Paralemmalin	Q9Z0P4	Palm	Pull-down		Duhr et al.
pericentriolar material 1 protein	Q9R0L6	Pcm1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (vps34)	Q6PF93	Pik3c3	Co-IP		Meffre et al.
Phosphomannomutase 1	O35621	Pmm1	Pull-down		Duhr et al.
Phostensin	Q8BQ30	Ppp1r18	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Poly(Rc)-binding protein 1	P60335	Pcbp1	Pull-down		Duhr et al.
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	F8WHR6	Ddx46	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Protein flightless 1 homolog	Q9JJ28	Flii	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1	Q9DBR7	Ppp1r12a	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Protein phosphatase 1A/PP2C alpha	P49443	Ppm1a	Pull-down		Duhr et al.
Protein phosphatase PTC7 homolog/TA-PP2C	Q6NVE9	Pptc7	Pull-down		Duhr et al.
Protein prune homolog	Q8BIW1	Prune1	Pull-down		Duhr et al.
Protein Rheb	Q540E6	Rheb	Pull-down	mTOR signaling	Duhr et al. Meffre et al.
Protein-arginine deiminase type-2	Q08642	Padi2	Pull-down		Duhr et al.
Putative adenosylhomocysteinase 2	Q80SW1	Ahcyl1	Pull-down		Duhr et al.
Ragulator complex protein LAMTOR1	Q9CQ22	Lamtor1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Ran-binding protein 6	Q8BIV3	Ranbp6	Co-IP		Meffre et al.
Regulatory-associated protein of mTOR	Q8K4Q0	Rptor	Co-IP		Meffre et al.
Reticulocalbin-2	Q8BP92	Rcn2	Pull-down		Duhr et al.
RNA Binding Protein Nova-1	Q9JKN6	Nova1	Y2H	Splicing activity of Nova-1, receptor expression	Kim et al.
Serine protein kinase ATM	Q62388	Atm	Co-IP		Meffre et al.
Serine/threonine-protein kinase ATR	Q9JKK8	Atr	Co-IP		Meffre et al.
Serine/threonine-protein kinase mTOR	Q9JLN9	Mtor	Co-IP	Cognition	Meffre et al.
Serine/threonine-protein kinase SMG1	Q8BKX6	Smg1	Co-IP		Meffre et al.
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	Q67MZ3	STH1965	Pull-down		Duhr et al.
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	Q61151	Ppp2r5e	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	P62141	Ppp1cb	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Sorting-Nexin-14	Q8BHY8	Snx14	Pull-down	Receptor trafficking and signal transduction	Ha et al.
Src substrate cortactin	Q60598	Cttn	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Succinate dehydrogenase (ubiquinone) Flavoprotein subunit, mitochondrial	Q8K2B3	Sdha	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Supervillin	Q8K4L3	Svil	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Synaptic vesicle membrane protein 1	Q62465	Vat1	Pull-down		Duhr et al.
TELO2-interacting protein 1 homolog	Q91V83	Tti1	Co-IP		Meffre et al.
Telomere length regulation protein TEL2 homolog	Q9DC40	Telo2	Co-IP		Meffre et al.
Thioredoxin-like protein 1	Q8CDN6	Txn1l	Pull-down		Duhr et al.
Transportin-1	Q8BFY9	Tnpo1	Co-IP		Meffre et al.
Tropomodulin-3	Q9JHJ0	Tmod3	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Tropomyosin 3 related sequence 7	D3Z2H9	Tpm3-rs7	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Tropomyosin alpha-1 chain	P58771	Tpm1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Tropomyosin alpha-3 chain	E9Q7Q3	Tpm3	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Tropomyosin alpha-4 chain	Q6IRU2	Tpm4	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Tropomyosin beta chain	P58774	Tpm2	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Tubulin-specific chaperone D	Q8BYA0	Tbcd	Co-IP		Meffre et al.
Unconventional myosin-VI	E9Q175	Myo6	Co-IP (cilia)		Kohli et al.
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Q9EQH3	Vps35	Pull-down		Ha et al.
Vesicle sortin protein 26B	Q8C0E2	Vps26b	Pull-down		Duhr et al.
Vesicle-fusing ATPase	P46460	Nsf	Co-IP		Meffre et al.
WASP family protein number 1	Q8R5H6	Wasf1	Pull-down		Duhr et al.
WD repeat-containing protein 1	O88342	Wdr1	Co-IP (cilia)		Kohli et al.

trafficking (Duhr et al., 2014; Ha et al., 2015; Meffre et al., 2012).

Soon after its cloning, the 5-HT₆ receptor was found in cilia-like processes by electron microscopy and peroxidase staining (Brailov et al., 2000; Hamon et al., 1999). Further studies confirmed ciliary localization of endogenously expressed receptors and their co-localization with adenylyl cyclase 3 (AC3), a specific marker of the primary cilium (Brodsky et al., 2017). Nevertheless, the precise characterization

of ciliary vs. extraciliary localization of 5-HT₆ receptors has so far been hampered by the lack of antibodies allowing detection of low amounts of endogenous receptor and the fact that expression of recombinant receptors leads to ectopic localization outside the primary cilia (Lesiak et al., 2018). This issue was addressed by the generation of knock-in mice expressing GFP-tagged 5-HT₆ receptor (5-HT₆-GFP mice) (Deraredj Nadim et al., 2016). As shown on Fig. 1, GFP immunostaining

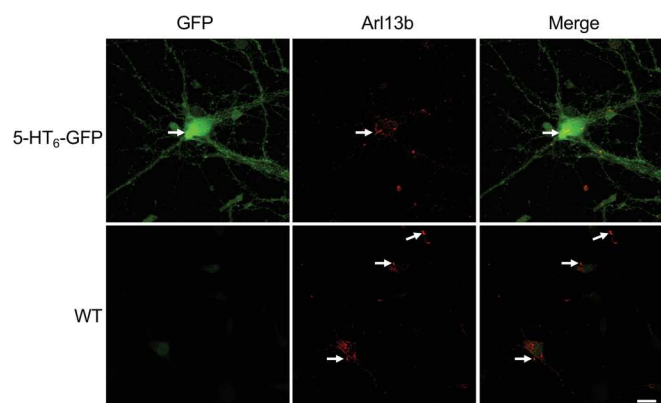


Fig. 1. Subcellular localization of 5-HT₆ receptor in neurons. Double immunofluorescence staining of GFP (green) and the ciliary protein Arl13b (red) in primary cultured hippocampal neurons from 5-HT₆-GFP mouse embryos shows the presence of the 5-HT₆ receptor in the primary cilium where it is co-localized with Arl13b, and a more discrete expression in other neuronal compartments including the cell body, dendrites and spines. Original confocal images are illustrated. The white arrows point to primary cilia. Scale bar: 20 μ m.

of hippocampal neurons from 5-HT₆-GFP mice not only confirmed the predominant expression of the 5-HT₆ receptor in the primary cilium where it is co-localized with the cilium marker Arl13b, but also revealed a substantial receptor expression in the soma, dendrites and dendritic spines, indicative of both ciliary and extraciliary localizations of endogenously expressed receptors. The ciliary localization of the 5-HT₆ receptor depends on a five amino-acid sequence located in the third intracellular loop (i3) of the receptor which, when recognized by specialized sorting complexes, allows for the crossing of the preciliary barrier (Berbari et al., 2008; Nachury et al., 2010). However, mutation of this motif only partially prevented the receptor's ciliary localization, suggesting a more complex regulation of its trafficking (Brodsky et al., 2017).

In a recent study, Kohli et al. took advantage of the predominant localization of the 5-HT₆ receptor in the membrane of the primary cilium to target APEX2, an enzyme that induces the biotinylation of

proteins within a radius of 20 nm in the presence of biotin-phenol, to cilia membrane in order to identify ciliary membrane-associated proteins following their affinity purification on streptavidin beads (Kohli et al., 2017). They also stably expressed a 5-HT₆-APEX-GFP construct in a ciliated cell line and immunoprecipitated the receptor with a GFP antibody in order to characterize the 5-HT₆ receptor interactome specifically in the primary cilium. Most of the proteins identified in this study were actin-binding proteins and differed from the previously identified 5-HT₆ receptor partners, suggesting that the receptor associates with different sets of proteins depending on its localization in primary cilia vs. other cell compartments. Intriguingly, the number of common proteins identified in the different proteomic screens is rather limited. This might result from the non-exhaustive identification of affinity-purified proteins in one study (Ha et al., 2015) and the different cell models (HEK-293 and NIH3T3) and approaches (co-IP vs. *in vitro* pull-down assays) used in the other ones (Duhr et al., 2014; Kohli et al., 2017; Meffre et al., 2012). The generation of knock-in mice expressing GFP-tagged 5-HT₆ receptor (Deraredj Nadim et al., 2016) will certainly provide a unique opportunity to directly identify receptor partners in an authentic context and at various development stages.

Collectively, previously published studies of the 5-HT₆ receptor interactome identified 125 putative receptor partners (Table 1). Analysis of Gene Ontology (GO) terms overrepresented in this comprehensive dataset to determine the major biological processes and functions within the 5-HT₆ receptor interactome revealed an overrepresentation of proteins related to “actin cytoskeleton organization” (46 proteins), “post-synapse organization” (37 proteins), “TOR signaling” (32 proteins), “receptor-mediated endocytosis” (30 proteins), “regulation of endocytosis” (17 proteins) and “lamellipodium organization” (Fig. 2, Tables 1 and 2). Other overrepresented GO terms are “regulation of phosphoprotein phosphatase activity”, “regulation of nucleocytoplasmic transport”, “regulation of terminal button organization” and “Rac protein signal transduction”. Though a limited number of interactions have so far been functionally validated (see Table 1), studies indicate a critical influence of some interacting proteins upon the 5-HT₆ receptor trafficking and plasma membrane localization and, accordingly, efficacy of signal transduction, while other partners stabilize the receptor in active conformations able to transduce signals in absence of agonist, as it will be described in the next chapter.

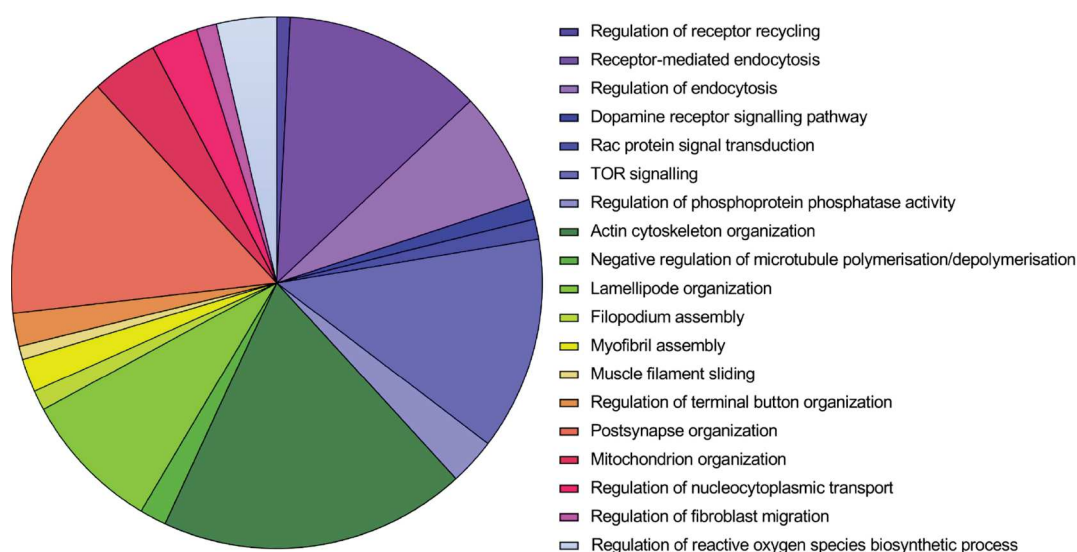


Fig. 2. Pie chart representing the percentage of genes encoding proteins of the 5-HT₆ receptor interactome belonging to each indicated functional group. Percentage values and gene names are shown in Table 2. Functional categories overrepresented in the 5-HT₆ receptor interactome were assessed using the Cytoscape's ClueGo plugin (version 2.5.4) (Bindea et al., 2009). Genes were grouped according to their Biological Function Gene Ontology (GO), using all evidence except those Inferred from Electronic Annotation (IEA), and using the latest version of the Uniprot GOA database (06/26/2019). Functional groups were determined based on Kappa score level (≥ 0.3), as previously described (Bindea et al., 2009). For each overlapping group, only the most significant term is represented.

Table 2

Genes encoding proteins of the 5-HT₆ receptor interactome retrieved in overrepresented GO categories. For each GO category, the number of genes, the % of genes (total number of unique proteins identified in the 5-HT₆ receptor interactome: 125) and the names of the genes corresponding to the GO term are indicated.

GO	GO term	Gene number	% of genes	Gene names
GO:0007212	dopamine receptor signaling pathway	3	2.4	Gna11, Palm, Vps35
GO:0001919	regulation of receptor recycling	2	1.6	Lamtor1, Nsf
GO:0010762	regulation of fibroblast migration	3	2.4	Acta2, Appl1, Coro1c
GO:0016601	Rac protein signal transduction	3	2.4	Dnm2, Nfl, Wasf1
GO:0030049	muscle filament sliding	2	1.6	Myl6b, Tpm1
GO:0030239	myofibril assembly	5	4	Actg1, Dnm1l, Prkar1a, Tmod3, Wdr1
GO:0046847	filopodium assembly	3	2.4	Dnm3, Palm, Ppp1r9b
GO:0031111	negative regulation of microtubule polymerization or depolymerization	4	3.2	Map1b, Wasf1, Tbcd, Prune1
GO:0043666	regulation of phosphoprotein phosphatase activity	7	5.6	Hsp90ab1, Mrip1, Ppp1r12a, Ppp1r9b, Ppp2r5e, Wdr1, Mtor
GO:0046822	regulation of nucleocytoplasmic transport	7	5.6	Cdk5, Mapk1, Nfl, Ppm1a, Ppp1r12a, Xpo4, Map1b
GO:2000331	regulation of terminal button organization	5	4	Dnm1l, Vps35, Snap91, Wdr1, Dnm2
GO:0030036	actin cytoskeleton organization	46	36.8	Actg1, Actn4, Arpc3, Arpc4, Arpc5, Arpc5l, Atr, Cald1, Capza1, Cdk5, Coro1b, Coro1c, Ctnn, Dnaja1, Dnm1l, Ermn, Flii, Gsn, Lima1, Mtor, Nfl, Ppp1r9b, Prkar1a, Tmod3, Tpm1, Tpm2, Tpm3, Tpm3-rs7, Tpm4, Wasf1, Wdr1, Dnm2, Hsp90ab1, Map1b, Rptor, Nsf, Snx14, Atm, Impact, Ppm1a, Prune1, Snap91, Tbcd, Vps35, Ablim, Opa1
GO:1903426	regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	9	7.2	Dnm2, Fyn, Hsp90ab1, Hspd1, Mtor, Coro1b, Lsp1, Cdk5, Lrrfip2
GO:0051646	mitochondrion localization	10	8	Dnm1l, Map1b, Opa1, Wasf1, Wdr1, Ap3m2, Copg2, Ctnn, Snap91, Tbcd
GO:0030100	regulation of endocytosis	17	13.6	Actn4, Ap2a1, Appl1, Dnm1, Dnm1l, Dnm2, Flot1, Nsf, Snap91, Wdr1, Coro1c, Nfl, Tbcd, Palm, Coro1b, Mtor, Cdk5
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	30	24	Ap2a1, Ap2a2, Ap2b1, Cltc, Ctnn, Dnm1, Dnm1l, Dnm2, Dnm3, Flot1, Myo6, Nsf, Snap91, Wasf1, Wdr1, Actg1, Cdk5, Fyn, Opa1, Rheb, Vps35, Actn4, Ap3m2, Snap91, lamtor1, Appl1, Amph, Palm, Mtor, Ppp1cb
GO:0097581	lamellipodium organization	21	16.8	Ablim1, Arpc5, Coro1b, Coro1c, Ctnn, Dnm2, Mtor, Wasf1, Cdk5, Mapk1, Ppp1r9b, Fyn, Hsp90ab1, Hspd1, Lamtor, Rptor, Mthfd1l, Ablim1, Impact, Actn4, Dnaja1
GO:0031929	TOR signaling	32	25.6	Atm, Lamtor1, Mtor, Rheb, Rptor, Telo2, Tti1, Ppp1r9b, Cdk5, Dnm2, Mapk1, Fyn, Hspd1, Lamtor, Ap2a1, Cltc, Ppp1cb, Dnm1l, Opa1, Nfl, Wdr1, Mrip1, Dnaja1, Dnm3, Aifm1, Cdk5rap3, Pik3c3, Atr, Smg1, Hsp90ab1, Myo6, Gsn
GO:0099173	postsynapse organization	37	29.6	Cdk5, Ctnn, Dnm1l, Dnm3, Fyn, Opa1, Vps35, Mtor, Ppp1r9b, Dnm2, Mapk1, Map1b, Nfl, Coro1c, Wdr1, Coro1b, Palm, Rheb, Aifm1, Atm, Hsp90ab1, Hspd1, lamtor, Rptor, Ppm1a, Ppp1r12a, Xpo4, Dnaja1, Actg1, Wasf1, Vat1, Ap3m2, Copg2, Myo6, Snap91, Pptc7, Dnaja1

3. From the modulation of canonical pathways to the engagement of novel signaling pathways

3.1. Modulation of canonical pathways

Association of the 5-HT₆ receptor with Fyn, or Jab1 or Map1B-LC1 increases receptor expression at the plasma membrane likely by preventing its internalization (Kim et al., 2014; Yun et al., 2007, 2010) (Fig. 3A and B), whereas receptor interaction with SNX14 and Nova-1 promotes its endocytosis and degradation (Ha et al., 2015; Kim et al., 2019) (Fig. 3C and D). Given the large number of receptor interacting proteins identified in the different interactomics screens that exhibit “receptor endocytosis and recycling” or “regulation of endocytosis” GO annotations (Table 1), it is likely that additional partners control receptor plasma membrane expression and stability.

Corroborating their contrasting effects upon receptor trafficking, Fyn, Jab1 and Map1B-LC1 enhance receptor coupling to G proteins and signal transduction (Kim et al., 2014; Yun et al., 2007, 2010), whereas Nova-1 and SNX14 behave as negative regulators of receptor-operated signaling pathways (Ha et al., 2015; Kim et al., 2019). SNX14 is also able to bind to Gas proteins via its putative RGS binding domain, thus inhibiting receptor-operated Gs signaling (Fig. 3D). SNX14 might thus negatively regulate 5-HT₆ receptor signaling by promoting both endocytic receptor degradation and Gas sequestration (Ha et al., 2015).

The data also indicate that some of the identified interactions not only regulate the receptor functional activity but also affect the function of the partners. 5-HT₆ receptor activation promotes Fyn phosphorylation on Tyr⁴⁰¹ and Erk1,2 MAP kinase activation through a

mechanism dependent of both Fyn activation and 5-HT₆ receptor/Fyn interaction (Yun et al., 2007) (Fig. 3A). 5-HT₆ receptor stimulation reduces its interaction with Jab1. This leads to Jab1 translocation to the nucleus and its association with c-Jun, thus stimulating the binding of c-Jun and Jun D to AP-1 sites and their transcription factor activity (Yun et al., 2010) (Fig. 3B). These findings suggest that 5-HT₆ receptors can regulate gene expression via Jab1. A more recent study showed that 5-HT₆ receptor expression as well as the activation of the Jab1/phospho-c-jun pathway are increased in a rat model of status epilepticus induced by pilocarpine injection (Liu et al., 2019). Treatment of the epileptic rats with the 5-HT₆ receptor antagonist SB271046 normalized the Jab1/phospho-c-jun pathway activity, reduced the frequency of spontaneous recurrent seizures and reversed the associated learning and memory impairments (Liu et al., 2019). This strongly suggests an important role of the Jab1/phospho-c-jun pathway, under the control of 5-HT₆ receptors, in status epilepticus.

Over-expression of the 5-HT₆ receptor promotes Nova-1 translocation from the nucleus to the cytosol and thus inhibits its splicing activity (Kim et al., 2019) (Fig. 3C). Again, this effect is likely mediated by the physical interaction between 5-HT₆ receptor and Nova-1, as expression of a truncated version of the receptor deleted of the C-terminal domain did not affect Nova-1 localization and splicing activity.

3.2. Constitutive activity

An important feature of the 5-HT₆ receptor is its high level of constitutive activity at Gs signaling, which was first established for recombinant receptors expressed in cell lines (Kohen et al., 2001) and

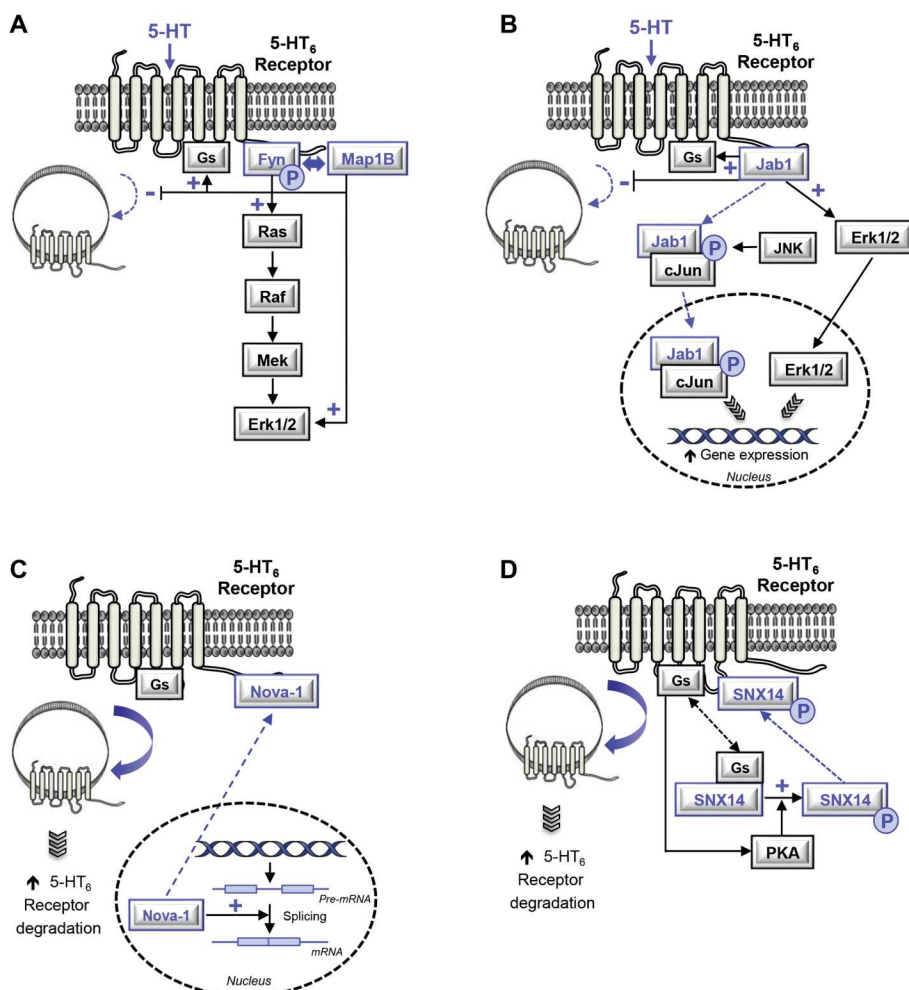


Fig. 3. Regulation of 5-HT₆ receptor trafficking and signaling by interacting proteins. **A.** The association of the 5-HT₆ receptor with the Fyn kinase and MAP1B inhibits receptor internalization, thus enhancing receptor-operated signaling (Gs and Erk1,2 pathways). Association of the receptor with Fyn is essential for receptor-dependent Erk12 activation. Fyn can phosphorylate MAP1B but whether both proteins concomitantly interact with the receptor and whether they affect each other's interaction with the receptor remain to be established. **B.** The association of the 5-HT₆ receptor with Jab1 also inhibits receptor internalization. 5-HT₆ receptor activation leads to the disruption of the 5-HT₆ receptor-Jab1 complex and association of Jab1 with phosphorylated cJun. The Jab1-phospho-cJun complex is then translocated to the nucleus where it enhances gene expression. **C.** The 5-HT₆ receptor interacts with the brain-enriched splicing regulator Nova-1. Nova-1 is translocated to the cytoplasm and associates with the 5-HT₆ receptor C-terminus when the receptor is over-expressed, thus reducing its splicing activity. Conversely, Nova-1 increases the internalization and degradation of the receptor by the proteasome. **D.** The association of the 5-HT₆ receptor with Sorting nexin 14 (SNX14) negatively regulates receptor-mediated signaling by i) promoting receptor internalization and degradation and ii) sequestering Gs. Phosphorylation of SNX14 by PKA induces the release of Gs. The non-phosphorylated SNX14 is then translocated to the membrane where it binds to the i3 loop of the receptor. In A-D., the receptor's partners are represented in blue and the dotted lines indicate the translocation of proteins.

then for native receptors in primary cultured neurons and the mouse brain (Deraredj Nadim et al., 2016). In light of previous findings indicating a possible influence of GPCR interacting proteins on their constitutive activity (Ango et al., 2001; Bockaert et al., 2010b), Deraredj-Nadim et al. focused on the role of receptor interaction with Neurofibromin, a Ras GTPase-activating protein (Ras-GAP) encoded by the tumor suppressor gene *NF1* known to be involved in adenylyl cyclase activation by various GPCRs (Deraredj Nadim et al., 2016). Mutations in the *NF1* gene are responsible for Neurofibromatosis type 1 (NF1), a genetic disorder characterized by skin pigmentation, benign skin tumors called neurofibromas, low-grade tumors of the central and peripheral nervous systems and, in some patients, learning and attention deficits (Trovo-Marqui and Tajara, 2006). Silencing Neurofibromin expression in HeLa cells and primary striatal neurons strongly reduced 5-HT₆ receptor constitutive activity at Gs signaling (Deraredj Nadim et al., 2016). Likewise, the level of receptor's constitutive activity (assessed by measuring phosphorylated CREB and cAMP levels) was strongly reduced in the brain of *Nf1* heterozygous mice (*Nf1*^{+/-}, NF1 model), compared to WT mice. Furthermore, treatment of brain micro-discs from *Nf1*^{+/-} mice with SB271046, a 5-HT₆ receptor inverse agonist, did not further decrease this reduced cAMP level, whereas this compound did inhibit basal cAMP formation in micro-discs from WT mice brain. Finally, agonist-independent activation of the receptor in cultured cells was strongly reduced by an interfering peptide corresponding to the 22 C-terminal amino acid residues of the receptor that disrupts 5-HT₆ receptor/Neurofibromin interaction or by *NF1* mutations identified in NF1 patients that are located in Neurofibromin PH domain and affect its recruitment by the receptor (Deraredj Nadim et al., 2016). Collectively, these findings demonstrate a key influence of the 5-HT₆ receptor/Neurofibromin physical interaction on the constitutive activity of the receptor.

Another process that may influence 5-HT₆ receptor constitutive activity is its localization in the primary cilium. Primary cilia are microtubule-based structures found on almost every cell type (Wheatley et al., 1996). They are dynamic structures that can assemble, disassemble and reassemble in the cells, depending on the cell cycle (Lepanto et al., 2016a, 2016b). They have numerous specialized roles, including light or odor sensing, which are defined by the identity of the receptors and signaling proteins they contain. Disruption in cilia

function through the mutations of genes involved in their formation or function are linked to diseases termed ciliopathies (Reiter and Leroux, 2017). Though the 5-HT₆ receptor is the only serotonin receptor targeted to the cilium and its ciliary localization has been known for two decades, little is known about the role of its targeting to the cilia. In an elegant series of experiments based on the use of a biosensor allowing a direct visualization of changes in cAMP concentration in the primary cilium in combination with strategies to discriminate cAMP signal in the cilium and the cell body, Jiang et al. recently demonstrated that 5-HT₆ receptors expressed in the ciliary membrane display a reduced level of constitutive activity, when compared to receptors located outside the cilium (Jiang et al., 2019). These findings together with the demonstration that native receptors exhibit constitutive activity strongly support that part of endogenously expressed receptors are located outside the cilium. The mechanism whereby 5-HT₆ receptor constitutive activity is abolished in the cilium remains to be fully elucidated. Treatment of cells harboring ciliary localization of 5-HT₆ receptors with an agonist of smoothened receptors to activate the Hedgehog (Hh) signaling pathway restored receptor constitutive activity (Jiang et al., 2019), suggesting that the absence of Hh signaling might affect receptor coupling to Gs, or the ciliary expression of G protein subunits or signaling molecules such as adenylyl cyclase. Other explanations for the reduced constitutive activity of 5-HT₆ receptors in the primary cilium include the distinct lipid composition of the ciliary membrane, which may impair its ligand-independent activation or the absence of receptor partners essential for constitutive activity. Notably, Neurofibromin was not identified in the proteomic screen assessing partners of receptors specifically localized in the cilia (Kohli et al., 2017). This suggests that the disruption of 5-HT₆ receptor/Neurofibromin interaction in the cilia might be one of the causes of the absence of constitutively active receptors in this compartment.

3.3. Engagement of novel signaling pathways

3.3.1. mTOR pathway

As shown in Fig. 4 and Table 2, the 5-HT₆ interactome shows a remarkable enrichment in proteins of mTOR signaling pathway (25% of identified proteins are encoded by genes with the “TOR signaling” GO annotation). These include mTOR itself and Raptor, another component

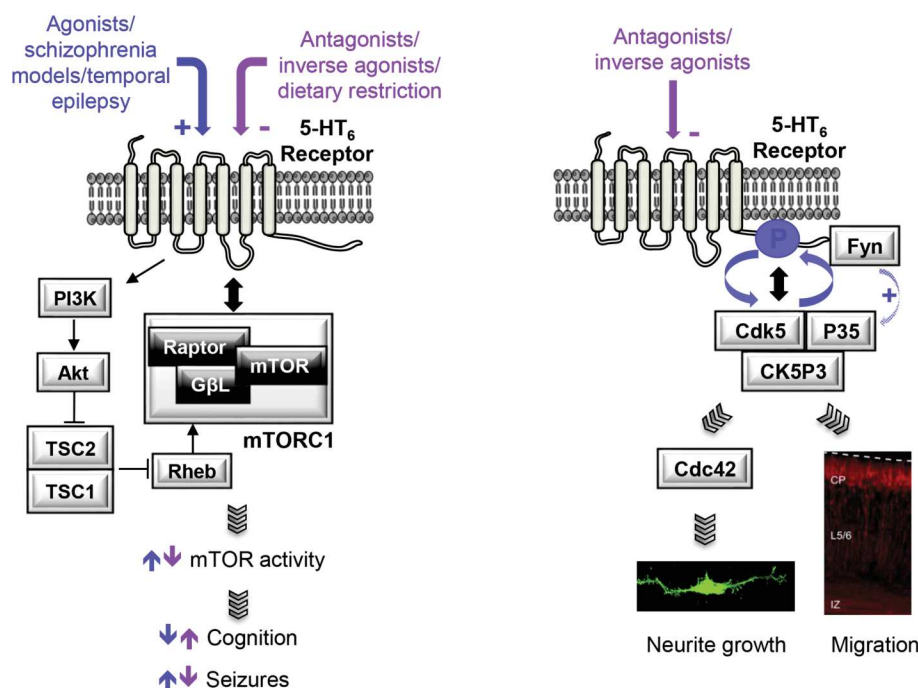


Fig. 4. Engagement of mTOR and Cdk5 signaling pathways by the 5-HT₆ receptor. *Left panel:* The 5-HT₆ receptor recruits mTORC1 and stimulates mTOR through a dual mechanism implicating the canonical PI3K/Akt/Tsc1,2/Rheb pathway and a physical interaction between 5-HT₆ receptor and mTOR. A non-physiological mTOR activation, under the control of 5-HT₆ receptors, compromises cognition in neurodevelopmental models of schizophrenia and contributes to epileptogenesis. Correspondingly, blockade of 5-HT₆ receptor-elicited mTOR activation or food deprivation increases cognitive performances. 5-HT₆ receptor inhibition also increases seizure latency and decreases their severity in temporal lobe epilepsy. *Right panel:* The 5-HT₆ receptor interacts with Cdk5 and activates Cdk5 signaling in an agonist-independent manner via a mechanism involving receptor phosphorylation on Ser³⁵⁰ by Cdk5 bound to the receptor. The 5-HT₆ receptor also recruits and activates the non-receptor tyrosine kinase Fyn, which can contribute to 5-HT₆ receptor-operated Cdk5 activation through the induction of expression of the Cdk5 activator p35. Agonist-independent activation of Cdk5 by the 5-HT₆ receptor plays a key role in the migration of cortical neurons and the initiation of neurite growth.

of the mTOR complex 1 (mTORC1). These findings suggested a potential engagement of mTORC1 signaling upon 5-HT₆ receptor stimulation that was further established in both cell lines expressing recombinant receptors and rodent brain, especially in the prefrontal cortex and the striatum, following peripheral administration of a 5-HT₆ receptor agonist (Meffre et al., 2012). Receptor-dependent activation of the mTOR pathway was inhibited by pharmacological inhibitors of PI3K or the expression of a dominant-negative Ras homolog enriched in brain (Rheb) mutant, indicating that it involves the canonical PI3K/Akt/Rheb pathway implicated in mTOR activation by growth factor receptors (Fig. 4). Furthermore, it required a physical interaction between the receptor's C-terminal domain and mTOR (Meffre et al., 2012). Interestingly, receptor-operated mTOR activation not only occurs in response to the administration of an agonist, but also in specific pathophysiological conditions. In two neuro-developmental models of schizophrenia, rats treated with the NMDA receptor antagonist phencyclidine (PCP) at the neonatal stage and rats reared in isolation after weaning, a non-physiological mTOR activation was measured specifically in prefrontal cortex, whereas mTOR was not affected in striatal neurons (Meffre et al., 2012). Moreover, administration of a 5-HT₆ receptor antagonist at the adult stage normalized prefrontal mTOR activity level in both models, indicating that it depends on a sustained activation of 5-HT₆ receptors. Likewise, an increased mTOR activity was measured in the hippocampus and cortex of rats treated with pilocarpine, a model of temporal epilepsy (TLE), which correlated with an increase in 5-HT₆ receptor expression (Wang et al., 2015). An enhanced expression of the 5-HT₆ receptor was likewise found in the temporal cortex of TLE patients (Wang et al., 2015). Furthermore, pre-treatment of pilocarpine-treated rats with the specific 5-HT₆ receptor antagonist SB399885 prevented both the increase in 5-HT₆ receptor expression and mTOR activation in the hippocampus measured after pilocarpine-induced seizures, suggesting a key influence of 5-HT₆ receptors in the overactivation of mTOR occurring in TLE (Wang et al., 2015). Conversely, chronic (8 weeks) dietary restriction (DR) in the mouse induces a decrease in 5-HT₆ receptor expression in the hippocampus and the prefrontal cortex and, correspondingly, a decrease in mTOR activity in these brain areas, compared with mice that received a normal diet (Teng et al., 2019). Further supporting the critical role of 5-HT₆ receptors in the maintenance of a basal level of mTOR activity in the brain of mice fed *ad libitum*, mTOR activation level was strongly reduced in the hippocampus of 5-HT₆ receptor knock-out mice (5-HT₆^{-/-} mice), compared to wild type (WT) mice, and chronic dietary restriction did not further decrease this reduced mTOR activity level.

3.3.2. Cdk5 pathway

Among the signaling proteins recruited by the 5-HT₆ receptor C-terminal domain, Cdk5 also raised particular attention given its common influence with the receptor upon neuro-developmental processes such as migration (Dayer et al., 2015; Lalioti et al., 2010). Interaction between the full-length receptor and Cdk5 was first validated by co-immunoprecipitation and BRET (Duhr et al., 2014). These experiments showed that 5-HT₆ receptors bind to Cdk5 in an agonist-independent manner but that the interaction is disrupted upon treatment of cells by a 5-HT₆ receptor antagonist. Further experiments showed that Cdk5 bound to the receptor was active and that this activity was inhibited by treatment of cells with an antagonist, which thus behaved as an inverse agonist at Cdk5 signaling. Interesting, a Ser residue closed to Cdk5-binding site in the receptor C-terminal domain (Ser³⁵⁰) was identified as a substrate of Cdk5 bound to the receptor. Furthermore, Ser³⁵⁰ phosphorylation was found to be essential to receptor-mediated activation of Cdk5 signaling (Duhr et al., 2014). Collectively, these findings suggest a reciprocal interplay between the 5-HT₆ receptor and associated Cdk5 whereby Cdk5 phosphorylates the Ser³⁵⁰ residue, a process allowing agonist-independent activation of Cdk5 by the receptor. They provide the first demonstration of constitutive activity of a GPCR that depends on its phosphorylation by an associated protein

kinase. They also indicate that 5-HT₆ receptors not only constitutively activate the canonical Gs-adenylyl cyclase pathway, but also additional, Gs-independent, pathways.

4. Neurodevelopmental roles of the 5-HT₆ receptor interactome

Neurodevelopment is achieved through a succession of tightly regulated processes. Stem cells give birth to neuroblasts, which will migrate to reach their final position. They will then start emitting neurites, which will differentiate to form an axon and multiple dendrites. Finally, the morphogenesis of dendritic spines will allow for the network to become connected. Understanding these processes has become a major challenge, as any alteration affecting them could result in neurodevelopmental diseases, such as schizophrenia or autism spectrum disorder (ASD). Serotonin has long been known to play key roles in neurodevelopment (Gaspar et al., 2003), and more recently an emphasis has been put on the 5-HT₆ receptor (Dayer et al., 2015; Vitalis et al., 2013). This receptor is expressed very early in development, and unlike other serotonin receptors, it is almost exclusively expressed in the central nervous system. Several studies have shown that the receptor and likely some of its protein partners are involved in every neurodevelopmental step. The role of the receptor in neural circuit formation has been reviewed elsewhere (Dayer et al., 2015). Here, we will focus on the roles of the receptor and its protein partners, with a special emphasis on newly discovered ciliary functions of the receptor.

4.1. Neurogenesis

The level of serotonin in the brain during development has to be precisely regulated, as both an excess or a lack of serotonin have deleterious effects on the proliferation of neural progenitors. For example, depleting serotonin in embryonic mice through genetic or pharmacological approaches results in smaller brain size, suggesting that proliferation is reduced (Vitalis et al., 2013). On the other hand, knock-out mice for the monoamine oxidases MAOA and B, which are involved in the degradation of serotonin, present an excess of serotonin but also show a reduced proliferation of neuronal stem cells (Cheng et al., 2010), which indicates that there is likely a balance point in the concentration of serotonin that has to be maintained for normal brain development. Pointing to a role of the 5-HT₆ receptor in this process, the effects of excess serotonin can be reversed by the inhibition of the 5-HT₆ receptor function, using either specific antagonists or siRNA (Wang et al., 2014), through the restoration of the activation of caspase 3 and 9, reinstating normal apoptotic activity in the developing brain. This suggests that the 5-HT₆ receptor is coupled to anti-apoptotic signaling pathways. Interestingly, Jab1, one of the receptor interacting proteins identified by a yeast two-hybrid screen (Yun et al., 2010), is a component of the Constitutive Photomorphogenic-9 (COP9) signalosome, which can regulate multiple intracellular signaling pathways (Chamovitz and Segal, 2001), including cell protection against apoptosis. The anti-apoptotic effects of serotonin might thus be mediated, at least in part, by the 5-HT₆ receptor, *via* Jab1 activation.

4.2. Neuronal migration

Serotonin plays an important role in neuronal migration. As for neurogenesis, the impact of serotonin seems to be tightly dependent of its concentration. Serotonin transporter (SERT) knock-out mice, which present high serotonin levels, also display an abnormal distribution of pyramidal neurons in the cortex (Frazer et al., 2015; Riccio et al., 2009; Vitalis et al., 2013). Lowering the serotonin concentration, either pharmacologically or genetically, also results in mispositioning of cortical neurons (Vitalis et al., 2007; Vitalis and Parnavelas, 2003). It has been shown that a low concentration of serotonin (5 μM) can accelerate the migration of neurons from cortical explants, whereas a high concentration (100 μM) slows down the migration of both cortical

GABAergic interneurons and pyramidal neurons (Durig and Hornung, 2000). This suggests that a tight regulation of the serotonin level is necessary for correct positioning of cortical neurons. The involvement of the 5-HT₆ receptor has been demonstrated by showing first that this receptor is expressed in these neurons at that developmental stage, and that EMD386088, a specific agonist of the receptor, fully recapitulates the effect of serotonin on migration (Riccio et al., 2009, 2011; Vitalis and Parnavelas, 2003). Furthermore, delivery of a specific antagonist of the receptor (SB258585) or inhibiting receptor-mediated Gs signaling by treatment with either a PKA inhibitor or a non-hydrolysable analogue of cAMP, reversed the effects of serotonin on migration (Riccio et al., 2009).

Independent of the effect of serotonin, the 5-HT₆ receptor has also been shown to control neuronal migration through a Cdk5-dependent pathway (Jacobshagen et al., 2014). The data show that reducing 5-HT₆ receptor expression or inhibiting the Cdk5 kinase activity results in mispositioning of cortical pyramidal neurons, due to both an inability of the neurons to switch from a multipolar to bipolar morphology and a defect in locomotion. The role of Cdk5 in the multipolar to bipolar transition is well documented (Ohshima et al., 2007a), but this study was the first to demonstrate a link with serotonin and the 5-HT₆ receptor.

It is also interesting to note that in addition to Cdk5, the interactome of the 5-HT₆ receptor includes the Fyn tyrosine kinase (Yun et al., 2007), and several proteins of the mTORC1 pathway (Meffre et al., 2012). These proteins can affect the reelin-dab1 signaling pathway, which controls the precise positioning of neurons (Beffert et al., 2004; Moon et al., 2015; Ohshima et al., 2007a, 2007b; Ohshima and Mikoshiba, 2002). As already described, Fyn kinase activity is promoted by the activation of the 5-HT₆ receptor (Yun et al., 2007). However, the exact role of receptor-elicited Fyn signaling in migration remains to be established. The mTORC1 pathway is known to have a role in neuronal migration, dendritic tree formation and dendritic spine morphogenesis (Takei and Nawa, 2014). Deregulation of this pathway results in numerous neurodevelopmental disorders, including some rare genetic forms of ASD, Rett and Down syndromes (Bockaert and Marin, 2015). The impact of the 5-HT₆ receptor-mediated mTOR activation in migration also remains to be elucidated.

4.3. Neurite growth

Once a neuroblast has reached its final destination, it will start emitting neurites, which will eventually form dendrites and the axon of the mature neuron. Depleting serotonin levels alters the length and complexity of dendrites in different areas of the cortex (Durig and Hornung, 2000; Feria-Velasco et al., 2002; Gonzalez-Burgos et al., 1996; Riccio et al., 2009, 2011; Vitalis et al., 2007) and in the hippocampus (Alves et al., 2002). A role for the 5-HT₆ receptor-Cdk5 complex in neurite growth has been demonstrated in various models including the NG108-15 neuroblastoma cell line, primary neuronal culture and mouse brain explants (Duhr et al., 2014). Of note, the 5-HT₆ receptor interactome also contains the G Protein-Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 1 (GPRIN1). GPRIN1 is a protein highly and specifically expressed in the brain, which selectively binds to activated G proteins and promotes neurite extension (Ge et al., 2009; Iida and Kozasa, 2004; Nordman and Kabbani, 2012). Whether GPRIN1 association with the 5-HT₆ receptor contributes to neurite growth remains to be investigated.

4.4. Impact of ciliary 5-HT₆ receptor localization

Primary cilia are observed in developing neurons and participate in every step of neurodevelopment (Park et al., 2019; Youn and Han, 2018). Cilia are present in migrating cortical interneurons and allow them to escape the migration path and to colonize the cortical plate through the Sonic Hedgehog (Shh) and Wnt signaling pathway (Baudoin et al., 2012). They drive the migration of cerebellar granule

neurons along glial fibers through the control of myosin II and F-actin dynamics (Trivedi et al., 2014). Primary cilia also participate in neuronal differentiation. They exhibit a highly dynamic behavior regarding both their presence and localization during the differentiation of retinal ganglion cells. Furthermore, cilia disruption experiments revealed their essential role in the proliferation and survival of retinal progenitors, as well as the generation of retinal ganglion cells (Lepanto et al., 2016b). Cilia are also found on mature hippocampal or cortical neurons, where they can play a role in dendritic growth and complexification as well as adult neurogenesis (Guadiana et al., 2013; Kumamoto et al., 2012). The role of primary cilia in neurodevelopment has been extensively reviewed recently (Park et al., 2019; Youn and Han, 2018). Here, we will describe recent data suggesting a key role of 5-HT₆ receptors located in the cilia in neuronal differentiation and morphology.

Pharmacological blockade of 5-HT₆ receptors in cultured striatal neurons results in a shortening of the primary cilia, whereas their stimulation with an agonist shows no effect on cilia morphology, suggesting that the receptor influence on cilia length mainly depends on its constitutive activity (Brodsky et al., 2017). Corroborating these findings, restoring the expression of the receptor in cilia of neurons from 5-HT₆^{-/-} mice increased cilia length in an agonist-independent manner (Lesiak et al., 2018). The effect of further over-expression of the receptor is less clear, with a study showing that it had no additional effect on cilia length (Brodsky et al., 2017), whereas two further studies showed a dramatic increase in length and even branching of the cilia when the receptor is overexpressed (Guadiana et al., 2013; Hu et al., 2017). Additional studies are needed to explain these discrepancies. Further supporting the role of agonist-independent activation of the receptor in cilia extension, expression of a mutated 5-HT₆ receptor insensitive to 5-HT and other agonists but displaying constitutive activity (5-HT₆^{D106A}) also induced an increase in cilia length (Lesiak et al., 2018). The ability of the 5-HT₆ receptor to control cilia length makes it likely to have an important role in neuronal architecture. Further supporting this hypothesis and corroborating previous observations indicating a key influence of receptor constitutive activity in neurite growth (Duhr et al., 2014), restoration of the 5-HT₆ receptor expression in neurons from 5-HT₆^{-/-} mice increased the average dendrite length, an effect reproduced by the expression of the 5-HT₆^{D106A} receptor mutant (Lesiak et al., 2018). On the other hand, expression of a 5-HT₆ receptor mutant deleted of the Fyn binding site did not affect dendrite length (Lesiak et al., 2018), suggesting that a Fyn-regulated signaling pathway dependent of its recruitment by 5-HT₆ receptors is involved in the regulation of neurite growth. Another study has shown that Src-family kinases such as Fyn can activate the Cdk5 pathway through the induction of the expression of the Cdk5 activator p35 (Kobayashi et al., 2014). Accordingly, 5-HT₆ receptor-mediated activation of Cdk5 signaling to promote neurite growth might involve a dual mechanism involving receptor phosphorylation by associated Cdk5 and Fyn-dependent induction of p35 expression.

Consistent with a role of the ciliary localization of 5-HT₆ receptors in neurodevelopment, a RNA-interference study conducted on 41 genes associated with neurodevelopmental diseases showed that more than half of these genes control cilia length (Marley and von Zastrow, 2012), implying that a dysregulation of cilia length and hence its signaling capacity might be key factors in the development of these pathologies. Further evidence of the role of ciliary 5-HT₆ receptors in neuronal morphology has been obtained in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease (AD). In these mice, the expression of the 5-HT₆ receptor is increased in the hippocampus, with a correlated increase in cilia length compared to WT mice, suggesting that cilia elongation in this model might be induced by the upregulation of 5-HT₆ receptor levels (Hu et al., 2017). The enhanced 5-HT₆ receptor expression is also accompanied with an increase in Axonal Initial Segment (AIS) length, a decrease in its distance relative to the soma, the translocation of ankyrin G, a marker of the AIS to the ciliary compartment and a reduction of axonal length (Hu et al., 2017; Wang et al., 2014). Finally,

administration of the selective 5-HT₆ receptor inverse agonist SB271046 to the APP/PS1 mice restored normal cilia length and AIS morphology, which correlated with its ability to prevent cognitive impairment, suggesting that the 5-HT₆ receptor might affect cognition in Alzheimer's disease through the regulation of cilia length and AIS morphology, which is known to have a crucial influence upon neuronal excitability (Yamada and Kuba, 2016).

5. Pathophysiological impact of the 5-HT₆ receptor interactome

5.1. Chemical probes to study the pathophysiological impact of the 5-HT₆ receptor

Over the last two decades, the 5-HT₆ receptor has been the focus of attention of numerous pharmaceutical companies in view of its restricted pattern of expression in the brain and the spinal cord, making it an attractive target. Although this focus has been mainly put on antagonists because of their clear pro-cognitive properties, both agonists and antagonists are considered as potentially valuable therapeutic tools that can also shed light on the receptor's physiological functions.

5.1.1. Agonists

5-HT₆ receptor agonists have been tested for several applications, including nociception, cognitive functions, mood, addiction, obesity and sleep, but their effects remain often controversial. Their therapeutic potential has recently been reviewed in depth (Karila et al., 2015). So, we will mostly illustrate some conflicting data obtained by taking as an example the widely used agonist EMD386088. EMD386088 induces clear-cut pro-nociceptive effects, in contrast to several antagonists (Castaneda-Corral et al., 2009; Godinez-Chaparro et al., 2011, 2012), while its influence on behavioral flexibility remains still controversial. A recent study has shown that EMD386088 impairs reversal learning (Amodeo et al., 2018), whereas a previous study found no effect of EMD386088 used at a similar dose (Nikiforuk, 2014; Nikiforuk et al., 2011). The authors postulated that this discrepancy was likely due to the difference in the behavioral tests used to assess reversal learning. EMD386088 has also been shown to impair both long-term and short-term working memory (Amodeo et al., 2018; Meneses et al., 2008), an effect that was also established for another 5-HT₆ receptor agonist, WAY181187 (Loiseau et al., 2008). Again, this contradicts the data of another study which showed a significant improvement of working memory in rats treated with EMD386088 or with the agonist E-6801 (Kendall et al., 2011). These conflicting results may be explained by the different models of memories studied (novel object recognition in (Kendall et al., 2011) vs. social recognition and associative learning in the other studies), which would suggest a specific effect of the receptor in different types of memories. Notably, these conflicting results come from studies that have investigated the effect of agonists on healthy animals. When used in models of cognitive impairment, EMD386088 as well as WAY181187 have been shown to improve memory in the same way as antagonists (Bokare et al., 2018; Nikiforuk et al., 2013; Rychtyk et al., 2019). EMD386088 also reverses cognitive deficits in a rat model of schizophrenia (ketamine treatment) (Nikiforuk et al., 2013). This suggests an alteration of a finely-tuned 5-HT₆ receptor signaling in pathological situations which can be normalized by both agonists and antagonists.

5-HT₆ receptor agonists have also been studied in the frame of depression and anxiety. EMD386088 displays anxiolytic and antidepressant effects (Jastrzebska-Wiesek et al., 2014; Nikiforuk et al., 2011), reminiscent of the effects of antagonists. A recent review has suggested that different molecular mechanisms might underlie the anxiolytic like effects induced by both agonists and antagonists (Nikiforuk, 2014).

5.1.2. Antagonists

5-HT₆ receptor antagonists have been extensively studied and there

is a large consensus that they have pro-cognitive properties. Numerous studies have shown unequivocal beneficial effects of 5-HT₆ receptor antagonists on cognitive deficits in rodent models of psychiatric and neurodegenerative diseases such as schizophrenia and AD and have been extensively reviewed elsewhere (de Bruin and Kruse, 2015; de Jong and Mork, 2017; Ferrero et al., 2017; Khoury et al., 2018; Lalut et al., 2017). Though 5-HT₆ receptor blockade raised an important hope as symptomatic treatment to improve cognition in AD, the initial enthusiasm was tempered by the recent failure of leading compounds in Phase 3 trials. For instance, the selective and high-affinity 5-HT₆ receptor antagonist Idalopirdine (Lu AE58054) in conjunction with the acetylcholine esterase inhibitor Donepezil improved cognitive function in patients with moderate AD in a randomized, double-blind, placebo-controlled Phase 2 trial (Wilkinson et al., 2014) but did not show any benefit in these patients after treatment for 6 months in subsequent Phase 3 studies (Atri et al., 2018). This failure might be linked to the reduction in the doses and changes in the dosing regimen from the Phase 2 to the Phase 3 studies. Phase 2 studies investigating another selective 5-HT₆ receptor antagonist, Intepirdine (SB742457), alone or in conjunction with Donepezil, in patients with mild to moderate AD, did not show any efficacy of Intepirdine used as monotherapy but, when added as adjunct to Donepezil, the compound induced a significant improvement of cognition and functional status, when compared with Donepezil treatment alone (Maher-Edwards et al., 2015). However, in a subsequent Phase 3 study, Intepirdine failed to demonstrate a statistically significant benefit in cognition in AD patients who were already taking Donepezil (Axovant Sciences press release, September 26, 2017). A novel 5-HT₆ receptor antagonist, SUVN-502, is currently under clinical investigation in subjects with moderate AD who received either Donepezil or the NMDA receptor antagonist memantine or the combined therapy.

These failures underscore the need of new studies to understand the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiological influence of the 5-HT₆ receptor. A recent work suggests that the regulation of cilia function by the receptor could impact cognition (Hu et al., 2017). The demonstration of receptor constitutive activity *in vivo* (Deraredj Nadim et al., 2016) also points the importance of designing 5-HT₆ receptor ligands with inverse agonist or neutral antagonist properties. Molecules such as Intepirdine have been shown to have an inverse agonist effect on receptor-operated Gs and Cdk5 signaling (Grychowska et al., 2016; Vanda et al., 2018). Interestingly, Intepirdine displays stronger effects on cognition when compared to the recently designed neutral antagonist CPPQ, but the latter had a higher anxiolytic effect (Grychowska et al., 2016), suggesting that targeting constitutive or evoked activity has a differential impact on behavior and cognition. A partial inverse agonist, which does not alter receptor-mediated Cdk5 signaling but partially inhibits constitutive activity at Gs signaling displayed pro-cognitive properties, and reversed scopolamine-induced memory deficits, when delivered in conjunction with donepezil (Vanda et al., 2018).

Finally, a focus has also been put on developing multi-target compounds that bind to the 5-HT₆ receptor and other receptors. For example, in an effort to find drugs that could control cognitive symptoms in patients with schizophrenia, dual 5-HT₆ receptor/dopamine D₃ receptor antagonists have been developed (Grychowska et al., 2019; Saavedra et al., 2017). Interestingly, the compound 19 synthesized by Grychowska and colleagues is a neutral 5-HT₆ receptor antagonist as well as a high-affinity D₃ receptor antagonist (Grychowska et al., 2019). This compound displays neuroprotective properties, which are not reproduced by Intepirdine, and is capable of reversing cognitive deficits in PCP-treated mice (schizophrenia model). Compounds combining 5-HT₄ receptor agonist/5-HT₆ receptor antagonist activities have recently been synthesized. The anti-amnesic effect of one of them (used at a dose of 1 mg/kg) has been established in a scopolamine-induced deficit model of working memory (Yahiaoui et al., 2016). More recently, the same group of investigators designed and synthesized a novel multi-

target directed ligand combining 5-HT₄ receptor agonist, 5-HT₆ receptor inverse agonist and acetylcholine esterase inhibitor activities that displayed an anti-amnesic effect at a dose of 0.3 mg/kg in the same model of working memory deficit (Hatat et al., 2019). These encouraging preliminary results highlight the potential of multitarget strategies for the treatment of cognitive deficits of psychiatric and neurodegenerative disorders.

5.2. Role of the 5-HT₆ receptor interactome in cognitive deficits

As previously mentioned, 5-HT₆ receptor stimulation promotes mTOR signaling in prefrontal cortex in neurodevelopmental models of schizophrenia (Meffre et al., 2012). In light of previous findings suggesting a deleterious influence of non-physiological mTOR activation in neurodevelopmental disorders, including rare genetic forms of ASD and Down syndrome (Ehninger and Silva, 2011; Troca-Marin et al., 2012), Meffre et al. demonstrated that an acute administration of the mTOR pharmacological inhibitor rapamycin prevented the deficits in episodic memory and social discrimination tests in rats treated with PCP at the neonatal stage or reared in isolation after the weaning, thereby reproducing the effects of 5-HT₆ receptor antagonists/inverse agonists (Meffre et al., 2012). These findings suggested that the upregulation of mTOR associated with prefrontal 5-HT₆ receptors might be involved in cognitive deficits of schizophrenia, which remain poorly controlled by currently available antipsychotics. They also suggested that 5-HT₆ receptor antagonists might be evaluated in genetic ASD forms exhibiting excessive mTOR activation (Ehninger and Silva, 2011). mTOR is a critical signaling node that controls many neuronal functions in response to numerous extracellular signals, including growth factors and neurotransmitters. It is not only essential for the proper structural and functional development of brain circuitry but also has a key influence upon synaptic transmission and synaptic plasticity in the mature brain (Bockaert and Marin, 2015). However, the mechanisms by which overactivation of mTOR signaling induces cognitive impairment remain to be fully elucidated. Excessive mTORC1 activation in ASD causes a decrease in autophagy, an increase in spine density, and a reduction of developmental spine pruning in pyramidal neurons. Alteration of spine formation and maturation and deregulation of specific forms of synaptic plasticity such as long-term depression have also been proposed (Bockaert and Marin, 2015).

As previously mentioned, the neurochemical mechanisms underlying pro-cognitive effects of 5-HT₆ receptor antagonists in preclinical models of AD are quite well characterized. They likely involve the blockade of receptors located on GABAergic interneurons, which in turn reduces interneuron-mediated inhibition of cholinergic and glutamatergic neurons and increases cholinergic and glutamatergic transmissions (Codony et al., 2011). How the reduction of mTOR signaling that is overactivated in the brain of AD patients (An et al., 2003), supports the pro-cognitive effects of 5-HT₆ receptor antagonists remains to be established. It has been suggested that aberrant activation of mTOR contributes to amyloid and Tau pathologies in AD via several mechanisms. These include the generation of fibrillar β -amyloid (A β) peptide, the increase in Tau phosphorylation at sites related to tauopathies and Tau protein levels, the formation of neurofibrillary tangles, the inhibition of autophagy and of the clearance of pathologically accumulated proteins (Caccamo et al., 2013; Di Domenico et al., 2018; Heras-Sandoval et al., 2014; Mueed et al., 2018; Oddo, 2012). Hence, blocking 5-HT₆ receptor-mediated mTOR activation may have beneficial effects not only on cognition, but also on many pathological features of AD.

The critical influence of the mTOR pathway, under the control of 5-HT₆ receptors, in memory performance was recently confirmed in the context of dietary restriction (DR) in the mouse (Teng et al., 2019). As previously described in Chapter 3, mice subjected to DR show a reduced expression of the 5-HT₆ receptor and, consequently, a decrease in 5-HT₆ receptor-mediated mTOR signaling in the hippocampal tissue (Teng

et al., 2019). In this study, the authors also showed that peripheral administration of WAY208466, a selective 5-HT₆ receptor agonist, abrogates DR-induced memory enhancement, whereas administration of SB399885, a 5-HT₆ receptor antagonist, does not further improve memory in DR mice. Furthermore, supplementation of food with phosphatidic acid, an mTORC1 activator, attenuates memory performance in DR mice and 5-HT₆^{-/-} mice, while the mTORC1 inhibitor Everolimus mimics but does not further enhance the memory performance of DR and 5-HT₆^{-/-} mice. Collectively, these results indicate that DR-induced reduction of 5-HT₆ receptor-operated mTOR signaling underlies the associated memory enhancement. The data also show a decreased complexity of dendrites and a reduction of dendritic length in hippocampal neurons of DR mice while the spine density was increased and LTP was enhanced, compared with mice fed *ad libitum*. Again, DR-associated structural alterations were caused by an attenuation of 5-HT₆ receptor-mediated mTORC1 signaling (Teng et al., 2019).

5.3. Role of the 5-HT₆ receptor interactome in epilepsy

In addition to its beneficial influence upon cognition, 5-HT₆ receptor blockade may be considered as a novel therapeutic strategy in epilepsy. Several studies have demonstrated that 5-HT₆ receptor antagonists have an anti-seizure activity by increasing the seizure threshold (Routledge et al., 2000; Stean et al., 2002; Wang et al., 2015). As previously mentioned (see Chapter 3), a higher expression of 5-HT₆ receptors was found in the cortex of TLE patients and in the pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy (Liu et al., 2019; Wang et al., 2015). Consequently, 5-HT₆ receptor-operated mTOR signaling as well as Jab1/phospho-c-jun signaling were augmented in the brain of pilocarpine-treated rats (Liu et al., 2019; Wang et al., 2015). Corroborating numerous studies showing a role of the mTOR pathway in epileptogenesis (Bockaert and Marin, 2015), administration of a 5-HT₆ receptor antagonist before the induction of seizures increased seizure latency, decreased their severity (Wang et al., 2015) and relieved learning and memory deficits in pilocarpine-treated rats (Liu et al., 2019).

6. Concluding remarks

This review illustrates the potential of deciphering the interactome of a GPCR to characterize novel mechanisms underlying the regulation of its functional status and to identify non-canonical signaling pathways involved in its physiological functions and associated pathologies. With regard to the 5-HT₆ receptor interactome, the functional outcome of only a minority of identified interactions has to date been characterized. Adding a further level of complexity, the receptor interactome might be dynamically regulated in time and space, depending on the receptor's conformational state and post-translational modifications. It is likely that many receptor interacting proteins successively participate in the highly temporally-regulated and complex processes under the control of 5-HT₆ receptors such as neuronal migration and differentiation, and cognition. Analysis of the interactome of native receptors, using for instance knock-in mice expressing epitope-tagged 5-HT₆ receptors, at different developmental stages or in pathological situations in which the receptor is implicated, will certainly provide important advance in the field.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interest with the present article.

Acknowledgments

The authors are supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Montpellier, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Agence Nationale de la Recherche [N° ANR-17-CE16-0010-01 and ANR-17-CE16-0013-01].

References

- Alves, S.E., Hoskin, E., Lee, S.J., Brake, W.G., Ferguson, D., Luine, V., Allen, P.B., Greengard, P., McEwen, B.S., 2002. Serotonin mediates CA1 spine density but is not crucial for ovarian steroid regulation of synaptic plasticity in the adult rat dorsal hippocampus. *Synapse* 45, 143–151.
- Amodeo, D.A., Peterson, S., Pahua, A., Posadas, R., Hernandez, A., Hefner, E., Qi, D., Vega, J., 2018. 5-HT6 receptor agonist EMD386088 impairs behavioral flexibility and working memory. *Behav. Brain Res.* 349, 8–15.
- An, W.L., Cowburn, R.F., Li, L., Braak, H., Alafuzoff, I., Iqbal, K., Iqbal, I.G., Winblad, B., Pei, J.J., 2003. Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 163, 591–607.
- Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J., Fagni, L., 2001. Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* 411, 962–965.
- Atri, A., Frolich, L., Ballard, C., Tariot, P.N., Molinuevo, J.L., Boneva, N., Windfeld, K., Raket, L.L., 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. *J. Am. Med. Assoc.* 319, 130–142.
- Baudoin, J.P., Viou, L., Launay, P.S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T., Alvarez, C., Rio, J.P., Boudier, T., Lechaire, J.P., Kessaris, N., Spassky, N., Metin, C., 2012. Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron* 76, 1108–1122.
- Beffert, U., Weeber, E.J., Morfini, G., Ko, J., Brady, S.T., Tsai, L.H., Sweatt, J.D., Herz, J., 2004. Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J. Neurosci.* 24, 1897–1906.
- Berbari, N.F., Johnson, A.D., Lewis, J.S., Askwith, C.C., Mykityn, K., 2008. Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell* 19, 1540–1547.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pages, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093.
- Bleich, A., Brown, S.L., Kahn, R., van Praag, H.M., 1988. The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 14, 297–315.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Dumuis, A., Marin, P., 2010a. Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors. In: Müller, Christian P., Jacobs, Barry L. (Eds.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Academic Press, London.
- Bockaert, J., Marin, P., 2015. mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol. Rev.* 95, 1157–1187.
- Bockaert, J., Perroy, J., Becamel, C., Marin, P., Fagni, L., 2010b. GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: roles in physiology and pathologies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 89–109.
- Bokare, A.M., Bhonde, M., Goel, R., Nayak, Y., 2018. 5-HT6 receptor agonist and antagonist modulates ICV-STZ-induced memory impairment in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 235, 1557–1570.
- Brailov, I., Bancila, M., Brisorgueil, M.J., Miquel, M.C., Hamon, M., Verge, D., 2000. Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.* 872, 271–275.
- Brodsky, M., Lesiak, A.J., Croicu, A., Cohenca, N., Sullivan, J.M., Neumaier, J.F., 2017. 5-HT6 receptor blockade regulates primary cilia morphology in striatal neurons. *Brain Res.* 1660, 10–19.
- Caccamo, A., Magri, A., Medina, D.X., Wisely, E.V., Lopez-Aranda, M.F., Silva, A.J., Oddo, S., 2013. mTOR regulates tau phosphorylation and degradation: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. *Aging Cell* 12, 370–380.
- Castaneda-Corral, G., Rocha-Gonzalez, H.I., Araiza-Saldana, C.I., Ambriz-Tututi, M., Vidal-Cantu, G.C., Granados-Soto, V., 2009. Role of peripheral and spinal 5-HT6 receptors according to the rat formalin test. *Neuroscience* 162, 444–452.
- Chamovitz, D.A., Segal, D., 2001. JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep.* 2, 96–101.
- Charnay, Y., Leger, L., 2010. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin. Neurosci.* 12, 471–487.
- Cheng, A., Scott, A.L., Ladenheim, B., Chen, K., Ouyang, X., Lathia, J.D., Mughal, M., Cadet, J.L., Mattson, M.P., Shih, J.C., 2010. Monoamine oxidases regulate telencephalic neural progenitors in late embryonic and early postnatal development. *J. Neurosci.* 30, 10752–10762.
- Cirrito, J.R., Disabato, B.M., Restivo, J.L., Verges, D.K., Goebel, W.D., Sathyan, A., Hayreh, D., D'Angelo, G., Benzinger, T., Yoon, H., Kim, J., Morris, J.C., Mintun, M.A., Sheline, Y.I., 2011. Serotonin signaling is associated with lower amyloid-beta levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14968–14973.
- Claeysen, S., Bockaert, J., Giannoni, P., 2015. Serotonin: a new hope in alzheimer's disease? *ACS Chem. Neurosci.* 6, 940–943.
- Codony, X., Vela, J.M., Ramirez, M.J., 2011. 5-HT(6) receptor and cognition. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 94–100.
- Dayer, A.G., Jacobshagen, M., Chaumont-Dubel, S., Marin, P., 2015. 5-HT6 receptor: a new player controlling the development of neural circuits. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 951–960.
- de Bruin, N.M., Kruse, C.G., 2015. 5-HT6 receptor antagonists: potential efficacy for the treatment of cognitive impairment in schizophrenia. *Curr. Pharmaceut. Des.* 21, 3739–3759.
- de Jong, I.E.M., Mork, A., 2017. Antagonism of the 5-HT6 receptor - preclinical rationale for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 125, 50–63.
- Deraredj Nadim, W., Chaumont-Dubel, S., Madouri, F., Cobret, L., De Tauzia, M.L., Zajdel, P., Benedetti, H., Marin, P., Morisset-Lopez, S., 2016. Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT6 receptor promotes receptor constitutive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12310–12315.
- Di Domenico, F., Tramutola, A., Foppoli, C., Head, E., Perluigi, M., Butterfield, D.A., 2018. mTOR in Down syndrome: role in Ass and tau neuropathology and transition to Alzheimer disease-like dementia. *Free Radic. Biol. Med.* 114, 94–101.
- Duhr, F., Deleris, P., Raynaud, F., Seveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Bockaert, J., Marin, P., Chaumont-Dubel, S., 2014. Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT6 receptors to promote neurite growth. *Nat. Chem. Biol.* 10, 590–597.
- Durig, J., Hornung, J.P., 2000. Neonatal serotonin depletion affects developing and mature mouse cortical neurons. *Neuroreport* 11, 833–837.
- Ehninger, D., Silva, A.J., 2011. Rapamycin for treating Tuberous sclerosis and Autism spectrum disorders. *Trends Mol. Med.* 17, 78–87.
- Feria-Velasco, A., del Angel, A.R., Gonzalez-Burgos, I., 2002. Modification of dendritic development. *Prog. Brain Res.* 136, 135–143.
- Ferrero, H., Solas, M., Francis, P.T., Ramirez, M.J., 2017. Serotonin 5-HT6 receptor antagonists in alzheimer's disease: therapeutic rationale and current development status. *CNS Drugs* 31, 19–32.
- Frazer, S., Otmung, J.P., Dayer, A., 2015. Early-life serotonin dysregulation affects the migration and positioning of cortical interneuron subtypes. *Transl. Psychiatry* 5, e644.
- Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L., 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1002–1012.
- Ge, X., Qiu, Y., Loh, H.H., Law, P.Y., 2009. GRIN1 regulates micro-opioid receptor activities by tethering the receptor and G protein in the lipid raft. *J. Biol. Chem.* 284, 36521–36534.
- Goadsby, P.J., 2007. Serotonin receptor ligands: treatments of acute migraine and cluster headache. *Handb. Exp. Pharmacol.* 129–143.
- Godinez-Chaparro, B., Barragan-Iglesias, P., Castaneda-Corral, G., Rocha-Gonzalez, H.I., Granados-Soto, V., 2011. Role of peripheral 5-HT(4), 5-HT(6), and 5-HT(7) receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 152, 687–697.
- Godinez-Chaparro, B., Lopez-Santillan, F.J., Orduna, P., Granados-Soto, V., 2012. Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT(4), 5-HT(6) and 5-HT(7) receptors. *Neuroscience* 222, 379–391.
- Gonzalez-Burgos, I., del Angel-Meza, A.R., Barajas-Lopez, G., Feria-Velasco, A., 1996. Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 673–679.
- Grychowska, K., Chaumont-Dubel, S., Kurczab, R., Koczurkiewicz, P., Deville, C., Krawczyk, M., Pietrus, W., Satala, G., Buda, S., Piska, K., Drop, M., Bantreil, X., Lamaty, F., Pekala, E., Bojarski, A.J., Popik, P., Marin, P., Zajdel, P., 2019. Dual 5-HT6 and D3 receptor antagonists in a group of 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinolines with neuroprotective and procognitive activity. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 3183–3196.
- Grychowska, K., Satala, G., Kos, T., Partyka, A., Colacino, E., Chaumont-Dubel, S., Bantreil, X., Wesolowska, A., Pawlowski, M., Martinez, J., Marin, P., Subra, G., Bojarski, A.J., Lamaty, F., Popik, P., Zajdel, P., 2016. Novel 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinoline based 5-HT6 receptor antagonists with potential application for the treatment of cognitive disorders associated with alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 972–983.
- Guadiana, S.M., Semple-Rowland, S., Daroszewski, D., Madorsky, I., Breunig, J.J., Mykityn, K., Sarkisian, M.R., 2013. Arborization of dendrites by developing neocortical neurons is dependent on primary cilia and type 3 adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* 33, 2626–2638.
- Ha, C.M., Park, D., Kim, Y., Na, M., Panda, S., Won, S., Kim, H., Ryu, H., Park, Z.Y., Rassenick, M.M., Chang, S., 2015. SNX14 is a bifunctional negative regulator for neuronal 5-HT6 receptor signaling. *J. Cell Sci.* 128, 1848–1861.
- Hamon, M., Doucet, E., Lefevre, K., Miquel, M.C., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J., Verge, D., 1999. Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT6 receptors. *Neuropsychopharmacology* 21, 68S–76S.
- Hatat, B., Yahiaoui, S., Lecoutey, C., Davis, A., Freret, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C., Dallemagne, P., 2019. A novel in vivo anti-amnesic agent, specially designed to express both acetylcholinesterase (AChE) inhibitory, serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist and serotonergic subtype 6 receptor (5-HT6R) inverse agonist activities, with a potential interest against alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 11, 148.
- Helboe, L., Egebjerg, J., de Jong, I.E., 2015. Distribution of serotonin receptor 5-HT6 mRNA in rat neuronal subpopulations: a double in situ hybridization study. *Neuroscience* 310, 442–454.
- Heras-Sandoval, D., Perez-Rojas, J.M., Hernandez-Damian, J., Pedraza-Chaverri, J., 2014. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell. Signal.* 26, 2694–2701.
- Hornung, J.P., 2003. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.* 26, 331–343.
- Houellebecq, M., 2019. *Sérotonine*. Flammarion, Paris.
- Hu, L., Wang, B., Zhang, Y., 2017. Serotonin 5-HT6 receptors affect cognition in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating cilia function. *Alzheimer's Res. Ther.* 9, 76.
- Iida, N., Kozasa, T., 2004. Identification and biochemical analysis of GRIN1 and GRIN2. *Methods Enzymol.* 390, 475–483.
- Jacobshagen, M., Niquille, M., Chaumont-Dubel, S., Marin, P., Dayer, A., 2014. The serotonin 6 receptor controls neuronal migration during corticogenesis via a ligand-independent Cdk5-dependent mechanism. *Development* 141, 3370–3377.
- Jastrzebska-Wiesek, M., Siwek, A., Partyka, A., Kubacka, M., Mogilski, S., Wasik, A., Kolaczowski, M., Wesolowska, A., 2014. Pharmacological evaluation of the

- anxiolytic-like effects of EMD 386088, a partial 5-HT₆ receptor agonist, in the rat elevated plus-maze and Vogel conflict tests. *Neuropharmacology* 85, 253–262.
- Jean, A., Conductier, G., Manrique, C., Bouras, C., Berta, P., Hen, R., Charnay, Y., Bockaert, J., Compan, V., 2007. Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16335–16340.
- Jiang, J.Y., Falcone, J.L., Curci, S., Hofer, A.M., 2019. Direct visualization of cAMP signaling in primary cilia reveals up-regulation of ciliary GPCR activity following Hedgehog activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 12066–12071.
- Kahn, R.S., van Praag, H.M., Wetzler, S., Asnis, G.M., Barr, G., 1988. Serotonin and anxiety revisited. *Biol. Psychiatry* 23, 189–208.
- Karila, D., Freret, T., Bouet, V., Boulouard, M., Dallemagne, P., Rochais, C., 2015. Therapeutic potential of 5-HT₆ receptor agonists. *J. Med. Chem.* 58, 7901–7912.
- Kendall, I., Slotten, H.A., Codony, X., Burgueno, J., Pauwels, P.J., Vela, J.M., Fone, K.C., 2011. E-6801, a 5-HT₆ receptor agonist, improves recognition memory by combined modulation of cholinergic and glutamatergic neurotransmission in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 213, 413–430.
- Khoury, R., Grysman, N., Gold, J., Patel, K., Grossberg, G.T., 2018. The role of 5-HT₆ receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin. Investig. Drugs* 27, 523–533.
- Kim, S.H., Kim, D.H., Lee, K.H., Im, S.K., Hur, E.M., Chung, K.C., Rhim, H., 2014. Direct interaction and functional coupling between human 5-HT₆ receptor and the light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B-LC1). *PLoS One* 9, e91402.
- Kim, S.H., Seo, M., Hwang, H., Moon, D.M., Son, G.H., Kim, K., Rhim, H., 2019. Physical and functional interaction between 5-HT₆ receptor and nova-1. *Exp. Neurobiol.* 28, 17–29.
- Kobayashi, H., Saito, T., Sato, K., Furusawa, K., Hosokawa, T., Tsutsumi, K., Asada, A., Kamada, S., Ohshima, T., Hisanaga, S., 2014. Phosphorylation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J. Biol. Chem.* 289, 19627–19636.
- Kohen, R., Fashingbauer, L.A., Heidmann, D.E., Guthrie, C.R., Hamblin, M.W., 2001. Cloning of the mouse 5-HT₆ serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90, 110–117.
- Kohli, P., Hohne, M., Jungst, C., Bertsch, S., Ebert, L.K., Schauss, A.C., Benzing, T., Rinschen, M.M., Schermer, B., 2017. The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. *EMBO Rep.* 18, 1521–1535.
- Kumamoto, N., Gu, Y., Wang, J., Janoschka, S., Takemaru, K., Levine, J., Ge, S., 2012. A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 399–405 S391.
- Laliti, V., Pulido, D., Sandoval, I.V., 2010. Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle* 9, 284–311.
- Lalut, J., Karila, D., Dallemagne, P., Rochais, C., 2017. Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in Alzheimer's disease treatment. *Future Med. Chem.* 9, 781–795.
- Lepanto, P., Badano, J.L., Zolessi, F.R., 2016a. Neuron's little helper: the role of primary cilia in neurogenesis. *Neurogenesis (Austin)* 3, e1253363.
- Lepanto, P., Davison, C., Casanova, G., Badano, J.L., Zolessi, F.R., 2016b. Characterization of primary cilia during the differentiation of retinal ganglion cells in the zebrafish. *Neural Dev.* 11, 10.
- Lesiak, A.J., Brodsky, M., Cohenca, N., Croicu, A.G., Neumaier, J.F., 2018. Restoration of physiological expression of 5-HT₆ receptor into the primary cilia of null mutant neurons lengthens both primary cilia and dendrites. *Mol. Pharmacol.* 94, 731–742.
- Liu, C., Wen, Y., Huang, H., Lin, W., Huang, M., Lin, R., Ma, Y., 2019. Over-expression of 5-HT₆ receptor and activated JAB-1/p-c-jun play important roles in pilocarpine-induced seizures and learning-memory impairment. *J. Mol. Neurosci.* 67, 388–399.
- Loiseau, F., Dekeyne, A., Millan, M.J., 2008. Pro-cognitive effects of 5-HT₆ receptor antagonists in the social recognition procedure in rats: implication of the frontal cortex. *Psychopharmacology (Berlin)* 196, 93–104.
- Maher-Edwards, G., Watson, C., Ascher, J., Barnett, C., Boswell, D., Davies, J., Fernandez, M., Kurz, A., Zanetti, O., Saffirstein, B., Schronen, J.P., Zvartau-Hind, M., Gold, M., 2015. Two randomized controlled trials of SB742457 in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 11, 23–36.
- Marin, P., Becamel, C., Dumuis, A., Bockaert, J., 2012. 5-HT receptor-associated protein networks: new targets for drug discovery in psychiatric disorders? *Curr. Drug Targets* 13, 28–52.
- Marley, A., von Zastrow, M., 2012. A simple cell-based assay reveals that diverse neuropsychiatric risk genes converge on primary cilia. *PLoS One* 7, e46647.
- Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D.J., Dekeyne, A., Seveno, M., Rivet, J.M., Gaven, F., Deleris, P., Herve, D., Fone, K.C., Bockaert, J., Millan, M.J., Marin, P., 2012. 5-HT₆ receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol. Med.* 4, 1043–1056.
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Flores-Galvez, D., Castillo, C., Castillo, E., 2008. The effects of the 5-HT₆ receptor agonist EMD and the 5-HT₇ receptor agonist AS19 on memory formation. *Behav. Brain Res.* 195, 112–119.
- Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., Mannoury la Cour, C., 2008. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 454–464.
- Moon, U.Y., Park, J.Y., Park, R., Cho, J.Y., Hughes, L.J., McKenna 3rd, J., Goetzl, L., Cho, S.H., Crino, P.B., Gambello, M.J., Kim, S., 2015. Impaired reelin-dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex. *Cell Rep.* 12, 965–978.
- Mueed, Z., Tandon, P., Maurya, S.K., Deval, R., Kamal, M.A., Poddar, N.K., 2018. Tau and mTOR: the hotspots for multifarious diseases in Alzheimer's development. *Front. Neurosci.* 12, 1017.
- Nachury, M.V., Seeley, E.S., Jin, H., 2010. Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 59–87.
- Nemeroff, C.B., Owens, M.J., 2009. The role of serotonin in the pathophysiology of depression: as important as ever. *Clin. Chem.* 55, 1578–1579.
- Nikiforuk, A., 2014. The procognitive effects of 5-HT₆ receptor ligands in animal models of schizophrenia. *Rev. Neurosci.* 25, 367–382.
- Nikiforuk, A., Fijal, K., Potasiewicz, A., Popik, P., Kos, T., 2013. The 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6 agonist EMD 386088 ameliorates ketamine-induced deficits in attentional set shifting and novel object recognition, but not in the prepulse inhibition in rats. *J. Psychopharmacol.* 27, 469–476.
- Nikiforuk, A., Kos, T., Wesolowska, A., 2011. The 5-HT₆ receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology (Berlin)* 217, 411–418.
- Nordman, J.C., Kabbani, N., 2012. An interaction between alpha7 nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *J. Cell Sci.* 125, 5502–5513.
- Oddo, S., 2012. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front. Biosci.* 4, 941–952.
- Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S., Hashimoto, M., Nakajima, K., Ogawa, M., Kulkarni, A.B., Mikoshiba, K., 2007a. Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development* 134, 2273–2282.
- Ohshima, T., Mikoshiba, K., 2002. Reelin signaling and Cdk5 in the control of neuronal positioning. *Mol. Neurobiol.* 26, 153–166.
- Ohshima, T., Suzuki, H., Morimura, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., 2007b. Modulation of reelin signaling by cyclin-dependent kinase 5. *Brain Res.* 1140, 84–95.
- Park, S.M., Jang, H.J., Lee, J.H., 2019. Roles of primary cilia in the developing brain. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 218.
- Rasmussen, H., Ebdrup, B.H., Erritzoe, D., Aggeraens, B., Oranje, B., Kalbitzer, J., Pinborg, L.H., Baare, W.F., Svarer, C., Lublin, H., Knudsen, G.M., Glenthøj, B., 2011. Serotonin_{2A} receptor blockade and clinical effect in first-episode schizophrenia patients treated with quetiapine. *Psychopharmacology (Berlin)* 213, 583–592.
- Reiter, J.F., Leroux, M.R., 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 533–547.
- Riccio, O., Jacobshagen, M., Golding, B., Vutsits, L., Jabaudon, D., Hornung, J.P., Dayer, A.G., 2011. Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Transl. Psychiatry* 1, e47.
- Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabo, G., Vutsits, L., Kiss, J.Z., Dayer, A.G., 2009. Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry* 14, 280–290.
- Routledge, C., Bromidge, S.M., Moss, S.F., Price, G.W., Hirst, W., Newman, H., Riley, G., Gager, T., Stean, T., Upton, N., Clarke, S.E., Brown, A.M., Middlemiss, D.N., 2000. Characterization of SB-271046: a potent, selective and orally active 5-HT₆ receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1606–1612.
- Rychtyk, J., Partyka, A., Gdula-Argasinska, J., Myslowaska, K., Wilczynska, N., Jastrzebska-Wiesek, M., Wesolowska, A., 2019. 5-HT₆ receptor agonist and antagonist improve memory impairments and hippocampal BDNF signaling alterations induced by MK-801. *Brain Res.* 1722, 146375.
- Saavedra, O.M., Karila, D., Brossard, D., Rojas, A., Dupuis, D., Gohier, A., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Ortuno, J.C., Hanessian, S., 2017. Design and synthesis of novel N-sulfonyl-2-indoles that behave as 5-HT₆ receptor ligands with significant selectivity for D3 over D2 receptors. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 38–52.
- Sebben, M., Ansanay, H., Bockaert, J., Dumuis, A., 1994. 5-HT₆ receptors positively coupled to adenylyl cyclase in striatal neurones in culture. *Neuroreport* 5, 2553–2557.
- 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., Upton, N., 2002. Pharmacological profile of SB-357134: a potent, selective, brain penetrant, and orally active 5-HT₆ receptor antagonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 645–654.
- Takei, N., Nawa, H., 2014. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 28.
- Teng, L.L., Lu, G.L., Chiou, L.C., Lin, W.S., Cheng, Y.Y., Hsueh, T.E., Huang, Y.C., Hwang, N.H., Yeh, J.W., Liao, R.M., Fan, S.Z., Yen, J.H., Fu, T.F., Tsai, T.F., Wu, M.S., Wang, P.Y., 2019. Serotonin receptor HTR6-mediated mTORC1 signaling regulates dietary restriction-induced memory enhancement. *PLoS Biol.* 17, e2007097.
- Thase, M.E., 1999. Antidepressant treatment of the depressed patient with insomnia. *J. Clin. Psychiatry* 60 (17), 28–31 discussion 46–28.
- Trivedi, N., Ramahi, J.S., Karakaya, M., Howell, D., Kerekes, R.A., Solecki, D.J., 2014. Leading-process actomyosin coordinates organelle positioning and adhesion receptor dynamics in radially migrating cerebellar granule neurons. *Neural Dev.* 9, 26.
- Troca-Marin, J.A., Alves-Sampaio, A., Montesinos, M.L., 2012. Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. *Prog. Neurobiol.* 96, 268–282.
- Trovo-Marqui, A.B., Tajara, E.H., 2006. Neurofibromin: a general outlook. *Clin. Genet.* 70, 1–13.
- Vanda, D., Soural, M., Canale, V., Chaumont-Dubel, S., Satala, G., Kos, T., Funk, P., Fulopova, V., Lemrova, B., Koczurkiewicz, P., Pekala, E., Bojarski, A.J., Popik, P., Marin, P., Zajdel, P., 2018. Novel non-sulfonamide 5-HT₆ receptor partial inverse agonist in a group of imidazo[4,5-b]pyridines with cognition enhancing properties. *Eur. J. Med. Chem.* 144, 716–729.
- Vitalis, T., Ansorge, M.S., Dayer, A.G., 2013. Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT_{3A} and 5-HT₆ receptor subtypes. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 93.
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebort, J., Parnavelas, J.G., 2007. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur. J. Neurosci.* 26, 331–344.
- Vitalis, T., Parnavelas, J.G., 2003. The role of serotonin in early cortical development. *Dev. Neurosci.* 25, 245–256.
- Wang, C.C., Man, G.C., Chu, C.Y., Borchert, A., Ugun-Klusek, A., Billett, E.E., Kuhn, H.,

- Ufer, C., 2014. Serotonin receptor 6 mediates defective brain development in monoamine oxidase A-deficient mouse embryos. *J. Biol. Chem.* 289, 8252–8263.
- Wang, L., Lv, Y., Deng, W., Peng, X., Xiao, Z., Xi, Z., Chen, G., Wang, X., 2015. 5-HT6 receptor recruitment of mTOR modulates seizure activity in epilepsy. *Mol. Neurobiol.* 51, 1292–1299.
- Wheatley, D.N., Wang, A.M., Strugnell, G.E., 1996. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol. Int.* 20, 73–81.
- Wilkinson, D., Windfeld, K., Colding-Jorgensen, E., 2014. Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT6 receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 13, 1092–1099.
- Yahiaoui, S., Hamidouche, K., Ballandonne, C., Davis, A., de Oliveira Santos, J.S., Freret, T., Boulouard, M., Rochais, C., Dallemagne, P., 2016. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) partial agonist and 5-HT6R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 121, 283–293.
- Yamada, R., Kuba, H., 2016. Structural and functional plasticity at the axon initial segment. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 250.
- Youn, Y.H., Han, Y.G., 2018. Primary cilia in brain development and diseases. *Am. J. Pathol.* 188, 11–22.
- Yun, H.M., Baik, J.H., Kang, I., Jin, C., 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., Kim, S., Kim, H.J., Kostenis, E., Kim, J.I., Seong, J.Y., Baik, J.H., Rhim, H., 2007. The novel cellular mechanism of human 5-HT6 receptor through an interaction with Fyn. *J. Biol. Chem.* 282, 5496–5505.

GPCR SIGNALING

Dynamic interactions of the 5-HT₆ receptor with protein partners control dendritic tree morphogenesisCamille N. Pujol¹, Vincent Dupuy¹, Martial Séveno², Leonie Runtz^{1,3}, Joël Bockaert¹, Philippe Marin^{1*†}, Séverine Chaumont-Dubel^{1*†}Copyright © 2020
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim
to original U.S.
Government Works

The serotonin (5-hydroxytryptamine) receptor 5-HT₆ (5-HT₆R) has emerged as a promising target to alleviate the cognitive symptoms of neurodevelopmental diseases. We previously demonstrated that 5-HT₆R finely controls key neurodevelopmental steps, including neuronal migration and the initiation of neurite growth, through its interaction with cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5). Here, we showed that 5-HT₆R recruited G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GPRIN1) through a G_s-dependent mechanism. Interactions between the receptor and either Cdk5 or GPRIN1 occurred sequentially during neuronal differentiation. The 5-HT₆R–GPRIN1 interaction enhanced agonist-independent, receptor-stimulated cAMP production without altering the agonist-dependent response in NG108-15 neuroblastoma cells. This interaction also promoted neurite extension and branching in NG108-15 cells and primary mouse striatal neurons through a cAMP-dependent protein kinase A (PKA)-dependent mechanism. This study highlights the complex allosteric modulation of GPCRs by protein partners and demonstrates how dynamic interactions between GPCRs and their protein partners can control the different steps of highly coordinated cellular processes, such as dendritic tree morphogenesis.

INTRODUCTION

Over the last two decades, it has become evident that G protein-coupled receptors (GPCRs) do not solely recruit canonical signaling proteins, such as heterotrimeric G proteins and β -arrestins (1), but that they also interact with large networks of intracellular proteins that finely control their targeting to specific subcellular compartments, their trafficking in and out of the plasma membrane, and their signaling (2–5). These complexes have been extensively described for certain GPCRs by means of unbiased interactomics screens (2, 3, 6, 7) and often include several proteins that interact with common binding sites within a given GPCR, stressing the importance of spatiotemporal regulation of the interactions of GPCRs with their protein partners in their pathophysiological functions. However, the dynamics of the associations of GPCRs with interacting proteins and their functional outcomes remain poorly characterized.

The serotonin (5-hydroxytryptamine) receptor 5-HT₆ (5-HT₆R) is a G_s-coupled receptor exclusively expressed in the nervous system. The highest receptor densities are found in regions involved in mnemonic functions (8–12). Consistent with this particular distribution, the 5-HT₆R has emerged as a promising target to alleviate the cognitive symptoms of various neurological and psychiatric disorders (13). 5-HT₆R blockade relieves deficits in a wide range of models of cognitive impairment in rodents, and preliminary clinical studies have unequivocally shown procognitive effects of several 5-HT₆R antagonists in humans (14–17). However, any initial hope has been tempered by the failure of phase 3 trials of the leading compound idalopirdine (Lu AE58054) used in conjunction with the acetylcholine esterase inhibitor donepezil in patients with Alzheimer's disease (18).

The 5-HT₆R is also expressed early during neuronal development, and studies have demonstrated its crucial role in both the correct migration and positioning of neurons, neurite growth, and neuronal differentiation (19, 20). Further lines of evidence showed that most of the effect of the receptor on neuronal development is independent of its coupling to G_s, suggesting the involvement of alternative signaling mechanisms (21). To address this issue, genetic and proteomics strategies were used to characterize the 5-HT₆R interactome (20, 22–27). These studies showed that the receptor interacts with several proteins of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, including mTOR itself, and that 5-HT₆R-elicited mTOR activation in the prefrontal cortex underlies cognitive deficits in neurodevelopmental models of schizophrenia in rodents (25). These studies also revealed that the 5-HT₆R recruits cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), as well as several of its targets that are involved in neurite growth and synaptogenesis (20). The interaction between 5-HT₆R and Cdk5 induces the phosphorylation of the receptor by Cdk5, which promotes the initiation of neurite growth through a Cdc42-dependent pathway (20). Further experiments showed that the 5-HT₆R also controls neuronal migration through a Cdk5-dependent mechanism (19).

Another important feature of the 5-HT₆R is its high level of constitutive activity, which was established not only for recombinant receptors expressed in cell lines (28) but also for native receptors in cultured neurons and mouse brain (29). Furthermore, the receptor constitutively activates not only the canonical G_s signaling pathway but also Cdk5 signaling through a mechanism dependent on receptor phosphorylation by associated Cdk5 (20), highlighting the potential influence of GPCR-interacting proteins (GIPs) upon GPCR constitutive activity. One of the Cdk5 substrates known to control neurodevelopmental processes identified in the 5-HT₆R interactome is G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GPRIN1), which is a member of a protein family consisting of three gene products (GPRIN1 to GPRIN3) (30). GPRIN1 is highly abundant in the brain, binds selectively to activated G proteins, and promotes neurite extension (30–32). Several lines of evidence suggest that GPRIN1 promotes neurite growth through its direct interaction with membrane-bound receptors (32, 33).

¹Institut de Génétique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France. ²BioCampus Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France. ³Department of Psychiatry, McGill University, Douglas Hospital Research Center, Montreal, Canada.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: philippe.marin@igf.cnrs.fr (P.M.); severine.chaumont-dubel@igf.cnrs.fr (S.C.-D.)

Here, we demonstrated that 5-HT₆R interacted sequentially with Cdk5 and GPRIN1 during the differentiation of NG108-15 neuroblastoma cells. Functional studies showed that the interaction between the 5-HT₆R and GPRIN1 potentiated 5-HT₆R constitutive activity and promoted neurite elongation and branching in an agonist-independent, but adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent, manner in both neuroblastoma cells and primary striatal neurons. Together, these findings suggest that the 5-HT₆R promotes neuronal differentiation through sequential engagement of different signaling pathways that depends on agonist-independent allosteric receptor activation by distinct interacting proteins.

RESULTS

The 5-HT₆R forms a complex with GPRIN1 in mouse brain

Using an affinity purification–mass spectrometry proteomic approach and the 5-HT₆R C-terminal domain as bait, we previously demonstrated the physical association of the 5-HT₆R with a network of proteins known to control key neurodevelopmental processes, such as the migration of neurons and neurite growth. These interaction partners include Cdk5 and some of its regulators and substrates, such as GPRIN1 (Fig. 1A). Given the developmental pattern of 5-HT₆R and GPRIN1 expression (8, 34) and their common influence upon neuronal differentiation (20, 32, 35), we first confirmed the existence of the 5-HT₆R–GPRIN1 interaction in the brains of newborn mice, taking advantage of knock-in (KI) mice expressing the 5-HT₆R fused to green fluorescent protein (GFP; 5-HT₆R–GFP) (29). GPRIN1 coimmunoprecipitated with 5-HT₆R–GFP from brain protein extracts, indicating an association between the receptor and GPRIN1 (Fig. 1B). Corroborating these findings, immunohistochemistry combined with confocal microscopy showed the colocalization of the receptor and GPRIN1 in the soma of striatal (Fig. 1C) and cortical (fig. S1A) neurons from newborn 5-HT₆R–GFP KI mice. Consistent with previous findings that showed expression of the 5-HT₆R in the primary cilium (36–39), GFP immunostaining was also detected on cilia-like processes positively stained with an antibody against Arl13b (fig. S1A), a ciliary marker, in both the striatum and cortex, but no colocalization between 5-HT₆R and GPRIN1 was found in the primary cilium. Amplifying the signal from the GFP antibody also uncovered a small population of receptors that displayed a somatodendritic localization in cultured striatal neurons from 5-HT₆R–GFP KI mice, but not wild-type (WT) mice. Furthermore, these somatodendritic receptors were colocalized with GPRIN1 (fig. S1B).

The 5-HT₆R sequentially interacts with Cdk5 and GPRIN1 in NG108-15 cells

Our interactomics screen showed that both Cdk5 and GPRIN1 interact with the 5-HT₆R C-terminal domain (20). To better characterize the dynamics of these interactions and to explore whether they occurred simultaneously or were exclusive, we performed immunoprecipitation experiments in NG108-15 cells transfected with complementary DNAs (cDNAs) encoding 5-HT₆R and either GPRIN1 or Cdk5. In cells coexpressing GPRIN1 and 5-HT₆R, we detected an interaction by immunoprecipitation 24 hours after transfection of the cells with both cDNAs, which was statistically significantly increased after 48 hours (Fig. 1D and fig. S2A). In contrast, although we observed an interaction between the receptor and Cdk5 24 hours after transfection, this was followed by dissociation of the complex 48 hours after transfection, as shown by coimmunoprecipitation

experiments (Fig. 1E and fig. S2B). These findings were confirmed with bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based assays (Fig. 1F): A specific BRET signal was detected in NG108-15 cells coexpressing 5-HT₆R–yellow fluorescent protein (YFP) and Cdk5 24 hours after transfection, whereas no interaction between the two proteins was detected 48 hours after transfection. These results indicate that the receptor sequentially interacts with Cdk5 and GPRIN1 in NG108-15 cells, suggesting that the receptor's interaction partners are dynamically regulated.

Because Cdk5 phosphorylates the 5-HT₆R on serine 350 (Ser³⁵⁰), we wondered whether this phosphorylation event modulated the interaction between the receptor and GPRIN1. We found that a receptor having a mutation that prevented the phosphorylation of the receptor by Cdk5 (S350A mutant) interacted to a greater extent with GPRIN1 than did the WT receptor (fig. S3A). In contrast, a mutant mimicking the phosphorylation of Ser³⁵⁰ (S350D) did not interact with GPRIN1. Similarly, overexpressing p35, a coactivator of Cdk5, to enhance Ser³⁵⁰ phosphorylation reduced the association between WT 5-HT₆R and GPRIN1 (fig. S3, A and B). This suggests that the 5-HT₆R is unable to interact with GPRIN1 when it is phosphorylated by Cdk5.

The association between GPRIN1 and the 5-HT₆R depends on G proteins and the conformational state of the receptor

The amount of GPRIN1 that coimmunoprecipitated with a mutant of the 5-HT₆R unable to activate G proteins [the triple mutant F69 L T70D D72A; (40)] or a mutant 5-HT₆R lacking the C-terminal domain (Δ Cter) was statistically significantly reduced when compared with the amount of GPRIN1 that coimmunoprecipitated with the full-length, WT receptor (Fig. 1G and fig. S2C). Combining the triple mutation with the C-terminal deletion abolished the ability of the receptor to coimmunoprecipitate with GPRIN1, suggesting that both the C-terminal domain of the receptor and the ability of the receptor to activate G proteins are required for the formation of the 5-HT₆R–GPRIN1 complex (Fig. 1G). To confirm the involvement of the receptor C-terminal domain in the 5-HT₆R–GPRIN1 interaction, we attempted to immunoprecipitate the WT receptor and GPRIN1 from cells treated with an interfering peptide corresponding to residues 320 to 342 of the C-terminal tail of 5-HT₆R fused to the transduction domain of the HIV TAT protein (TAT–Ct320–342 peptide). Reminiscent of the effect of the C-terminal domain truncation, exposing cells to the TAT–Ct320–342 peptide reduced the amount of GPRIN1 that coimmunoprecipitated with the 5-HT₆R when compared with that in cells exposed to a control peptide (Fig. 1H and fig. S2D). Last, the amount of GPRIN1 that coimmunoprecipitated with the 5-HT₆R was reduced by exposing cells to the 5-HT₆R antagonist SB271046 (Fig. 1I and fig. S2E), which behaves as an inverse agonist with respect to receptor-operated G_s signaling, suggesting that the binding of GPRIN1 to the 5-HT₆R is a dynamic process that depends on the conformational state of the receptor.

The interaction between GPRIN1 and the 5-HT₆R enhances receptor constitutive activity

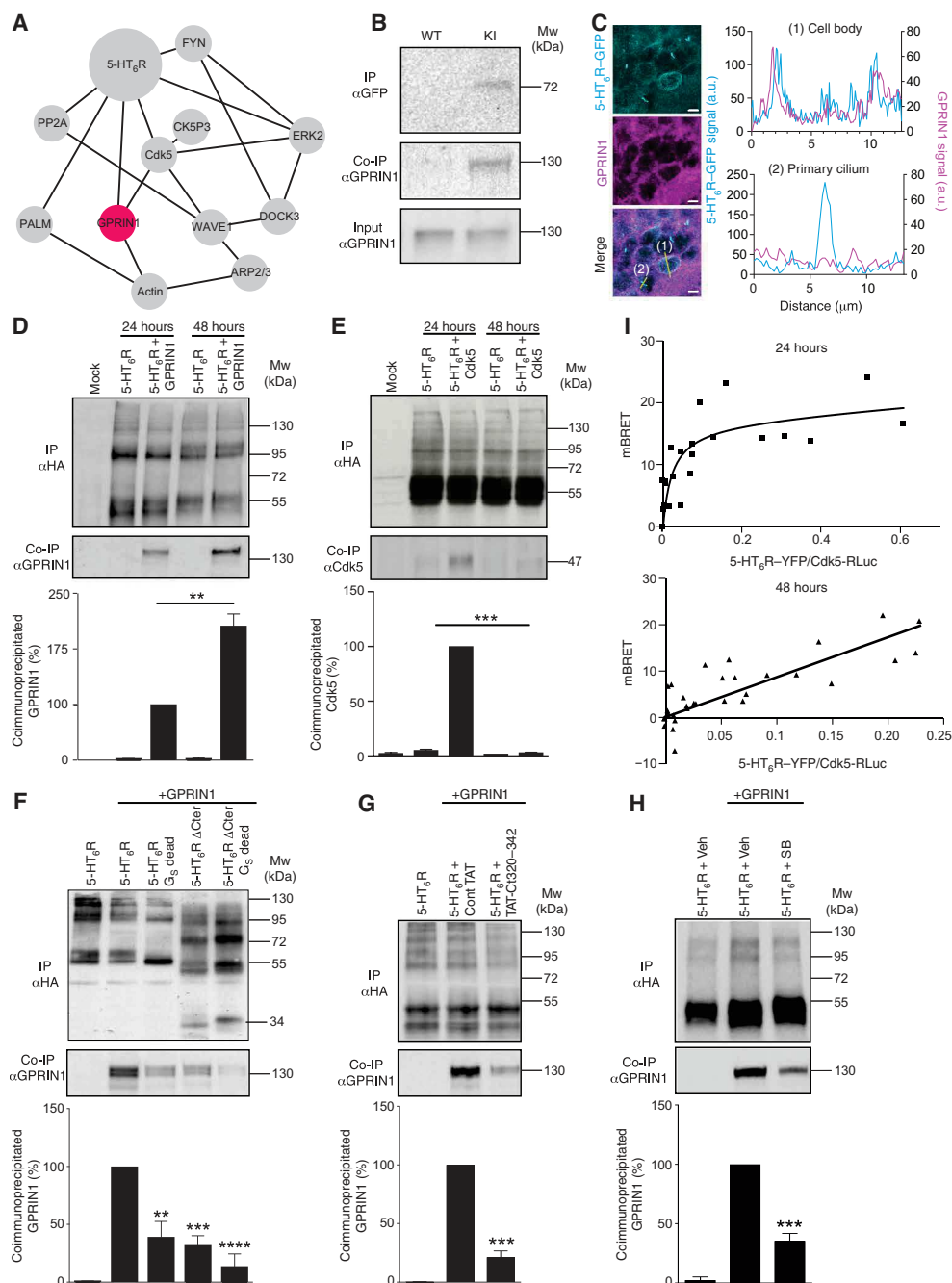
We previously demonstrated that the 5-HT₆R exhibits constitutive activation of the G_s pathway in NG108-15 neuroblastoma cells and in striatal neurons (20, 29). Using the CAMYEL cAMP BRET sensor (41), we found that coexpressing GPRIN1 with the 5-HT₆R did not change basal cAMP production 24 hours after transfection of the NG108-15 cells, whereas it enhanced agonist-independent

Fig. 1. Association of the 5-HT₆R with GPRIN1 requires both the receptor C-terminal domain and G_s protein. (A) A simple interaction file was designed and imported in Cytoscape (v2.8.1) to graphically show the interactions between the 5-HT₆R and a network of proteins involved in the control of cytoskeletal dynamics.

GPRIN1 is highlighted in pink. ERK, extracellular signal-regulated kinase; PALM, paraelemen; DOCK3, dedicator of cytokinesis 3; WAVE1, WASP-family verprolin homologous protein 1; ARP2/3, actin-related protein 2/3; FYN, Fyn kinase. (B) Coimmunoprecipitation of the 5-HT₆R and GPRIN1 from the brain extracts of newborn 5-HT₆R-GFP KI mice. Western blots are representative of three independent experiments. IP, immunoprecipitation. (C) 5-HT₆R immunostaining (assessed with an anti-GFP antibody, cyan) and GPRIN1 immunostaining (magenta) in the striatum from neonatal 5-HT₆R-GFP KI mice. Scale bars, 5 μ m. a.u., arbitrary units. Right: Line graphs generated in ImageJ using the lines represented on the merged image highlight the colocalization of both proteins at the plasma membrane in cell bodies (top), but not primary cilia (bottom).

(D to H) NG108-15 cells were cotransfected with constructs encoding HA-tagged WT 5-HT₆R or the indicated 5-HT₆R mutants in the absence or presence of a GPRIN1 construct. (F and G) Cells were lysed 48 hours after transfection. (H) Cells were treated with 1 μ M SB271046 (SB; which was added 24 hours after transfection and incubated for 24 hours), and the cells were lysed 48 hours after transfection. 5-HT₆R proteins were immunoprecipitated with agarose-conjugated anti-HA antibodies. The presence of GPRIN1 (D and F to H) or Cdk5 (E) in the immunoprecipitated samples was assessed by Western blotting analysis. Western blots are representative of three independent experiments. Bar charts show densitometric analysis of the indicated bands and are means $\pm$ SEM of three experiments. ** P < 0.01, *** P < 0.001, and **** P < 0.0001 compared to cells expressing the 5-HT₆R alone and exposed to vehicle.

(I) BRET experiments measuring the interaction between the 5-HT₆R-YFP and Cdk5-RLuc in NG108-15 cells 24 (top) and 48 hours (bottom) after transfection. Data are from four experiments.



cAMP production 48 hours after transfection (Fig. 2A). These findings are consistent with our earlier immunoprecipitation experiments showing that the extent of the interaction between the receptor and GPRIN1 was greater 48 hours after transfection than at 24 hours after transfection. Further functional studies of the 5-HT₆R-GPRIN1 interaction were, thus, performed 48 hours after transfection. Consistent with a role for this interaction in the constitutive activity of the receptor, potentiation of 5-HT₆R-dependent cAMP production in cells coexpressing GPRIN1 was inhibited when the cells were treated with the TAT-Ct320-342 peptide (Fig. 2A). Moreover, the apparent affinity and efficacy of the inverse agonist SB271046 in inhibiting 5-HT₆R-dependent cAMP production were reduced in cells co-

expressing GPRIN1 (Fig. 2B), suggesting that the binding of GPRIN1 may stabilize the receptor in an active conformation that exhibits a reduced affinity for inverse agonists. When cells were treated with the 5-HT₆R agonist WAY181187, they produced similar amounts of cAMP irrespective of the presence or absence of GPRIN1 (Fig. 2B), suggesting that constitutive, but not agonist-dependent, cAMP production depended on the physical interaction of the receptor with GPRIN1 (Fig. 2B).

To further confirm that only the constitutive and not the agonist-dependent activity of the receptor was modulated by its interaction with GPRIN1, we engineered a 5-HT₆R mutated at a tryptophan residue in the sixth transmembrane domain of the receptor (W281A), because

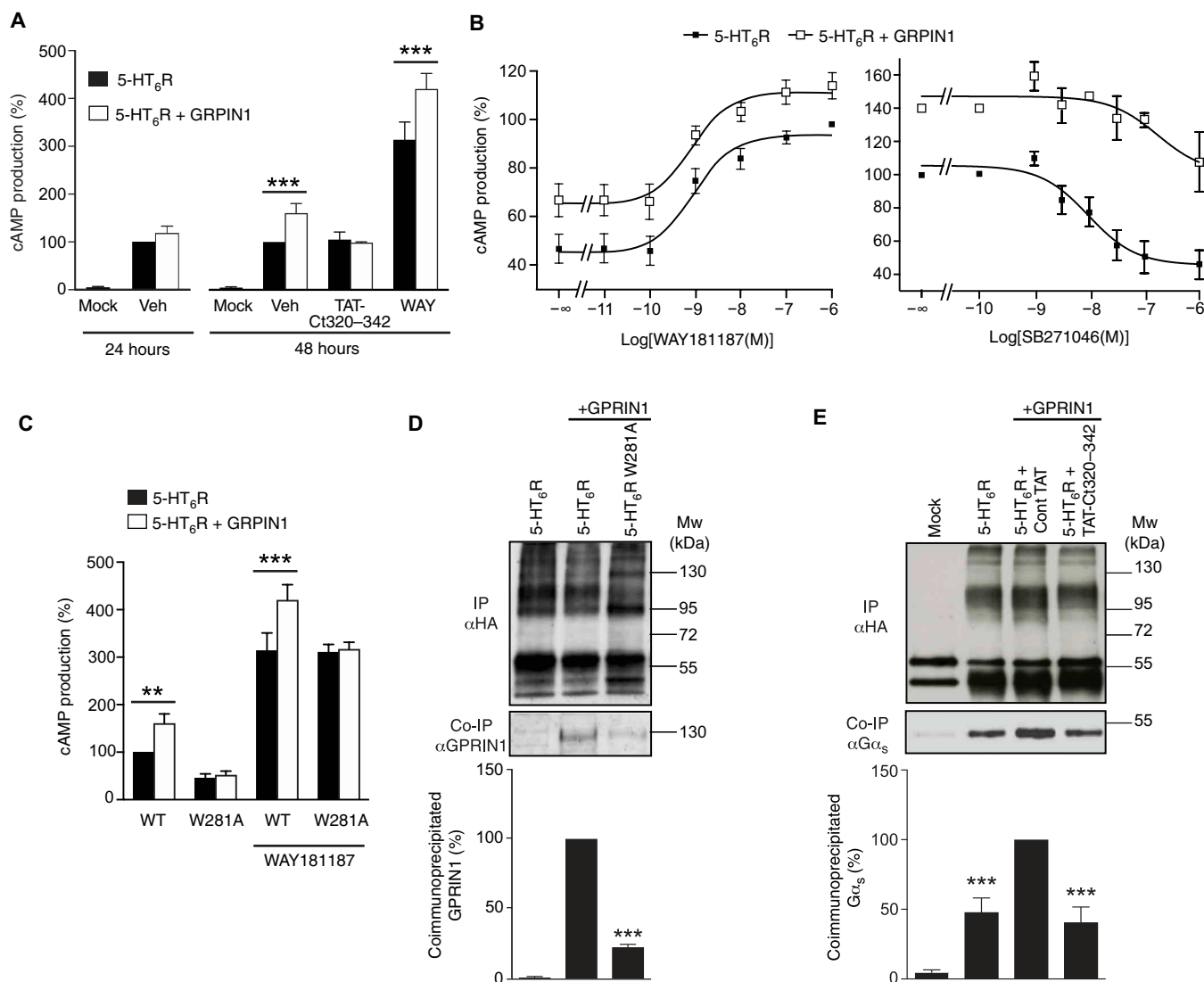


Fig. 2. GPRIN1 increases 5-HT₆R constitutive activity through G_s-cAMP signaling and promotes G_s binding to the receptor in NG108-15 cells. (A to C) The CAMY-EL cAMP signal was measured in NG108-15 cells transfected with constructs encoding the 5-HT₆R (WT or W281A mutant) alone or in combination with a GPRIN1 construct 24 (A) or 48 hours (B and C) after transfection. Cells were treated with the TAT-Ct320-342 peptide (10 μg, applied in the cell medium for 24 hours) or 1 μM WAY181187 for 5 min (A), or the indicated concentrations of either WAY181187 or SB271046 (B) or vehicle (C) for 5 min. (B) Left: Data were normalized to the amount of cAMP in cells that did not express GPRIN1 and were challenged with 1 μM WAY181187. Right: Data were normalized to the basal amount of cAMP in cells not expressing GPRIN1. Data are means ± SEM of values obtained from at least three independent experiments performed on different sets of cultured cells. ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001. (D and E) NG108-15 cells were transfected with constructs encoding either HA-tagged WT or W281A 5-HT₆R alone or in combination with the GPRIN1 construct and lysed 48 hours after transfection. (E) Cells were treated with control TAT peptide or TAT-Ct320-342 peptide (1 μM, added 24 hours after transfection to the culture medium and incubated for 24 hours). 5-HT₆R proteins were immunoprecipitated with agarose-conjugated anti-HA antibodies. The presence of GPRIN1 (D) or Gα_s (E) in the immunoprecipitated samples was assessed by Western blotting analysis. Western blots are representative of three independent experiments. Bar graphs show means ± SEM of immunoreactive signals measured in the three experiments. ****P* < 0.001 compared to cells coexpressing WT 5-HT₆R and GPRIN1 (D) and compared to cells coexpressing WT 5-HT₆R and GPRIN1 and exposed to the control TAT peptide (E).

previous studies indicate that the corresponding tryptophan residue in 5-HT₄R is essential for the constitutive activity of that receptor (42). As expected, the constitutive activity of the W281A mutant 5-HT₆R was reduced compared with that of the WT receptor, whereas the agonist-dependent activity was not affected (Fig. 2C). Furthermore, GPRIN1 was unable to potentiate the residual constitutive activity of the W281A mutant 5-HT₆R. Immunoprecipitation experiments showed that mutation of Trp²⁸¹ reduced the extent of the interaction between the receptor and GPRIN1 (Fig. 2D and fig. S2F),

suggesting that GPRIN1 may not only enhance the constitutive activity of the 5-HT₆R but also preferentially associate with the receptor when it is in its active conformational state.

The increase in the constitutive activity of the receptor could result either from the increased recruitment of activated G protein by the receptor in the presence of GPRIN1 or from an increase in abundance of the receptor at the plasma membrane. To discriminate between these two possibilities, we compared the membrane abundance of the receptor in NG108-15 cells in the presence or absence of GPRIN1.

We found no substantial difference in the membrane abundance of the receptor in either cell population (fig. S4). Furthermore, the amount of G_s protein that coimmunoprecipitated with the receptor was increased in the presence of GPRIN1, an effect that was prevented by treatment of the cells with the TAT-Ct320–342 peptide (Fig. 2E and fig. S2G). These results suggest that the GPRIN1-dependent increase in 5-HT₆R constitutive activity results from enhanced G_s signaling by the receptor rather than an increase in its abundance at the plasma membrane.

GPRIN1 enhances 5-HT₆R-dependent neurite elongation and branching in NG108-15 cells

We previously demonstrated that the 5-HT₆R induces the initiation of neurite growth in NG108-15 cells in a ligand- and cAMP-independent manner, through a Cdk5-Cdc42 pathway (20). Consistent with previous studies showing that GPRIN1 can also induce neurite growth (31–33), we sought to determine whether GPRIN1 promoted neurite growth in NG108-15 cells expressing the 5-HT₆R. Immunocytochemistry experiments with NG108-15 cells transfected with cDNAs encoding either GFP or the GFP-fused receptor, alone or in combination with GPRIN1, showed that 24 hours after transfection, coexpression of GPRIN1 did not further increase the length of neurites when compared with the length of neurites produced by cells expressing the receptor alone (Fig. 3A). Consistent with our previous findings, 5-HT₆R-dependent neurite growth was reduced when a dominant-negative mutant Cdk5 was coexpressed (Fig. 3A), suggesting that the initiation of neurite growth did not depend on the presence of GPRIN1 but required the kinase activity of Cdk5. In contrast, 48 hours after transfection, cells expressing both 5-HT₆R and GPRIN1 exhibited longer and more branched neurites than did cells expressing the receptor alone, as determined by immunocytochemistry and quantified by Sholl analysis (Fig. 3A). Furthermore, coexpression of the dominant-negative mutant Cdk5 did not affect the GPRIN1-induced increase in branching at that stage of neuronal differentiation, although a residual effect on neurite length was seen (Fig. 3B). This suggests that the branching of neurites does not require the activity of Cdk5 and is consistent with our results showing that Cdk5 does not interact with the receptor 48 hours after transfection.

Treating cells coexpressing 5-HT₆R and GPRIN1 with the TAT-Ct320–342 peptide or coexpressing the 5-HT₆R S350D mutant with GPRIN1 abolished the effect of GPRIN1 on both neurite extension and branching (Fig. 3, A and B, and fig. S3C), indicating that the growth-promoting effects of GPRIN1 depended on its physical interaction with the 5-HT₆R. Last, the constitutive activity of the receptor was also required, as shown by the lack of effect of GPRIN1 in cells cotransfected with the W281A mutant 5-HT₆R, which exhibits reduced constitutive activity compared with that of the WT receptor (Fig. 3, A and B). This latter result prompted us to explore whether the length of neurites in NG108-15 cells correlated with the abundance of cAMP; thus, we plotted the neurite length of cells as a function of the extent of 5-HT₆R constitutive activity. As expected, there was no correlation between these two factors in cells 24 hours after transfection, whereas 48 hours after transfection, neurite length positively correlated with the extent of constitutive activity of the 5-HT₆R (Fig. 3C). Further supporting the link between neurite growth, branching, and cAMP production resulting from the constitutive activity of the 5-HT₆R, neurite length and branching in NG108-15 cells coexpressing GPRIN1 with the mutant 5-HT₆R incapable of activating G proteins were reduced compared with those in cells coexpressing

GPRIN1 with the WT receptor (Fig. 3, D and E). Moreover, treating cells coexpressing the WT receptor with the 5-HT₆R antagonist SB271046, the membrane-permeable cAMP analog RpCAMP, or KT 5720 [both of which are inhibitors of cAMP-dependent protein kinase (PKA)] also prevented GPRIN1-dependent neurite growth and branching (Fig. 3, D and E), whereas none of these treatments affected neurite architecture in cells expressing the receptor alone. This finding suggests that neurite elongation and branching depend on the activation of PKA stimulated by agonist-independent, 5-HT₆R-dependent cAMP production, which itself requires the physical interaction of GPRIN1 with the receptor. Consistent with our previous study (20), there was no effect of the G protein coupling-defective triple receptor mutant or of treatment with RpCAMP on neurite length 24 hours after transfection (fig. S5).

The GPRIN1–5-HT₆R interaction promotes neurite elongation and branching in neurons

We next sought to determine whether the interaction between the native 5-HT₆R and GPRIN1 likewise promoted neurite elongation and branching in primary cultured neurons. We performed these experiments on striatal neurons, which express large amounts of 5-HT₆R density and GPRIN1 (Fig. 4). We first infected striatal neurons with lentiviruses encoding two different short hairpin RNAs (shRNAs) directed against GPRIN1. Both shRNAs led to a nearly total loss of GPRIN1 protein detection by Western blotting (Fig. 4A). Furthermore, knocking down GPRIN1 statistically significantly decreased both neurite length and the complexity of mature striatal neurons (Fig. 4B), as assessed by Sholl analysis on neurons grown for 13 days in vitro (DIV), reminiscent of what was observed in transfected NG108-15 cells. We next exposed striatal neurons to the TAT-Ct320–342 peptide to disrupt the interaction between GPRIN1 and 5-HT₆R. This treatment resulted in a marked decrease in neurite length and complexity as compared with neurons treated with a control TAT peptide (Fig. 4C), suggesting that the interaction between endogenous GPRIN1 and 5-HT₆R is necessary to promote neurite growth and branching in striatal neurons. We then compared, from DIV 1 to DIV 4, the neurite length of neurons treated with either the TAT-Ct320–342 peptide or the control TAT peptide. We found a statistically significant reduction in neurite length as early as DIV 2 in neurons exposed to the TAT-Ct320–342 peptide, and this reduction was further enhanced at DIVs 3 and 4 (fig. S6A). Last, reminiscent of the observations made in NG108-15 cells, neurons treated with RpCAMP also showed a marked decrease in neurite length measured at DIV 4 (fig. S6B).

DISCUSSION

Studies have demonstrated that the 5-HT₆R plays crucial roles in both the correct migration and positioning of neurons, as well as in the initiation of neurite growth (19, 20, 43). These effects, which are mostly independent of the canonical G_s -cAMP pathway, prompted the use of unbiased interactomics studies to identify previously uncharacterized signaling proteins recruited by the receptor and alternative signaling pathways underlying its control of neurodevelopmental processes. These studies revealed that Cdk5 binds to the C-terminal domain of the receptor to promote neurite growth initiation through an agonist-independent mechanism involving the phosphorylation of Ser³⁵⁰ in the receptor, which in turn leads to activation of the small GTPase (guanosine triphosphatase) Cdc42 (Fig. 5) (20). Here, we

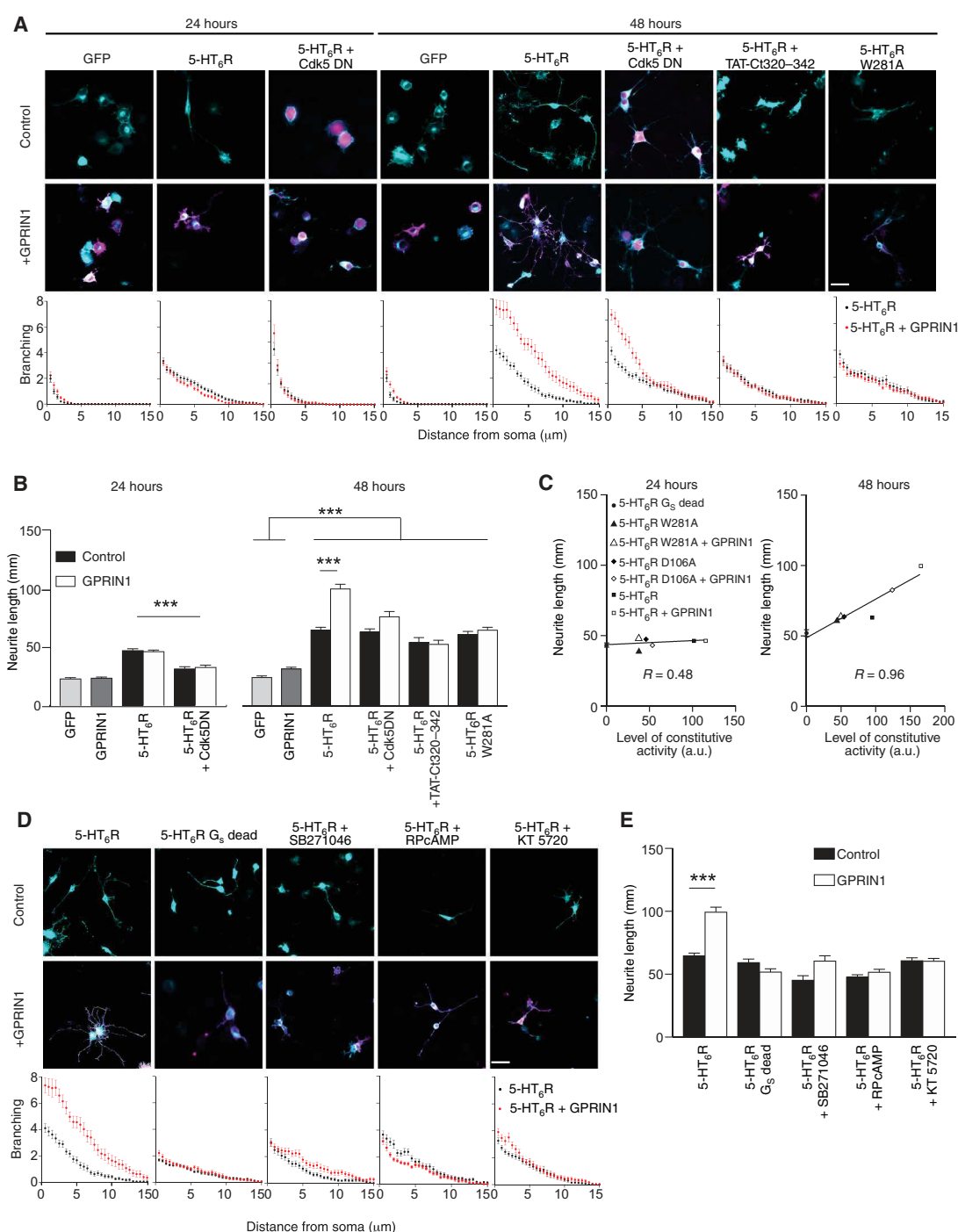
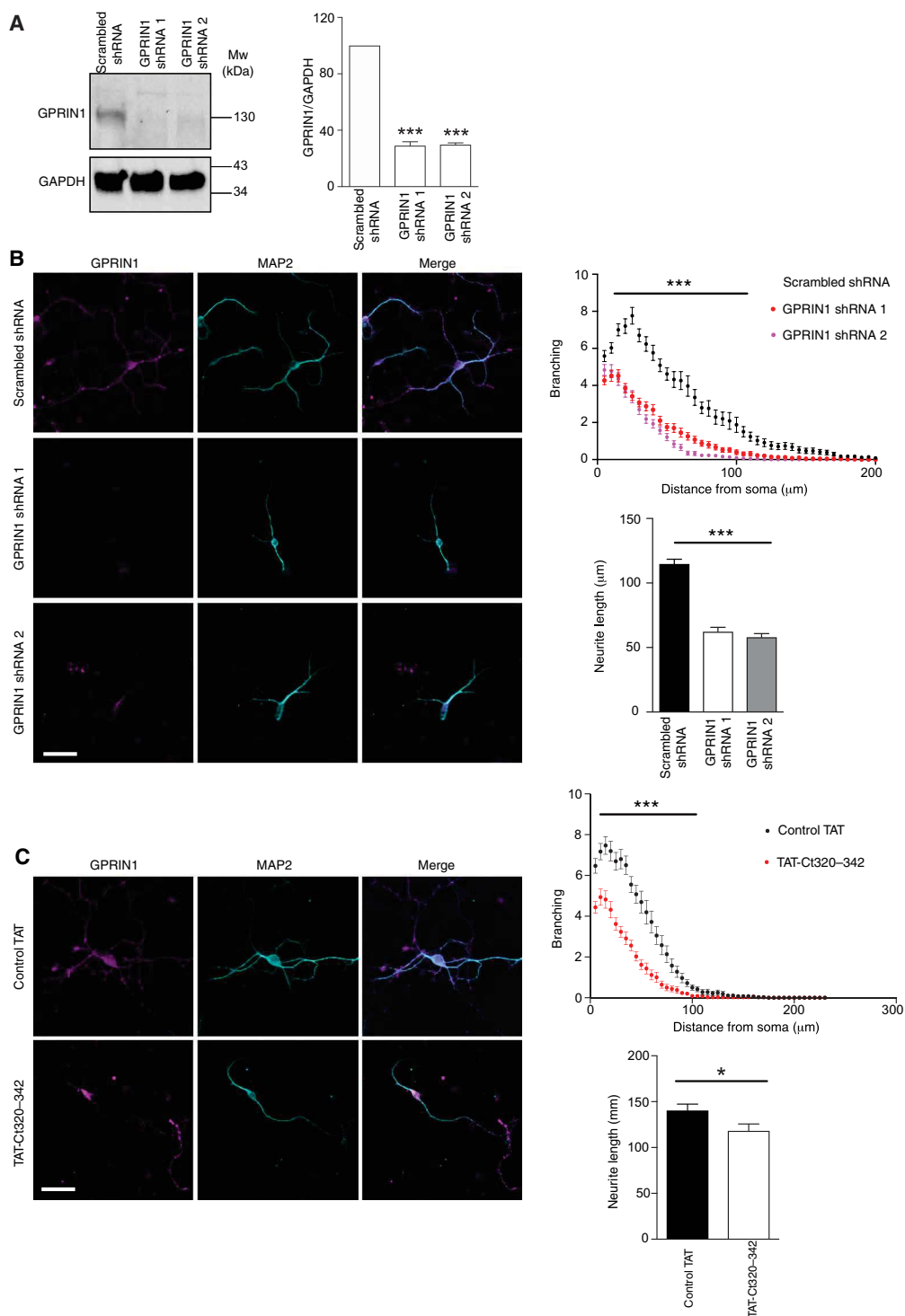


Fig. 3. GPRIN1 interaction with the 5-HT₆R promotes neurite growth and branching in a PKA-dependent manner in NG108-15 cells. (A) NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding GFP or YFP-tagged WT or W281A 5-HT₆R alone or in combination with constructs encoding a dominant-negative Cdk5 mutant (Cdk5-DN; top) or GPRIN1 (bottom). GFP or receptor labeling is shown in cyan; GPRIN labeling is shown in magenta. Where indicated, cells were treated for 24 hours with the TAT-Ct320–342 peptide (1 μM). The images show fields representative of three independent experiments performed on different cultures. Scale bar, 50 μm. The graphs represent the branching index, measured as the number of intersections between dendrites and an overlaid concentric sphere, as a function of the distance from the soma. (B) Histogram showing the quantification of neurite length (μm) in NG108-15 cells expressing the corresponding constructs and that were left untreated or were incubated with the TAT-Ct320–342 peptide. At least 300 neurites were analyzed per condition. ****P* < 0.001. (C) Correlation plots between neurite length and basal cAMP amounts in NG108-15 measured either 24 (left) or 48 hours (right) after transfection of the cells with the indicated constructs. (D) NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding YFP-tagged WT 5-HT₆R or a mutant receptor incapable of coupling to G protein (G_s dead) alone or in combination with the GPRIN1 construct. Cells expressing the WT receptor were treated for 24 hours with 1 μM SB271046, 25 μM RpCAMP, or 2 μM KT 5720. Cells were lysed 48 hours after transfection. Representative fields of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are shown. Scale bar, 50 μm. The graphs represent the branching index, which was measured as described in (A). (E) The histogram shows the quantification of neurite length in the indicated conditions, which were from the experiments shown in (D). ****P* < 0.001.

Fig. 4. Interaction between endogenous 5-HT₆R and GPRIN1 promotes neurite extension and the branching of striatal neurons. (A) Knockdown of GPRIN1 after infection of cultured mouse striatal neurons at DIV 4 by a virus expressing either control or two different GPRIN1-specific shRNAs. The neurons were lysed at DIV 13, and GPRIN1 was detected by Western blotting analysis. The bar graph shows the mean $\pm$ SEM of the GPRIN1 immunoreactive signal [normalized to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunoreactive signal] in each condition. *** P < 0.001 compared to neurons expressing the scrambled shRNA. (B) Neurons were infected with either control (top) or GPRIN1-specific (middle and bottom) shRNAs. Neurons were fixed at DIV 13. GPRIN1 immunoreactivity is shown in magenta, and MAP2 immunoreactivity in cyan. Scale bar, 5 μ m. The graph shows the measurement of neurite branching, as assessed by the Sholl analysis. The bar graph shows neurite length for neurons infected with control (black bar) or GPRIN1-specific shRNAs (white and gray bars). For both branching and neurite length, data are means $\pm$ SEM of three independent experiments performed from different sets of cultured neurons with at least 300 neurites measured per conditions. *** P < 0.001. (C) Neurons were treated with either the control TAT peptide (top) or the TAT-Ct320–342 peptide (1 μ M, added to cultures at DIV 4; bottom), and fixed at DIV 13. GPRIN1 is shown in magenta, and MAP2 in cyan. Neurite branching and length were determined and plotted as described in (B). * P < 0.05.



showed that the 5-HT₆R C-terminal domain also recruited GPRIN1, a Cdk5 substrate initially identified in a cDNA bank screen designed to find previously uncharacterized partners of α subunits (30, 44). Two other variants (GPRIN2 and GPRIN3) have been described, but only GPRIN1 was identified in the 5-HT₆R interactome. GPRIN1 is mainly found in the central nervous system, where it is expressed by neurons but not glial cells. Its expression is high during embryonic development, with a peak at E16.5. It is still found in the adult brain, but only in the hippocampus, ventral striatum, and some cortical regions (34), which greatly overlaps with the expression pattern of the 5-HT₆R. Corroborating these observations, we found that the receptor forms a complex with GPRIN1 in mouse brain at the neonatal stage, a critical period for neuronal differentiation and wiring of neuronal networks (45). At that stage of neural development, receptors are found not only in the primary cilium, as previously described (36, 39, 46), but also in the soma of neurons, where they are mainly detected at the plasma membrane.

However, we did not detect GPRIN1 in primary cilia, suggesting that only the receptor pool found outside the cilium is engaged in complexes with GPRIN1.

The GPRIN1 association with the 5-HT₆R, which occurred in the absence of agonist, was reduced in cells treated with the 5-HT₆R antagonist SB271046, which acted as an inverse agonist toward receptor-stimulated G_s-cAMP signaling (Fig. 2A). These results suggest that the 5-HT₆R–GPRIN1 interaction is dynamically

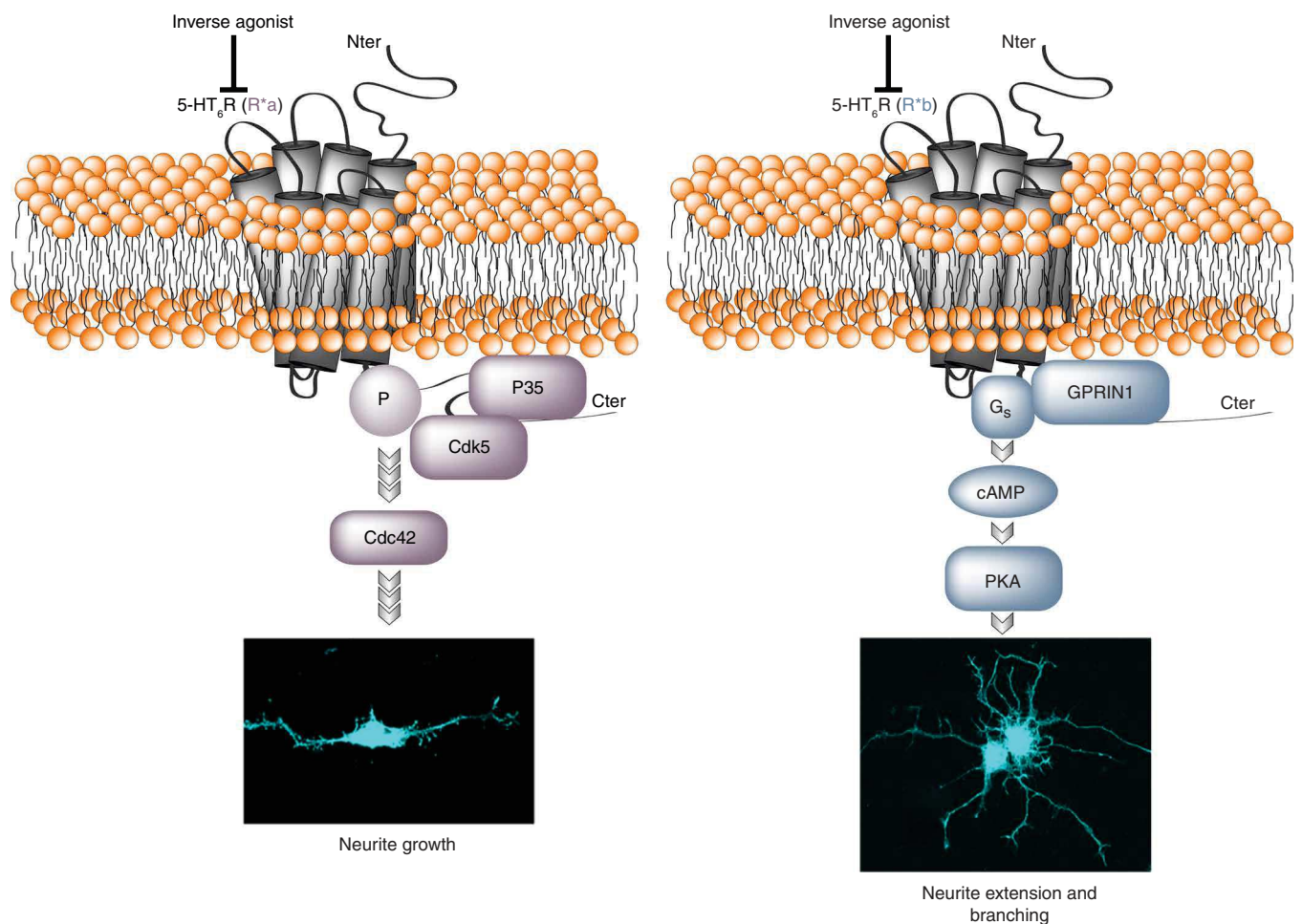


Fig. 5. Schematic representation of the sequential interaction between the 5-HT₆R and either Cdk5 or GPRIN1 and its consequence on agonist-independent 5-HT₆R-stimulated signaling. Association of the 5-HT₆R with Cdk5 results in receptor phosphorylation on a serine residue located in the receptor C-terminal (Cter) domain, a necessary step in the agonist-independent, receptor-mediated activation of Cdc42 signaling and initiation of neurite outgrowth (left), whereas the association of the receptor with GPRIN1 promotes the recruitment of activated G_s and neurite extension and branching through an agonist-independent, PKA-dependent mechanism (right). Nter, N-terminal. The application of an inverse agonist inhibits both pathways, indicating that these are dependent on the receptor's constitutive activity.

regulated by the conformational state of the receptor and that a specific receptor conformation in the absence of ligand is favorable for GPRIN1 recruitment. Consistent with this hypothesis, mutating a tryptophan residue essential for 5-HT₆R constitutive activity to an alanine reduced the interaction between the receptor and GPRIN1.

GPRIN1 not only associated with the 5-HT₆R in its active conformation but also enhanced the constitutive activity of the receptor leading to G_s signaling (Figs. 1G and 2, A and B). Furthermore, we showed that GPRIN1 promoted the recruitment of G_s protein by 5-HT₆R (Fig. 2E). Previous studies showed that GPRIN1 preferentially interacts with activated G_s proteins of the G_{i/o} subfamily (35). Assuming that GPRIN1 likewise associates with activated G_s, we hypothesize that GPRIN1 favors the recruitment of G_s by active receptor conformations, resulting in the formation of a ternary complex comprising 5-HT₆R, GPRIN1, and active G_s, thus promoting receptor constitutive activity. Alternatively, the association of GPRIN1 with the 5-HT₆R might induce a conformational change in the receptor toward a more active state exhibiting a higher level of constitutive activity through G_s signaling.

Together, our current and previous findings (20) demonstrate a high level of 5-HT₆R constitutive activity toward both canonical G_s signaling and G protein-independent signaling, which depends on allosteric modulations by interacting proteins. To our knowledge, these data provide one of the few examples of the modulation of the constitutive activity of a GPCR by GIPs. Other examples are the constitutive activity of type I metabotropic glutamate receptors (mGluRs), which can be modulated by Homer proteins, and the constitutive activity of the ghrelin receptor growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR1a), which can be regulated by the melanocortin receptor accessory protein subunit 2 (MRAP2) (47, 48). However, in contrast to our current findings, the association of Homer3 with the C-terminal domain of mGluR1 or mGluR5 prevents rather than promotes the constitutive activity of either receptor, whereas the expression of the short, inducible form of Homer (Homer1a) results, indirectly through the disruption of mGluR1- or mGluR5-Homer3 complexes, in the enhanced constitutive activity of mGluR1 or mGluR5. In the case of GHSR1a, the interaction with MRAP2 results in biased signaling, enhancing receptor signaling through G_q, while blocking both its constitutive activity and the recruitment of

β -arrestin. Our data also suggest that constitutive 5-HT₆R activation can result from different mechanisms depending on the nature of the associated GIP: Agonist-independent engagement of Cdk5-Cdc42 signaling depends on receptor phosphorylation at Ser³⁵⁰ by receptor-associated Cdk5, whereas the activation of G_s signaling by GPRIN1 might result from an enhanced recruitment of activated G α_s or a switch to a more active conformational state of the receptor.

The interactions of 5-HT₆R with Cdk5 and GPRIN1 seem to occur sequentially to facilitate a fine temporal regulation of key neurodevelopmental processes (Fig. 5). Previous studies showed that the agonist-independent activation of Cdk5 by 5-HT₆R early during brain development is essential for the normal positioning of cortical neurons, indicating a fine control of the migration process (19, 43). Beyond migration, the association of 5-HT₆R with Cdk5 also promoted the initiation of neurite growth (20), which is consistent with previous studies performed in pheochromocytoma (PC12) cells, for which the initiation of neurite growth is cAMP independent (49). At a later stage of neuronal differentiation, the 5-HT₆R might associate with GPRIN1 to induce neurite elongation and branching. This sequential association of 5-HT₆R with Cdk5 and GPRIN1, initially established in transfected NG108-15 cells, likely occurs between native proteins in primary neurons. Inhibiting agonist-independent activation of Cdk5/Cdc42 signaling induced by the 5-HT₆R prevented the initiation of neurite growth measured during the first 24 hours after neuron seeding, whereas knockdown of GPRIN1 or disruption of the 5-HT₆R–GPRIN1 interaction at later stage of neuronal differentiation (between 2 and 13 days after plating) prevented further neurite elongation and branching. These findings provide an example of functionally relevant dynamic interactions between a GPCR and several GIPs. The cellular mechanisms underlying the sequential interaction of 5-HT₆R with Cdk5 and GPRIN1 remain to be elucidated. As previously mentioned, Cdk5-mediated initiation of neurite growth depends on the phosphorylation of the 5-HT₆R on Ser³⁵⁰ by associated Cdk5. We also identified in the 5-HT₆R interactome the protein phosphatase PP2A, which dephosphorylates Cdk5 targets (50). Because PKA can phosphorylate and activate PP2A (51), we hypothesize that constitutively active 5-HT₆R might promote the activation of PP2A through PKA, leading to the dephosphorylation of Ser³⁵⁰ and the release of Cdk5, thus facilitating interaction with GPRIN1. The 5-HT₆R might also interact with either Cdk5 or GPRIN1 depending on their respective subcellular localization. Because both 5-HT₆R and Cdk5 activation increase ciliary length, one can speculate that the formation of 5-HT₆R–Cdk5 complexes occurs in the primary cilium or cellular compartments involved in primary cilium morphogenesis (for example, the distal centriole appendages), whereas GPRIN1 associates with receptors located in the soma of neurons.

A viable GPRIN1 knockout (KO) mouse model has been described. Cultured neurons from GPRIN1 KO mice show reduced firing activity compared with neurons from WT mice, and adult GPRIN1 KO mice display altered learning performance (52), a phenotype possibly reflecting defects in neurite growth and early neuronal network shaping. Although initial studies showed the ability of GPRIN1 bound to activated G $\alpha_{i/o}$ proteins to promote neurite growth through the activation of Cdc42 (33, 35), our data together with previously published results suggest that its neurite growth-promoting effects tightly depend on its interaction with membrane receptors (31–33). Only the coexpression of GPRIN1 and 5-HT₆R induced a substantial effect upon neurite elongation and branching in NG108-15 cells, whereas

expression of GPRIN1 alone only induced a marginal effect upon neurite growth. Similarly, the association of GPRIN1 with the μ -opioid receptor (MOR) potentiates receptor-mediated neurite growth by targeting MOR tethered with activated G α_i to lipid rafts (31), whereas the interaction of GPRIN1 with the $\alpha 7$ nicotinic receptor targets the receptor to growth cones and increases its plasma membrane localization, which results in longer and more complex neurites (31). The signaling mechanisms underlying neurite growth under the control of GPRIN1 might also depend on the nature of the receptor with which GPRIN1 is associated. Whereas neurite growth under the control of the $\alpha 7$ -GPRIN1 complex seems to involve a Ca²⁺/CaM-kinase II/phosphatase 2B pathway (32), the 5-HT₆R–GPRIN1 complex promotes neurite elongation and branching through a cAMP- and PKA-dependent mechanism.

In conclusion, our study provides an example of dynamic associations between a GPCR and several of its GIPs to ensure highly coordinated cellular processes such as the growth initiation, extension, and branching of neurites. These findings further highlight the allosteric properties of GPCRs, which can adopt many active and physiologically relevant conformations, some of them being stabilized upon interaction with GIPs in the absence of orthosteric agonists.

MATERIALS AND METHODS

Animals

5-HT₆^{GFP/GFP} KI mice (29) were generated at the Institut Clinique de la Souris (Illkirch-Graffenstaden, France) and were used for GFP-TRAP and immunohistochemistry experiments. Primary cultures of neurons were realized from OF1 (Oncins-France 1) mouse embryos originating from Charles River. Procedures were performed in strict compliance with the animal use and care guidelines of Montpellier University (authorization D34-172-4).

Plasmids, chemicals, and antibodies

The human hemagglutinin (HA)-tagged WT 5-HT₆R construct was previously described (25, 53). The human YFP-tagged 5-HT₆R construct was provided by S. Morisset (Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, France). 5-HT₆R mutants were generated by site-directed mutagenesis and assessed by sequencing. Plasmid encoding human GPRIN1 was purchased from Sigma-Aldrich, and the peGFPc1 plasmid was from Clontech. The viral constructs encoding two different shRNAs directed against GPRIN1, subcloned into the pLKO vector, were obtained from Sigma-Aldrich, and pLKO enhanced GFP (eGFP) was obtained from the virus production platform of Montpellier (PVM, BioCampus, Montpellier, France). Viral particles were produced by the PVM platform. The agarose-conjugated anti-HA antibody (clone no. HA-7) was purchased from Sigma-Aldrich, GFP-TRAP beads were from Chromotek, the rabbit anti-GPRIN1 antibody was from Proteintech (ref 13771-1-AP), the rabbit anti-G α_s antibody was from Calbiochem (ref 371732), the rat anti-HA antibody (clone 3F10) was from Roche, the mouse anti-MAP2 (microtubule-associated protein 2) antibody (clone [HM2], ref ab11267) was from Abcam, and the mouse anti-Arl13b (clone N295B/66, ref 75-287) was from Antibodies Incorporated. For GFP labeling, we used the chicken polyclonal anti-GFP antibody (A10262, ref 10524234) from Thermo Fisher Scientific or the rabbit polyclonal anti-GFP antibody (ref PABG1) from Chromotek. WAY181187, SB271046 hydrochloride, KT 5720, and cAMPs-Rp triethylammonium salt were purchased from Tocris Biosciences. Coelenterazine h (used for

BRET experiments) was purchased from Nanolight Technology (ref 50909-86-9). The CAMYEL probe and the derivatized benzyl guanine labeled with europium cryptate (BG-K) or d2 (BG-d2) as acceptor were provided by the pharmacological screening facility (ARPEGE, BioCampus, Montpellier, France). Interfering peptides (>90% purity) were purchased from GenScript. Peptide sequences were as follows: TAT-Ct320–342 peptide: YGRKKRRQRRRPLFM-RDFKRALGRFLPCPRCPR; TAT control peptide: GRKKRRQRR-RRPCRPCPLFRGLARKFDRMFLP.

Cell culture, transfection, and treatments

NG108-15 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum (FBS), 2% hypoxanthine/aminopterin/thymidine (Life Technologies), and antibiotics. Cells were transfected in suspension using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) with plasmids encoding GFP, WT, or mutant HA-5-HT₆Rs with or without the plasmid encoding GPRIN1. After transfection, cells were maintained in DMEM supplemented with 2% dialyzed FBS and treated as indicated in the figure legends either 5 or 24 hours after transfection. The cells were used either 24 or 48 hours after transfection for all experiments. Primary cultures of striatal neurons were prepared from E15.5 OF1 mouse embryos. Striata were dissociated by manual trituration, and cells were plated onto polyornithine- and laminin-coated 12-mm glass coverslips in 24-well plates. Cultures were maintained in Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 ml of B27 supplement (Gibco, ref 17504-044), 0.2 mM GlutaMAX, with 0.2 mM glutamine and penicillin (100 U)/streptomycin (100 µg) and kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For branching experiments, neurons were transfected at DIV 1 with cDNA encoding GFP to visualize dendritic trees, treated at DIV 4 as indicated in the figure legends, and fixed at DIV 13.

Immunocytochemistry and morphological analyses

NG108-15 cells or neurons, grown on coated glass coverslips, were fixed in paraformaldehyde (PFA; 4% for 10 min for NG108-15 cells and 2% for 15 min for neurons). Cells were then successively incubated with primary antibodies (mouse anti-MAP2, 1:1000; rabbit anti-GPRIN1, 1:500; or rat anti-HA, 1:1000) and with secondary antibodies (Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse or Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit, 1:1000). For labeling of the 5-HT₆R in cultured neurons, tyramide amplification of the signal given by the rabbit polyclonal antibody (1:1000) was performed using the Invitrogen Alexa Fluor 488 Tyramide SuperBoost Kit (ref 15631902) according to the manufacturer's protocol. Coverslips were mounted in Mowiol. Images were captured with an Axio Imager Z1 microscope equipped with epifluorescence (Zeiss), using a 20× objective. Neurites were detected on the basis of MAP2 staining or GFP expression. Neurite length was measured using the NeuronJ plugin of ImageJ software. A minimum of 15 fields of cells originating from three independent cultures were analyzed per condition. Branching was assessed using a semiautomated Sholl analysis with 5-µm ring intervals starting at 5 µm from the soma (SynD, MATLAB). A minimum of 45 cells originating from three independent cultures were analyzed for each condition.

Immunohistochemistry on brain slices

Mice were rapidly anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered sodium (PBS; pH 7.5). Brains

were then fixed in 4% PFA diluted in PBS for 24 hours at 4°C and then incubated successively in 10, 20, and 30% (w/v) sucrose diluted in PBS for cryoprotection. Sixteen-micrometer-thick sections were cut with a cryostat (Leica), deposited directly on slides, and stored at –80°C until use. For immunolabeling experiments, sections were thawed at room temperature and rehydrated for 15 min in PBS. Sections were blocked for 2 hours in PBS containing 0.2% (v/v) Triton X-100, 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA; A2153, Sigma-Aldrich), and then incubated overnight at room temperature in primary antibody solution containing 1:1000 anti-GFP from chicken (A10262, Invitrogen) and 1:500 anti-GPRIN1 from rabbit (13771-1-AP, Proteintech) in PBS, 0.2% Triton X-100, 1% BSA. Sections were then washed three times for 30 min each in PBS and incubated with Alexa Fluor 488-coupled goat anti-chicken and Cy3-coupled goat anti-rabbit secondary antibodies (1:1000) for 2 hours at room temperature. Sections were washed three times for 30 min each in PBS, dried, and mounted in DPX mountant (Sigma-Aldrich, ref 06522). Images were acquired with a Leica SP8 confocal microscope equipped with an oil-immersed 63× objective, with a 2048 × 2048 resolution (excitation lasers, 488 and 561 nm; acquisition filters, 500 to 539 and 572 to 617 nm, respectively).

Immunoprecipitation experiments

Whole brains from newborn mice were washed in PBS and homogenized by potterization. The samples were centrifuged at 3000g for 10 min at 4°C. Pellets were resuspended in solubilization buffer containing 10 mM tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.4% dodecyl maltoside, 0.5% Triton X-100, and a protease cocktail inhibitor (Roche). Samples were left to solubilize at 4°C for 4 hours and then were centrifuged for 30 min at 13,000g at 4°C. Protein concentration was measured using a bicinchoninic assay (BCA, Sigma-Aldrich), and solubilized proteins were used for GFP-TRAP assays (Chromotek). Transfected NG108-15 cells were lysed in a solubilization buffer containing 20 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, dodecyl maltoside (4 mg/ml), phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium pyrophosphate, and 50 mM β-glycerophosphate), and a protease inhibitor cocktail (Roche) for 1 hour at 4°C. Samples were centrifuged at 15,000g for 15 min at 4°C, and supernatants containing solubilized proteins were used for immunoprecipitation. Solubilized proteins (1 mg per condition) were incubated either with agarose-conjugated anti-HA antibody or GFP-TRAP beads overnight at 4°C. The beads were washed five times with lysis buffer for anti-HA beads or with a washing buffer specified by the manufacturer protocol for GFP-TRAP beads [10 mM tris/Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.5 mM EDTA]. Immunoprecipitated proteins were then eluted in Laemmli sample buffer and analyzed by Western blotting.

Western blotting analysis

Proteins were separated on 10% polyacrylamide gels and then were transferred to Hybond C nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were first incubated with the appropriate primary antibodies (rabbit anti-GPRIN1, 1:500; rabbit anti-Gα_s, 1:500; rat anti-HA, 1:1000) and then with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rat or anti-rabbit secondary antibodies (1:5000; GE Healthcare). Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence method (ECL plus detection reagent, GE Healthcare) and imaged with a ChemiDoc system (Bio-Rad). Immunoreactive bands were quantified by densitometry using Image Lab software (Bio-Rad).

BRET experiments

NG108-15 cells were transfected in white 96-well microplates (Greiner) with a fixed amount of Cdk5-RLuc (Renilla-luciferin 2-monooxygenase) plasmid and an increasing concentration of 5-HT₆R-YFP construct (from 0 to 20 ng per well). The BRET signal from each plate was first analyzed 24 hours after the transfection and then again at 48 hours. We collected BRET measurements 2 min after the addition of the luciferase substrate coelenterazine h at a final concentration of 5 μ M. Luminescence and fluorescence were detected with the Mithras LB 940 Multireader (Berthold), which enables the sequential integration of luminescence signals detected with two filter settings (RLuc filter, 485 $\pm$ 10 nm; YFP filter, 530 $\pm$ 12 nm). Emission signals at 530 nm were divided by emission signals at 485 nm. The BRET ratio was defined as the difference between the emission ratio obtained with cotransfected RLuc and YFP fusion proteins and that obtained with the RLuc fusion protein alone. The results were expressed in millibRET units (mBU; with 1 mBU corresponding to the BRET ratio values multiplied by 1000). Total fluorescence and luminescence were used as relative measures of total amounts of the YFP- and RLuc-tagged proteins, respectively. BRET signals were plotted as a function of the ratio between total fluorescence and total luminescence ratio.

cAMP measurements

cAMP measurement was performed in NG108-15 cells transiently expressing 5-HT₆R using the BRET sensor for cAMP, CAMYEL (cAMP sensor using YFP-Epac-RLuc) (41). NG108-15 cells were cotransfected in suspension with the 5-HT₆R and CAMYEL constructs using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol and plated in white 96-well plates (Greiner) at a density of 80,000 cells per well. Twenty-four hours after transfection, the cells were washed with PBS containing calcium chloride and magnesium chloride (Gibco, ref 14040-091). Coelenterazine h was added at a final concentration of 5 μ M. Plates were incubated at room temperature for 5 min before BRET measurements. BRET was measured using a Mithras LB 940 plate reader. Expression of 5-HT₆R in NG108-15 cells induced a decrease in the CAMYEL BRET signal compared to that in cells transfected with an empty vector. This decrease in CAMYEL BRET signal was used as an index of 5-HT₆R constitutive activity through G_s signaling.

Measurement of cell surface 5-HT₆R by time-resolved-fluorescence resonance energy transfer

These experiments were performed as described previously (54). NG108-15 cells were transfected with plasmid encoding a soluble NSF attachment protein (SNAP)-tagged 5-HT₆R with or without plasmid encoding GPRIN1 or were transfected with an empty plasmid. Forty-eight hours after transfection, the cells were plated in a Greiner CELLSTAR 96-well plate (at 50,000 cells per well) and washed with PBS supplemented with calcium chloride and magnesium chloride (Gibco, ref 14040-091). The cells were then labeled with derivatized benzyl guanine (BG-K or BG-d2) for 1 hour at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After labeling, the cells were washed four times with PBS. The emission signal from the cryptate was recorded at 620 nm on a time-resolved fluorimeter (RUBYstar, BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France) after excitation at 337 nm by a nitrogen laser, and the emission signal from the d2 was recorded at 682 nm on an Analyst reader (Molecular Devices) using a 640-nm excitation. The specific fluorescence signal was determined by sub-

tracting the nonspecific signal in mock-transfected cells from the total fluorescence signal in the cells expressing the SNAP-tagged 5-HT₆R.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 4 (GraphPad Software Inc.). For two-sample and multiple comparisons (Western blots, cAMP production, and neurite length measurements), the unpaired Student's *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparisons test were used, respectively. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test was used to evaluate significance of the Sholl analysis. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant. Correlation between neurite length and the extent of 5-HT₆R constitutive activity in NG108-15 cells was evaluated 24 and 48 hours after transfection by linear regression analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

stke.sciencemag.org/cgi/content/full/13/618/eaax9520/DC1

Fig. S1. 5-HT₆R and GPRIN1 are colocalized at the soma plasma membrane of striatal and cortical neurons, but not in primary cilia.

Fig. S2. Analysis of cell lysates used for immunoprecipitation experiments.

Fig. S3. Effect of the phosphorylation of 5-HT₆R Ser³⁵⁰ on its interaction with GPRIN1 and neurite morphology.

Fig. S4. Effect of GPRIN1 coexpression with the 5-HT₆R on receptor cell surface expression in NG108-15 cells.

Fig. S5. GPRIN1 selectively affects the late stage of neurite growth in NG108-15 cells.

Fig. S6. The interaction between endogenous 5-HT₆R and GPRIN1 promotes neurite extension through a cAMP-dependent mechanism in striatal neurons.

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. S. K. Shenoy, R. J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptor signaling through β -arrestin. *Sci. STKE* **2005**, cm10 (2005).
2. J. Bockaert, L. Fagni, A. Dumuis, P. Marin, GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol. Ther.* **103**, 203–221 (2004).
3. J. Bockaert, J. Perroy, C. Bécamel, P. Marin, L. Fagni, GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 89–109 (2010).
4. A. C. Magalhaes, H. Dunn, S. S. G. Ferguson, Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 1717–1736 (2012).
5. S. L. Ritter, R. A. Hall, Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 819–830 (2009).
6. J. Bockaert, P. Marin, A. Dumuis, L. Fagni, The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: An anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**, 65–72 (2003).
7. J. Bockaert, G. Roussignol, C. Bécamel, S. Gavarini, L. Joubert, A. Dumuis, L. Fagni, P. Marin, GPCR-interacting proteins (GIPs): Nature and functions. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 851–855 (2004).
8. C. Gérard, M.-P. Martres, K. Lefevre, M.-C. Miquel, D. Vergé, L. Lanfumey, E. Doucet, M. Hamon, S. El Mestikawy, Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res.* **746**, 207–219 (1997).
9. L. Helboe, J. Egebjerg, I. E. M. de Jong, Distribution of serotonin receptor 5-HT₆ mRNA in rat neuronal subpopulations: A double in situ hybridization study. *Neuroscience* **310**, 442–454 (2015).
10. A. M. Kinsey, A. Wainwright, R. Heavens, D. J. S. Sirinathsinghji, K. R. Oliver, Distribution of 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor mRNAs in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **88**, 194–198 (2001).
11. F. J. Monsma Jr., Y. Shen, R. P. Ward, M. W. Hamblin, D. R. Sibley, Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol. Pharmacol.* **43**, 320–327 (1993).
12. M. Ruat, E. Traiffort, J. M. Arrang, J. Tardivel-Lacombe, J. Diaz, R. Leurs, J. C. Schwartz, A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: Molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 268–276 (1993).
13. X. Codony, J. M. Vela, M. J. Ramirez, 5-HT₆ receptor and cognition. *Curr. Opin. Pharmacol.* **11**, 94–100 (2011).

14. G. Maher-Edwards, R. Dixon, J. Hunter, M. Gold, G. Hopton, G. Jacobs, J. Hunter, P. Williams, SB-742457 and donepezil in Alzheimer disease: A randomized, placebo-controlled study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **26**, 536–544 (2011).
15. G. Maher-Edwards, C. Watson, J. Ascher, C. Barnett, D. Boswell, J. Davies, M. Fernandez, A. Kurz, O. Zanetti, B. Safirstein, J. P. Schronen, M. Zvartau-Hind, M. Gold, Two randomized controlled trials of SB742457 in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **1**, 23–36 (2015).
16. G. Maher-Edwards, M. Zvartau-Hind, A. J. Hunter, M. Gold, G. Hopton, G. Jacobs, M. Davy, P. Williams, Double-blind, controlled phase II study of a 5-HT₆ receptor antagonist, SB-742457, in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 374–385 (2010).
17. D. Wilkinson, K. Windfeld, E. Colding-Jorgensen, Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol.* **13**, 1092–1099 (2014).
18. A. Atri, L. Frölich, C. Ballard, P. N. Tariot, J. L. Molinuevo, N. Boneva, K. Windfeld, L. L. Raket, J. L. Cummings, Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease: Three randomized clinical trials. *JAMA* **319**, 130–142 (2018).
19. M. Jacobshagen, M. Niquille, S. Chaumont-Dubel, P. Marin, A. Dayer, The serotonin 6 receptor controls neuronal migration during corticogenesis via a ligand-independent Cdk5-dependent mechanism. *Development* **141**, 3370–3377 (2014).
20. F. Duhr, P. Deléris, F. Raynaud, M. Séveno, S. Morisset-Lopez, C. Mannoury la Cour, M. J. Millan, J. Bockaert, P. Marin, S. Chaumont-Dubel, Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT₆ receptors to promote neurite growth. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 590–597 (2014).
21. O. Riccio, G. Potter, C. Walzer, P. Vallet, G. Szabó, L. Vutsits, J. Z. Kiss, A. G. Dayer, Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry* **14**, 280–290 (2009).
22. C. M. Ha, D. Park, Y. Kim, M. Na, S. Panda, S. Won, H. Kim, H. Ryu, Z. Y. Park, M. M. Rasenick, S. Chang, SNX14 is a bifunctional negative regulator for neuronal 5-HT₆ receptor signaling. *J. Cell Sci.* **128**, 1848–1861 (2015).
23. S.-H. Kim, D. H. Kim, K. H. Lee, S.-K. Im, E.-M. Hur, K. C. Chung, H. Rhim, Direct interaction and functional coupling between human 5-HT₆ receptor and the light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B-LC1). *PLOS ONE* **9**, e91402 (2014).
24. S.-H. Kim, M. Seo, H. Hwang, D.-M. Moon, G. H. Son, K. Kim, H. Rhim, Physical and functional interaction between 5-HT₆ receptor and Nova-1. *Exp. Neurobiol.* **28**, 17–29 (2019).
25. J. Meffre, S. Chaumont-Dubel, C. Mannoury la Cour, F. Loiseau, D. J. G. Watson, A. Dekeyne, M. Seveno, J. M. Rivet, F. Gaven, P. Deléris, D. Herve, K. C. F. Fone, J. Bockaert, M. J. Millan, P. Marin, 5-HT₆ receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol. Med.* **4**, 1043–1056 (2012).
26. H.-M. Yun, J.-H. Baik, I. Kang, C. Jin, H. Rhim, 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 (2010).
27. H. M. Yun, S. Kim, H. J. Kim, E. Kostenis, J. I. Kim, J. Y. Seong, J. H. Baik, H. Rhim, The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn. *J. Biol. Chem.* **282**, 5496–5505 (2007).
28. R. Kohen, L. A. Fashingbauer, D. E. A. Heidmann, C. R. Guthrie, M. W. Hamblin, Cloning of the mouse 5-HT₆ serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **90**, 110–117 (2001).
29. W. Deraredj Nadim, S. Chaumont-Dubel, F. Madouri, L. Cobret, M.-L. De Tauzia, P. Zajdel, H. Bénédetti, P. Marin, S. Morisset-Lopez, Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT₆ receptor promotes receptor constitutive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 12310–12315 (2016).
30. N. Iida, T. Kozasa, Identification and biochemical analysis of GRIN1 and GRIN2. *Methods Enzymol.* **390**, 475–483 (2004).
31. X. Ge, Y. Qiu, H. H. Loh, P.-Y. Law, GRIN1 regulates μ -opioid receptor activities by tethering the receptor and G protein in the lipid raft. *J. Biol. Chem.* **284**, 36521–36534 (2009).
32. J. C. Nordman, N. Kabbani, An interaction between $\alpha 7$ nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *J. Cell Sci.* **125**, 5502–5513 (2012).
33. J. C. Nordman, W. S. Phillips, N. Kodama, S. G. Clark, C. A. Del Negro, N. Kabbani, Axon targeting of the $\alpha 7$ nicotinic receptor in developing hippocampal neurons by Gprn1 regulates growth. *J. Neurochem.* **129**, 649–662 (2014).
34. I. Masuho, Y. Mototani, Y. Sahara, J. Asami, S. Nakamura, T. Kozasa, T. Inoue, Dynamic expression patterns of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GRIN1) and its colocalization with Gao implicate significant roles of Gao-GRIN1 signaling in nervous system. *Dev. Dyn.* **237**, 2415–2429 (2008).
35. H. Nakata, T. Kozasa, Functional characterization of Gao signaling through G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1. *Mol. Pharmacol.* **67**, 695–702 (2005).
36. M. Brodsky, A. J. Lesiak, A. Croicu, N. Cohenca, J. M. Sullivan, J. F. Neumaier, 5-HT₆ receptor blockade regulates primary cilia morphology in striatal neurons. *Brain Res.* **1660**, 10–19 (2017).
37. M. Hamon, E. Doucet, K. Lefèvre, M.-C. Miquel, L. Lanfumey, R. Insausti, D. Frechilla, J. Del Rio, D. Vergé, Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT₆ receptors. *Neuropsychopharmacology* **21**, 68–76 (1999).
38. L. Hu, B. Wang, Y. Zhang, Serotonin 5-HT₆ receptors affect cognition in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating cilia function. *Alzheimer's Res. Ther.* **9**, 76 (2017).
39. A. J. Lesiak, M. Brodsky, N. Cohenca, A. G. Croicu, J. F. Neumaier, Restoration of physiological expression of 5-HT₆ receptor into the primary cilia of null mutant neurons lengthens both primary cilia and dendrites. *Mol. Pharmacol.* **94**, 731–742 (2018).
40. J. Zhang, C.-P. Shen, J. C. Xiao, T. J. Lanza, L. S. Lin, B. E. Francis, T. M. Fong, R. Z. Chen, Effects of mutations at conserved TM II residues on ligand binding and activation of mouse 5-HT₆ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **534**, 77–82 (2006).
41. L. I. Jiang, J. Collins, R. Davis, K.-M. Lin, D. DeCamp, T. Roach, R. Hsueh, R. A. Rebres, E. M. Ross, R. Taussig, I. Fraser, P. C. Sternweis, Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G₁₃ pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 10576–10584 (2007).
42. L. P. Pellissier, J. Sallander, M. Campillo, F. Gaven, E. Queffeuilou, M. Pillot, A. Dumuis, S. Claeyens, J. Bockaert, L. Pardo, Conformational toggle switches implicated in basal constitutive and agonist-induced activated states of 5-hydroxytryptamine-4 receptors. *Mol. Pharmacol.* **75**, 982–990 (2009).
43. A. G. Dayer, M. Jacobshagen, S. Chaumont-Dubel, P. Marin, 5-HT₆ receptor: A new player controlling the development of neural circuits. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 951–960 (2015).
44. L. T. Chen, A. G. Gilman, T. Kozasa, A candidate target for G protein action in brain. *J. Biol. Chem.* **274**, 26931–26938 (1999).
45. B. D. Semple, K. Blomgren, K. Gimlin, D. M. Ferriero, L. J. Noble-Haueslein, Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 1–16 (2013).
46. N. F. Berbari, A. D. Johnson, J. S. Lewis, C. C. Askwith, K. Mykityn, Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1540–1547 (2008).
47. F. Ango, L. Prézeau, T. Muller, J. C. Tu, B. Xiao, P. F. Worley, J. P. Pin, J. Bockaert, L. Fagni, Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* **411**, 962–965 (2001).
48. A. A. J. Rouault, L. K. Rosselli-Murai, C. C. Hernandez, L. E. Gimenez, G. G. Tall, J. A. Sebag, The GPCR accessory protein MRAP2 regulates both biased signaling and constitutive activity of the ghrelin receptor GHSR1a. *Sci. Signal.* **13**, eaax4569 (2020).
49. J.-Z. Yu, R. H. Dave, J. A. Allen, T. Sarma, M. M. Rasenick, Cytosolic G α_s acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **284**, 10462–10472 (2009).
50. Veeranna, K. T. Shetty, W. T. Link, H. Jaffe, J. Wang, H. C. Pant, Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A. *J. Neurochem.* **64**, 2681–2690 (1995).
51. J.-H. Ahn, T. McAvoy, S. V. Rakhilin, A. Nishi, P. Greengard, A. C. Nairn, Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56 δ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2979–2984 (2007).
52. C. Savoia, J. B. Pujol, A. Vaucher, U. De Marchi, C. Rieker, E. Heikkilä, A. Núñez Galindo, L. Dayon, E. Dioum, GPRIN1 modulates neuronal signal transduction and affects mouse-learning behavior. *bioRxiv* **2018**, 291377 (2018).
53. S. Claeyens, P. Faye, M. Sebben, S. Lemaire, J. Bockaert, A. Dumuis, Cloning and expression of human 5-HT_{4S} receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenyl cyclase. *Neuroreport* **8**, 3189–3196 (1997).
54. D. Maurel, L. Comps-Agrar, C. Brock, M.-L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet, J.-P. Pin, Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: Application to GPCR oligomerization. *Nat. Methods* **5**, 561–567 (2008).

Acknowledgments: Mass spectrometry analyses were performed using the facilities of the Functional Proteomics Platform of Montpellier, Languedoc-Roussillon. Confocal microscopy was performed using the facilities of the Montpellier Imaging Resources (MRI) platform. The BRET and FRET experiments were performed using the ARPEGE (Pharmacology, Screening, Interactome) platform facility (IGF, Montpellier, France). We thank Q. Durix and E. Belan from the iExplore animal facility, RAM, Biocampus. We also thank A. Monteil and C. Lemmers from the virus production facility, PVM (Biocampus Montpellier, CNRS UMS 3426) for the production of viral particles. We thank M. Asari for help with iconography. We also thank S. Morisset for the gift of the 5-HT₆R-GFP plasmid. **Funding:** This work was supported by grants from the ANR [Sero6Cognet (ANR-11-BSV4-008-01) and Sero6Dev (ANR-17-CE16-0010-01)], CNRS, INSERM,

and the University of Montpellier and la Région Occitanie. We also thank the Foundation for Medical Research (FRM). **Author contributions:** P.M., J.B., and S.C.-D. designed the experiments. M.S. performed mass spectrometry experiments. C.N.P. and L.R. studied neurite growth and branching in culture. C.N.P. performed BRET, FRET, and biochemistry experiments. V.D. performed immunohistochemistry experiments. S.C.-D. performed BRET and pharmacology experiments. P.M., J.B., and S.C.-D. wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper or the Supplementary Materials.

Submitted 7 May 2019

Accepted 28 January 2020

Published 11 February 2020

10.1126/scisignal.aax9520

Citation: C. N. Pujol, V. Dupuy, M. Séveno, L. Runtz, J. Bockaert, P. Marin, S. Chaumont-Dubé, Dynamic interactions of the 5-HT₆ receptor with protein partners control dendritic tree morphogenesis. *Sci. Signal.* **13**, eaax9520 (2020).

Dynamic interactions of the 5-HT₆ receptor with protein partners control dendritic tree morphogenesis

Camille N. Pujol, Vincent Dupuy, Martial Séveno, Leonie Runtz, Joël Bockaert, Philippe Marin and Séverine Chaumont-Dubel

Sci. Signal. **13** (618), eaax9520.
DOI: 10.1126/scisignal.aax9520

Taking the time to signal

The serotonin receptor 5-HT₆R is a GPCR exclusively found in the nervous system that has emerged as a potential therapeutic target in various neurological disorders. Although preliminary studies suggested that 5-HT₆R antagonists have procognitive effects, clinical trials have been disappointing. Pujol *et al.* analyzed the dynamics of 5-HT₆R interactions with other proteins and found that after its previously characterized interaction with and phosphorylation by the kinase Cdk5, the 5-HT₆R interacted with GPRIN1, a promoter of neurite extension. These sequential interactions enhanced 5-HT₆R constitutive activity, promoting neurite extension and branching in neuroblastoma cells and primary striatal neurons. The GPRIN1–5-HT₆R interaction was reduced by 5-HT₆R antagonist, suggesting that the dynamic interactions of this receptor are regulated by its conformational state.

ARTICLE TOOLS

<http://stke.sciencemag.org/content/13/618/eaax9520>

SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://stke.sciencemag.org/content/suppl/2020/02/07/13.618.eaax9520.DC1>

RELATED CONTENT

<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/13/613/eaax4569.full>
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/11/520/eaah3738.full>

REFERENCES

This article cites 54 articles, 20 of which you can access for free
<http://stke.sciencemag.org/content/13/618/eaax9520#BIBL>

PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Science Signaling (ISSN 1937-9145) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Signaling* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2020 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works