



Réseaux de protéines associés aux récepteurs de la sérotonine : rôle et options thérapeutiques pour la Maladie d'Alzheimer

Hugo Payan

► To cite this version:

Hugo Payan. Réseaux de protéines associés aux récepteurs de la sérotonine : rôle et options thérapeutiques pour la Maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT012 . tel-03629349

HAL Id: tel-03629349

<https://theses.hal.science/tel-03629349>

Submitted on 4 Apr 2022

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

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

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

En Biologie Santé

École doctorale des Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF)

Réseaux de protéines associés aux récepteurs de la sérotonine : rôle et options thérapeutiques pour la Maladie d'Alzheimer

Présentée par Hugo PAYAN

Le 4 Septembre 2020

Sous la direction de Sylvie CLAEYSEN

Devant le jury composé de

Justine MASSON, Chargée de recherche, IFM, Paris

Jérôme BECKER, Chargé de recherche, INRA Centre Val de Loire, Nouzilly

Evelyne MARCHETTI-GAUTHIER, Professeure, Université Aix-Marseille

Philippe RONDARD, Directeur de recherche, IGF, Montpellier

Véronique PERRIER, Directrice de recherche, MMDN, Montpellier

Kévin BARANGER, Chargé de recherche, INP, Marseille

Sylvie CLAEYSEN, Chargée de recherche, IGF, Montpellier

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Présidente du jury

Invité

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser tous mes remerciements au Dr. Philippe Marin qui m'a accueilli dans son équipe et qui m'a fait partager ses intuitions tout au long de cette thèse. Ton expertise en biochimie et ta rigueur scientifique ont été d'une grande aide au cours de ces trois ans.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Sylvie Claeysen pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir formé à la neuropharmacologie et au monde passionnant des récepteurs couplés aux protéines G. Je te remercie aussi pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps surchargé, pour les discussions scientifiques intéressantes que nous avons pu avoir. Tu as incontestablement exacerbé ma passion pour la biologie. Mes remerciements également pour tes qualités humaines hors normes. Je pense que tous les étudiants t'ayant eue pour encadrante ont su apprécier ta gentillesse, ton sens de l'organisation et ton accompagnement au cours de leurs travaux.

Mes remerciements vont également au Dr. Justine Masson et au Dr. Jérôme Becker de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. J'exprime également ma gratitude au Pr. Evelyne Marchetti-Gauthier, au Dr. Véronique Perrier et au Dr. Philippe Rondard d'avoir accepté d'examiner ma thèse, ainsi qu'au Dr. Kévin Baranger d'assister à ma soutenance. J'ai hâte d'entendre vos commentaires et critiques ainsi que d'engager une discussion scientifique avec vous.

Mes plus sincères remerciements s'adressent aussi au Pr. Michel Hamon qui m'a initié à la recherche et aux neurosciences lors de mon stage de 4^{ème} année. Cette courte expérience de recherche a été un déclic pour moi et m'a conduit à finalement réaliser une thèse. Je te suis très reconnaissant pour le soutien et les recommandations que tu m'as apporté lorsque j'ai décidé de candidater pour obtenir une bourse de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres passés et présents de l'équipe Marin. Dr. Carine Becamel, Dr. Séverine Chaumont-Dubel, Pr. Joël Bockaert, Dr. Eric Thouvenot, Dr. Franck Vandermoere, Angelina, Bérénice, Camille, Clara, Clémentine, Coralie, Emilie, Lucile, Simon, Vincent. Merci Anne pour ton aide précieuse au quotidien. Je remercie également particulièrement Elisabeth qui m'a formé aux rudiments de la biochimie au début de ma thèse et Samy pour les discussions scientifiques ainsi que pour m'avoir bien intégré dans cet institut. Un grand merci aussi à Laura de l'équipe Valjent pour nos excursions sportives après le labo.

Je tiens à remercier tous les nouveaux ou anciens docteurs avec qui j'ai passé de bons moments à l'IGF et en dehors : Jennifer, Joyce, Julie, Laura, Pauline, Rosanna, Alexandre, Amaury, Antoine, Babilou, Benoit, Malik, Matthias, Pierre².

Un remerciement spécial à ma voisine de bureau, j'ai nommé Caroline ! Ce fut un plaisir de partager ces années de thèse à tes côtés que ce soit au labo, pour les pauses café/repas ou en dehors (2.0). Etant donné que nous sommes devenus amis, ne t'inquiète pas tu ne te débarrasseras pas de moi comme ça et j'ai d'ailleurs hâte de venir assister à ta soutenance dans une petite année. Merci également à Adrien (que dis-je, Dr. Decorsière) pour ta compagnie depuis que j'ai croisé ta route lors du déménagement au RDC de l'IGF. Nos discussions et les « petit Cas ? » vont me manquer. Un énorme merci au Dr. Amos Fumagalli (ça fait bizarre d'écrire ça) qui fut également une de mes rencontres les plus marquantes à l'IGF. Tu es aussi rapidement devenu un ami sur qui compter et tes qualités scientifiques incontestables ont été d'une grande aide.

De manière plus générale, je souhaite remercier les personnes de l'IGF et notamment les plateformes et services communs qui sont d'une aide précieuse pour la recherche.

Merci à mes parents pour votre gentillesse hors du commun et pour m'avoir toujours soutenu dans mes études. Merci de m'avoir transmis des valeurs comme la persévérance et la résilience. Merci à ma petite sœur pour m'avoir toujours encouragé dans ce que je fais et d'être une épaule sur qui compter. Vous êtes ce que j'ai de plus cher.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont fait partie de ma nouvelle vie à Montpellier et ont rendu cette expérience inoubliable: Audrey, Eva, Laure, Maeva, Priscillia, Arnaud, Darys, Julien, Loris, Seb, Willy, Xav et plein d'autres. Merci à mes colocos Magali et Julien pour le soleil que vous m'apportez au quotidien. Merci à toute ma bande d'amis à Marseille et à Paris qui ont été un formidable soutien.

Enfin, je dédicace cette thèse à Rémi mon coloc et ami pour la vie. Ta disparition au milieu de ma thèse a été une immense tragédie mais je ne retiendrai que les bons moments. Merci d'avoir toujours été là et d'avoir été le meilleur décompresseur de thèse qu'il puisse exister. Merci pour tous les moments inoubliables, merci pour ta générosité sans faille, merci d'avoir été la personne sur qui compter à Montpellier. J'aurais aimé que tu sois là pour ma soutenance mais je suis sûr que tu me regarderas de là haut.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS 3

CHAPITRE 1 – LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (RCPG)..... 12

I-	Généralités et structure des RCPG.....	13
II-	Classification	15
B-	La classe B (Sécrétine)	17
C-	La classe C (Glutamate).....	18
D-	La classe des récepteurs d'Adhésion	19
E-	La classe des récepteurs de type Frizzled	19
III-	Les voies de signalisation des RCPG.....	20
A-	Les voies de signalisation G-dépendantes	20
B-	Les voies de signalisation G-indépendantes	25
1)	La voie des β -arrestines.....	25
2)	La voie ERK1/2	28
3)	Transactivation des RTK par les RCPG	30
IV-	Modulation de la signalisation des RCPG	32
A-	Trafic, endocytose et recyclage des RCPG	32
B-	Activation biphasique	34
C-	Agonisme biaisé	35
D-	Modulation du couplage aux protéines G.....	37
E-	Oligomérisation.....	39
V-	Les GIP (<i>GPCR Interacting Proteins</i>).....	41
A-	Les protéines chaperonnes.....	41
B-	Les protéines à domaine PDZ.....	43
C-	Les protéines RGS.....	45

CHAPITRE II – LES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES..... 47

I-	Le système sérotoninergique	48
A-	Généralités.....	48
B-	Classification	48
II-	Le récepteur 5-HT ₄	49
A-	Historique	49
B-	Localisation et rôle physiologique	49
1)	Au niveau central.....	49
2)	Au niveau périphérique.....	51
C-	Variants d'épissage.....	53
D-	Pharmacologie	55
1)	Les ligands du 5-HT ₄	55
2)	Le RASSL-5-HT ₄	56
E-	Signalisation du 5-HT ₄ et trafic.....	58
1)	Les voies couplées aux protéines G.....	58
2)	La voie ERK	59
3)	Les courants ioniques liés à l'activation du récepteur	60
4)	Le devenir des récepteurs endocytés.....	60
5)	La dimérisation des récepteurs 5-HT ₄	61
F-	5-HT ₄ et pathologies	62
1)	Le syndrome du côlon irritable.....	62
2)	La dépression.....	63
3)	La maladie d'Alzheimer	64
4)	La maladie de Parkinson.....	68
G-	Les protéines partenaires du récepteur 5-HT ₄	68
1)	NHERF	69
2)	SNX27	69
3)	APP et ADAM10	70
4)	P11	71

H-	5-HT ₄ et insuline	72
III-	Le récepteur 5-HT₆.....	73
A-	Historique	73
B-	Localisation et fonction	74
C-	Voies de signalisation	75
CHAPITRE III – LES NANOBODIES COMME OUTILS D'ETUDE DES RCPG		78
I-	Découverte des nanobodies	79
II-	Structure des nanobodies	79
III-	Réarrangement des gènes.....	82
IV-	Propriétés et avantages des nanobodies.....	85
V-	Applications des nanobodies.....	86
A-	En immunohistochimie	86
B-	En tant que chaperonnes de cristallisation.....	88
C-	En tant qu'outils pharmacologiques.....	90
D-	Intérêt thérapeutique des nanobodies.....	92
OBJECTIFS		95
RESULTATS		96
I-	Développement technologique d'un procédé pour générer des nanobodies contre les récepteurs 5-HT ₄ et 5-HT ₆	97
A-	Stratégie utilisée pour générer la banque de phages.....	97
B-	Sélection des nanobodies par <i>phage display</i>	99
C-	Criblage des nanobodies par cytométrie de flux.....	101
1)	Préparation des <i>masterblocks</i>	101
2)	Criblage par FACS.....	102
D-	Caractérisation du clone de nanobody A6	105
1)	Purification et validation par FACS.....	105
2)	Caractérisation fonctionnelle du nanobody A6	107
3)	Évaluation du <i>binding</i> du nanobody A6 au récepteur 5-HT ₄ par HTRF®.....	108
E-	Criblage des intrabodies par HTRF®.....	110
II-	Identification des réseaux de protéines associés au récepteur 5-HT ₄ par analyse protéomique	114
ARTICLE 1.....		116
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		117
I-	Développement technologique d'un procédé pour obtenir des nanobodies contre les récepteurs 5-HT ₄ et 5-HT ₆	118
II-	Réseaux de protéines associés au récepteur 5-HT ₄	121
MATERIELS ET METHODES.....		125
ANNEXES.....		131
ARTICLE 2.....		132
ARTICLE 3.....		133
REFERENCES		134

Liste des abréviations

α_x : Récepteur adrénergique de type X
 β_x -AR : Récepteur β x-adrénergique
 x OR : x opioid receptor
 ^{68}Ga : Gallium 68
5-HT : 5-hydroxytryptamine
5-HTT : 5-hydroxytryptophane
5-HT $_x$: Récepteur sérotoninergique de type X

A - B - C - D

A β : Peptide amyloïde bêta
 A_x : Récepteur adénosine de type X
AC : Adénylyl cyclase
ACh : Acétylcholine
AD : *Alzheimer's disease*
ADAM10/30 : *A disintegrin and metalloprotease 10/30*
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGS : *Nonreceptor activator of G protein signaling*
AICD : *Amyloid precursor protein cytoplasmic/C-terminal domain*
AKAP : *A-kinase-anchoring protein*
AM : Adrénomédulline
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMY : Récepteur de l'amyline
AP-2 : *Adaptor protein 2*
AP-MS : *Affinity purification – Mass spectrometry*
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASK1 : *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

ASRT : *Actin-sorting nexin-retromer complex*
 AT_xR : Récepteur de l'angiotensine de type X
 ATP : Adénosine triphosphate
 BACE1 : *Beta-site APP cleaving enzyme 1*
 BCA : *Bicinchoninic acid*
 BG : O⁶-benzylguanine
 BRET : *Bioluminescence resonance energy transfer*
 BSA : *Bovine Serum Albumin*
 c-jun : *Jun proto-oncogen* (de *ju-nana*, le mot 17 en japonais)
 Ca²⁺ : Calcium
 CamKII : Calmoduline kinase II
 CASK : *Calmodulin-dependent serine protein kinase*
 CCK2 : Cholecystokinin-2
 Cdk5 : *Cyclin-dependent kinase 5*
 CDR : *Complementary determining region*
 CGRP : *Calcitonin gene related peptide*
 CIPP : *Channel-interacting PDZ protein*
 CLR : *Calcitonin receptor-like receptor*
 Co-IP : Co-Immunoprécipitation
 COFRADIC : *Combined fractional diagonal chromatography*
 COPI : *Coat protein complex I*
 COS-7 : *CV-1 in origin, carrying SV40 type 7*
 cPLA2 : *Calcium-dependent phospholipase A2*
 CRE : *cAMP response element*
 CREB : *CRE binding protein*
 CTF α/β : *C-terminal fragment α/β*
 CTR : *Calcitonin receptor*
 CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*
 CXCL12 : *C-X-C motif chemokine ligand 12*
 D_x : Récepteur dopaminergique de type X
 Da : Dalton
 DAG : Diacyl glycérol
 DDM : *n-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside*
 DGK : Diacylglycérol kinase

DLG1 : *Disc large homolog 1*

DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*

E - F - G - H

E. Coli : *Escherichia Coli*

EC50 : *Half maximal effective concentration*

EDTA : *Éthylènediaminetétraacétique*

EGFR : *Epidermal growth factor receptor*

EGTA : *Ethylene glycol tetraacetic acid*

Epac : *Exchange protein directly activated by cAMP*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Eph : *Ephrine*

EPSP : *Potentiel post-synaptique excitateur*

ERK : *Extracellular signal regulated kinase*

ERM : *Ezrin-Radixin-Moesin*

Fab : *Antigen-binding fragment*

FACS : *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FAK : *Focal adhesion kinase*

Fc : *Fragment constant*

FDA : *Food and drugs administration*

FDR : *False discovery rate*

FR : *Framework region*

FRAP : *Fluorescence recovery after photobleaching*

FRET : *Förster resonance energy transfer*

FSC : *Forward scatter*

Fyn : *Fyn proto-oncogène*

GABA_{A/B} : *Acide gamma-aminobutyrique de type A/B*

GAIN : *GPCR-autoproteolysis inducing domain*

GAP : *GTPase-activating protein*

GEF : *Guanine nucleotide exchange factor*

GFP : *Green fluorescent protein*

GIP : *GPCR-interacting protein*

GIPC : *GAIP-interacting protein, C-terminus*

GIRK : *G-protein activated inwardly rectifying K⁺ current*

GLP-1 : *Glucagon-like peptide 1*
 GnRH : *Gonadotropin releasing hormone*
 GO : *Gene ontology*
 GPS : *GPCR-proteolytic sites*
 GPR : *orphan G protein-coupled receptor*
 Grb2 : *Growth factor receptor-binding protein 2*
 GRK_x : *G protein-coupled receptor kinase X*
 GTP : *Guanosine triphosphate*
 HA : *Hémagglutinine*
 HCAb : *Heavy chain only antibody*
 HDAC5 : *Histone déacétylase de type 5*
 HEK-293 : *Human embryonic kidney 293 cells*
 HEPES : *acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique*
 HER-2 : *Human epidermal growth factor receptor 2*
 His : *Hexahistidine*
 HPLC : *High performance liquid chromatography*
 HRP : *Horserasidh peroxidase*
 Hsp-70 : *Heat shock protein 70*
 HTRF : *Homogeneous Time Resolved Fluorescence*

I - J - K - L

IκBα : *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*
 iBAQ : *Intensity based absolute quantification*
 IGF-1 : *Insulin-like growth factor 1*
 IgG : *Immunoglobuline G*
 IP : *Inositol phosphate*
 IP3 : *Inositol triphosphate*
 IPTG : *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*
 IQGAP1 : *IQ motif containing GTPase activating protein 1*
 IR : *Insulin receptor*
 IRS4 : *Insulin receptor substrate 4*
 Jab1 : *Jun activation domain-binding protein 1*

JNK3 : *c-Jun N-terminal kinase 3*

KO : *Knock-out*

LFQ : *Label-free quantification*

LIMK : *Lin11-Isl-1-Mec-3 kinase*

LRP : *Low-density lipoprotein-related protein*

M - N - O - P

M_x : Récepteur muscarinique de type X

MA : Maladie d'Alzheimer

MAGUK : *Membrane-associated guanylate kinase*

MAP : *Mitogen-activated protein*

MAP1B-LC1 : *Microtubule-associated protein 1B light chain*

MEK : *Mitogen-activated protein kinase*

Mg²⁺ : Magnésium

mGluRx : *Récepteur métabotrope du glutamate de type X*

MLC : *Myosin light-chain*

MMP : Matrix métalloprotéinase

MPP_x : *Membrane palmitoylated protein x*

MRAP : *Melanocortin receptor-accessory protein*

MS : *Mass spectrometry*

MT_{1/2} : Récepteurs de la mélatonine 1/2

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

MUPP1 : *Multi-PDZ domain protein 1*

NaCl : Chlorure de sodium

Nav1.8 : Canal sodium de type 10 avec sous-unité alpha

Nb : Nanobody

NCB-20 : *Neuroblastoma Cellosaurus cell line*

Nf1 : Neurofibrine

NFκB : *Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*

NHERF : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*

Ni-NTA : *Nickel-nitrilotriacetic acid*

nm : nanomètre

NMDA : *N-méthyl-D-aspartate*

nNOS : *Neuronal nitric oxide synthase*
 Nova-1 : *Neuro-ongological ventral antigen 1*
 P11 : *S100A10 ou S100 calcium-binding protein A10*
 P53 : *Tumor protein 53*
 PACAP : *Pituary adenylate cyclase activating polypeptide*
 PBP : *Periplasmic binding protein*
 PBS : *Phosphate buffered saline*
 PCNA : *Proliferating cell nuclear antigen*
 PCR : *Polymerase chain reaction*
 PDE : *Phosphodiesterase*
 PDZ : *PSD95-Dlg1-zo1*
 PE-ELISA : *Periplasmic extract – Enzyme linked immunosorbent Assay*
 PEA15 : *Astrocytic phosphoprotein PEA-15*
 PEG : *Polyéthylène Glycol*
 PEI : *Polyéthylènimine*
 PFA : *Paraformaldéhyde*
 PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
 PICK1 : *Protein interacting with C kinase 1*
 PIP2 : *Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*
 PKA : *Protéine kinase A*
 PKC : *Protéine kinase C*
 PKR_x : *Prokineticin Receptor X*
 PLCβ : *Isoforme β de la phospholipase C*
 PPR : *Pattern recognition receptor*
 PrP : *Protéine du prion*
 PSD-95 : *Post-synaptic density 95*
 PTH1R : *Parathyroid hormone receptor 1*
 PTX : *Toxine pertussique*

Q - R - S – T

RAIG : *Retinoic acid-inducible orphan GPCR*
 Rac : *Ras-related C3 botulinum toxin*

RAMP : *Receptor activity-modifying proteins*
 Rap1 : *Ras-related protein 1*
 RASSL : *Receptor activated solely by a synthetic ligand*
 RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
 RGS : *Regulator of G protein signaling*
 RE : Réticulum endoplasmique
 RhoA : *Ras homolog family member A*
 RhoGEF : *Ras homolog guanine nucleotide exchange factor*
 Rluc : *Renilla Luciferase*
 ROCK : RhoA kinase
 Rsk1 : *Ribosomal protein S6 kinase alpha-1*
 RTK : Récepteur tyrosine kinase
 sAPP α/β : *Soluble amyloid precursor protein α/β*
 sdAb : *Single domain antibody*
 SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
 Sec23 : *Saccharomyces Cerevisiae transport protein 23*
 Sef1 : *Suppressor of essential function protein 1*
 SERT : Transporteur de la sérotonine
 siRNA : *Small interfering ribonucleic acid*
 SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*
 SNX : *Sortin nexin*
 Src : Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src, de « Sarcome »
 SRF : *Serum response transcription factor*
 SSC : *Side scatter*
 SSRI : Inhibiteur de recapture de la sérotonine
 STEF : *SIF and Tiam1-like exchange factor*
 TAS1R : *Taste receptor type 1*
 Tau : *Tubulin-associated unit*
 Tb : Terbium
 TEABC : Triéthylammoniumbicarbonate
 TLR : *Toll-like receptor*
 TGF : *Transforming growth factor*
 TM : Domaine transmembranaire
 TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TR-FRET : *Time-resolved FRET*

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

TSHR : *Thyroid-stimulating hormone receptor*

U - V - W - X - Y - Z

USP : *Ubiquitin Specific Peptidase*

V2R : *Vasopressin 2 receptor*

Veli : *Vertebrate lin-7*

VEGFR2 : *Vascular endothelial growth factor receptor 2*

V_L : Chaîne légère du domaine variable

V_H : Chaîne lourde du domaine variable

V_HH : Heavy chain only variable domain

VLGR1 : *Very large G protein coupled receptor 1*

VLP : *Virus-like particle*

Vps : *Vacuolar protein sorting*

VRS : Virus respiratoire syncytial

WASH : *WAS protein family homolog*

YFP : *Yellow fluorescent protein*

ZO-1 : *Zonula occludens-1*

Introduction

Chapitre 1

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

I- Généralités et structure des RCPG

L'évolution des organismes pluricellulaires a été rendue possible grâce à la capacité des cellules à communiquer entre elles et avec leur environnement. Cette communication s'est mise en place *via* l'apparition de récepteurs membranaires. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs et représentent de 1 à 5% du génome des mammifères et plus de 2% du génome humain (Fredriksson et al., 2003). Environ 900 gènes codent pour ces récepteurs très hétérogènes, capables de reconnaître de nombreux stimuli provenant de particules (ions, photons) et de molécules (acides aminés, lipides, molécules odorantes ou gustatives, hormones et neurotransmetteurs). De par leur très large diversité et leur implication dans de nombreuses fonctions physiologiques essentielles, les RCPG sont la cible de 40 à 50% des molécules thérapeutiques disponibles sur le marché (Drews, 2000; Heng et al., 2013).

La principale caractéristique structurale des RCPG est la présence de sept segments transmembranaires qui leur vaut aussi le nom de « Récepteurs à 7 Domaines Transmembranaires ». Néanmoins, cette appellation est moins utilisée depuis la découverte de récepteurs à 7 domaines transmembranaires n'étant pas couplés aux protéines G (Rajagopal et al., 2005). Les sept segments transmembranaires, très conservés, sont chacun composés d'une hélice alpha et nommés TM1 à TM7 (Figure 1A). Par ailleurs, la structure générale d'un RCPG comprend également (Figure 1A) :

- Une extrémité N-terminale toujours extracellulaire de taille variable impliquée notamment dans le repliement et l'adressage des récepteurs.
- Trois boucles extracellulaires nommées e1, e2 et e3 qui comportent des sites de N-glycosylation
- Trois boucles intracellulaires nommées i1, i2 et i3 qui sont impliquées dans le couplage avec les protéines G.
- Une extrémité C-terminale intracellulaire qui joue également un rôle dans le couplage aux protéines G et permet aussi le recrutement d'autres

protéines nécessaires à la signalisation des RCPG telles que les β -arrestines.

De nombreuses perspectives et pistes thérapeutiques impliquant des RCPG ont été récemment ouvertes grâce à une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation mis en jeu mais aussi par les remarquables avancées en biologie structurale, qui ont permis la résolution de plusieurs structures de RCPG (Figure 1B).

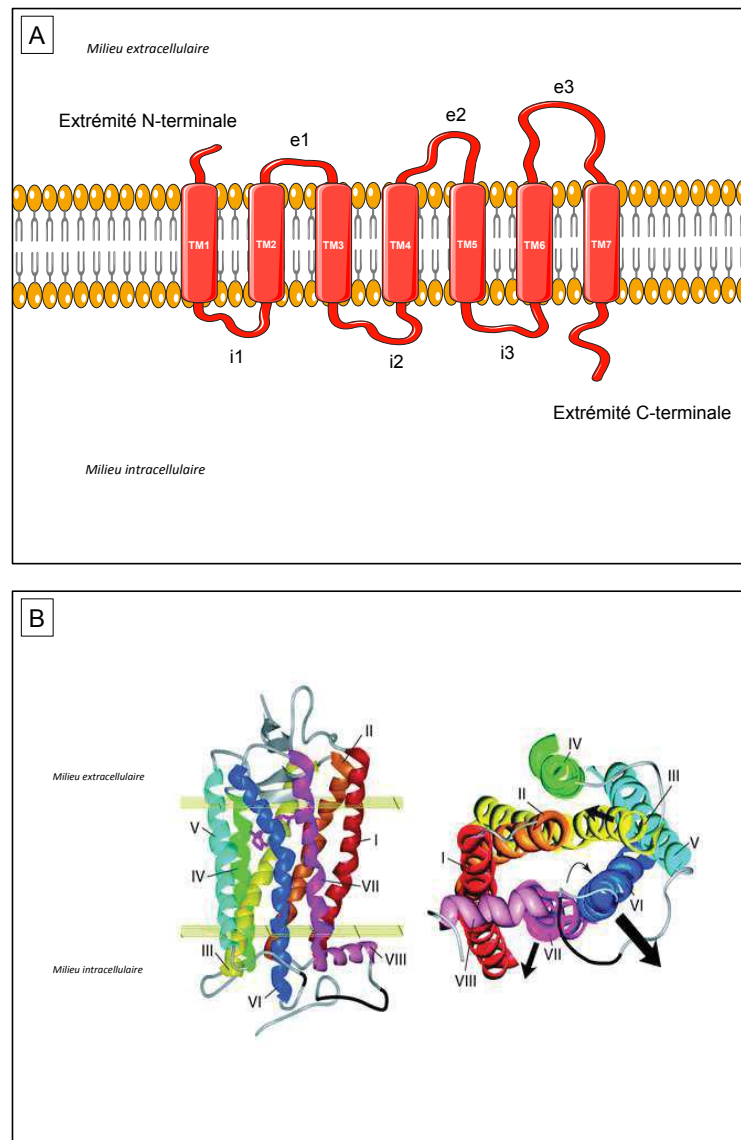


Figure 1 : Les Récepteurs Couplés aux protéines G

- A- Représentation schématisée d'un RCPG comprenant les 3 boucles extracellulaires e1, e2, e3 et les 3 boucles intracellulaires i1, i2, i3.
- B- Structure tridimensionnelle de la rhodopsine cristallisée. A gauche en vue transversale et à droite vue du dessus avec les mouvements générés lors de la fixation du ligand. *D'après Meng & Bourne, 2001, Trends in Pharmacological Sciences.*

A- LA CLASSE A (RHODOPSINE)

La famille de la Rhodopsine est la plus grande des 5 familles de RCPG avec environ 700 membres. Une grande diversité existe au sein de ce groupe au niveau de la signalisation des récepteurs, des mécanismes moléculaires mais aussi de la variété des ligands qui se lient aux RCPG de classe A : peptides, amines, protéines, sucres, lipides, nucléotides et photons (Fredriksson et al., 2003).

Par ailleurs, cette famille est bien connue puisqu'elle contient 2 récepteurs ayant fait l'objet de recherches intensives : le récepteur de la rhodopsine et le récepteur β_2 -adrénergique. De nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes structuraux des RCPG ont d'ailleurs été rendues possibles grâce à la haute résolution de la structure du récepteur β_2 -adrénergique (Sören G.F. Rasmussen et al., 2011) ainsi que du récepteur de la rhodopsine auparavant (Palczewski et al., 2000).

Une des caractéristiques majeures de cette famille de RCPG est la présence de résidus et motifs conservés qui sont impliqués dans la signalisation de ces récepteurs (Figure 2). Parmi ces résidus on peut citer le pont disulfure situé entre les boucles extracellulaires e1 et e2 qui est extrêmement conservé au sein des RCPG en général et contribue à stabiliser les boucles extracellulaires. D'autre part, on dénombre deux motifs conservés chez les RCPG de classe A :

- Le motif E/DRY, à la jonction du TM 3 et de la boucle i2, permet de maintenir l'activité des RCPG dans un état basal en absence d'agoniste (Rovati et al., 2007) mais est également essentiel au couplage à la protéine G (Hajjhussein et al., 2013).
- Le motif NPxxY, positionné à la fin du TM 7, est important dans la stabilisation de la conformation active du récepteur (Huynh et al., 2009), dans le couplage aux protéines G (Galés et al., 2000) ainsi que dans la désensibilisation et l'endocytose (Fan et al., 2001).

Il est important de noter que cette famille comporte également plus de 150 récepteurs orphelins, nom donné aux récepteurs dont on ne connaît pas le ligand naturel.

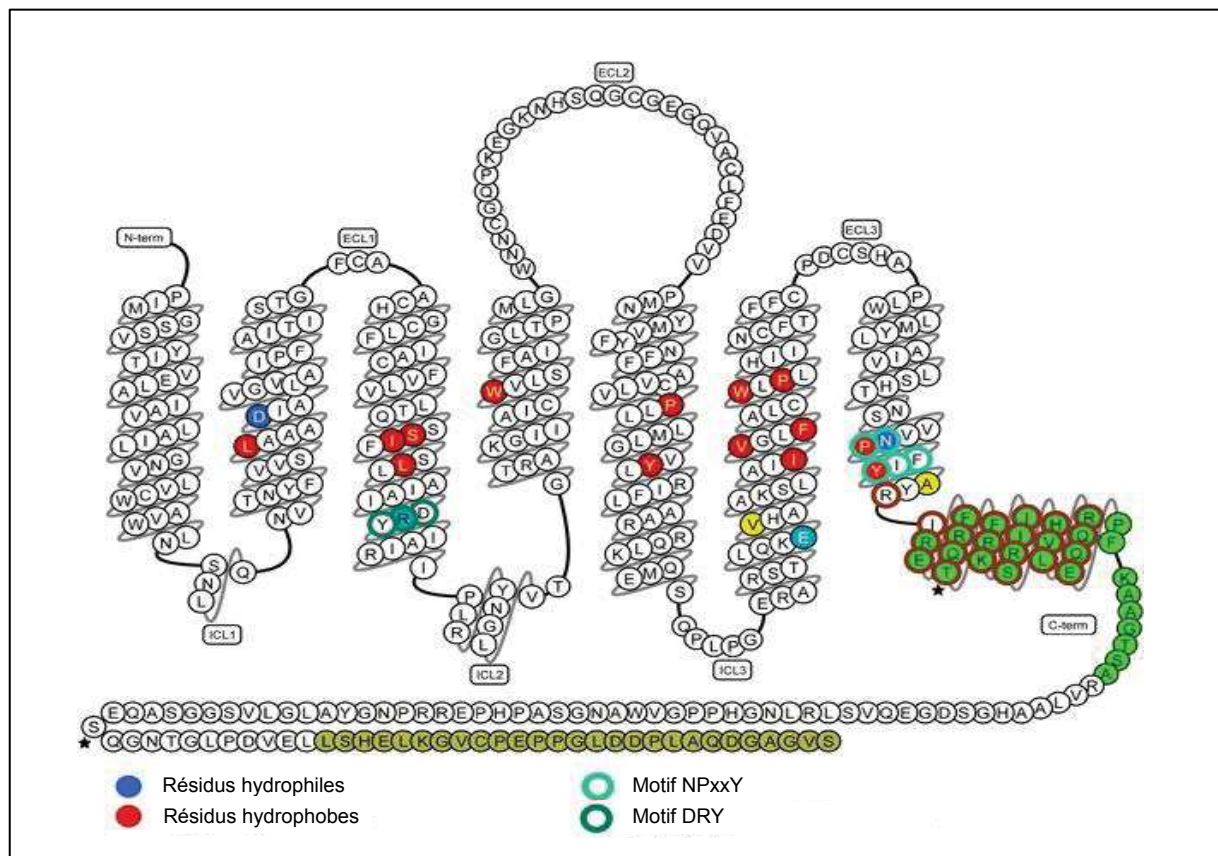


Figure 3 : Représentation schématique d'un RCPG de classe A

Représentation de la structure secondaire du récepteur de l'adénosine $A_{2A}R$. Les acides aminés sont schématisés par des boules. Les motifs DRY et NPxxY sont indiqués par des cercles colorés. D'après Prosser, Ye, Pandey, & Oraziotti, 2017, Bioessays.

B- LA CLASSE B (SECRETINE)

La famille du récepteur de la Sécrétine comporte une quinzaine de membres dont la principale caractéristique est la présence d'un long domaine extracellulaire (entre 100 et 500 acides aminés) sur lequel se trouvent de nombreuses cystéines engagées dans des ponts disulfures (Figure 3). Ces récepteurs ont pour ligands principalement des hormones peptidiques de haut poids moléculaire. Parmi ces récepteurs, on peut citer le récepteur du PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*) ou le récepteur du GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide 1*). Pendant longtemps, un manque de données sur la structure et la localisation des sites de liaison a entraîné de nombreux échecs dans le développement de molécules ciblant les récepteurs de classe B (Archbold et al., 2011). Cependant, ces dernières années, plusieurs structures de récepteurs de classe B ont été résolues.

C- LA CLASSE C (GLUTAMATE)

Cette famille comprend les récepteurs du Glutamate, de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA_B), du calcium (*Calcium-Sensing Receptor*), trois récepteurs du goût (TAS1Rs), les récepteurs RAIG (*Retinoic Acid-Inducible orphan GPCRs*) ainsi que quelques récepteurs orphelins. La particularité de cette famille de récepteurs repose sur la présence d'un très large domaine extracellulaire (400 à 600 acides aminés) composé de 2 lobes articulés qui peuvent s'ouvrir et se fermer et nommé « *Venus Flytrap* » en référence à la plante carnivore *Dionaea muscipula* dont la morphologie est similaire (Figure 3). Ce domaine particulier contient une poche qui constitue le site de liaison principal pour le ligand, et sa structure provient, d'un point de vue évolutif, d'une famille de protéines présentes chez les bactéries Gram-négatives (*Periplasmic Binding Proteins* ou PBPs) (Felder et al., 1999). Une des propriétés majeures des récepteurs de classe C est leur capacité à dimériser voire oligomériser en homomères ou hétéromères, ce qui est nécessaire pour leur fonctionnement (Kniazeff et al., 2011). La cristallisation récente et la détermination de la structure à haute résolution du récepteur mGluR₁ (Wu et al., 2014) a permis de mieux comprendre les mécanismes structuraux de cette famille de récepteurs.

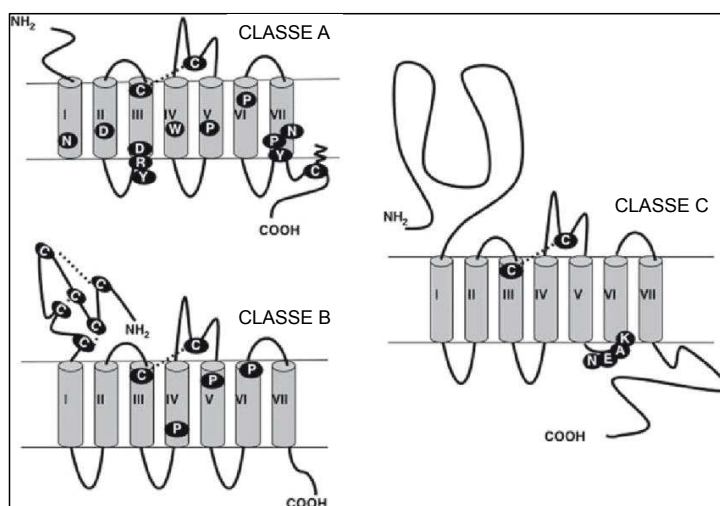


Figure 4 : Propriétés structurales des RCPG de classe A, B et C

Représentation schématisée des principales caractéristiques structurales des récepteurs de classe A, B et C. Le pont disulfure entre les cystéines de la boucle e1 et e2 très conservé y est schématisé. Pour les récepteurs de classe A, on remarque la présence des motifs DRY et NPxxY. Pour les récepteurs de classe B, est schématisé le large domaine extracellulaire contenant de nombreux ponts disulfures. Pour les récepteurs de classe C, on constate la présence d'un large domaine extracellulaire ainsi que des résidus conservés sur la boucle i3. D'après Massotte & Kieffer, 2005, *The G Protein-Coupled Receptors Handbook*.

D- LA CLASSE DES RECEPTEURS D'ADHESION

Originellement classés dans la famille des récepteurs *Secretine-like* (Baud et al., 1995), les RCPG d'adhésion forment désormais une famille à part entière, composée de 33 récepteurs chez l'homme (Hamann et al., 2015). En effet, de nombreux travaux ont montré leur divergence avec les récepteurs de classe B, notamment leur mécanisme d'autocatalyse unique ainsi que leur rôle dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice. La majorité de ces GPCR sont des récepteurs orphelins. Structurellement, ils sont caractérisés par la présence d'une région extracellulaire étendue mais de taille très variable. Par exemple, le récepteur VLGR1 (*Very Large G Protein-Coupled Receptor 1*) possède un domaine extracellulaire de presque 6000 acides aminés. Cette région N-terminale contient une variété de domaines impliqués dans l'adhésion cellulaire mais aussi des domaines dits GAIN (*GPCR-Autoproteolysis INducing domain*) contenant des sites d'auto-clivage protéolytiques (*GPCR-proteolytic sites* ou GPS) cruciaux pour leur fonction (Trudel et al., 2016). L'importance physiologique précise de ces motifs GPS reste encore à élucider mais des mutations dans ces domaines peuvent provoquer un mauvais repliement du récepteur et des pathologies.

E- LA CLASSE DES RECEPTEURS DE TYPE FRIZZLED

Cette classe de récepteurs comporte une dizaine de membres (FZD₁₋₁₀) qui ont tous pour ligand des lipoglycoprotéines sécrétées nommées Wnt. La signalisation Wnt est essentielle pour de nombreux processus développementaux. Cette famille de GPCR est assez atypique car leur voie de signalisation canonique est la voie β -caténine. L'appartenance des récepteurs de la classe Frizzled aux RCPG a longtemps été débattue. En effet, bien qu'ils possèdent toutes les caractéristiques structurales des RCPG, ce n'est que récemment que des études ont démontré pour la première fois une interaction directe entre ces récepteurs et les protéines G (Kilander et al., 2011; Koval & Katanaev, 2011; Nichols et al., 2013). Par ailleurs, l'étude de la pharmacologie des récepteurs Frizzled a été freinée à cause de l'insolubilité des protéines Wnt. De nombreux progrès ont été faits en ce sens grâce au développement de Wnt purifiées et biologiquement actives (Willert et al., 2003).

III- Les voies de signalisation des RCPG

A- LES VOIES DE SIGNALISATION G-DEPENDANTES

Les RCPG sont couplés à des protéines G hétérotrimériques dont les 3 sous-unités sont : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$ comporte un domaine GTPase permettant d'hydrolyser le GTP en GDP mais qui permet également d'interagir avec le dimère $G\beta\gamma$. Lorsque le récepteur est activé, le ligand stabilise le RCPG dans une conformation qui lui permet d'interagir avec la protéine G. Cette interaction entraîne l'échange du GDP par le GTP et provoque la dissociation de la sous-unité $G\alpha$ du complexe $G\beta\gamma$. La dissociation du complexe $G\alpha\beta\gamma$ active d'autres voies de signalisation en aval. Par la suite, l'hydrolyse du GTP permet la réassociation de la sous-unité $G\alpha$ avec les sous-unités $G\beta\gamma$, permettant la reformation du complexe $G\alpha\beta\gamma$.

Les sous-unités $G\alpha$ sont regroupées au sein de quatre familles : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$:

La famille $G\alpha_s$ stimule l'adénylyl cyclase (AC), qui est une enzyme permettant d'hydrolyser l'ATP en AMP cyclique, second messager (Figure 5). L'activation de la voie $G\alpha_s$ entraîne donc une augmentation du niveau d'AMPc ce qui déclenche l'activation de différents effecteurs comme la protéine kinase A (PKA) ou EPAC (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*) à plus haute concentration. Ces effecteurs sont capables de phosphoryler des résidus sérine et thréonine sur leurs substrats cibles, ce qui induit un changement d'activité de ces substrats. Ils peuvent aussi réguler des événements dynamiques comme des interactions ou des localisations. Par exemple, la PKA activée va phosphoryler d'autres substrats en aval comme CREB (*CRE Binding protein*) qui est transloqué dans le noyau et se fixe sur un CRE (*cAMP Response Element*) permettant la régulation de l'expression des gènes. L'activation de la protéine EPAC active quant à elle, la famille Ras des petites GTPases : Rap. Rap1 régule ainsi plusieurs fonctions cellulaires telles que l'adhésion cellulaire (Bos et al., 2003), la sécrétion de protéines telle que l'insuline (Kashima et al., 2001) ou le sAPP α (forme non-amyloïdogène soluble de la protéine précurseur de l'amyloïde) (Maillet et al., 2003) mais aussi la différenciation (Shi et al., 2006).

L'activation d'EPAC peut également conduire sous certaines conditions à l'activation des ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) via la cascade de signalisation Rap/Rac/MEK (Z. Wang et al., 2006). Les RCPG couplés à $G\alpha_s$ stimulent la production d'AMPc via l'adénylyl cyclase. Celle-ci active entre autres la PKA qui va phosphoryler CREB. Une fois activée, CREB est transloquée dans le noyau et va réguler la transcription de gènes.

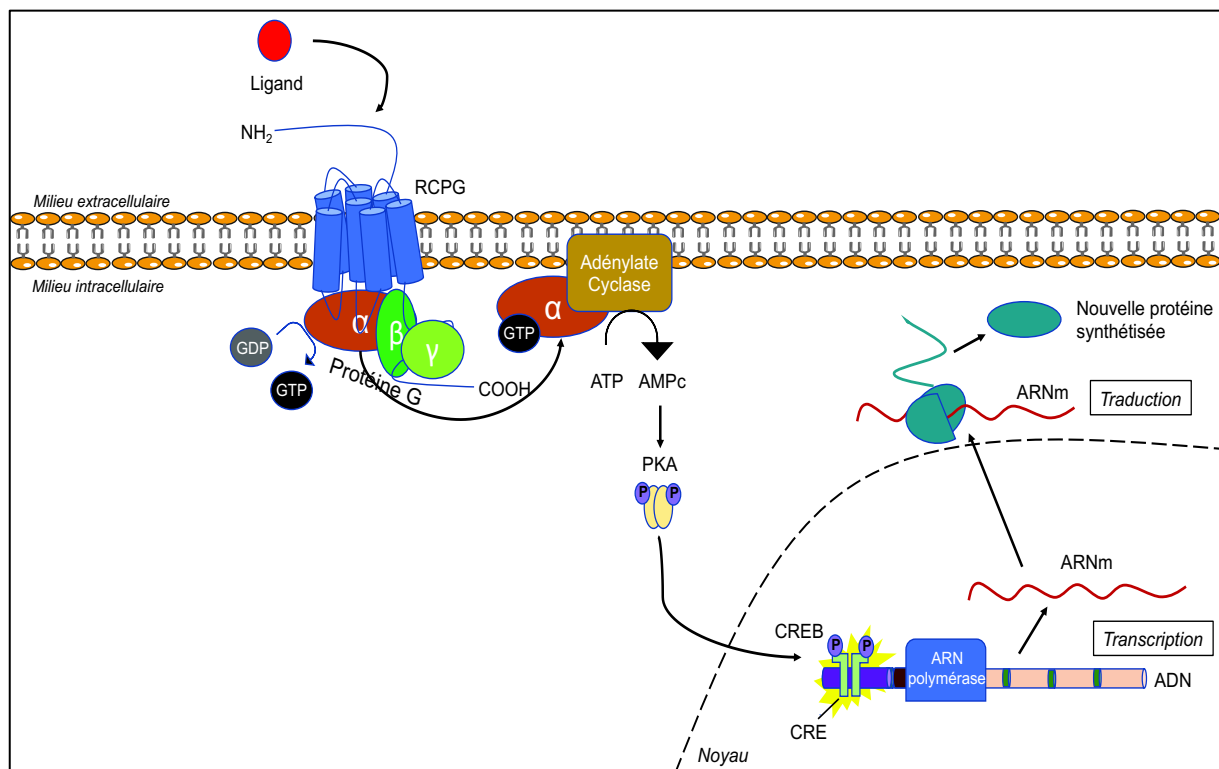


Figure 5 : Schéma d'une voie de signalisation G dépendante : la voie $G\alpha_s$

Les RCPG couplés à $G\alpha_s$ stimulent la production d'AMPc via l'adénylyl cyclase. Celle-ci active entre autres la PKA qui va phosphoryler CREB. Une fois activée, CREB est transloquée dans le noyau et va réguler la transcription de gènes.

- La famille $G_{\alpha_{i/o}}$ à l'inverse inhibe l'AC ce qui résulte en une diminution de la production d'AMPc. La signalisation de cette famille de protéines G s'effectue via la libération du complexe $G\beta\gamma$ qui régule l'ouverture de certains canaux comme les canaux GIRK (*G protein-gated Inwardly rectifying potassium channel*) (Kano et al., 2019). Il est à noter qu'une stimulation prolongée d'un RCPG couplé à la voie $G_{\alpha_{i/o}}$ provoque une sensibilisation de l'AC : une activation ultérieure de l'AC conduira à une réponse AMPc beaucoup plus importante que la normale (Watts & Neve, 2005). Ce phénomène, décrit pour la première fois il y a plus de 40 ans pour le récepteur δ -opioïde (Sharma et al., 1975), est un événement de signalisation commun à presque tous les récepteurs $G_{\alpha_{i/o}}$ (Watts & Neve, 2005).
- Les protéines de la famille G_q , qui contient G_{α_q} , $G_{\alpha_{11}}$, $G_{\alpha_{14}}$ et $G_{\alpha_{15}}$, activent l'isoforme β de la phospholipase C ($PLC\beta$) (Figure 6). Une fois activée, cette enzyme hydrolyse le PIP_2 (Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en DAG (Diacyl Glycerol) et en IP_3 (Inositol Triphosphate). Le DAG et l' IP_3 sont des seconds messagers : le DAG va activer la PKC (Protéine Kinase C) en restant à la membrane plasmique tandis que l' IP_3 diffuse et, en se fixant sur les récepteurs à l' IP_3 , entraîne le relargage du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. Cette augmentation importante de la concentration en calcium intracellulaire va déclencher un certain nombre de processus sensibles au calcium *via* des protéines qui se lient au calcium comme la CamKII (Calmoduline Kinase II). Récemment, de nombreuses équipes de recherche ont mis en lumière l'interaction des protéines G_q avec une multitude de protéines, régulant ainsi d'autres voies de signalisation. On peut citer par exemple l'association de G_{α_q} avec la PI3K ce qui l'implique dans la modulation de la voie de signalisation Akt (Golebiewska & Scarlata, 2008). D'autres études montrent une interaction entre $G_{\alpha_{q/11}}$ et p63RhoGEF, ce qui lie les RCPG couplés aux protéines G_q à l'activation de RhoA (Lutz et al., 2005, 2007).
- La famille $G_{12/13}$, qui comporte G_{12} et G_{13} , active des RhoGEFs (*RhoGTPase Guanine Exchange Factors*) (Figure 6). A ce jour, quatre RhoGEFs régulées par les protéines $G_{12/13}$ chez les mammifères sont connues : p115-RhoGEF,

PSD-95/Disc-large/ZO-1 *homology-RhoGEF*, *leukemia-associated RhoGEF* et *lymphoid blast crisis-RhoGEF*. Tous les RCPG couplés aux protéines $G_{12/13}$ identifiés à ce jour, transduisent également un signal via d'autres protéines G. Aucun RCPG couplé exclusivement aux protéines $G_{12/13}$ n'est connu à ce jour (Siehler, 2009). L'activation des protéines $G_{12/13}$ provoque la translocation de RhoGEF du cytosol vers la membrane plasmique, ce qui stimule la phosphorylation du GDP en GTP de la protéine RhoA. Une fois activée, RhoA régule plusieurs effecteurs, notamment de nombreuses protéines du cytosquelette dont la plus connue est ROCK (RhoA kinase). ROCK peut phosphoryler FAK (*Focal Adhesion Kinase*) ce qui induit la formation de fibres de stress d'actine et active le facteur de transcription SRF (*Serum Response transcription Factor*) (Riento & Ridley, 2003). ROCK phosphoryle également d'autres substrats comme la MLC phosphatase, Ezrin/Radixin/Moesin (ERM), la LIM kinase (LIMK) ou encore Tau (*microtubule Associated Unit*) (Sah et al., 2000). Plus généralement, la famille $G_{12/13}$ régule des processus de remodelage du cytosquelette, ce qui l'implique dans de nombreuses pathologies telles que le cancer.

Une controverse existe au sein de la communauté scientifique concernant un éventuel pré-couplage des protéines G au récepteur. En effet, le paradigme principal considère que les protéines G se couplent au récepteur seulement au moment de son activation (*collision coupling*), alors que plusieurs études hypothétisent un pré-couplage de ces protéines G au récepteur en absence d'agoniste (*precoupling*). Des techniques de microscopie de type FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) ou de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont mis en évidence de tels précouplages pour plusieurs RCPG comme les récepteurs muscariniques M_3 et M_4 , le récepteur adrénergique α_2 , le récepteur A_1 ou encore le récepteur dopaminergique D_2 (Nobles et al., 2005; Qin et al., 2011).

Par ailleurs, la communauté scientifique a longtemps pensé que les sous-unités $G\beta\gamma$ n'étaient que des régulateurs négatifs de la signalisation $G\alpha$ -dépendante. De nombreuses études ont montré qu'elles étaient capables d'activer et/ou de réguler de nombreuses voies de signalisation via des interactions avec des protéines variées : des PI3-kinases (Kerchner et al., 2004), des protéines à domaine PDZ (Zairong Li et

al., 2006) ou encore des protéines du complexe SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) (E. J. Yoon et al., 2007). Plus surprenant encore, le dimère Gβγ peut interagir avec des protéines localisées dans des compartiments cellulaires éloignés de la membrane plasmique où se trouve le récepteur. Par exemple, le complexe Gβγ est capable de moduler la transcription de l'ADN au niveau du noyau en s'associant avec l'enzyme Histone déacetylase 5 (HDAC5) (Spiegelberg & Hamm, 2005). Ces études viennent souligner le fait que la signalisation des RCPG peut s'effectuer dans plusieurs compartiments intracellulaires, mais nous reviendrons sur cet aspect dans la partie IV.

Par ailleurs, un groupe de protéines nommées AGS (*non-receptor Activator of G protein Signaling*) peuvent activer les protéines G de manière indépendante des RCPG (Blumer et al., 2005).

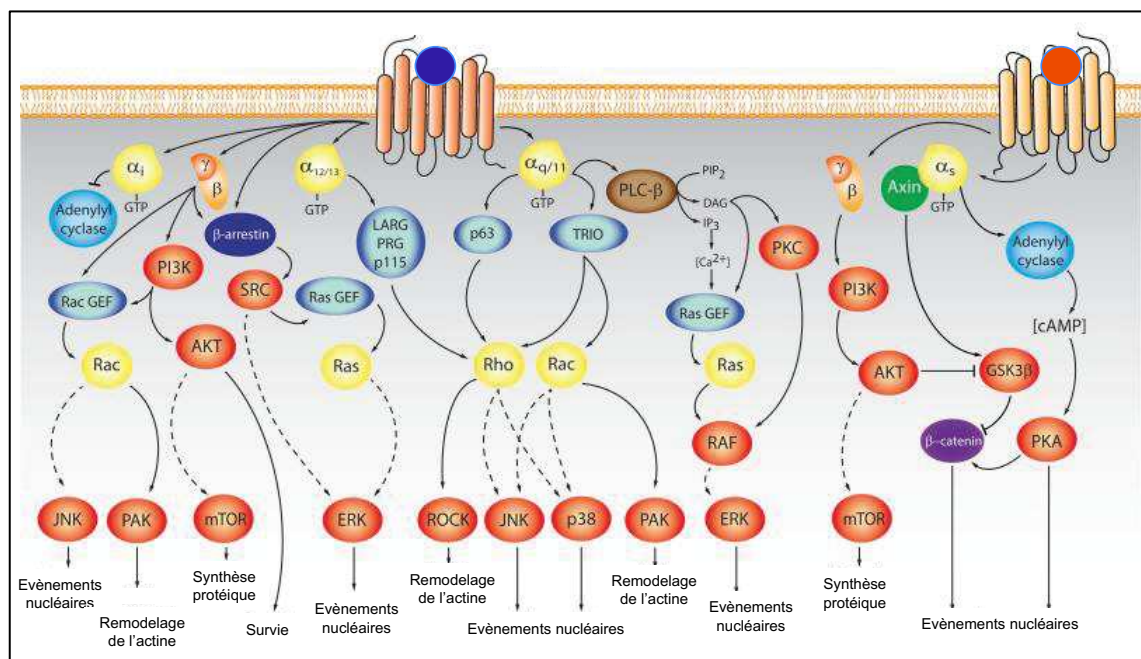


Figure 6 : Voies de signalisation dépendantes des différentes protéines G

La stimulation des RCPG résulte en l'activation de multiples voies de signalisation, incluant celles dépendantes des seconds messagers, des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) pour Ras et les Rho GTPases, des MAP kinases, de la PI3K et de leurs nombreuses cibles cellulaires en aval. Ces voies de signalisation sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la synthèse de protéines, la survie cellulaire, la différenciation ou la migration. D'après O'Hayre, Degese, & Gutkind, 2014, *Current Opinion in Cell Biology*.

B- LES VOIES DE SIGNALISATION G-INDEPENDANTES

1) La voie des β -arrestines

La complexité de la coordination de la signalisation cellulaire a nécessité l'implémentation évolutive de protéines d'échafaudage dont le rôle est de réguler l'activité de plusieurs processus cellulaires médiés par des récepteurs, des enzymes ou des canaux. Ces protéines d'échafaudage n'ont pas d'activité catalytique intrinsèque mais sont capables d'accomplir trois fonctions basiques : augmenter l'efficacité du transfert de l'information entre des enzymes d'une même cascade de signalisation, améliorer la fidélité d'une voie de signalisation en amortissant le « cross-talk » avec une voie parallèle, et adresser des effecteurs dans des localisations subcellulaires spécifiques.

Les β -arrestines ont été découvertes à la fin des années 80 à partir d'une expérience montrant qu'un excès de GRK2 (*G protein-coupled Receptor Kinase* ou *β -adrenergic receptor kinase*) provoquait une perte de la désensibilisation du récepteur β_2 -adrenergique. Cette perte de désensibilisation était empêchée par addition d'une forte concentration d'arrestine visuelle (Benovic et al., 1987).

La famille des arrestines est composée de deux arrestines rétiniennes, l'arrestine 1 et l'arrestine 4, et de deux arrestines non visuelles, la β -arrestine 1 (arrestine 2) et la β -arrestine 2 (arrestine 3). En fonction du type cellulaire et de l'état métabolique de la cellule, les arrestines peuvent avoir des localisations variées : dans le cytosol, liées au cytosquelette, concentrées dans le centrosome, attachées aux endosomes ou encore dans le noyau.

La particularité des β -arrestines, par rapport aux autres protéines d'échafaudage, est leur capacité à interagir avec des RCPG activés. Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur, un changement conformationnel permet aux GRK de phosphoryler des sites sérines ou thréonines localisés sur le domaine C-terminal ou la boucle i3 du récepteur. Ces phosphorylations vont créer un site de haute affinité pour la liaison des β -arrestines, permettant ainsi leur recrutement. Originellement décrite comme la première étape nécessaire à la désensibilisation des RCPG, de nombreuses études ont montré que la phosphorylation des RCPG par les GRK est un mécanisme crucial pour la régulation de la signalisation. En effet, le profil de phosphorylation des RCPG permet de recruter différentes conformations de β -arrestines, permettant de

promouvoir leurs fonctions variées : on parle de « code-barres de phosphorylation » (Lee et al., 2016; Reiter et al., 2012). Les β -arrestines sont constitutivement phosphorylées et sont déphosphorylées lors de leur liaison au récepteur. L'ubiquitination est également une autre modification post-traductionnelle permettant de réguler les β -arrestines (Shenoy & Lefkowitz, 2003).

Une fois recrutées, les β -arrestines peuvent échafauder plusieurs complexes de signalisation qui exerceront des fonctions cellulaires diverses. La plus connue est la désensibilisation des RCPG, qui est un processus au cours duquel une stimulation répétée du récepteur entraîne une diminution de la réponse cellulaire. En effet, la β -arrestine est un régulateur négatif de la signalisation des RCPG : sa liaison empêche physiquement le couplage de la protéine G au récepteur, bien qu'une étude récente montre le contraire (Thomsen et al., 2016). Elle assure le recrutement de protéines PDE (Phosphodiesterases) et DGK (Diacylglycérol Kinases) qui vont dégrader les seconds messagers activés par les RCPG. Par la suite, les β -arrestines vont promouvoir l'internalisation des récepteurs en recrutant la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine via un mécanisme qui sera détaillé dans la partie 4-A- (D. S. Kang et al., 2013) (Figure 7).

Les β -arrestines peuvent également activer la voie de signalisation JNK3 (*c-Jun N-terminal Kinase 3*). JNK3 est une MAP kinase identifiée originellement comme étant un partenaire de la β -arrestine 2. Celle-ci échafauda un module de signalisation pour JNK3 qui répond à l'activation d'un RCPG, comme le récepteur AT_{1A}R (McDonald et al., 2000).

Une autre MAP kinase activée par les β -arrestines est p38. Bien que les chercheurs n'aient pas montré directement que les β -arrestines pouvaient se lier à p38 ou à d'autres kinases en amont, au moins trois études ont montré l'implication des β -arrestines dans l'activation de p38 (Bruchas et al., 2006; W. E. Miller et al., 2003; Sun et al., 2002). Par ailleurs, les β -arrestines sont impliquées dans la signalisation d'autres kinases comme la PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase), Akt ou encore RhoA (Barnes et al., 2005; Povsic et al., 2003).

Un rôle nucléaire des β -arrestines a été également mis en évidence par plusieurs études. En effet, les β -arrestines sont partenaires de I κ B α , une protéine qui se lie au facteur de transcription nucléaire NF κ B et inhibe sa translocation dans le noyau (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004). Un autre exemple est la capacité de la β -arrestine

1, qui possède une localisation nucléaire, à se lier directement aux régions promotrices de plusieurs gènes comme *c-fos* ou *p27* et à recruter son partenaire CREB pour augmenter la transcription de ces gènes via p300, une histone acétyltransférase (J. Kang et al., 2005).

Par ailleurs, quelques études mettent le doigt sur une possible multimérisation des β -arrestines, bien que leur rôle ne soit pas éclairci. Par exemple, Milano et ses collaborateurs ont montré que la β -arrestine 1 et la β -arrestine 2 pouvaient former des hétérodimères (Milano et al., 2006). D'autre part, l'équipe de S. Marullo a montré que des β -arrestines exogènes pouvaient homo- ou hétéro-dimériser constitutivement dans des cellules de mammifères (Storez et al., 2005).

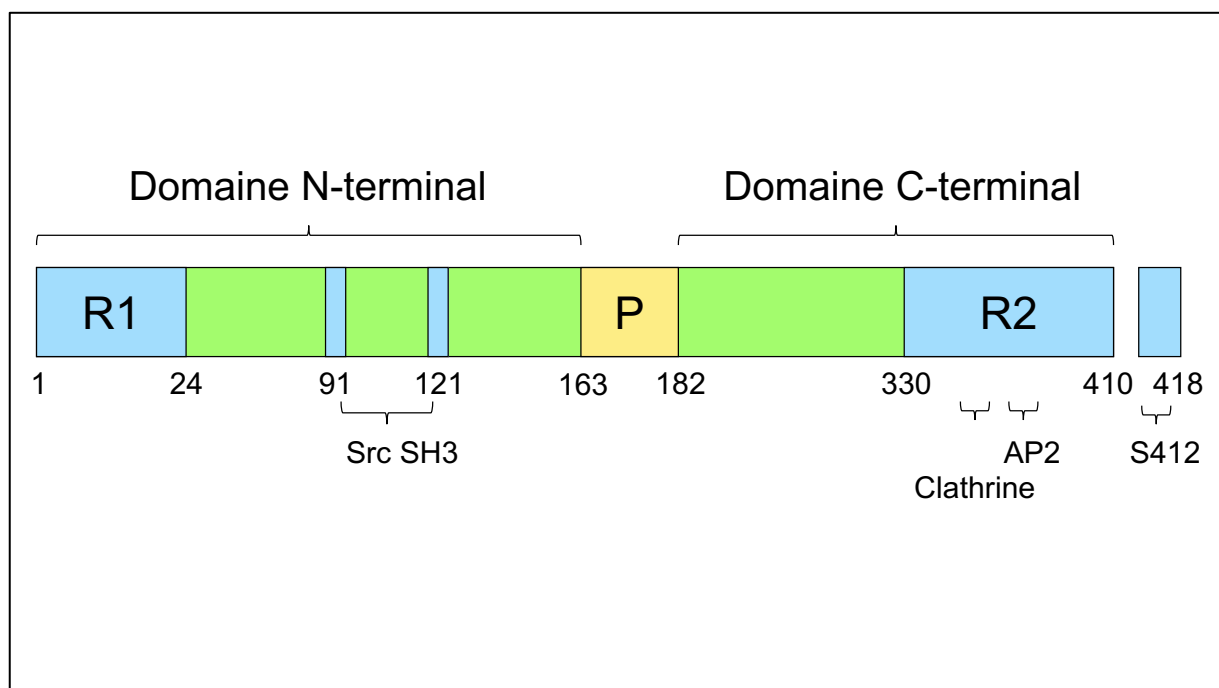


Figure 7 : Représentation schématique des domaines fonctionnels des β -arrestines

Un cœur polaire constitué d'acides aminés polaires ou chargés positivement sépare le domaine N-terminal du domaine C-terminal. Ce domaine central constitue un véritable détecteur de phosphate (P). L'interaction de la région N-terminale et du cœur polaire avec le RCPG activé et phosphorylé induit un changement de conformation de la β -arrestine vers un état actif. Les sites R1 et R2 sont des sites régulateurs. Le site R1 contient deux motifs SH3 impliqués dans l'interaction avec Src. Le site R2 contient le motif de liaison à la clathrine (LIEF) ainsi que le motif d'interaction avec le complexe AP2. La β -arrestine 1 présente une séquence additionnelle qui contient son principal site de phosphorylation, la sérine S412, et est donc plus longue que la β -arrestine 2. Inspiré de Luttrell & Lefkowitz, 2002, *Journal of Cell Science*.

2) La voie ERK1/2

La voie ERK1/2 est une autre voie de signalisation des RCPG qui a été extensivement étudiée. Les ERK sont des MAPK (ou sérine/thréonine kinases) impliquées dans des fonctions physiologiques variées telles que la régulation de la transcription ou l'apoptose. En ce sens, elles peuvent phosphoryler plus de 200 substrats cellulaires (S. Yoon & Seger, 2006). ERK est le dernier effecteur activé de la cascade des MAPK, qui s'effectue en trois étapes : dans la première, l'activation de Ras va lui permettre de phosphoryler Raf. Raf va ensuite activer MEK par phosphorylation dans la deuxième étape. Enfin, l'activation de MEK conduit à l'activation de ERK, qui peut moduler son interaction avec de nombreux effecteurs cytosoliques tels que cPLA2, Rsk1, PEA15, Sef1 etc. (Figure 8).

Les premiers travaux montrant que ERK1/2 pouvait être activée par des RCPG remontent au début des années 90. En effet, plusieurs observations montraient que les récepteurs couplés à $G\alpha_i$ pouvaient activer ERK. Par exemple, une étude montrait que la cascade de signalisation Ras/Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK était activée par le récepteur muscarinique M2 dans des fibroblastes de rat, un effet qui était aboli après traitement à la PTX (Toxine pertussique), qui est un inhibiteur connu de $G\alpha_i$ (Winitz et al., 1993). Par la suite, l'implication d'autres protéines G a été démontrée par une étude pionnière dans des cellules COS-7 surexprimant plusieurs RCPG (Faure et al., 1994).

La voie de signalisation canonique menant à la phosphorylation des MAP kinases ERK1/2 passe par l'activation de récepteurs tyrosine kinase, qui contrairement aux RCPG possèdent une activité catalytique intrinsèque leur permettant de transduire le signal via une autophosphorylation de leurs sites tyrosines. Ainsi, les mécanismes d'activation de ERK1/2 par les RCPG impliquent des effecteurs variés qui vont activer des protéines participant à la cascade de signalisation des MAP kinases. Les effecteurs recrutés sont très différents d'un RCPG à l'autre, mais dépendent également du type cellulaire et de la localisation subcellulaire du RCPG.

Par exemple, les récepteurs couplés à $G\alpha_s$ activent généralement ERK1/2 par une cascade de signalisation dépendante de l'AC et de la PKA, tandis que les récepteurs couplés à $G\alpha_q$ utilisent un mécanisme dépendant de la PKC.

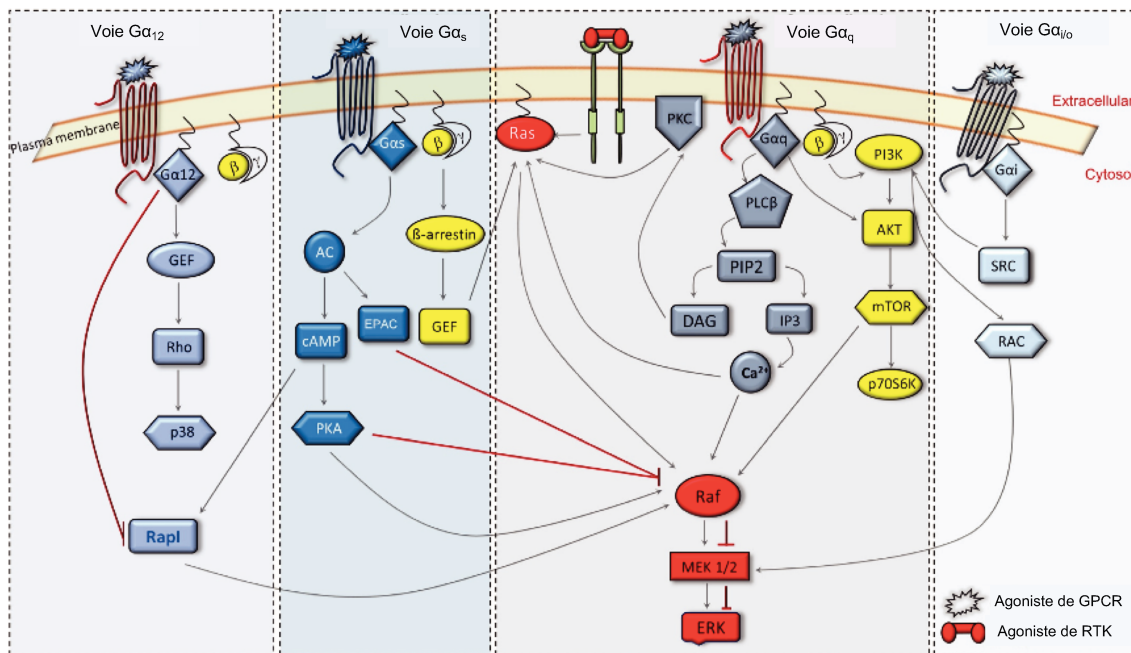


Figure 8 : Cascades d'activation des MAP kinases déclenchées par les différentes sous-unités des protéines G.

Seules les voies d'activations indépendantes du ligand et du récepteur sont montrées. La cascade d'activation des MAP kinases résulte en l'activation de ERK1/2. Plusieurs protéines peuvent déclencher son activation comme PKA, Ras, Rap1, RAC ou mTOR. *D'après Jain, Watson, Vasudevan, & Saini, 2018, International Review of Cell and Molecular Biology.*

Un autre acteur majeur de l'activation de ERK1/2 est la β -arrestine. En effet, de nombreuses études ont montré que les β -arrestines pouvaient servir d'échafaudage pour l'activation des MAPK (DeFea et al., 2000; Pierce & Lefkowitz, 2001). Lorsque l'activation des ERK est dépendante des protéines G, elle est rapide et transitoire alors que lorsqu'elle dépend des β -arrestines, elle n'implique pas la translocation et provoque une lente et persistante activation de cette cascade (Lefkowitz & Shenoy, 2005). Par ailleurs, la désensibilisation des RPCG, processus qui implique les β -arrestines, induit également des réponses mitogènes qui passent par une phosphorylation de ERK (Luttrell et al., 1999).

L'activation des ERK peut également être dépendante de l'activation de protéines kinases de la famille Src, qui agissent en amont de la phosphorylation des ERK (Barthet et al., 2007).

3) Transactivation des RTK par les RCPG

Les RCPG sont capables de transactiver des RTK (Récepteur Tyrosine Kinase), ce qui constitue en soi une autre voie de signalisation des RCPG si on considère ces récepteurs comme des effecteurs. L'activation de ces RTK entraînera *in fine* la phosphorylation de ERK1/2. Historiquement, la première étude faisant mention de ce mécanisme montrait que plusieurs agonistes de RCPG entraînaient une phosphorylation rapide puis une activation du récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), effet qui était inhibé par des antagonistes de ces RCPG (Daub et al., 1996). Par la suite, ce phénomène de transactivation a été retrouvé pour de nombreux RCPG : le récepteur GABA_B, les récepteurs de la sérotonine, les récepteurs aux chimiokines, le récepteur à l'angiotensine II etc. De plus, les récepteurs tyrosine kinase activés par les RCPG sont très variés : les récepteurs de la famille du TGF (*Transforming Growth Factor*) comme TGF- β , les récepteurs de la famille des PPR (*Pattern Recognition Receptors*) comme les *Toll-like receptors* ou TLR, ou encore le récepteur de l'IGF-1 (*Insuline-like Growth Factor*).

Deux mécanismes ont été décrits : un mécanisme ligand-dépendant et un mécanisme ligand-indépendant. La voie ligand dépendante est caractérisée par la sécrétion d'un ligand endogène dont la production est activée par la fixation d'une molécule sur le RCPG. Dans cette voie, la phosphorylation de la kinase Src, par le RCPG est nécessaire à la transactivation du RTK. Les β -arrestines sont parfois également impliquées dans ce mécanisme (Oligny-Longpré et al., 2012). L'activation de Src stimule l'expression d'une MMP (Matrix Métalloprotéinase), qui va cliver une protéine transmembranaire. Le clivage de cette protéine provoque le relargage dans le milieu extracellulaire d'un ligand qui se fixe sur le RTK avec une haute affinité, entraînant ainsi son activation (Cattaneo et al., 2014).

Dans la voie ligand-indépendante, Src va directement aller phosphoryler le RTK dans le cytoplasme. Un autre mécanisme possible est la formation d'un complexe RCPG-RTK qui va activer le RTK (Wetzker & Böhmer, 2003).

Plusieurs études mentionnent que les récepteurs tyrosines kinases peuvent aussi activer des RCPG. Par exemple, le récepteur de l'IGF-1 peut transactiver le récepteur CXCR4 et l'insuline peut transactiver le récepteur β_2 -adrénergique (Akekawatchai et al., 2005; Valiquette et al., 1995). Deux mécanismes distincts ont été décrits. Dans le

premier, la stimulation du récepteur tyrosine kinase induit la synthèse et la sécrétion d'un ligand du RCPG transactivé, qui se lie et active le RCPG (El-Shewy et al., 2006) (Figure 9). Dans le deuxième, le mécanisme est indépendant du ligand : l'activation du récepteur tyrosine kinase entraîne la formation d'un complexe RCPG-RTK qui va activer le RCPG (Delcourt et al., 2007) (Figure 9).

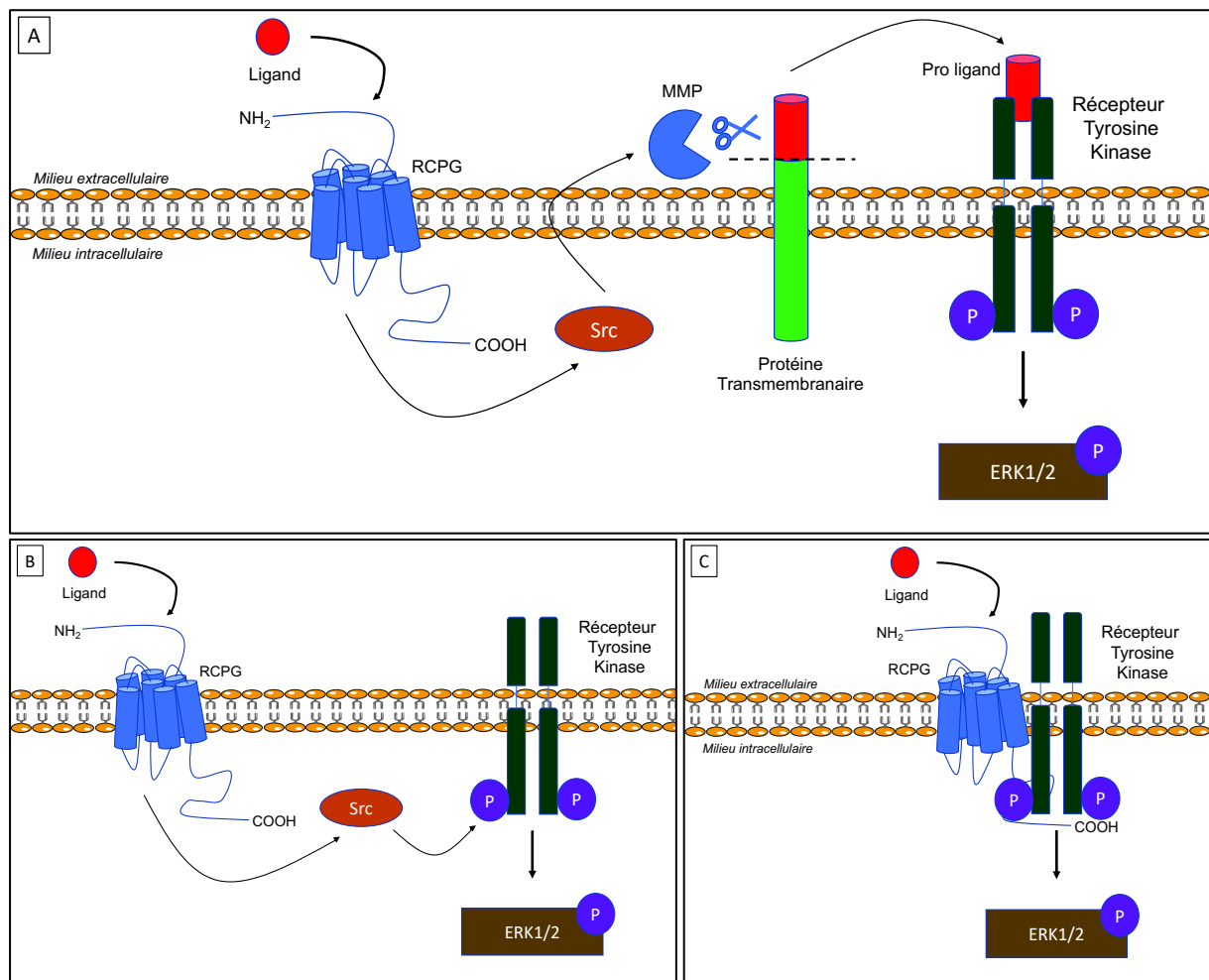


Figure 9 : Transactivation des RTK par les RCPG

Trois mécanismes sont proposés. (A) Dans la voie dépendante du ligand, Src est activé par le RCPG et stimule l'expression d'une MMP qui va cliver une protéine transmembranaire, libérant ainsi un pro-ligand. Le pro-ligand généré va se lier au récepteur tyrosine kinase et induire son activation. La voie ligand-indépendante inclut (B) une phosphorylation directe du RTK par Src dans le cytoplasme et (C) l'activation du RTK via la formation d'un complexe RCPG-RTK.

IV- Modulation de la signalisation des RCPG

Pendant de nombreuses années, le paradigme communément accepté concernant les RCPG était un modèle dit ternaire, où la signalisation de cette classe de récepteurs mettait en jeu trois partenaires : le ligand, le récepteur et la protéine G. Nous avons vu dans la partie III- que la signalisation des RCPG était bien plus complexe que ce modèle. A cette complexité viennent s'ajouter d'autres mécanismes cellulaires de modulation de la signalisation des RCPG que nous allons détailler dans cette partie.

A- TRAFIC, ENDOCYTOSE ET RECYCLAGE DES RCPG

Il a été longtemps accepté que le modèle d'activation des RCPG était cyclique : le ligand se lie à son récepteur ce qui induit un changement de conformation, l'activation de voies de signalisation en aval, suivie d'une inactivation du récepteur et de son recyclage avant un nouveau tour de stimulation. Ce processus permet de protéger la cellule d'une stimulation excessive qui pourrait être néfaste.

L'inactivation des récepteurs est suivie d'une endocytose. Lorsqu'ils sont internalisés, les récepteurs peuvent être adressés dans des compartiments où ils seront dégradés, ou bien être recyclés à la membrane. Le concept de base statuait que les récepteurs devenaient inactifs lorsqu'ils étaient internalisés, mais des études récentes ont montré que les RCPG internalisés restaient non seulement actifs, mais étaient aussi capables d'exercer une signalisation soutenue via l'activation de ERK1/2 ou l'AMPc. C'est le cas par exemple du récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH), du récepteur de la thyroïdostimuline (TSH), du récepteur du GLP1 (*Glucagon-like Peptide 1*), du récepteur du PACAP ou encore du récepteur V2 (Vasopressine 2) (Calebiro et al., 2009; Feinstein et al., 2013; Ferrandon et al., 2009; Kuna et al., 2013; Merriam et al., 2013). L'endocytose des RCPG est généralement médiée par les β -arrestines, qui une fois recrutées vont adresser les récepteurs vers des puits à clathrine où vers le complexe AP-2. Les récepteurs sont alors internalisés dans des endosomes précoces et leur devenir va être déterminé : soit ils seront déphosphorylés et recyclés à la membrane plasmique, soit ils seront séquestrés dans des compartiments cellulaires, soit ils seront dégradés dans des lysosomes. Il semblerait qu'une interaction prolongée avec la β -arrestine favorise la séquestration des récepteurs alors qu'une interaction transitoire

favorise leur recyclage (Lefkowitz & Shenoy, 2005).

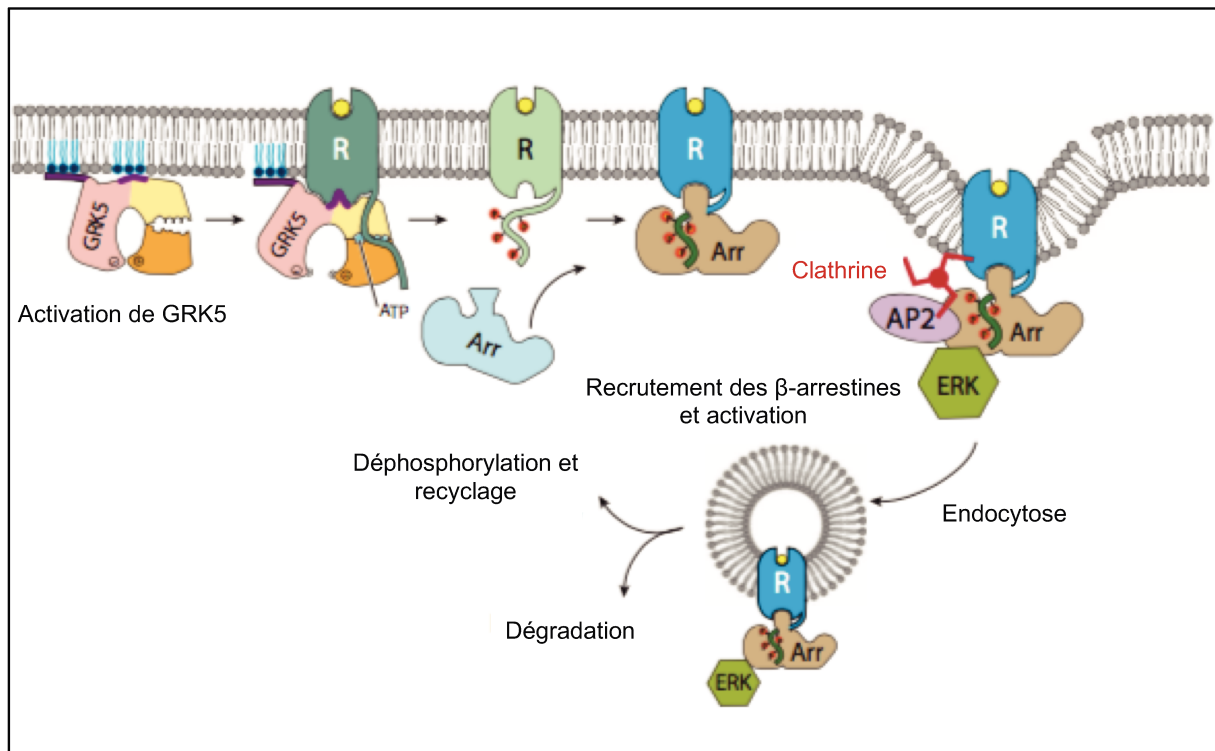


Figure 10 : Signalisation des RCPG via les β -arrestines

Le RCPG est phosphorylé sur son domaine C-terminal par la protéine GRK5 ce qui va permettre le recrutement et l'activation des β -arrestines. Une fois activée, la β -arrestine va déclencher l'endocytose en interagissant avec le complexe AP-2 et en activant ERK. Par la suite, le récepteur sera soit dégradé, soit recyclé à la membrane. D'après Weis & Kobilka, 2018, *Annual Review of Biochemistry*.

Parmi les machineries permettant le recyclage et plus généralement le recrutement des récepteurs à la membrane, le complexe ASRT est d'une importance majeure. Ce complexe comporte la SNX27 (*Sortin Nexin 27*), le complexe WASH et le rétromère, composé des protéines Vps (*Vacuolar Protein Sorting*) Vps26-Vps-29-Vps35. ASRT organise l'assemblage des tubules sur les endosomes précoces, l'emballage des protéines cargo, et le transport de ces protéines vers la membrane plasmique grâce à des intermédiaires (Temkin et al., 2011). Ce complexe de recyclage semble être d'une importance capitale étant donné l'implication de mutations génétiques de la SNX27 ou du rétromère dans des pathologies graves telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Follett et al., 2016, 2014).

Par ailleurs, une signalisation intracellulaire des RCPG a été décrite pour des

récepteurs localisés dans des compartiments subcellulaires bien spécifiques : mitochondries, réticulum endoplasmique, noyau etc. Par exemple, le récepteur mGlu5 (*Metabotropic Glutamate Receptor 5*) peut être localisé sur la membrane interne du noyau où il interagit avec la chromatine, et où il médie des flux de Ca^{2+} via son interaction avec $\text{G}_{q/11}$ (Cattaneo et al., 2014). Il semblerait que ces RCPG localisés dans des compartiments intracellulaires exercent des fonctions distinctes de celles qu'ils exercent à la membrane plasmique (Joyal et al., 2015).

Après leur synthèse, les RCPG subissent un processus de maturation continue qui persiste jusqu'à ce qu'ils atteignent leur destination finale située à la membrane plasmique. Cette maturation comporte plusieurs étapes : un repliement correct dans le réticulum endoplasmique, un trafic du *cis*- au *trans*- Golgi durant lequel plusieurs modifications post-traductionnelles vont avoir lieu puis un adressage où les récepteurs devront être correctement insérés dans la membrane plasmique. Un mécanisme de contrôle de la qualité des protéines qui sortent du réticulum endoplasmique existe au sein des cellules. Celui-ci a pour rôle d'adresser les protéines mal repliées au protéasome pour qu'elles soient dégradées. Le repliement des RCPG s'effectue grâce à des protéines chaperonnes qui vont permettre aux récepteurs de passer le contrôle qualité du réticulum endoplasmique et de sortir de ce compartiment cellulaire. Par exemple, la famille des protéines HSP (*Heat Shock Protein*) est connue pour assurer ce rôle.

Une fois adressé à la membrane plasmique, le récepteur doit être retenu à la surface de la cellule pour permettre une interaction avec son ligand. Diverses protéines sont impliquées dans la stabilisation des RCPG à la membrane plasmique comme la spinophiline, Homer ou PSD-95 (Tan et al., 2004). Ces interactions s'effectuent généralement via un domaine PDZ qui interagit avec le domaine C-terminal du récepteur.

B- ACTIVATION BIPHASIQUE

L'activation biphasique des RCPG a initialement été décrite chez les récepteurs AT1 (Angiotensine 1). La phosphorylation de ERK1/2 suivant l'activation du récepteur AT1 atteint un pic transitoire à 2 minutes, suivi d'un autre pic plus soutenu à 120-150 minutes. Ces 2 phases d'activation de ERK1/2 contribuent à l'activité transcriptionnelle

de c-jun et à la prolifération cellulaire. Néanmoins, seule la seconde phase a un effet sur la synthèse de l'ADN et la croissance cellulaire induite par le ligand Angiotensine II (Schorb et al., 1995). Par la suite, cette activation biphasique a été retrouvée chez de nombreux RCPG et a rapidement été reconnue comme un nouveau mode d'activation des voies de signalisation puisqu'il semblerait que les deux phases aient des fonctions différentes.

Dans la plupart des mécanismes identifiés, la phase précoce semble être médiée par les protéines G, tandis que la phase tardive semble être dépendante de la voie des β -arrestines (Gesty-Palmer et al., 2006; McLennan et al., 2008). Toutefois, il est à l'heure actuelle peu clair si ce mode d'activation est commun à tous les RCPG puisqu'il n'a été observé que chez certains récepteurs. De plus, les mécanismes d'activation sous-jacents à cette activation biphasique restent encore à élucider.

C- AGONISME BIAISE

Initialement, la signalisation des RCPG était considérée comme médiée seulement par les protéines G. Ce concept a été totalement revisité lorsqu'il a été découvert que les β -arrestines étaient capables de générer une signalisation des RCPG de manière indépendante. De plus, de nombreux ligands de RCPG sont capables d'activer sélectivement la voie des protéines G ou la voie des β -arrestines : ce sont des ligands biaisés. Il est maintenant admis que la fixation d'un ligand sur un RCPG va induire un changement conformationnel qui est spécifique à ce ligand, et qui va moduler l'efficacité de recrutement des différents transducteurs du signal (Zürn et al., 2009). D'autres concepts récents en pharmacologie montrent que les mouvements conformationnels des complexes ligands-récepteurs se propagent aux transducteurs du signal. Pour les arrestines, ces changements de conformation influencent leur interaction avec leurs partenaires protéiques d'échafaudage. Pour les protéines G, cela induit une modification du taux de liaison du GTP, ainsi que celui du temps de liaison de la protéine G au récepteur. Par ailleurs, l'interaction RCPG-arrestine est au moins partiellement dépendante de la phosphorylation de motifs conservés du récepteur par les GRK ou d'autres kinases. Plusieurs études ont montré que des ligands pouvaient induire des motifs spécifiques de phosphorylation des RCPG, qui contrôlent l'affinité d'interaction avec l'arrestine ainsi que le recrutement des effecteurs en aval (Butcher et al., 2011; Shiraishi et al., 2018; Zidar et al., 2009).

contrôlent l'affinité d'interaction avec l'arrestine ainsi que le recrutement des effecteurs en aval (Butcher et al., 2011; Shiraishi et al., 2018; Zidar et al., 2009).

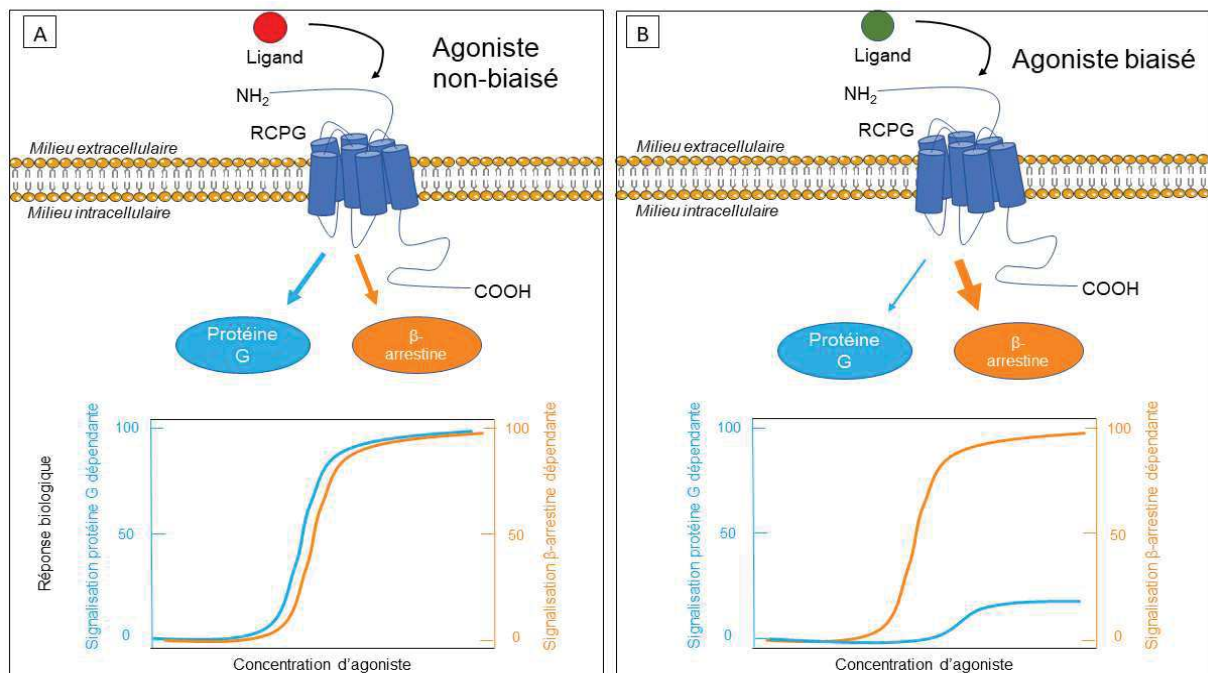


Figure 11 : Agonisme non-biaisé vs agonisme biaisé

Les agonistes non-biaisés activent les différentes voies de signalisation avec la même efficacité. Les agonistes biaisés stimulent une voie de signalisation de façon préférentielle par rapport aux autres.

La découverte de cet agonisme biaisé a eu un fort impact sur le développement de molécules à visée thérapeutique. En effet, les molécules doivent désormais être testées sur plusieurs voies de signalisation lors de leur développement préclinique. D'autre part, la communauté scientifique s'est rendue compte que les ligands biaisés pouvaient permettre de s'affranchir d'effets secondaires délétères chez les patients. Par exemple, le Carvedilol, un agoniste β -arrestine biaisé des récepteurs β -adrénergiques a montré qu'il pouvait inhiber l'effet toxique médié par la voie des protéines G des catécholamines et qu'il pouvait stimuler la survie cellulaire via la voie des β -arrestines. Des essais cliniques ont montré par la suite que ce composé augmentait de manière significative la survie des patients atteints d'un arrêt cardiaque comparés aux autres β -bloquants non biaisés (Poole-Wilson et al., 2003; Wisler et al., 2007).

D- MODULATION DU COUPLAGE AUX PROTEINES G

Comme nous l'avons vu précédemment, les RCPG étaient autrefois vus comme des protéines quiescentes qui requièrent leur activation par un agoniste, ce qui leur permet de générer une signalisation via une protéine G. Par conséquent, les sous-types de RCPG sont souvent classifiés en fonction de leur ligand physiologique et de leur association préférentielle à une famille de protéines G. Néanmoins, la plupart, si ce n'est tous les RCPG peuvent se coupler à de multiples transducteurs du signal ainsi qu'à plusieurs protéines G grâce à la dynamique conformationnelle intrinsèque à ces protéines.

Plusieurs approches expérimentales ont mis en évidence cette sélectivité des RCPG pour des protéines G distinctes, incluant l'analyse des seconds messagers, des expériences de co-précipitation ou des approches de transfert d'énergie (J. Hu et al., 2010; Milligan, 2003; Stewart et al., 2010; H.-Y. Wang et al., 2005). L'équipe du docteur Lirussi a quant à elle démontré une activation biphasique de la voie ERK1/2 du récepteur β_3 -adrénergique via une signalisation G_s puis une signalisation G_i . En effet, la prolifération cellulaire induite par le récepteur β_3 -adrénergique dépend d'une activation séquentielle de ERK1/2 : à 3 minutes, un pic de phosphorylation de ERK serait induit par une voie G_s /PKA/Src tandis qu'un deuxième pic d'activation à 8 heures semble être médié par une signalisation G_i /Src/PI3K (Hadi et al., 2013).

Plus récemment, une étude a prédit le couplage de presque 150 RCPG activés avec la partie C-terminale de 11 sous unités $G\alpha$ en utilisant un test de séparation du TGF- α en fonction de la présence de protéines G chimères. Ces résultats ont montré que de nombreux RCPG étaient capables de coupler plusieurs sous-unités $G\alpha$ (Inoue et al., 2019).

Le domaine de signalisation de prédilection des RCPG est la membrane plasmique. Mais les membranes plasmiques physiologiques peuvent être très complexes et contenir jusqu'à 1000 types de lipides différents (Harayama & Riezman, 2018). Ceux-ci peuvent interagir directement avec les récepteurs mais peuvent aussi être assemblés dans des microdomaines via des interactions avec les protéines membranaires, comme les cavéolines ou les radeaux lipidiques. Ces microdomaines sont enrichis en transducteurs du signal spécifiques, incluant aussi des sous-types de protéines G (Parton & Del Pozo, 2013). Par ailleurs, des différences dans la

composition lipidique de la membrane peuvent aussi altérer sa courbure, ce qui peut influencer la dynamique conformationnelle des RCPG (Rosholm et al., 2017). Ceci peut donc altérer la signalisation des récepteurs, et contribuer aux différences observées dans le comportement de certaines molécules.

Une étude très récente montre d'ailleurs que la composition phospholipidique de la membrane a une influence sur le couplage du récepteur β_2 -adrénergique avec G_s ou G_{i3} . En effet, Strohmman et collaborateurs montrent qu'en bombardant la membrane plasmique avec des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , ceux-ci interagissent avec les charges négatives des phospholipides et changent le couplage du récepteur avec G_{i3} (Strohmman et al., 2019). La charge locale de la membrane peut donc avoir une influence sur le couplage du récepteur avec différentes protéines G.

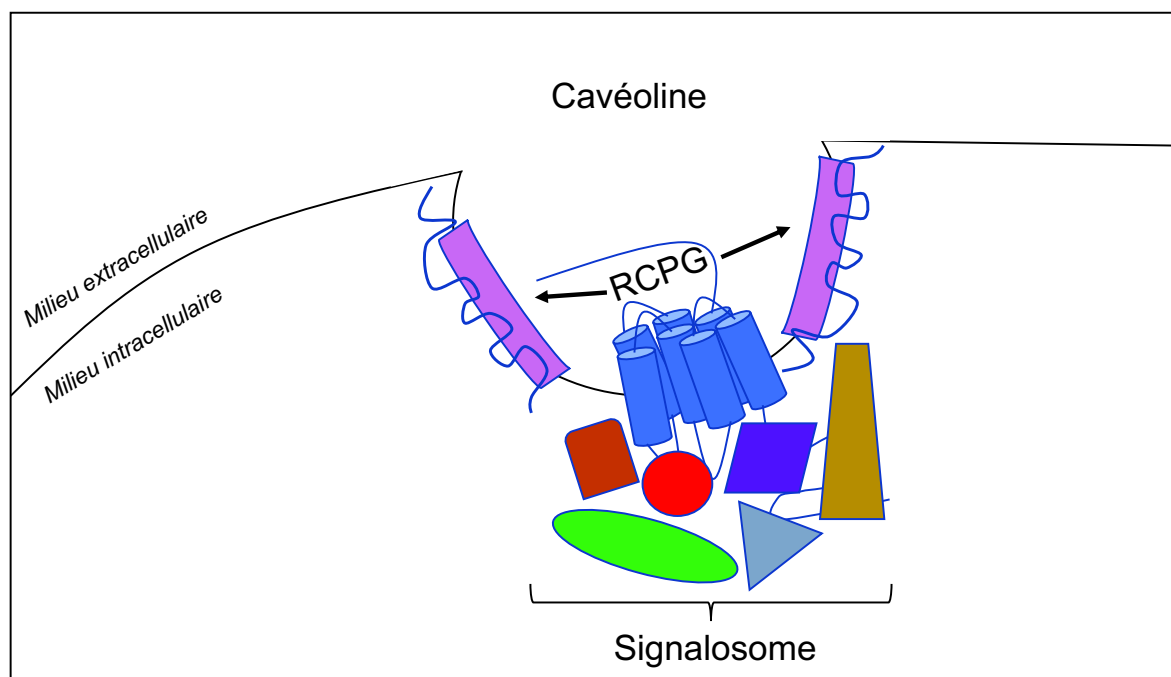


Figure 12 : Schéma d'un RCPG localisé dans une cavéoline

La signalisation des RCPG peut être spatialement (et temporellement) compartimentalisée pour encoder des réponses uniques au niveau cellulaire. Cette signalisation s'effectue grâce à des complexes de protéines (signalosomes) autour du RCPG. Ici, la localisation du RCPG au sein d'un microdomaine (cavéoline) peut influencer sa conformation et donc sa signalisation grâce à des interactions avec des lipides ou des protéines enrichies au sein de ces microdomaines.

E- OLIGOMERISATION

La vue traditionnelle où les RCPG fonctionnaient comme des unités monomériques a été complètement remise en question ces dernières années. En effet, il est maintenant clair que les RCPG peuvent former des homo- et hétéro-oligomères, les homo-oligomères étant des assemblages du même récepteur et les hétéro-oligomères étant des assemblages de récepteurs différents. Cette vision a initialement été accueillie avec scepticisme par une partie de la communauté des chercheurs, qui considéraient que l'oligomérisation était un artefact lié à la surexpression de RCPG dans des systèmes hétérologues. Elle est désormais communément admise par la communauté scientifique. L'oligomérisation a des impacts significatifs sur la signalisation, la pharmacologie, la régulation, le *cross-talk*, l'internalisation et le trafic des RCPG. Pour certains récepteurs, cette oligomérisation est même obligatoire pour leur fonctionnement. Étant donné leur implication dans la modulation de processus physiologiques cruciaux, les hétéromères sont à l'heure actuelle d'importantes cibles thérapeutiques pour de nombreuses maladies telles que la schizophrénie, la maladie de Parkinson, l'addiction ou encore l'obésité.

Le concept d'oligomérisation des RCPG date de 1980 où L.F. Agnati et K. Fuxe ont envisagé une interaction entre les récepteurs aux monoamines et les récepteurs aux neuropeptides pour expliquer le *cross-talk* entre ces deux entités (Agnati et al., 1980). Par la suite, le paradigme des RCPG en tant qu'entités monomères a été remis en question par des études biochimiques, physiques et fonctionnelles montrant une possible interaction entre les RCPG (Dupré et al., 2012). La première preuve physique de dimérisation vient d'une analyse du récepteur de la rhodopsine par microscopie à force atomique où il a été observé sous forme de dimère dans des disques membranaires de souris (Fotiadis et al., 2003). Par la suite, la découverte que le récepteur GABA_B fonctionne obligatoirement sous forme d'hétérodimère, ainsi que les avancées dans les techniques de transfert d'énergie telles que le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) et le FRET ont confirmé l'existence d'hétéromères de RCPG qui possèdent des propriétés de signalisation uniques que ne possèdent pas leurs homomères respectifs (Maurel et al., n.d.; White et al., 1998). En effet, lorsqu'elle est exprimée individuellement dans des systèmes hétérologues, la sous-unité GbR₁ du récepteur GABA_B possède un motif RXR(R) qui permet la rétention du récepteur dans le réticulum endoplasmique, alors que GbR₂ est acheminé

jusqu'à la membrane plasmique mais est incapable d'activer des voies de signalisation en aval. Ceci est dû au fait que GbR₁ possède les éléments structuraux pour permettre la liaison du ligand mais pas pour coupler la protéine G tandis que GbR₂ peut coupler la protéine G mais ne peut pas se lier au ligand. L'expression des deux sous-unités résulte en leur dimérisation, ce qui masque le motif de rétention dans le RE de la sous-unité GbR₁ et permet l'assemblage d'un récepteur GABA_B fonctionnel à la surface cellulaire (Margeta-Mitrovic et al., 2000; Ng et al., 1999; Robbins et al., 2001).

R. Lefkowitz, co-lauréat du prix Nobel de chimie 2012 avec B. Kobilka, statuait en 2005 lors d'un symposium, sur la possibilité qu'un nombre important de récepteurs orphelins puissent ne pas avoir de ligands extracellulaires, mais puissent donner de nouvelles propriétés à d'autres RCPG en hétéromérisant avec (Lefkowitz, 2005). Ces récepteurs orphelins agiraient donc comme des modulateurs allostériques en permettant d'élargir les fonctions de signalisation de récepteurs non-orphelins. Plusieurs études ont ensuite montré que des récepteurs orphelins dimérisaient avec des RCPG non-orphelins. Par exemple, GPR179 est capable de recruter mGlu6 et d'hétéromériser avec ce récepteur, tandis que GPR50 hétérodimérise constitutivement avec le récepteur de la mélatonine MT₁, abolissant la liaison avec son ligand, son couplage à la protéine G ainsi que la liaison avec la β -arrestine (Levoye et al., 2006; Orlandi et al., 2013).

La formation d'oligomères de RCPG peut avoir d'autres conséquences fonctionnelles comme la modification de la sélectivité d'un récepteur pour un sous-type de protéine G. C'est par exemple le cas pour l'hétéromère 5-HT_{2A}-mGluR₂, une cible des drogues hallucinogènes détecté en système hétérologue et dans des échantillons de cerveaux humains. Après liaison du ligand, cet hétéromère subit un changement conformationnel et une phosphorylation du récepteur mGlu₂ permettant le couplage du récepteur 5-HT_{2A} à G_{i/o} et G_{q/11} (González-Maeso et al., 2008; Murat et al., 2019). Néanmoins, la découverte de l'oligomérisation des RCPG a soulevé de nombreuses questions. Le lieu et la façon dont ces complexes se forment et sont exprimés à la membrane plasmique restent des points à résoudre. Il semblerait que ces complexes se constituent avant d'être adressés à la surface de la cellule et que des protéines chaperonnes soient impliquées dans leur assemblage (Dupré et al., 2012).

V- Les GIP (*GPCR Interacting Proteins*)

Bien que la communauté scientifique ait compris depuis longtemps que les RCPG pouvaient s'assembler dans des complexes multi-protéiques, et que cela pouvait altérer l'observation de la fonction d'un récepteur et la réponse cellulaire, ce n'est que récemment que l'on s'est rendu compte de l'importance de ce type d'évènements via des concepts comme l'agonisme biaisé ou l'oligomérisation (Ellisdon & Halls, 2016). Les RCPG peuvent également interagir avec des partenaires qui ne sont pas des RCPG, ce qui peut moduler la reconnaissance du ligand, l'engagement d'un transducteur du signal ou encore le trafic du récepteur. Parmi les familles de protéines connues pour interagir avec les RCPG, on peut citer les protéines d'échafaudage comme les AKAP (*A-Kinase-Anchoring Protein*), les RAMP (*Receptor Activity-Modifying Proteins*), les MRAP (*Melanocortin Receptor-Accessory Proteins*) ou encore les LRP (*Low-density lipoprotein receptor-Related Proteins*) (Barbash et al., 2017; DeBruine et al., 2017; Hay & Pioszak, 2016; Malbon et al., 2004; Rouault et al., 2017).

A- LES PROTEINES CHAPERONNES

Durant leur biosynthèse, les RCPG interagissent avec des protéines chaperonnes de la machinerie cellulaire qui aident à leur repliement correct et leur maturation en masquant les surfaces hydrophobes, en aidant à la formation des ponts disulfures qui vont stabiliser le récepteur, ou encore en interagissant avec le domaine N-terminal immature. Les protéines de la famille des Hsp-70 (*Heat shock protein 70*) sont un exemple bien connu de ces chaperonnes.

Certains motifs présents sur la séquence des RCPG permettent le recrutement de GIP spécifiques. Par exemple, la séquence *RXR* présente chez de nombreux RCPG permet l'interaction avec le complexe COPI responsable de la rétention dans le RE et le transport rétrograde.

Les RAMP sont une famille de trois protéines transmembranaires, originellement identifiées pour leur rôle dans le trafic des récepteurs CLR (*Calcitonin receptor-like Receptor*) à la membrane via des hétérodimérisations CLR-RAMP1, CLR-RAMP2 et CLR-RAMP3. Ces protéines ont pour rôle de permettre aux CLR de quitter l'appareil

de Golgi ou le réticulum endoplasmique jusqu'à la surface cellulaire puis d'aider ces récepteurs à former une poche de liaison pour le ligand (McLatchie et al., 1998).

En plus de jouer un rôle dans le trafic des récepteurs CLR à la membrane, les RAMP sont nécessaires à leur signalisation et leur pharmacologie (voir figure). En effet, le récepteur CLR est incapable de lier un ligand par lui-même, et va avoir besoin d'hétérodimériser avec une protéine RAMP. Ainsi, le complexe CLR/RAMP1 forme un récepteur au CGRP (*Calcitonin Gene Related Peptide*) de haute affinité, alors qu'un hétérodimère CLR/RAMP2 ou CLR/RAMP3 donne naissance à deux sous-types distincts de récepteurs AM (Récepteurs de l'Adrénomédulline), AM₁ et AM₂ respectivement (Poyner et al., 2002).

D'autre part, les récepteurs CTR (*Calcitonin receptor*) sont capables d'être adressés à la membrane en absence de protéines RAMP, ainsi que de lier leur ligand la calcitonine (Poyner et al., 2002). Néanmoins, l'affinité du ligand pour le récepteur est faible comparée à celle pour les récepteurs AMY, qui résultent de l'association des CTR avec RAMP. Dans ces exemples, les protéines RAMP en tant que partenaires des RCPG introduisent une complexité où un récepteur étant associé avec une protéine partenaire ou non peut engendrer plusieurs phénotypes pharmacologiques distincts.

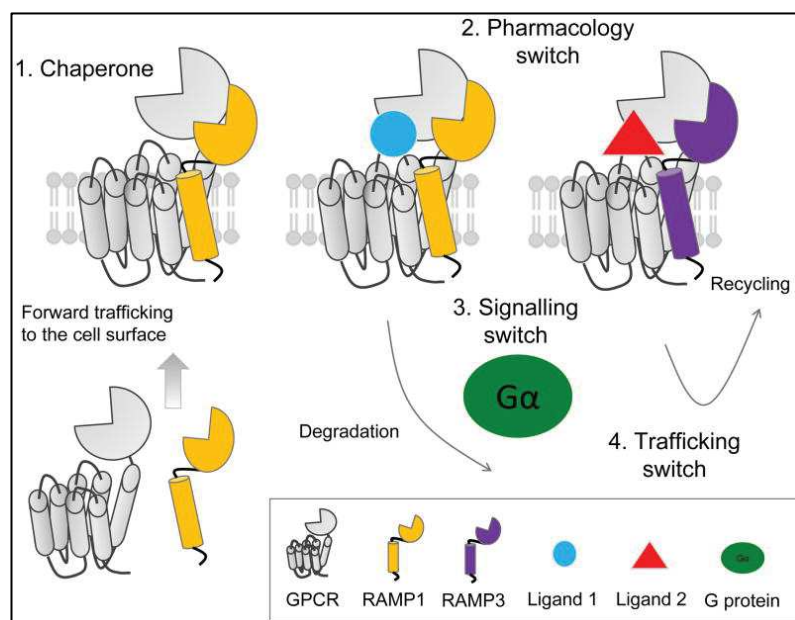


Figure 13 : Les différents rôles des RAMP

Quatre rôles principaux ont été décrits pour les RAMP. (1) Les RAMP permettent l'adressage de certains RCPG à la surface cellulaire. (2) Les RAMP peuvent altérer la pharmacologie des RCPG en modifiant la sélectivité du ligand pour certains RCPG. (3) Les RAMP peuvent modifier le couplage de certains RCPG. (4) Les RAMP peuvent avoir une influence sur le trafic de certains RCPG depuis la membrane, avec différentes RAMP permettant soit le recyclage soit la dégradation des récepteurs. D'après Hay & Pioszak, 2016, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.

Pour donner un autre exemple, on peut citer les protéines Homer qui se lient aux domaines C-terminaux des récepteurs du glutamate mGlu₁ et mGlu₅ et participent à la signalisation des complexes dans les densités postsynaptiques (Sheng & Hoogenraad, 2007). Dans les neurones, Homer1b est responsable de la rétention intracellulaire du récepteur mGlu₅, alors que Homer1a permet son adressage synaptique (Ango et al., 2002). Dans les neurones excitateurs, le ratio entre ces deux protéines est un régulateur clé de l'expression du récepteur mGlu₅ à la surface et à sa réponse cellulaire associée.

B- LES PROTEINES A DOMAINE PDZ

Les GIP peuvent s'organiser en complexes de signalisation des RCPG, pour moduler la signalisation protéine G-dépendante ou bien être des protéines de signalisation par elles-mêmes. A leur extrémité C-terminale, la plupart des RCPG possèdent une séquence PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) composé de 3 ou 4 acides aminés qui vont se lier aux domaines PDZ. Ces domaines sont des modules présents chez de nombreuses protéines qui fonctionnent comme des « adaptateurs » de complexes multimériques qui vont moduler la signalisation des RCPG. Les domaines PDZ sont des régions assez larges puisqu'elles contiennent 80-90 acides aminés, mais vont généralement se lier à une courte région située à l'extrémité C-terminale d'autres protéines. Cette liaison se fait par « extension » du feuillet bêta. En effet, le feuillet bêta situé dans le domaine PDZ est étendu par addition d'un autre feuillet bêta provenant de la protéine partenaire (Cowburn, 1997).

Les protéines NHERF-1 et NHERF-2 (*Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor*) sont une famille de protéines adaptatrices caractérisées par deux tandems de domaines PDZ et d'un domaine C-terminal qui se lie à la famille de protéines *Ezrin-Radixin-Moesin* qui s'associent à l'actine. NHERF-1 et NHERF-2 sont connues pour interagir avec une multitude de RCPG (Weinman et al., 2006). Initialement, une interaction entre NHERF-1 et le récepteur β_2 -AR a été montrée comme inhibitrice de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ de type 3 résultant de l'activation du β_2 -AR (Hall et al., 1998). Par la suite, une étude a montré que l'association de NHERF-1 avec le récepteur κ OR (κ *Opioid Receptor*) stimulait l'échange Na^+/H^+ provoqué après stimulation avec l'agoniste (P. Huang et al., 2004). Plus récemment, des études ont

montré que les protéines NHERF pouvaient influencer directement le couplage des récepteurs aux protéines G. En effet, NHERF-1 semble augmenter le couplage du récepteur PTH1 (*Parathyroid Hormone receptor 1*) activé à $G\alpha_q$, tandis que lorsque le récepteur PTH1 est activé, NHERF-2 diminue le couplage à $G\alpha_s$ et augmente l'activation de $G\alpha_q$ et $G\alpha_i$ (B. Wang et al., 2010, 2009).

MUPP1 est une protéine composée de treize domaines PDZ. Le premier RCPG à avoir été identifié comme interagissant avec MUPP1, via son 10^{ème} domaine PDZ, est le récepteur 5-HT_{2C} (Becamel et al., 2001). Les conséquences fonctionnelles de cette interaction restent pour le moment obscures, mais le même domaine PDZ s'associe avec le récepteur MT₁. Dans ce cas, MUPP1 favorise le couplage du récepteur à la voie de signalisation G_i/AC (Guillaume et al., 2008). Par ailleurs, MUPP1 interagit également avec le récepteur GABA_B via son 13^{ème} domaine PDZ et stimule sa signalisation en allongeant la durée des réponses Ca^{2+} (Balasubramanian et al., 2007). PSD-95 est une autre protéine contenant plusieurs domaines PDZ (3), et est le membre le plus étudié de la superfamille des protéines MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinase*). Cette protéine est presque exclusivement localisée dans les densités post-synaptiques des neurones ce qui en fait un important acteur de la plasticité synaptique et de la stabilisation des changements synaptiques lors de la potentialisation à long terme (Meyer et al., 2014). PSD-95 est un partenaire protéique du récepteur β_1 -AR. Bien que la coexpression de PSD-95 et du β_1 -AR n'ait aucun effet sur la désensibilisation du récepteur ou l'accumulation d'AMPc induite par l'activation du récepteur, l'internalisation du β_1 -AR induite par son ligand est fortement atténuée en présence de PSD-95. En outre, PSD-95 facilite l'association physique du β_1 -AR avec des protéines synaptiques telles que les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) (L. A. Hu et al., 2000).

La protéine PICK1 (*Protein Interacting with C Kinase 1*) est un autre exemple de GIP contenant un domaine PDZ et modulant la signalisation de certains RCPG. Cette protéine interagit principalement avec des récepteurs mGlu qui sont fortement enrichis dans les terminaisons pré-synaptiques des synapses glutamatergiques où PICK1 régule négativement le rétrocontrôle de la libération des neurotransmetteurs. Le partenaire prédominant de PICK1 semble être le récepteur mGlu_{7a} bien que d'autres récepteurs mGlu puissent s'associer avec PICK1 (Boudin et al., 2000). Dans des cultures de cellules granulaires du cervelet, l'interaction entre PICK1 et le récepteur mGlu_{7a} est requise pour l'inhibition spécifique des canaux Ca^{2+} de type P/Q suivant

l'activation présynaptique des récepteurs mGlu_{7a} (Perroy et al., 2002). Enfin, une disruption de l'association mGlu_{7a}/PICK1 par injection intraveineuse de peptide Tat est capable de générer des crises d'épilepsies chez la souris ou le rat (Bertaso et al., 2008). Ces résultats montrent qu'une interaction RCPG/GIP peut résulter en un trouble neurologique spécifique. Plus généralement, ils soulignent l'importance de ces associations d'un point de vue fonctionnel, et leur implication dans de potentielles pathologies.

C- LES PROTEINES RGS

La signalisation des RCPG peut aussi être régulée par des protéines RGS (*Regulators of G protein Signaling*), une famille de protéines multifonctionnelles qui peuvent atténuer et/ou moduler la signalisation des RCPG en se liant aux sous-unités G α et agissant comme des GAPs (*GTPase-activating Proteins*). Les protéines de cette famille partagent une séquence conservée de 120 acides aminés qui contient un site de liaison aux sous-unités G α et responsable de l'activité GAP : la *RGS box*. Les domaines N- et C- terminal de la *RGS box* contiennent également des domaines structuraux et des motifs de liaison à une multitude de protéines de signalisation comme le PIP₂ (Druey, 2017). Des études plus récentes ont révélé qu'en plus d'interagir avec les protéines G, les RGS étaient capables de s'associer directement avec les RCPG et de moduler leur signalisation.

RGS2 s'associe avec la boucle i3 des récepteurs muscariniques M₁, M₅ et dans une moindre mesure M₃. Une coexpression de RGS2 avec les récepteurs M₁ inhibe la formation d'IP (Inositol Phosphate) médiée par le récepteur (Bernstein et al., 2004). Un effet similaire est observé avec d'autres RCPG comme le récepteur adrénergique α 1_A ou le récepteur CCK2 (*Cholecystokinin-2 receptor*) (Hague et al., 2005; Langer et al., 2009).

RGS4 interagit avec le domaine C-terminal de deux sous-types de récepteurs aux opioïdes : μ OR et δ OR. Cette interaction inhibe la stimulation de l'adénylyl cyclase induite ainsi que la phosphorylation de ERK1/2, tout en favorisant l'internalisation de δ OR (Georgoussi et al., 2006; Leontiadis et al., 2009).

De manière intéressante, RGS20 augmente l'activité des canaux GIRK activés par le récepteur MT₁, et ce même au sein de l'hétérodimère MT₁/MT₂ ce qui ouvre la voie à des notions de régulation plus poussées de certaines GIP (Maurice et al., 2010).

Par ailleurs, les protéines RGS peuvent aussi moduler la signalisation des RCPG en se couplant de manière indirecte à des protéines d'échafaudage. Les exemples les plus connus concernent des protéines à domaine PDZ : GIPC (*GAIP-Interacting Protein, C-terminus*) et la spinophiline. A titre d'exemple, GIPC est capable de recruter RGS19 aux récepteurs dopaminergiques D₂ ce qui est important pour la signalisation du récepteur D₂ (Jeanneteau et al., 2004).

D'autre part, la spinophiline joue un rôle dans la détermination de la signalisation en améliorant l'accès des RGS aux RCPG et en facilitant l'interaction RCPG-RGS. Elle inhibe également les fonctions des β -arrestines en bloquant l'association entre GRK2 et le complexe RCPG-G β γ (Qin Wang & Limbird, 2002; Qin Wang et al., 2004).

Chapitre II

Les récepteurs sérotoninergiques

I- Le système sérotoninergique

A- GENERALITES

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), a été découverte à la fin des années 40. Initialement appelée entéramine, elle a été isolée dans les cellules entérochromaffines du tube digestif où elle exerce un effet vasoconstricteur (Erspamer, 1946). Par la suite, la sérotonine fut caractérisée dans le système nerveux central en tant que neurotransmetteur (Twarog & Page, 1953). La sérotonine exerce de multiples fonctions dont la plupart seront détaillées plus bas. Cette diversité fonctionnelle s'explique par la présence chez l'homme d'au moins 30 récepteurs codés par 14 gènes différents.

B- CLASSIFICATION

Les récepteurs de la sérotonine sont classés de 5-HT₁ à 5-HT₇ selon leur ordre de découverte, leur pharmacologie et leur homologie de séquence et de structure. Le nombre exact de récepteurs 5-HT varie en fonction de l'espèce car certains gènes codant pour ces récepteurs ont été identifiés chez l'homme mais pas chez les rongeurs. Tous les récepteurs de la sérotonine sont des RCPG à l'exception des récepteurs 5-HT₃ (3A et 3B) qui est un récepteur ionotrope. Les récepteurs 5-HT₁ (1A, 1B, 1D, 1E, 1F) et les récepteurs 5-HT₅ (5A et 5B) sont couplés aux protéines G_{i/o} et inhibent donc l'adénylyl cyclase, ce qui résulte en une diminution d'AMPc. Les récepteurs 5-HT₂ (2A, 2B, 2C) sont couplés aux protéines G_q ce qui stimule la PLC qui clive le PIP₂ en DAG et IP₃. Les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ sont couplés aux protéines G_s et stimulent l'adénylyl cyclase, ce qui induit la production d'AMPc. Dans les prochaines parties, nous nous focaliserons plus particulièrement sur le fonctionnement du récepteur 5-HT₄, et en moindre mesure sur le récepteur 5-HT₆.

II- Le récepteur 5-HT₄

A- HISTORIQUE

Le récepteur 5-HT₄ est un RCPG découvert dans des cultures primaires de collicules de souris par le Dr Dumuis et ses collaborateurs (Dumuis et al., 1988). A cette époque, seules trois classes de récepteurs sérotoninergiques avaient été découvertes : les récepteurs 5-HT₁, 5-HT₂ et 5-HT₃. Cette nouvelle classe de récepteurs avait pour ligand endogène la sérotonine (5-HT ou 5-Hydroxytryptamine), était couplée à G_s puisqu'elle activait l'adénylyl cyclase et était insensible aux antagonistes des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂. Le développement de composés pharmacologiquement actifs sur cette classe de récepteurs a permis de caractériser le récepteur 5-HT₄ (J. Bockaert et al., 1992). Par la suite, le gène codant pour le récepteur sera cloné pour la première fois chez le rat (Gerald et al., 1995). Il sera ensuite cloné chez la souris et chez l'homme au sein de l'équipe (Claeyssen et al., 1997, 1996). A la suite de sa découverte, ce récepteur a été impliqué dans de nombreuses fonctions au niveau du système nerveux central mais également au niveau périphérique (Eglen, Wong, et al., 1995).

B- LOCALISATION ET ROLE PHYSIOLOGIQUE

1) Au niveau central

Au niveau du système nerveux central, le récepteur 5-HT₄ est localisé au niveau des neurones situés dans le bulbe olfactif, dans le striatum (noyaux caudé et putamen), dans les ganglions de la base, dans le noyau accumbens, dans l'hippocampe, dans le cortex frontal, dans l'hypothalamus, dans l'amygdale et dans la substance noire (J. Bockaert et al., 2004; Y. Y. Huang & Kandel, 2007; Waeber et al., 1994). Au sein de la voie nigrostriée, qui transmet la dopamine de la substance noire au noyau caudé et au putamen, le récepteur est localisé au niveau des corps cellulaires et des terminaisons des neurones GABAergiques (Figure 14). Dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale, les récepteurs 5-HT₄ sont préférentiellement localisés sur les neurones cholinergiques, où ils stimulent la libération d'acétylcholine, ainsi que sur les neurones

glutamatergiques (Figure 14) (Bockaert et al., 2004; Bockaert et al., 2008; Johnson et al., 2012). Dans l'embryon de souris, le récepteur 5-HT₄ est fortement exprimé dans les collicules, ce qui fait des neurones primaires issus de cette structure un modèle expérimental pour étudier le R-5-HT₄ en système natif.

Le récepteur 5-HT₄ est impliqué dans de nombreuses fonctions telles que l'apprentissage et la mémoire, le comportement alimentaire, la plasticité synaptique, la respiration, l'humeur et possède des effets antidépresseurs (Asakawa et al., 2006; Kemp & Manahan-Vaughan, 2005; Kulla & Manahan-Vaughan, 2002; Manzke et al., 2003; Marchetti et al., 2000). D'après une étude récente, il semblerait que ces effets antidépresseurs dépendent des récepteurs localisés dans le cortex préfrontal médian (Castello et al., 2018).

Le récepteur est impliqué dans la libération d'un certain nombre de neurotransmetteurs et d'hormones comme l'acétylcholine, la dopamine, la sérotonine, l'insuline et la prolactine (Bonhomme et al., 1995; Chen et al., 2016b; Consolo et al., 1994; Ge & Barnes, 1996; Papageorgiou & Deneff, 2007). Cette libération de neurotransmetteurs suite à l'activation du récepteur est impliquée par exemple dans l'augmentation de la mémoire à court et à long terme (Mohler et al., 2007). Bien qu'il soit admis que le récepteur a une localisation plutôt post-synaptique, son implication dans la libération de neurotransmetteurs suggère également une localisation pré-synaptique. Le manque d'anticorps spécifiques du récepteur n'a pas permis d'effectuer des études d'immunolocalisation subcellulaires.

Dans des modèles d'amnésie, l'utilisation d'agonistes du récepteur 5-HT₄ restaure les facultés mnésiques (Micale et al., 2006). Par ailleurs, le récepteur jouerait un rôle dans la formation des dendrites et son activation aurait des propriétés neuroprotectrices en augmentant la sécrétion de la forme sécrétée soluble de l'APP (sAPP α), connue pour avoir des effets neuroprotecteurs (Cachard-Chastel et al., 2007; Chasseigneaux & Allinquant, 2012; Kozono et al., 2017).

Les souris invalidées pour le gène *HTR4*, qui code pour le récepteur, présentent plusieurs déficits. En effet, leurs neurones ont une libération de sérotonine diminuée, elles présentent une hyper-sensibilité aux crises d'épilepsies, et l'absence de récepteur abolit l'hypophagie induite par le stress et l'exploration en présence de nouveauté chez ces souris (Compan et al., 2004; Conductier et al., 2006).

Une étude récente a comparé par une approche de *RNA sequencing* les différences d'expression des gènes des cellules du cortex humain et de la souris. Cette étude

révèle que les récepteurs sérotoninergiques sont en deuxième position dans le classement des familles de gènes dont les différences d'expression sont les plus grandes. Le gène *HTR4* notamment voit son expression parmi les plus divergentes entre l'homme et la souris (Hodge et al., 2019). Ces résultats sont à prendre en considération lorsque l'on effectue des études sur le récepteur 5-HT₄ chez la souris.

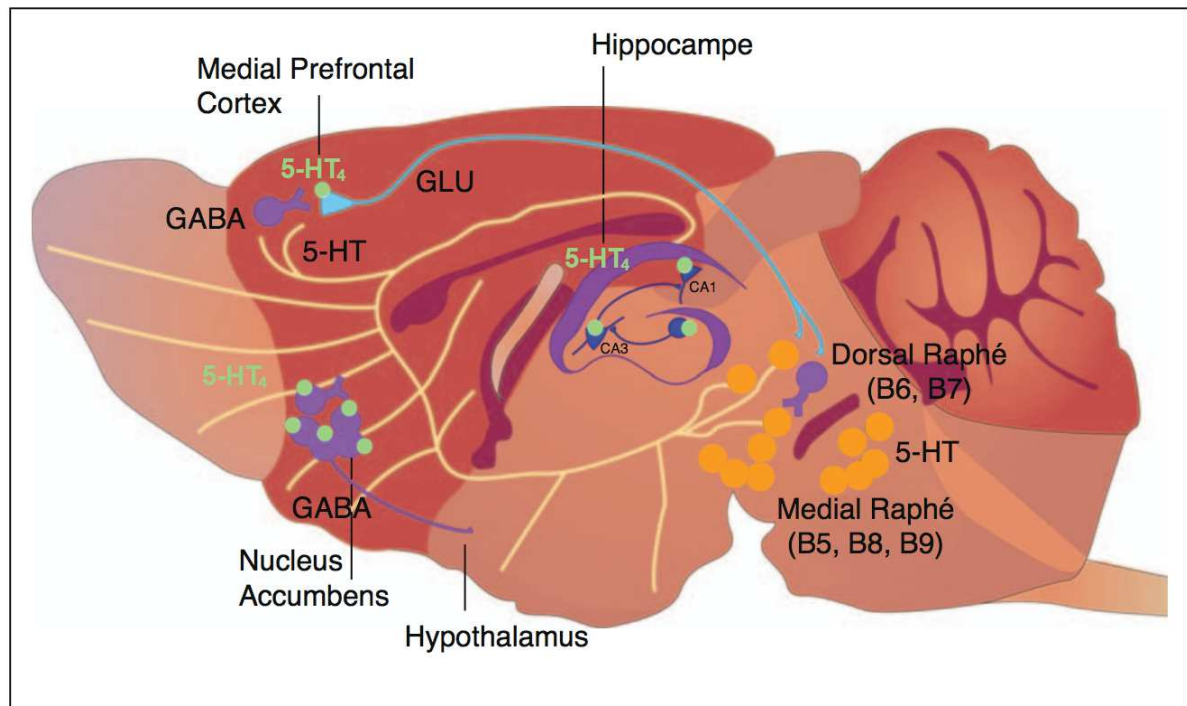


Figure 14 : Localisation du récepteur 5-HT₄ dans le cerveau

Les récepteurs 5-HT₄ sont majoritairement localisés sur les neurones GABAergiques du noyau accumbens et du striatum, sur les neurones pyramidaux exprimant du glutamate dans le cortex préfrontal médian, et sur les neurones de l'hippocampe (aires CA1, CA3 et cellules granulaires). Ils sont également exprimés par les neurones efférents du noyau accumbens à l'hypothalamus latéral. *D'après J. Bockaert, Claeysen, Compan, & Dumuis, 2011, Current Opinion in Pharmacology.*

2) Au niveau périphérique

Au niveau périphérique, le récepteur 5-HT₄ est exprimé au niveau de la vessie, du système gastro-intestinal (intestins, côlon, œsophage), des glandes surrénales et du cœur (Baxter et al., 1991; Darblade et al., 2005; Foxx-Orenstein et al., 1996; A J Kaumann & Sanders, 1994; McLean & Coupar, 1996).

Comme dans le cerveau, l'activation du récepteur facilite la transmission cholinergique dans les neurones myentériques. Le récepteur 5-HT₄ est impliqué dans les désordres gastro-intestinaux, et plusieurs agonistes du récepteur comme le prucalopride sont d'ailleurs utilisés dans le traitement du syndrome du côlon irritable ou de la constipation

chronique, ces ligands augmentant la motilité intestinale (Bassotti et al., 2019; Binienda et al., 2017).

Par ailleurs, le récepteur est exprimé dans l'atrium et le tissu ventriculaire au niveau du système cardiovasculaire. Une stimulation du récepteur 5-HT₄ produit un effet inotrope positif et une tachycardie qui peut entraîner des arythmies (A J Kaumann & Sanders, 1994). De plus, une localisation mitochondriale du récepteur 5-HT₄ a été décrite dans des cardiomyocytes où il jouerait un rôle dans la régulation des fonctions des mitochondries en agissant sur les flux de Ca²⁺ (Qingyi Wang et al., 2016). En raison de sa localisation cardiaque, le développement de composés agissant sur le récepteur 5-HT₄ et à visée thérapeutique est compliquée. De nombreuses molécules ont dû être arrêtées pendant leur développement clinique. A titre d'exemple, le tegaserod, un agoniste du récepteur initialement approuvé pour la constipation a dû être retiré du marché en 2007 à cause d'effets secondaires sur le système cardiovasculaire, avant d'être réintroduit par la FDA en 2018 chez une population restreinte (Marciniak & Serebruany, 2019). Cependant, il a par la suite été démontré que les effets cardiaques indésirables des agonistes du récepteur 5-HT₄ retirés du marché n'étaient pas dus à leur action sur le récepteur mais à une liaison non spécifique aux canaux hERG (*human Ether-à-go-go-Related Gene*) cardiaques. L'existence d'une affinité éventuelle aux canaux hERG étant à présent systématiquement recherchée dans le développement préclinique des candidats-médicaments, la mise sur le marché de molécules hautement spécifiques du récepteur 5-HT₄, telle que le prucalopride, a pu être réalisée. Le prucalopride a ainsi bien démontré son innocuité cardiaque dans des études de *safety* et de pharmacovigilance (Mendzelevski et al., 2012)

Au niveau de la vessie, le récepteur facilite la miction et au niveau des glandes surrénales, il favorise la libération de cortisol (D'Agostino et al., 2006; Lefebvre et al., 1998).

Plus récemment, dans un modèle de souris autiste, la souris SERT Ala56, l'activation des récepteurs 5-HT₄ a montré un retour à la normale de la composition de leur microbiote intestinal, bien que la restauration des déficits comportementaux associés n'ait pas été évaluée (Liu et al., 2009). Ces résultats, ainsi que l'implication du récepteur dans la neurogénèse entérique suggèrent un rôle du récepteur dans la communication entre le cerveau et le microbiote intestinal (Margolis et al., 2016). Un autre rôle atypique du récepteur a également été mis en avant récemment puisque

une étude montre que son activation jouerait un rôle dans la fertilisation *in vitro* chez la souris en augmentant le pourcentage de spermatozoïdes hyperactivés (Sugiyama et al., 2019).

C- VARIANTS D'ÉPISSAGE

Le gène *HTR4* codant pour le récepteur 5-HT₄ est situé sur le chromosome 5. C'est l'un des plus longs gènes codant pour un RCPG (> 700kb). Le gène est constitué d'au moins 38 exons qui génèrent chez l'homme dix variants d'épissage ce qui en fait également l'un des gènes codant pour un RCPG les plus complexes. De plus, le gène codant pour le récepteur β_2 -adrénergique est localisé sur le brin non-codant du gène codant pour le récepteur 5-HT₄. A ce jour, trois variants d'épissage ont été clonés chez le rat (a, b, e) et quatre chez la souris (a, c, e, f).

Les dix variants d'épissage clonés chez l'homme (a-i, n) diffèrent tous à partir du résidu leucine 358 de la partie C-terminale, à l'exception du variant (h) qui présente une insertion au niveau de la boucle extracellulaire e2 (Figure 15). Les variants (a) et (b) sont les plus représentés chez l'homme (Claeyssen et al., 1997). Toutes les isoformes partagent les mêmes capacités de couplage à la protéine G_s, mais quelques différences commencent à émerger dans la littérature concernant d'autres voies de signalisation. Par exemple, l'isoforme (a) nécessite la PKC, GRK2 et la β -arrestine pour son internalisation tandis que l'isoforme (b) nécessite la PKC et en moindre mesure la β -arrestine. De plus, l'isoforme (b) est recyclée abondamment à la membrane après un arrêt d'exposition au ligand tandis que l'isoforme (a) s'accumule dans des compartiments périnucléaires et est très peu recyclée (Mnie-Filali et al., 2010). Une autre étude suspecte l'isoforme (b) de coupler la protéine G_{i/o} dans des cardiomyocytes de rat ce qui n'est pas le cas de l'isoforme (d) (Castro et al., 2005).

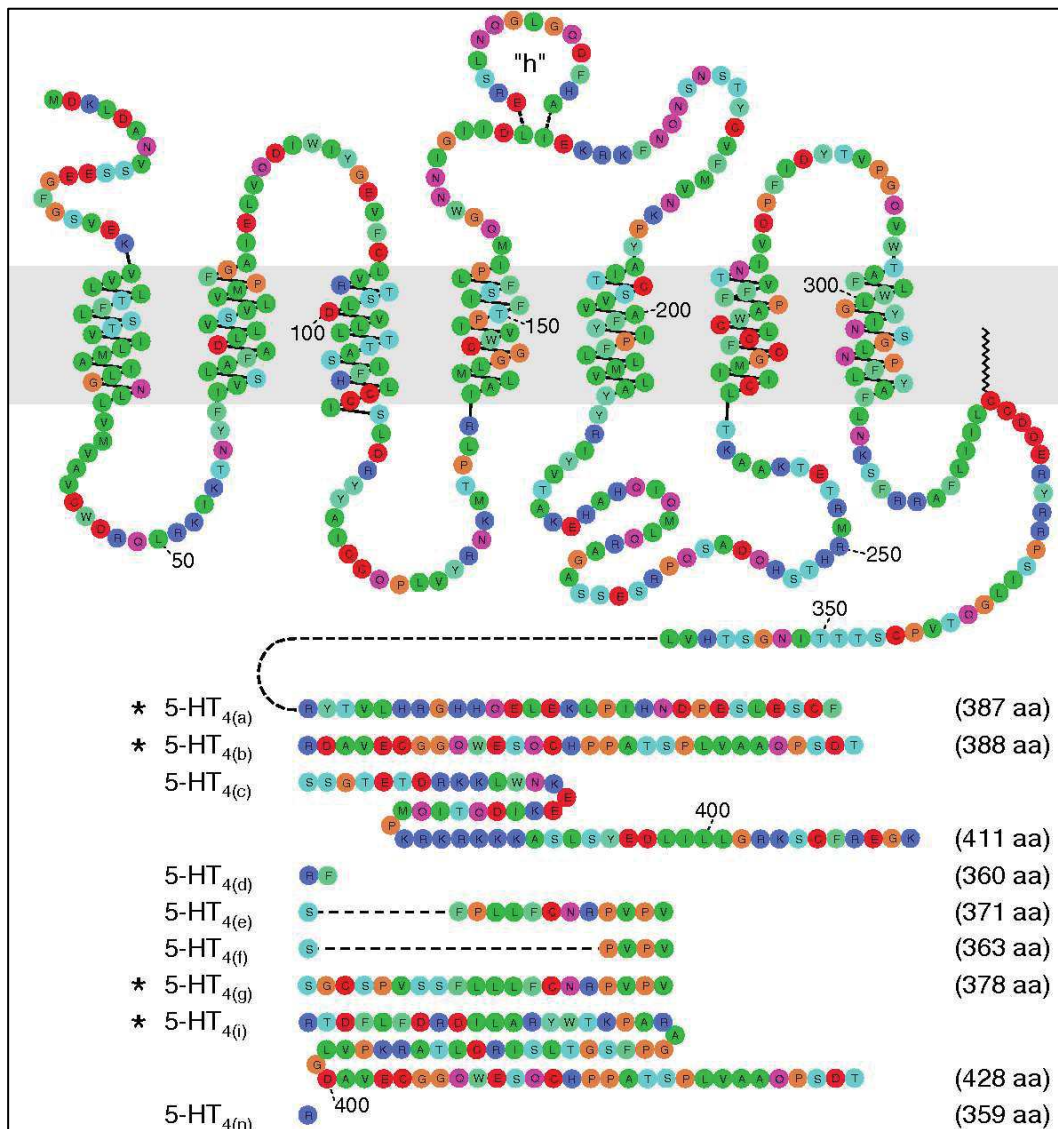


Figure 15 : Variants d'épissage du récepteur 5-HT₄ humain.

Tous les variants diffèrent à partir de la Leucine 358 et ont une extrémité C-terminale variable, à l'exception du variant (h) qui possède une insertion dans la boucle extracellulaire e2. Les variants marqués d'un astérisque représentent les isoformes exprimées dans le cœur. D'après Alberto J. Kaumann & Levy, 2006, *Pharmacology & Therapeutics*.

D- PHARMACOLOGIE

1) Les ligands du 5-HT₄

Le récepteur 5-HT₄ est très bien caractérisé pharmacologiquement de par la disponibilité de nombreux ligands et mutants du récepteur. De multiples ligands synthétiques ont été générés par des laboratoires pharmaceutiques dans le but de développer des traitements efficaces contre les troubles gastro-intestinaux, où le récepteur est une cible de premier choix. Il existe à l'heure actuelle plus d'une quarantaine de ligands synthétiques pour le récepteur 5-HT₄ (Rodrigo Andrade et al., 2019).

Le ligand endogène est la sérotonine, qui est une monoamine de la famille des indolamines. Sa biosynthèse s'effectue à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel puisqu'il provient de l'alimentation. Le tryptophane est absorbé par les neurones de noyau du raphé ou les cellules entérochromaffines qui le transforment en 5-HTP (5-hydroxytryptophane), puis en 5-HT grâce à deux enzymes.

Parmi les agonistes, on retrouve en plus de la sérotonine des composés dérivés de la famille des indoles, mais également des composés de la classe des benzoates, banzamides ou benzimidazolones : le zacopride, le cisapride ou encore le BIMU8, agoniste total et très spécifique du récepteur (Bockaert et al., 2012).

Les composés de la classe des aryl cétones ont donné naissance à des antagonistes mais aussi des agonistes comme le RS 67333 (Eglen, Bonhaus, et al., 1995). Ce dernier est très utilisé de par son agonisme partiel (50% de l'effet maximum de la 5-HT) mais aussi sa capacité à passer la barrière hémato-encéphalique et sa bonne biodisponibilité (Marchetti et al., 2000).

Le GR 113808 (Alberto J. Kaumann, 1993), de la famille des indoles, est le premier antagoniste synthétique ayant été généré ayant peu d'affinité pour le récepteur 5-HT₃, mais qui est également un agoniste inverse. Par ailleurs, la L-Lysine est un antagoniste naturel partiel du récepteur 5-HT₄ permettant de diminuer les problèmes gastro-intestinaux et ayant des propriétés anxiolytiques chez le rat (Smriga & Torii, 2003).

Enfin, le récepteur 5-HT₄ ayant une forte activité constitutive, de nombreux composés antagonistes sont aussi des agonistes inverses puisqu'ils inhibent cette activité basale. C'est le cas par exemple de composés synthétisés comme le RO 116-2617, le SB 207266 et le GR 125487 (Bockaert et al., 2012).

Il est à noter que les composés pharmacologiques disponibles sont bien caractérisés sur la voie G-dépendante mais moins bien caractérisés sur les autres voies de signalisation telles que la voie ERK ou la voie des β -arrestines.

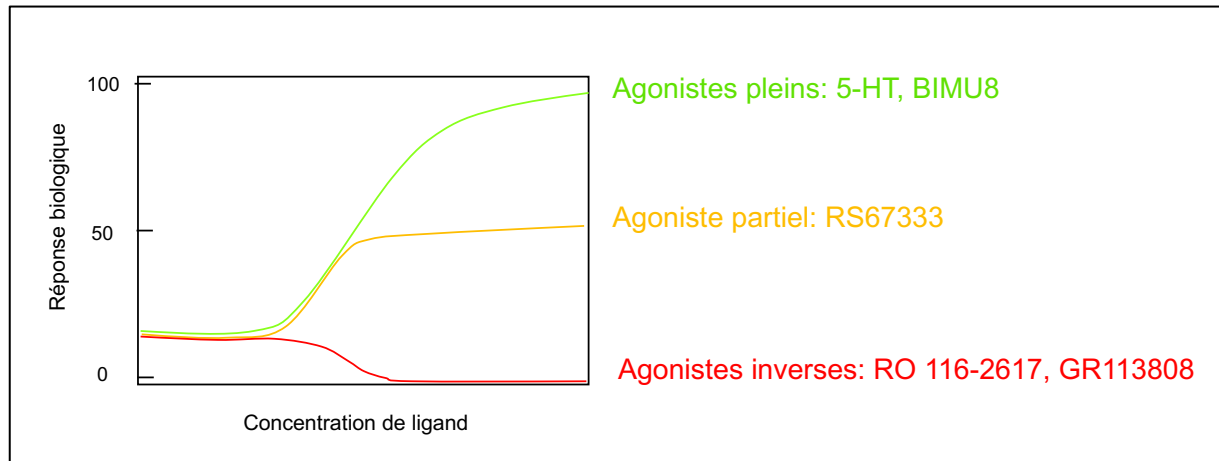


Figure 16 : Pharmacologie du récepteur 5-HT₄

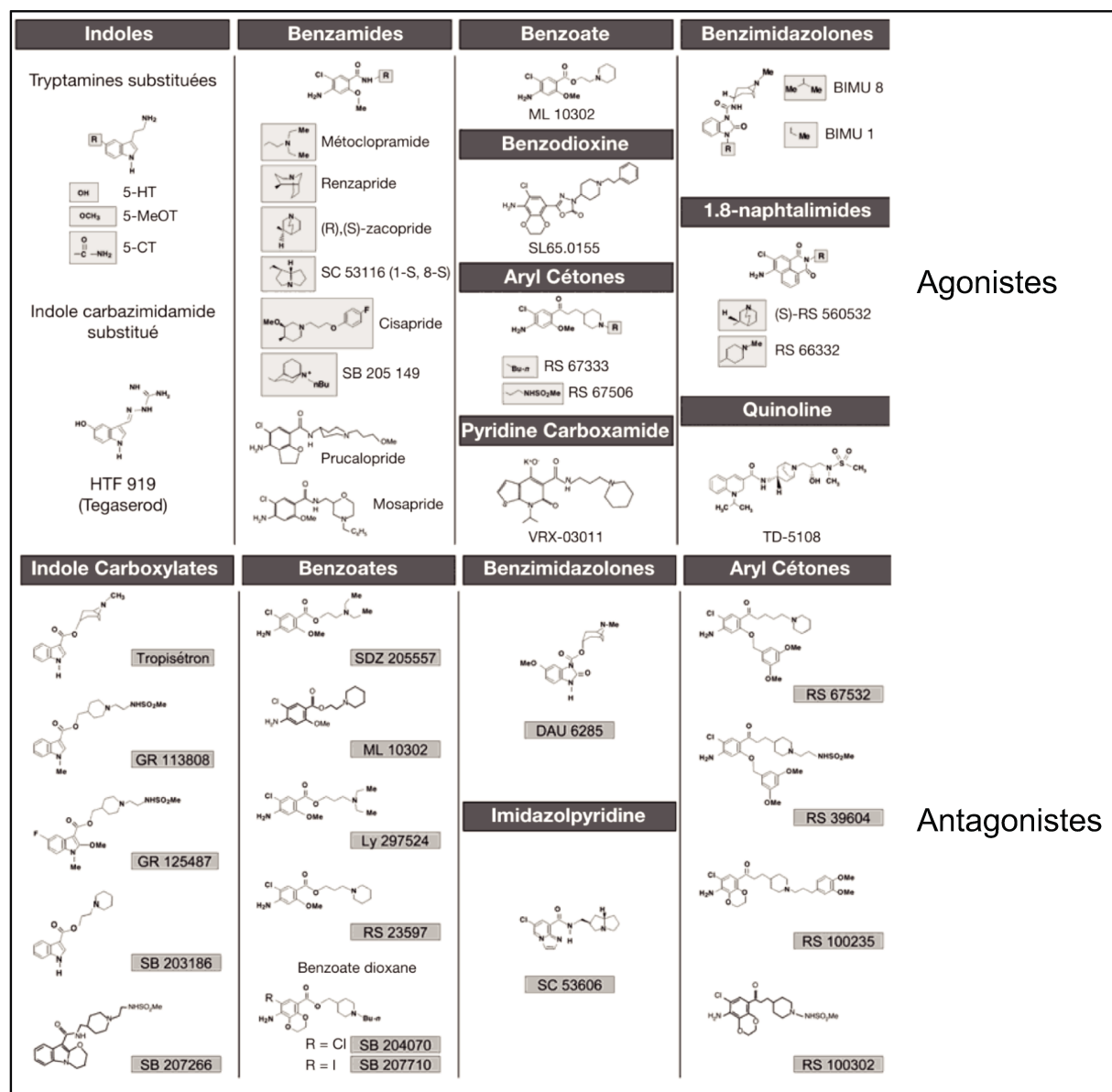
2) Le RASSL-5-HT₄

Les RASSL (*Receptor Activated Solely by a Synthetic Ligand*) sont des récepteurs couplés aux protéines G créés de façon à n'être sensibles qu'aux molécules synthétiques et plus au ligand naturel. Ces constructions permettent un contrôle spatial et temporel de la signalisation des RCPG *in vivo* notamment en les exprimant par une approche virale chez la souris. Ils sont particulièrement utilisés dans le domaine des neurosciences pour identifier la circuiterie et les signaux cellulaires spécifiques à certains comportements et fonctions motrices (Roth, 2016). Un des premiers RASSL à avoir été développé est basé sur le récepteur muscarinique 3 nommé hM3Dq, obtenu avec 2 mutations, qui répond au ligand synthétique CNO avec une affinité de l'ordre du nanomolaire mais plus au ligand naturel l'acétylcholine.

Pour le 5-HT₄, la simple mutation d'un aspartate très conservé au sein du TM3 en alanine (D100A) rend le récepteur totalement insensible à la sérotonine. Ce résidu se situe dans le domaine de liaison aux amines biogènes, dont la sérotonine fait partie. Néanmoins, ce récepteur est capable de répondre à tous les ligands synthétiques exceptés ceux de la famille des indoles (Claeysen et al., 2003).

La pharmacologie du récepteur se voit modifiée par cette mutation : son activité

constitutive, déjà élevée à l'origine, est encore plus importante. De plus, tous les ligands déplacent un peu plus l'équilibre du récepteur vers une conformation plus active. Ainsi, les agonistes inverses deviennent des antagonistes neutres, les antagonistes deviennent des agonistes partiels, et les agonistes partiels deviennent des agonistes totaux.



Agonistes

Antagonistes

Figure 17 : Classification et structure des ligands du récepteur 5-HT₄

D'après Bockaert et al., 2012.

E- SIGNALISATION DU 5-HT₄ ET TRAFIC

1) Les voies couplées aux protéines G

Le récepteur 5-HT₄ a été découvert à l'origine dans les collicules de souris comme étant couplé canoniquement à la protéine G_s (Dumuis et al., 1988). Ce couplage à G_s a aussi été mis en évidence *in vivo* dans l'hippocampe du cochon d'inde, le cortex humain, l'œsophage de rat et l'atrium humain (Bockaert et al., 1990; Ford et al., 1992; A J Kaumann, 1990; Monferini et al., 1993). Dans des systèmes hétérologues, le récepteur 5-HT₄ possède une forte activité constitutive pour la voie G_s. Cette activité constitutive est augmentée pour les isoformes avec un domaine C-terminal court, et des troncations progressives de ce domaine augmentent également l'activité basale. Ces résultats suggèrent que le domaine C-terminal joue un rôle dans le déplacement de l'équilibre du récepteur vers une conformation plus inactive (Claeysen et al., 2000). De plus, le récepteur 5-HT₄ semble être activé selon le modèle de *collision coupling*, à l'inverse du récepteur 5-HT₇ qui est précouplé à la protéine G_s. Ces résultats ont été mis en évidence par la combinaison de deux approches : le FRET et le FRAP (Andressen et al., 2018).

Une fois produit, l'AMPc active la PKA et le facteur d'échange Epac. Ce dernier active les petites GTPases Rap1 et Rac, ainsi que le facteur d'échange STEF (*SIF and Tiam1-like Exchange Factor*) ce qui conduit à la sécrétion de sAPP α (Maillet et al., 2003).

Tous les variants d'épissage sont capables d'activer l'adénylyl cyclase et d'augmenter la concentration d'AMPc intracellulaire après stimulation par un agoniste en système hétérologue, bien qu'avec des efficacités différentes. Ces différences peuvent s'expliquer par le couplage du récepteur avec d'autres protéines G comme G α_{13} , G α_q et G α_i (Pindon et al., 2002; E. G. Ponimaskin et al., 2002). Néanmoins, la pertinence physiologique de ces couplages à différentes sous-unités G α est discutable étant donné qu'ils ont été uniquement décrits dans des lignées cellulaires transfectées.

Dans des cellules de mammifères, l'activation de G α_{13} dépendante du récepteur 5-HT_{4(a)} résulte en une activation de RhoA, puis du facteur de transcription SRE, qui module l'activité transcriptionnelle. Dans des cellules de neuroblastomes, l'expression des récepteurs 5-HT_{4(a)} induit une rétractation des neurites dépendante de RhoA, après stimulation avec un agoniste ou non. Ces résultats suggèrent que le couplage

du R-5-HT₄ avec Gα₁₃ joue un rôle dans la régulation de l'architecture neuronale (E. G. Ponimaskin et al., 2002). Par ailleurs, une courte activation de la voie Gα₁₃ via le R-5-HT₄ augmente l'expression de la protéine ASK1 (Apoptosis Signal-regulation Kinase) alors qu'une activation soutenue diminue l'expression de ASK1 et de Gα₁₃ (Kutuzov et al., 2007). Dans des neurones à GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*), l'activation du récepteur 5-HT₄ stimule la production d'AMPc mais augmente également leur taux d'activation et induit une augmentation soutenue de leur sécrétion de GnRH (Wada et al., 2006).

2) La voie ERK

La stimulation du récepteur 5-HT₄ induit une activation puissante, mais transitoire, de la voie ERK dans des neurones en culture primaire (Barthet et al., 2007). Cette activation de ERK dépend de la tyrosine kinase Src, mais est indépendante de l'activation des protéines G ou des β-arrestines, ce qui est assez atypique chez les RCPG. Dans les cellules COS-7 et HEK-293, l'activation de ERK1/2 par le 5-HT_{4(b)} implique la PKA et Ras, mais pas Rap1 ou Epac (Norum et al., 2007, 2003). La même équipe de recherche a montré que la phosphorylation de ERK1/2 après activation du R-5-HT₄ dépendait du Ca²⁺ et était sensible à un antagoniste de la Calmoduline.

Par ailleurs, la β-arrestine 1 semble être un régulateur négatif de la voie de signalisation Src/ERK engagée après activation du récepteur. La kinase GRK5 est physiquement associée à la région C-terminale du récepteur 5-HT₄ que ce soit dans les cellules HEK-293 ou les neurones de collicule. GRK5 inhibe la voie de signalisation R-5-HT₄/Src/ERK en s'associant d'une part à un cluster sérine/thréonine phosphorylé au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur. et d'autre part, en phosphorylant la β-arrestine 1 liée au récepteur. Une fois phosphorylée, la β-arrestine 1 empêche Src, qui est constitutivement liée au récepteur, d'être activée. La quantité de GRK5, ainsi qu'une modification post-traductionnelle de la β-arrestine 1 semble déterminer si c'est la voie des protéines G ou la voie ERK qui est préférentiellement engagée lors de l'activation du récepteur 5-HT₄ (Barthet et al., 2009).

3) Les courants ioniques liés à l'activation du récepteur

Dans les neurones de collicule, l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc suite à l'activation du récepteur 5-HT₄ induit une inhibition des canaux potassiques voltage-dépendants et des canaux calciques voltage-dépendants (Ansanay et al., 1995). Ce blocage des canaux potassiques est durable dans le temps, ce qui provoque une hyperexcitabilité des neurones via un mécanisme dépendant de l'AMPc mais pas de la PKA (Chapin et al., 2002; Fagni et al., 1992). Cet effet à long-terme possède des caractéristiques différentes de la LTP et les voies de signalisation sous-jacentes responsables de cet effet ne sont pas encore bien comprises (Mlinar et al., 2006). Dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1, le récepteur 5-HT₄ réduit l'hyperpolarisation de la période réfractaire (qui suit un potentiel d'action) en inhibant le relargage du calcium (R Andrade & Chaput, 1991; Torres et al., 1996).

Dans les cardiomyocytes humains, l'effet inotrope positif induit par l'activation du récepteur 5-HT₄ dont nous parlons dans la partie II-B- est dû à une augmentation des courants calciques de type L et une augmentation de la phosphorylation de la phospholambane (une protéine qui régule le taux de Ca²⁺ cytoplasmique) (Birkeland et al., 2007).

4) Le devenir des récepteurs endocytés

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont permis de mettre en lumière les mécanismes responsables de la désensibilisation et de l'endocytose des récepteurs 5-HT₄. Il semblerait que la kinase GRK2 soit impliquée dans la désensibilisation du récepteur 5-HT₄, mais *via* une interaction physique et non grâce à son activité enzymatique. De plus, l'endocytose dépendante de la β -arrestine 2 nécessite que la GRK2 phosphoryle des clusters sérine/thréonine localisés au niveau du domaine C-terminal du récepteur (Barthet et al., 2005). Comme d'autres RCPG, le récepteur 5-HT₄ est fortement régulé par des modifications post-traductionnelles sur son domaine C-terminal. Des expériences montrent que certains sites de palmitoylation sont également impliqués dans la régulation de l'endocytose dépendante de la β -arrestine 2 (E. Ponimaskin et al., 2005). Dans les neurones, la concentration en GRK2 semble suffisante pour induire une désensibilisation et une endocytose rapide et

profonde du récepteur 5-HT₄, qui n'est pas observée dans les lignées HEK-293 et COS-7. En effet, pour observer une désensibilisation équivalente, il faut co-transfecter la GRK2 et le R-5-HT₄, ce qui suggère une faible concentration de GRK2 dans les lignées (Barthet et al., 2005). De plus, l'internalisation des récepteurs 5-HT₄ semble varier suivant le variant d'épissage du récepteur : l'isoforme (a) nécessite GRK2 alors qu'elle n'est pas requise pour internaliser l'isoforme (b). Ces résultats soulignent l'importance des modifications post-traductionnelles situées sur le domaine C-terminal des récepteurs 5-HT₄ (Mnie-Filali et al., 2010).

Il semblerait que le devenir des récepteurs 5-HT₄ endocytés soit assez atypique. Alors que les RCPG sont généralement recyclés à la membrane ou dégradés, le récepteur 5-HT₄ reste séquestré dans des endosomes périnucléaires pendant au moins 6 heures (Barthet et al., 2005). Encore une fois, il semblerait que ce phénomène soit variant-dépendant puisqu'il concernerait l'isoforme (a) et non l'isoforme (b) (Mnie-Filali et al., 2010). Le rôle du récepteur 5-HT₄ dans ces compartiments intracellulaires reste à l'heure d'aujourd'hui une question ouverte.

Une hypothèse avancée par des résultats non publiés de l'équipe suggèrent une activation de la calcineurine et donc une libération de calcium médiée par une activation intracellulaire du récepteur 5-HT₄. D'autre part, une étude récente montre que le récepteur β_1 -adrénergique, un récepteur de classe A comme le récepteur 5-HT₄, est capable de déclencher une signalisation intracellulaire via la protéine G_s et une augmentation d'AMPc. En effet, son ligand l'épinéphrine est capable de traverser la membrane plasmique et d'aller activer des β_1 -AR localisés au niveau de l'appareil de Golgi où une signalisation PKA dépendante est alors déclenchée (Irannejad et al., 2017). Ces résultats suggèrent une signalisation intracellulaire R-5-HT₄-dépendante.

5) La dimérisation des récepteurs 5-HT₄

La découverte que les RCPG de classe C fonctionnaient obligatoirement en dimères a soulevé la question de cette dimérisation pour les RCPG de classe A (Kniazeff et al., 2011). Bien qu'il ait été montré que des monomères de RCPG de classe A couplaient et activaient normalement les protéines G dans des vésicules lipidiques, les conséquences fonctionnelles d'une dimérisation de cette classe de RCPG méritent d'être questionnées (Whorton et al., 2007, 2008). D'autres hypothèses réfutent même l'existence de monomères de RCPG *in vivo* (Franco et al., 2016). *In vivo*, l'existence

de dimères de RCPG de classe A a été démontrée grâce à des ligands fluorescents et des anticorps marqués (Albizu et al., 2010; Cottet et al., 2013). L'importance fonctionnelle de tels dimères a été mise en évidence au sein de l'équipe. En effet, l'hétérodimère 5-HT_{2A}/mGluR₂ est nécessaire à la phosphorylation de la sérine 843 sur le récepteur mGlu₂, et promeut la signalisation G_{i/o}. Cette hétérodimérisation est cruciale dans l'intégration des effets des antipsychotiques (Murat et al., 2019).

Concernant le récepteur 5-HT₄, l'homodimérisation ainsi qu'une hétérodimérisation avec le récepteur β₂-adrénergique a été mise en évidence en système hétérologue (Berthouze et al., 2005). De plus, l'activation des deux parties du dimère augmente significativement le couplage à la protéine G. Enfin, d'autres expériences ont montré qu'une seule protéine G_s était activée par le dimère (Pellissier et al., 2011).

F- 5-HT₄ ET PATHOLOGIES

1) Le syndrome du côlon irritable

Le syndrome du côlon irritable est une maladie chronique fréquente du système gastro-intestinal dont les symptômes sont principalement d'ordre digestifs : ballonnements, crampes digestives, diarrhées et constipations. Cette maladie est fortement associée à une diminution de la motilité du système gastro-intestinal et à un déséquilibre du microbiote intestinal.

La sérotonine, synthétisée à 90% dans l'appareil digestif, joue un rôle majeur dans la motilité gastro-intestinale (Kato, 2013). En effet, les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₄ sont fortement impliqués dans cette motilité de l'appareil digestif, ainsi que dans la neurogénèse entérique pour le récepteur 5-HT₄ (Boakye et al., 2012; Margolis et al., 2016). De ce fait, les récepteurs 5-HT₄ sont une cible de premier plan pour le développement de composés visant à traiter les désordres liés à la motilité de l'appareil digestif (Marcello Tonini & Pace, 2006).

L'action principale des récepteurs 5-HT₄ dans l'appareil digestif consiste à augmenter le réflexe péristaltique via la sécrétion d'acétylcholine (Pan & Galligan, 1994; M. Tonini et al., 1989). Une fois stimulés, les récepteurs 5-HT₄ présynaptiques des terminaisons nerveuses cholinergiques myentériques induisent rapidement un potentiel post-synaptique exciteur (EPSP), qui active les neurones post-synaptiques et augmentent la motilité des neurones de l'intestin via un relargage d'acétylcholine des neurones

moteurs. Cette facilitation présynaptique à l'intérieur du circuit du réflexe péristaltique semble être le mécanisme majeur des effets bénéfiques des agonistes du récepteur 5-HT₄ (Gershon, 2005; Jin et al., 1999; Nurgali et al., 2003).

Ainsi, plusieurs agonistes comme le cisapride, le mosapride ou le tegaserod ont été utilisés pendant plusieurs années dans le traitement du syndrome du côlon irritable, avant que le cisapride et le tegaserod soient retirés du marché à cause des effets indésirables sur le système cardiovasculaire pour les effets "*dirty drugs*" sur les canaux hERG mentionnés plus haut. Néanmoins, le développement d'agonistes partiels avec une meilleure affinité et une meilleure sélectivité pour le récepteur 5-HT₄ est une piste thérapeutique toujours d'actualité pour traiter les désordres intestinaux.

2) La dépression

La dépression est un trouble mental caractérisé par une baisse d'humeur, une faible estime de soi et d'une anhédonie (perte de plaisir dans des activités normalement senties comme agréables par l'individu).

Il est maintenant connu depuis plus de 35 ans que la transmission sérotoninergique au niveau du système nerveux central joue un rôle clé dans les effets thérapeutiques des antidépresseurs, traitement privilégié de la dépression. En effet, l'utilisation des inhibiteurs de recapture de la sérotonine (SSRIs) chez des patients dépressifs a été un succès. Plus spécifiquement, il semblerait que la 5-HT agisse en augmentant l'inhibition du tonus exercé sur les récepteurs 5-HT_{1A} post-synaptiques dans plusieurs structures limbiques comme l'hippocampe (Haddjeri et al., 1998). Malheureusement, l'amélioration sur l'humeur des patients dépressifs survient généralement à partir de 4 à 8 semaines de traitement. Cet effet est dû à la présence d'autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodendritiques responsables d'une forte auto-inhibition de l'activité électrique induite par la sérotonine, qui ont besoin d'être désensibilisés (Artigas et al., 2002).

L'intérêt de cibler les récepteurs 5-HT₄ dans le contexte de la dépression est apparu plus récemment. D'une part, certains agonistes du récepteur tels que le renzapride sont capables de faciliter la sécrétion de sérotonine dans l'hippocampe (Ge & Barnes, 1996). D'autre part, une étude a montré l'existence d'un polymorphisme du gène codant pour le récepteur 5-HT₄ humain. Une forte corrélation entre certains allèles et la manifestation d'un syndrome dépressif et/ou des désordres bipolaires a été

identifiée (Ohtsuki et al., 2002). De plus, l'analyse *post-mortem* de cerveaux de victimes suicidées suite à une dépression a révélé des altérations dans les concentrations d'AMPC et les sites de liaison au récepteur 5-HT₄ (Rosel et al., 2004). Par ailleurs, il semblerait que les traitements aux SSRI induisent une désensibilisation des récepteurs 5-HT₄ dans l'hippocampe, le striatum et la substance noire (Licht et al., 2009; Vidal et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les SSRI induisent une activation des récepteurs 5-HT₄ et qu'ils seraient donc impliqués dans les effets antidépresseurs des SSRI.

Enfin, plusieurs études montrent qu'un traitement avec un agoniste du récepteur 5-HT₄ a des effets antidépresseurs rapides chez les rongeurs (Lucas et al., 2007; Mendez-David et al., 2014; Pascual-Brazo et al., 2012; Samuels et al., 2016). Les récepteurs 5-HT₄ constituent donc à l'heure actuelle une cible thérapeutique majeure dans le développement de nouveaux antidépresseurs, qui pourraient avoir un délai d'action plus rapide que les médicaments actuellement disponibles (Lucas, 2009).

3) La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des pathologies neurodégénératives au niveau mondial et un enjeu majeur de santé publique pour les sociétés occidentales. Les symptômes principaux, caractérisés par les quatre « A », sont l'Amnésie (perte de la mémoire), l'Aphasie (trouble du langage), l'Agnosie (non reconnaissance d'objets/personnes) et l'Apraxie (difficultés à effectuer certains gestes). Chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer, deux lésions cérébrales sont caractéristiques de la pathologie :

- Les plaques amyloïdes, agrégats denses de peptides amyloïdes β (A β) non solubles.
- La dégénérescence neurofibrillaire, assemblage de protéines Tau hyperphosphorylées ou anormalement phosphorylées.

Bien qu'il soit admis que ces deux lésions permettent de poser le diagnostic de la maladie, l'ordre de leur apparition est sujet à une forte controverse au sein de la communauté scientifique.

La formation du peptide A β provient du clivage successif d'une protéine transmembranaire, l'APP (*Amyloid Precursor Protein*). La protéine précurseur de

l'amyloïde peut être clivée via 2 voies majoritaires (Figure 17) :

- La voie amyloïdogène, où l'APP est clivée par la protéase BACE1, une β -sécrétase, pour donner un fragment extracellulaire soluble, le sAPP β , ainsi qu'un fragment transmembranaire, le CTF β . Le clivage du fragment CTF β par une γ -sécrétase produit ensuite un fragment intracellulaire, le AICD (*APP Intracellular Domain*) et le peptide A β qui existe sous 2 formes majoritaires : A β_{40} et A β_{42} nommés ainsi en fonction de leur nombre d'acides aminés.
- La voie non-amyloïdogène, où l'APP est clivée par une α -sécrétase, l'enzyme majoritaire dans le cerveau étant l'ADAM10 (*A Disintegrin and Metalloprotease 10*), au sein de la séquence produisant l'A β . Ce clivage produit un fragment transmembranaire, le CTF α , et un fragment extracellulaire, le sAPP α . Le clivage du fragment CTF α par une γ -sécrétase produit l'AICD dans le milieu intracellulaire et un fragment extracellulaire, p3.

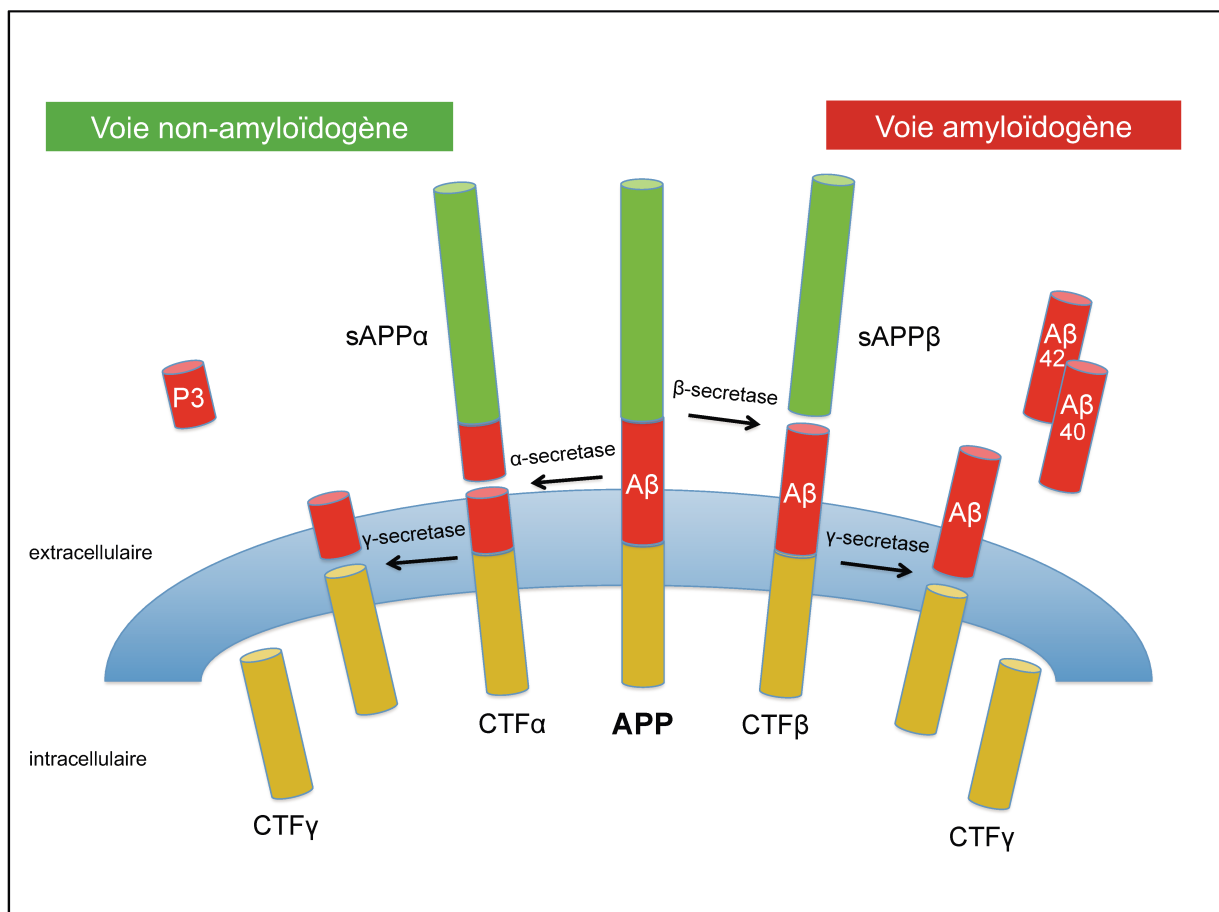


Figure 17 : Clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

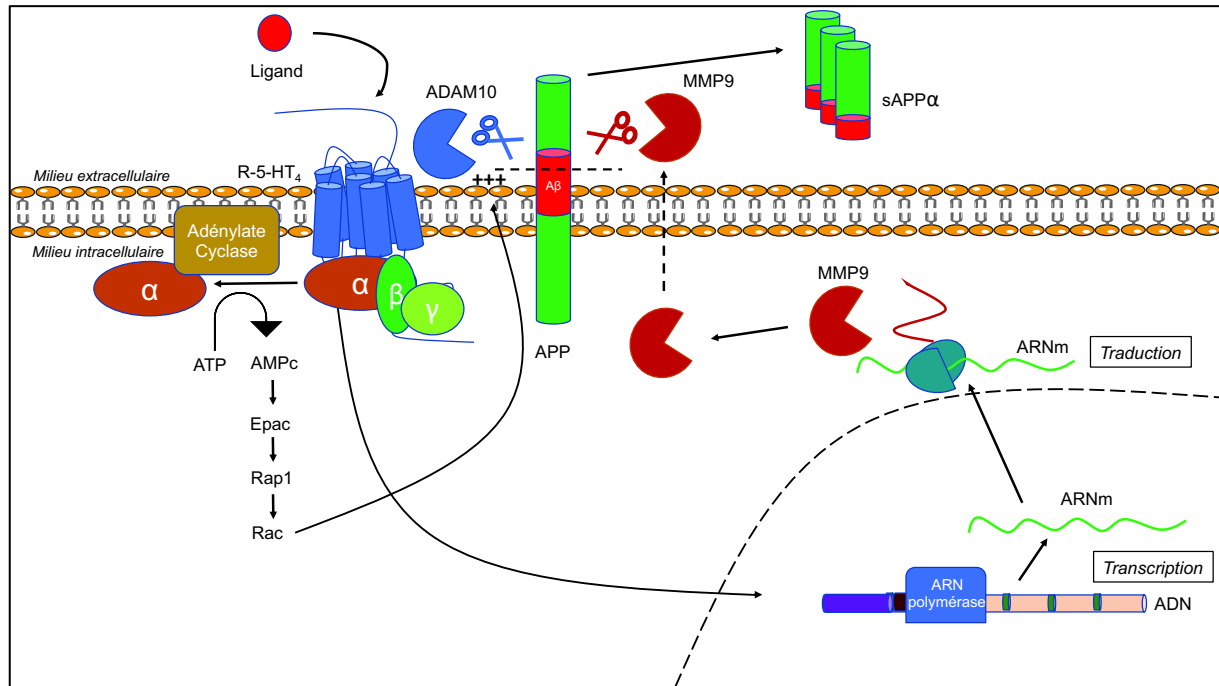
Les seuls traitements contre la maladie d'Alzheimer, tous symptomatiques, disponibles sur le marché à l'heure actuelle sont principalement des inhibiteurs d'acétylcholinestérase. En effet, les populations de neurones cholinergiques font partie des plus touchées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'acétylcholine (ACh) étant un neurotransmetteur fortement impliqué dans les processus de mémorisation et d'apprentissage, une inhibition de l'enzyme qui dégrade l'ACh est une stratégie thérapeutique pertinente qui a fait ses preuves chez les patients atteints de la maladie à des stades précoces. L'inhibition de l'enzyme qui dégrade l'ACh permet de compenser la mort des neurones cholinergiques.

Les stratégies visant à inhiber BACE1, la γ -sécrétase, ainsi que le développement d'antiagrégants, ou d'anticorps dirigés contre les plaques amyloïdes ou le peptide A β , de même que les stratégies visant la protéine Tau ont toutes été infructueuses lors de leur développement clinique. Cependant, une lueur d'espoir persiste avec les annonces récentes de la compagnie Biogen dont l'étude de phase III EMERGE qui visait à tester l'aducanumab, un anticorps monoclonal contre les formes agrégées d'A β , semble positive. Ces résultats, dont la publication et la validation sont en attente, renforcent la légitimité de l'hypothèse amyloïde comme causale dans la maladie d'Alzheimer

Dans ce contexte, le récepteur 5-HT₄ constitue une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. En effet, les effets pro-cognitifs sur la mémoire à court et à long terme des agonistes du récepteur 5-HT₄ ont été largement documentés dans la littérature (Bockaert et al., 2004). Ces effets sur la mémoire sont au moins partiellement dus à la capacité du récepteur à stimuler la libération d'acétylcholine lorsqu'il est activé (Bockaert et al., 2008; Johnson et al., 2012; Mohler et al., 2007). De plus, l'activation du récepteur 5-HT₄ diminue la production du peptide A β dans des cultures primaires de neurones corticaux ainsi que dans le modèle hAPP/PS1 de souris Alzheimer (Cachard-Chastel et al., 2007; Tesseur et al., 2013). Par ailleurs, l'activation du récepteur 5-HT₄ stimule la production du fragment sAPP α , connu pour être neuroprotecteur et neurotrophique, au détriment de l'A β , grâce à 3 principaux mécanismes identifiés à ce jour (Chasseigneaux & Allinquant, 2012) :

- Via l'activation de Epac, Rap1, Rac et le facteur d'échange STEF (Lezoualc'h, 2007).

- Via une association constitutive avec l'α-sécrétase ADAM10 qui n'est pas dépendante de la production d'AMPC et donc du couplage avec la protéine G_s (Cochet et al., 2013).



Les trois voies de stimulation de la production du sAPP α décrites dans la littérature sont représentées. Après activation du récepteur, un mécanisme dépendant de la voie G_s et de l'activation de Epac augmente la production de sAPP α . D'autre part, l'activation du récepteur stimule le clivage alpha-sécrétase via une interaction physique avec ADAM10. Enfin, une activation du 5-HT₄ entraîne une régulation positive de l'expression de MMP9, qui est capable d'effectuer un clivage alpha-sécrétase également.

Ces effets positifs de l'activation du récepteur ont amené deux agonistes du récepteur 5-HT₄ dans des essais cliniques de phase II pour le traitement de la maladie d'Alzheimer : le SL 650155 et le PRX-03140. Malgré des propriétés promnési-antes, le

développement clinique de ces deux composés a malheureusement été interrompu (Mohler et al., 2007; Moser et al., 2002; “Short Term Effects of PRX-03140 in Patients With Mild Alzheimer’s Disease Being Treated With Aricept - ClinicalTrials.gov,” n.d.).

4) La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique et progressive. Les symptômes se caractérisent par des troubles moteurs, notamment des tremblements au repos, une rigidité des membres, une bradykinésie (lenteur du mouvement) et une instabilité du maintien de la posture. Ces symptômes sont accompagnés de troubles cognitifs et psychiatriques, tous dus à une dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée. Ainsi, la maladie de Parkinson est provoquée par une déplétion de la dopamine au niveau du système nerveux central. Bien qu’à priori la modulation des récepteurs 5-HT₄ ne joue pas un rôle dans la bradykinésie induite par la maladie de Parkinson, la modulation des récepteurs pourrait avoir un effet sur d’autres symptômes de la maladie de Parkinson (dyskinésie, troubles de l’humeur, psychose etc.) (Ohno, Imaki, Mae, Takahashi, & Tatara, 2011b; Ohno, Shimizu, Tokudome, Kunisawa, & Sasa, 2015). En effet, le récepteur 5-HT₄ est localisé dans la substance noire, et est impliqué dans la libération de dopamine (Bonhomme et al., 1995; Waeber et al., 1994). De plus, la voie de signalisation AMPc/PKA/CREB est connue pour son rôle neuroprotecteur. Ce rôle a d’ailleurs été mis en évidence dans un modèle de dégénérescence de culture de neurones dopaminergiques (Michel & Agid, 1996). Enfin, plusieurs études montrent les effets bénéfiques de l’activation du récepteur 5-HT₄ sur les troubles cognitifs associés à la maladie de Parkinson. Par exemple, l’activation des récepteurs 5-HT₄ dans un modèle de souris Parkinson facilite l’extinction de la peur conditionnelle (Ishii et al., 2019). D’autre part, la modulation des récepteurs 5-HT₄ améliore la mémoire de travail dans un modèle de souris Parkinson déplété en dopamine (Guo et al., 2019).

G- LES PROTEINES PARTENAIRES DU RECEPTEUR 5-HT₄

Comme tous les RCPG, le récepteur 5-HT₄ interagit avec de nombreuses protéines partenaires qui vont réguler sa localisation subcellulaire et sa signalisation. L’existence

d'une dizaine de variants d'épissage du récepteur, dont tous sauf le (d) s'expriment dans le cerveau et qui diffèrent dans la longueur et la composition en acides aminés de leur extrémité C-terminale suggère que ces isoformes s'associent spécifiquement avec des protéines différentes.

1) NHERF

Comme décrit précédemment, les protéines de la famille NHERF sont souvent des interacteurs des RCPG de par la présence de domaines PDZ. Ces protéines sont également connues pour leur capacité à interagir avec les protéines de la famille ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) *via* leur domaine C-terminal. Les protéines de la famille ERM jouent le rôle d'adaptateurs entre la membrane plasmique et le cytosquelette. Une étude antérieure de l'équipe montre que le récepteur 5-HT₄ interagit avec les protéines NHERF. Les auteurs ont utilisé une approche de protéomique en utilisant le domaine C-terminal des récepteurs 5-HT_{4(a)} et 5-HT_{4(e)} comme appât pour identifier les protéines associées aux domaines C-terminaux de ces récepteurs (Joubert et al., 2004). Les ligands PDZ présents sur les domaines C-terminaux des isoformes R-5-HT_{4(a)} et R-5-HT_{4(e)} sont de 2 classes différentes, respectivement de classe I et de classe II, ce qui suggérerait que les protéines recrutées soient différentes. Les résultats montrent qu'en effet, le récepteur 5-HT_{4(a)} mais pas le R-5-HT_{4(e)} interagit avec NHERF et SNX27. Il semblerait que le récepteur 5-HT_{4(a)} colocalise avec NHERF au niveau des microvillosités, ce qui induit le changement de conformation de l'ézrine, qui est également recrutée au niveau des microvillosités. L'ézrine est un régulateur essentiel de la morphologie cellulaire. Ces résultats montrent donc que l'interaction entre le récepteur 5-HT_{4(a)} et NHERF contribue à l'adressage du récepteur dans des régions subcellulaires spécifiques et à une régulation de la morphologie de la cellule (Joubert et al., 2004).

2) SNX27

La même étude a montré que le récepteur 5-HT_{4(a)}, mais pas le R-5-HT_{4(b)} ou le R-5-HT_{4(e)} interagit avec les protéines SNX27a et SNX27b. Les protéines SNX27 appartiennent à une famille de protéines dont le rôle est, entre autres, d'adresser les récepteurs présents à la surface cellulaire vers les endosomes. Plus récemment, la

SNX27 a été impliquée dans la plasticité neuronale où elle joue un rôle dans l'adressage des récepteurs AMPA au niveau des synapses via un mécanisme dépendant du calcium (Loo et al., 2014). L'interaction entre le R-5-HT_{4(a)} et la SNX27 s'effectue par un mécanisme dépendant du domaine PDZ. Une surexpression de la SNX27a redirige une partie du R-5-HT_{4(a)} de la membrane vers les endosomes précoces (Joubert et al., 2004). Étant donné que récepteur 5-HT₄ se désensibilise rapidement dans les neurones avant d'être séquestré, et que la SNX27 semble être un acteur majeur du recrutement du récepteur dans ces compartiments, il est possible que la SNX27 puisse moduler la signalisation de cette isoforme du récepteur en l'assignant à une localisation subcellulaire spécifique (Barthet et al., 2005).

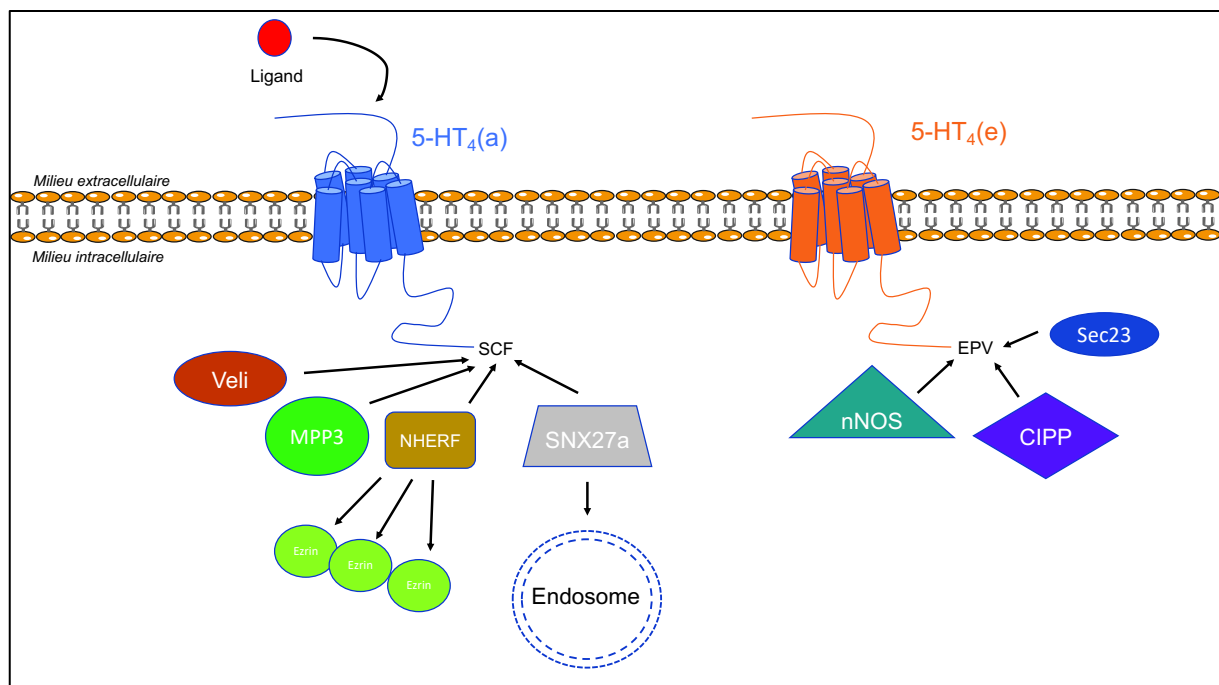


Figure 19 : Différentes protéines PDZ interagissent avec les R-5-HT_{4(a)} et (e)

Les protéines Vel1, MPP3, NHERF et SNX27a interagissent avec les acides aminés SCF de l'extrémité C-terminale de l'isoforme (a) alors que les protéines nNOS, CIPP et Sec23 interagissent avec les acides aminés EPV de l'extrémité C-terminale de l'isoforme (e).

3) APP et ADAM10

Il y a plus d'une dizaine d'années, l'équipe de F. Lezoualc'h a montré que l'activation du récepteur 5-HT₄ promeut l'activité alpha-sécrétase et donc le clivage non-amyloïdogène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et la sécrétion de sAPPα

via un mécanisme dépendant de l'activation de Epac (Robert et al., 2005). Plus récemment, notre équipe a mis en évidence une interaction entre le récepteur 5-HT₄, l'APP et l' α -sécrétase majoritaire dans le cerveau : l'ADAM10. Dans des neurones corticaux et dans des cellules HEK-293, l'expression du récepteur 5-HT₄ augmente la sécrétion de sAPP α . De plus, l'activation du récepteur stimule cette production de sAPP α de manière plus importante. Il semblerait que l'effet constitutif ne soit pas dépendant de la voie G_s ni de Epac, tandis que l'effet des agonistes est G-dépendant. Enfin, des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une interaction physique entre le récepteur 5-HT₄ et l'ADAM10 (Cochet et al., 2013).

4) P11

p11 ou S100A10 (*S100 calcium-binding protein A10*) est un membre de la famille des protéines S100 qui présente des motifs *EF hand* qui se lient au calcium. Ces protéines régulent plusieurs processus cellulaires dont l'exocytose et l'endocytose en réorganisant les filaments d'actine. De par son interaction avec le récepteur 5-HT_{1B} et les canaux sodiques Nav1.8, des travaux ont étudié l'implication de p11 dans des processus neurologiques comme la dépression et la nociception (Okuse et al., 2002; Svenningsson et al., 2006). Ces études ont montré que p11 était surexprimé dans le cerveau des rongeurs après traitement avec des antidépresseurs. A l'inverse, les niveaux de p11 sont diminués dans des modèles de souris dépressives ainsi que dans le cerveau de patients déprimés. Les souris KO pour le gène codant pour p11 présentent une réponse diminuée à la stimulation des récepteurs 5-HT_{1B}. De plus, une surexpression de p11 dans des lignées cellulaires augmente le nombre de récepteurs 5-HT_{1B} à la surface cellulaire (Svenningsson & Greengard, 2007; Svenningsson et al., 2013).

Plus récemment, une interaction entre le récepteur 5-HT₄ et p11 a été mise en évidence. Après avoir identifié le récepteur 5-HT₄ comme interacteur de p11 par criblage double-hybride de levure, les auteurs ont montré que les deux protéines colocalisent dans des coupes de cerveau de souris. Par le même mécanisme que pour le 5-HT_{1B}, une surexpression de p11 en système hétérologue augmente l'expression du 5-HT₄ à la membrane alors que le 5-HT₄ est moins exprimé à la membrane dans les cellules de souris *knock-out* (KO) pour p11. Par ailleurs, une coexpression de p11 et du récepteur 5-HT₄ facilite la signalisation du récepteur comme en témoignent

l'augmentation d'AMPC et de la phosphorylation de ERK1/2 après stimulation par rapport à la condition où seul le récepteur est exprimé. Comme évoqué précédemment, l'administration chronique de l'agoniste RS 67333 induit des effets antidépresseurs chez la souris. Dans cette étude, l'effet du RS 67333 n'induit pas d'effet antidépresseur dans les souris KO pour p11 (Warner-Schmidt et al., 2009). Ces résultats montrent que p11 est un modulateur de la localisation et de la signalisation du récepteur 5-HT₄.

H- 5-HT₄ ET INSULINE

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas. Elle intervient dans la régulation centrale de nombreuses fonctions et comportements tels que le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, le comportement alimentaire ou encore la cognition. Dans le cerveau, les récepteurs de l'insuline sont exprimés majoritairement dans l'encéphale, en particulier dans l'hypothalamus (Bruning et al., 2000). Cependant, il a été montré plus récemment que la signalisation de l'insuline régula le métabolisme et le comportement dans d'autres régions cérébrales comme l'hippocampe et l'amygdale, deux régions où le récepteur 5-HT₄ est exprimé (Derakhshan & Toth, 2013; Soto et al., 2019). De plus, plusieurs équipes ont montré dans des modèles de rongeurs que l'administration d'insuline exerçait des effets antidépresseurs *via* une action au niveau de l'hippocampe, et que la dépression et le diabète de type 2 partageaient des mécanismes pathogéniques communs (Burgdorf et al., 2016; Lyra e Silva et al., 2019; Zemdeg et al., 2019). Par ailleurs, la sérotonine, *via* le récepteur 5-HT₄, la protéine Src, et l'insuline partagent une voie de signalisation commune : la voie PI3K/Akt (Cowen, 2007). Il semblerait que la phosphorylation d'Akt induite par la 5-HT soit atténuée dans des conditions d'insulino-résistance ce qui suggère un dialogue entre les voies de signalisation de l'insuline et de la sérotonine (Papazoglou et al., 2012). D'autre part, une autre étude montre une localisation du récepteur 5-HT₄ au niveau du pancréas où il jouerait un rôle dans la stimulation de la sécrétion d'insuline (Chen et al., 2016a). D'autres résultats montrent une augmentation rapide du glucose dans le sang de patients atteints de diabète de type 2 après administration de mosapride, un agoniste des récepteurs 5-HT₄ (Ueno & Satoh, 2009).

L'insuline a également attiré l'attention des chercheurs pour son rôle éventuel dans la

maladie d'Alzheimer. En effet, le diabète est un facteur de risque pour la MA, et une réduction de la signalisation de l'insuline est une caractéristique des patients atteints de MA, même en l'absence de diabète de type 1 ou type 2 systémique. Cette caractéristique a d'ailleurs incité certains chercheurs à faire référence à la maladie d'Alzheimer comme un diabète de type 3 (Monte, 2014; Steen et al., 2005). En outre, des études montrent qu'une stimulation d'insuline induit le trafic de l'APP du réseau trans-Golgi vers la membrane plasmique où il se produit une libération d'A β , et qu'elle inhibe l'accumulation intracellulaire d'A β et sa dégradation enzymatique (Gasparini et al., 2001; Watson et al., 2003). Une dérégulation de la signalisation de l'insuline induit une diminution de la clairance des peptides A β dans le cerveau. De plus, une accumulation d'A β diminue l'affinité de l'insuline pour son récepteur, et les oligomères d'A β désensibilisent les récepteurs de l'insuline (Ling et al., 2002; Xie et al., 2002). D'autres effets sur la phosphorylation de tau, et l'implication de la résistance à l'insuline dans le stress oxydant associé à la maladie d'Alzheimer ont été décrits (Monte, 2014). Enfin, l'injection de streptozotocine chez le rat provoque des déficits cognitifs, une résistance à l'insuline dans le cerveau et une neurodégénération similaire à la maladie d'Alzheimer (Lester-Coll et al., 2006).

Tous ces travaux montrent un *cross-talk* entre la signalisation sérotoninergique et la signalisation de l'insuline, ainsi qu'un rôle de l'insuline dans la maladie d'Alzheimer, où le récepteur 5-HT₄ est également une cible thérapeutique d'intérêt.

VI- Le récepteur 5-HT₆

A- HISTORIQUE

Autre membre de la famille des récepteurs sérotonergiques, le récepteur 5-HT₆ a été découvert plus tardivement que le récepteur 5-HT₄. Identifié initialement dans une lignée de cellules de souris, les cellules NCB-20, ce récepteur avait des propriétés pharmacologiques des récepteurs 5-HT_{1C} et 5-HT₄ (Conner & Mansour, 1990). On lui a donc donné le nom de 5-HT₆ et les données pharmacologiques sont devenues plus claires lorsqu'il a été cloné pour la première fois en 1993 chez le rat (Ruat et al., 1993). Rapidement, on a constaté des différences dans le comportement pharmacologique

de plusieurs molécules en fonction de l'espèce. Par exemple, le LSD, qui est un agoniste partiel des récepteurs 5-HT₆ chez l'homme ou chez le rat, est un agoniste plein chez la souris (Boess et al., 1997). Le ligand RO 04-6790, qui se lie aux récepteurs 5-HT₆ chez l'homme et le rat, ne se lie pas au récepteur 5-HT₆ murin (Hirst et al., 2003).

B- LOCALISATION ET FONCTION

Les récepteurs 5-HT₆ sont exclusivement localisés dans le système nerveux central mais à l'instar des données pharmacologiques, leur distribution dans le cerveau est très variable en fonction des espèces (Setola & Roth, 2003). Chez l'homme, des expériences d'autoradiographie avec un antagoniste tritié du récepteur 5-HT₆ sur des cerveaux post-mortem de plusieurs individus ont montré une localisation dans le striatum, le noyau caudé, le putamen, l'accumbens, l'hippocampe et le cortex préfrontal (Marazziti et al., 2012). Chez les rongeurs, une localisation neuronale dans le cil primaire a été démontrée par plusieurs études (Brailov et al., 2000; Brodsky et al., 2017). Il semblerait que l'administration d'un antagoniste du récepteur 5-HT₆ régule la morphologie du cil primaire dans les neurones du striatum de souris. Cette localisation subcellulaire bien spécifique est due à une séquence d'adressage située dans la boucle i3 du récepteur, et semble jouer un rôle clé dans la pousse neuritique et la migration des interneurones durant le neurodéveloppement chez la souris (Berbari et al., 2008; Duhr et al., 2014; Jacobshagen et al., 2014). L'interaction entre le récepteur 5-HT₆ et la kinase Cdk5 est nécessaire à ces effets.

D'autres études démontrent un potentiel thérapeutique de la modulation des récepteurs 5-HT₆ dans des modèles animaux. Par exemple, l'administration d'agonistes et d'antagonistes du récepteur a des effets antidépresseurs, anti-obésité ou des effets positifs sur la cognition (Dawson & Li, 2003; Frassetto et al., 2008; Kotańska et al., 2018; Meneses, 2001; Rogers & Hagan, 2001). Les récepteurs 5-HT₆ semblent également impliqués dans l'analgésie, la régulation du sommeil, l'épilepsie, les mécanismes de l'addiction, le suicide, le dépassement de soi ou la maladie de Parkinson (Azenha et al., 2009; Castañeda-Corral et al., 2009; Ferguson et al., 2008; Freitas et al., 2009; Ham et al., 2004; Kindlundh-Högberg et al., 2006; Messina et al., 2002; Morairty et al., 2008). Les effets procognitifs des antagonistes du récepteur 5-HT₆ ont permis de l'envisager comme une cible thérapeutique prometteuse dans le

contexte de la maladie d'Alzheimer. En effet, l'idalo pridine, un antagoniste des récepteurs 5-HT₆, a longtemps suscité l'espoir jusqu'à son échec récent lors de plusieurs essais cliniques de phase 3, en co-administration avec un inhibiteur d'acétylcholinestérase (Atri et al., 2018). En plus des effets pro-cognitifs liés au blocage des récepteurs 5-HT₆, l'idalo pridine inhiberait le cytochrome CYP206 ce qui permettrait d'augmenter la biodisponibilité du donepezil, un inhibiteur d'acétylcholinestérase (Marcos et al., 2008). Toutefois, il semblerait que le donepezil ait une interaction pharmacodynamique négative avec les antagonistes 5-HT₆ (Roberts et al., 2012). Cela laisse la porte ouverte à d'autres stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs 5-HT₆, telles que l'utilisation de ligands multi-cibles (*Multitarget-directed ligands* ou MTDLs), mais nous reviendrons sur cet aspect dans la partie résultats.

Récemment, une étude réalisée au sein de de l'équipe a montré que le récepteur 5-HT₆ interagit avec la neurofibromine (Nf1), un suppresseur de tumeur. La mutation du gène *NF1* provoque une maladie génétique, la neurofibromatose de type 1 qui provoque des neurofibromes, tumeurs localisées le long des nerfs, ainsi que des troubles cognitifs. Il semblerait que des mutations présentes chez les patients atteints de neurofibromatose de type 1 affectent l'interaction entre le récepteur 5-HT₆ et Nf1 dans des neurones de souris et des cellules humaines. Dans un modèle animal de la maladie, caractérisé par des troubles de la mémoire, la production d'AMPc induite par l'activation du récepteur 5-HT₆ en est affectée. Ces résultats font du récepteur 5-HT₆ une cible thérapeutique intéressante pour traiter les troubles cognitifs observés chez les patients atteints de Neurofibromatose de type 1 (Nadim et al., 2016).

Par ailleurs, le blocage des récepteurs 5-HT₆ apparait comme une stratégie thérapeutique pertinente pour traiter des maladies psychiatriques comme la schizophrénie, bien que son rôle précis reste à éclaircir (Leng et al., 2003; Zhu Li et al., 2007; Meffre et al., 2012; Mitchell & Neumaier, 2008; Rodefer et al., 2008).

C- VOIES DE SIGNALISATION

Le récepteur 5-HT₆ est un RCPG couplé à la protéine G_s. L'activation du récepteur stimule donc l'activité de l'AC, ce qui induit l'activation de la voie de signalisation en aval de la PKA. Le récepteur 5-HT₆ a connu un fort intérêt lorsque l'on a découvert que de nombreux antipsychotiques et antidépresseurs avaient pour effet de bloquer la

stimulation de l'AC dépendante de l'activation du 5-HT₆. Le développement de plusieurs ligands spécifiques ont par la suite permis de comprendre que la signalisation du récepteur 5-HT₆ dépendait principalement de l'activation de 2 sous-types d'AC, l'AC2 et l'AC5, bien que la cascade de signalisation ne soit pas entièrement bien comprise (Baker et al., 1998; Nawoschik et al., 2007).

L'activation du récepteur 5-HT₆ conduit également à l'activation de ERK1/2. Le recrutement de Fyn (une kinase de la famille de Src) par le domaine C-terminal du récepteur est nécessaire à cette activation. L'activation du R-5-HT₆ induit la phosphorylation de Fyn, qui va activer la voie de signalisation Ras-MEK-ERK1/2. Cette voie de signalisation est partiellement dépendante de PKA et de Rap1 (Hyung-Mun et al., 2007). D'autre part, le récepteur 5-HT₆ est aussi capable de recruter Jab1 (*Jun activation domain-binding protein 1*) ce qui va transloquer Jab1 du cytoplasme au noyau où il se lie à c-Jun et induit sa phosphorylation (Yun et al., 2010). Les mécanismes responsables de l'interaction directe avec Fyn ou Jab1 ne sont pas encore entièrement élucidés. Par ailleurs, l'activation du récepteur 5-HT₆ induit une réduction des courants entrants via les canaux K⁺ dans les interneurons cholinergiques du striatum (Bonsi et al., 2007).

Plus récemment, l'association du récepteur 5-HT₆ avec d'autres protéines comme Map1B-LC1, qui augmente l'expression du récepteur à la membrane ou SNX14 et Nova-1, qui induisent son endocytose et sa dégradation, a été mise en évidence (Ha et al., 2015; Kim et al., 2014, 2019).

Enfin, l'engagement d'une signalisation cellulaire via la protéine mTOR après stimulation du récepteur 5-HT₆ a été montrée par une approche de protéomique non-biaisée. L'interactome du récepteur 5-HT₆ révèle un enrichissement de plusieurs protéines appartenant à la voie de signalisation mTOR. Il semblerait que l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT₆ interagisse physiquement avec mTOR, ce qui induit son activation dans des modèles de cellules exprimant transitoirement le récepteur ainsi que dans le cortex préfrontal et le striatum de souris (Meffre et al., 2012).

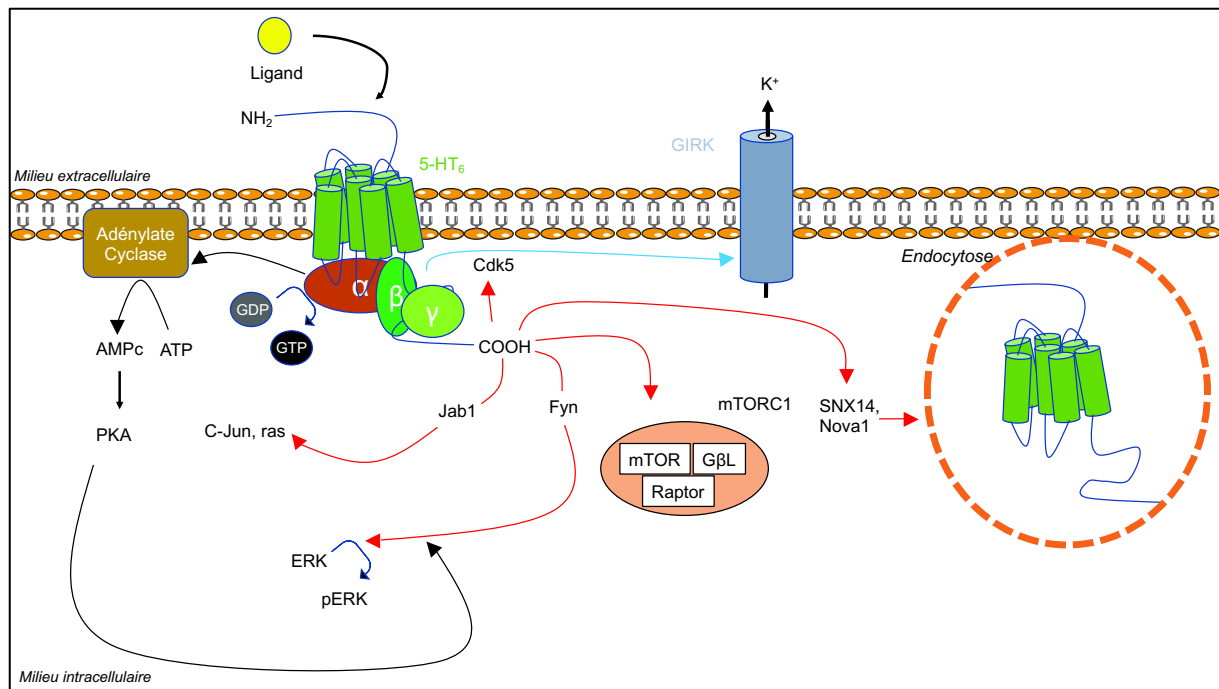


Figure 20 : Principales voies de signalisation du récepteur 5-HT₆

Le récepteur 5-HT₆ est couplé positivement à la voie AC/AMPc via la protéine G α_s . Sa stimulation inhibe les canaux GIRK dans les neurones. Il active également des kinases de qui résulte en une phosphorylation de ERK ou une translocation de Jun dans le noyau. Son domaine C-terminal interagit aussi avec Cdk5, le complexe mTOR ainsi que les protéines SNX14 et Nova1 qui induisent son endocytose.

Chapitre III

Les nanobodies comme outils d'étude des RCPG

I- Découverte des nanobodies

Les nanobodies ont été découverts de manière fortuite en 1989 à l'Université libre de Bruxelles par les immunologistes R. Hamers et C. Casterman (Hamers-Casterman et al., 1993). Durant des travaux pratiques de biologie, un binôme d'étudiants devait extraire des anticorps à partir de sérum humain. Pas très motivés à l'idée de reproduire cette expérience réalisée de nombreuses fois et dont le résultat était documenté dans leurs livres, et dans un contexte de développement de l'épidémie du SIDA, leur enseignant leur proposa de travailler sur du sérum de dromadaire qui était stocké dans le congélateur du laboratoire. Cette expérience exotique motiva les étudiants qui commencèrent à travailler sur leur séparation d'anticorps. En plus de la distribution habituelle des immunoglobulines, ils découvrirent un groupe d'anticorps plus petits qui ne correspondaient pas à quelque chose de connu, ces anticorps étant dépourvus de chaînes légères. Par la suite, R. Hamers et C. Casterman commencèrent à caractériser cette nouvelle classe d'anticorps qui étaient des variants dégradés d'anticorps conventionnels. Il aura fallu un voyage en Afrique et deux ans d'expérimentations pour confirmer la découverte (Gross, 2008). Par la suite, ces anticorps furent identifiés dans d'autres camélidés comme les chameaux et les lamas. En 1995, ils furent découverts chez le requin-nourrice mais une analyse évolutionnaire montra que les camélidés et les requins avaient évolué de manière indépendante (Greenberg et al., 1995; V. Nguyen et al., 2002). L'explication la plus plausible de l'émergence des nanobodies chez ces espèces est leur besoin de cibler des épitopes inaccessibles pour des anticorps conventionnels (Flajnik et al., 2011).

II- Structure des nanobodies

En plus de leur petite taille représentant $1/10^{\text{ème}}$ de celle d'une IgG (Immunoglobuline) conventionnelle, la caractéristique majeure des nanobodies est que leur paratope est constitué d'un seul domaine variable nommé V_HH (*heavy chaine only variable domain*). Ce domaine est formé par une unique chaîne peptidique qui conserve la même diversité de répertoire et les mêmes caractéristiques d'affinité que des anticorps classiques.

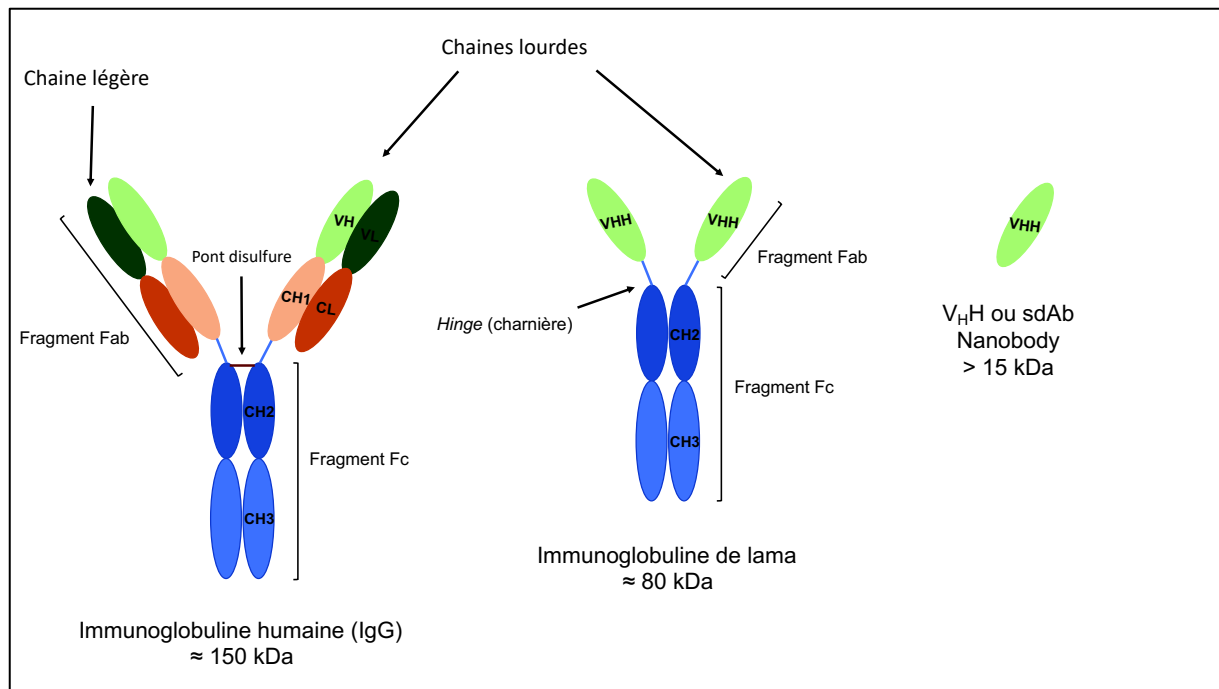


Figure 21 : Structure d'une IgG humaine et des anticorps de camélidés

Un anticorps V_HH ou nanobody (également appelé sdAb pour *single domain antibody*) correspond à la région variable d'une chaîne lourde d'un anticorps de camélidés. Sa taille est 10 fois inférieure à celle d'une immunoglobuline humaine.

Contrairement aux anticorps conventionnels, les nanobodies sont plus résistants à la chaleur et stables dans des détergents. Ils sont également moins lipophiles et plus solubles dans l'eau. Ces propriétés permettent à leur région CDR3 (*Complementary Determining Region 3*), impliquée dans la reconnaissance de l'épitope, de couvrir le site lipophile qui se lie normalement à une chaîne légère. Une étude montre que certains V_HH peuvent survivre à des températures de 90°C sans perdre leur capacité à lier leur antigène (Van Der Linden et al., 1999).

Les camélidés produisent deux types d'anticorps en plus des immunoglobulines classiques :

- Des homodimères de chaînes lourdes (IgG2 et IgG3) également appelés HCAs (*Heavy Chain only Antibodies*) formés de trois domaines. Le domaine CH₁, ainsi que les chaînes légères (C_L et V_L) sont absentes. Il semblerait que l'absence de domaine CH₁ vienne de l'absence de chaînes légères. En effet, une interaction entre le domaine CH₁ des chaînes lourdes et des protéines chaperonnes permet la rétention du complexe dans le RE. Ce sont les chaînes

légères qui vont déplacer les chaperonnes et permettre aux IgG d'être sécrétées. Il est donc nécessaire que le domaine CH₁ soit tronqué pour permettre la sécrétion d'IgG2 et IgG3 (Vincke et al., 2012)

Ainsi, le domaine variable V_HH est directement relié à la charnière (ou *hinge* en anglais) qui les relie au fragment Fc constitué des domaines CH₂ et CH₃ et similaire à celui des IgG conventionnelles. La taille du *hinge* permet de classer les IgG en deux catégories : les IgG2 ont une chaîne de 15 à 35 acides aminés et les IgG3 ont 12 acides aminés.

- Des sdAb (appelés Nanobodies en raison de leur petite taille) constitués du domaine globulaire d'IgG appelé V_HH. Un V_HH est une chaîne peptidique d'environ 110 acides aminés, qui est capable de reconnaître un épitope avec la même efficacité qu'un anticorps composé de chaînes légères et chaînes lourdes (S. Muyldermans et al., 1994).

Des expériences de cristallisation montrent que les nanobodies sont agencés en deux ensembles de quatre et cinq feuillets β antiparallèles, qui leur permettent d'adopter le repliement caractéristique des immunoglobulines (Serge Muyldermans et al., 2001). Les V_HH et les V_H sont composés de quatre séquences conservées, les *Framework Regions* (FR) entourant trois régions hypervariables, les *Complementary Determining Region* (CDR). Il existe des différences dans la composition en acides aminés de ces régions. Par exemple, le CDR1 et le CDR3 des V_HH est plus long que celui des V_H, ce qui leur permet d'avoir une diversité paratopique équivalente à celle des V_H (Conrath et al., 2003; V. K. Nguyen et al., 1998). De plus, la forme convexe des V_HH leur permet de reconnaître préférentiellement des antigènes concaves, alors que les V_H sont plus plats et reconnaissent plutôt des antigènes plans ou convexes (De Genst et al., 2006). Par ailleurs, la région FR2, très conservée chez les V_H, contient de nombreux résidus hydrophobes servant de points d'ancrages au domaine V_L. Ils sont absents chez les V_HH qui contiennent plutôt des résidus hydrophiles, améliorant ainsi leur solubilité (S. Muyldermans et al., 2009). Enfin, un pont disulfure peut se former entre les CDR1 et les CDR3 des V_HH grâce à des résidus cystéines (voir figure 22, bande jaune), ce qui permet le repliement des boucles CDR (De Genst et al., 2006).

Il est aussi important de souligner que les trois CDR des domaines V_H et les trois CDR des domaines V_L contribuent à parts égales à la reconnaissance de l'épitope dans une

immunoglobuline, alors que pour les V_HH, le CDR3 est fortement impliqué dans le contact avec l'épitope puisqu'il contribue pour 60 à 80% (S. Muyldermans et al., 2009).

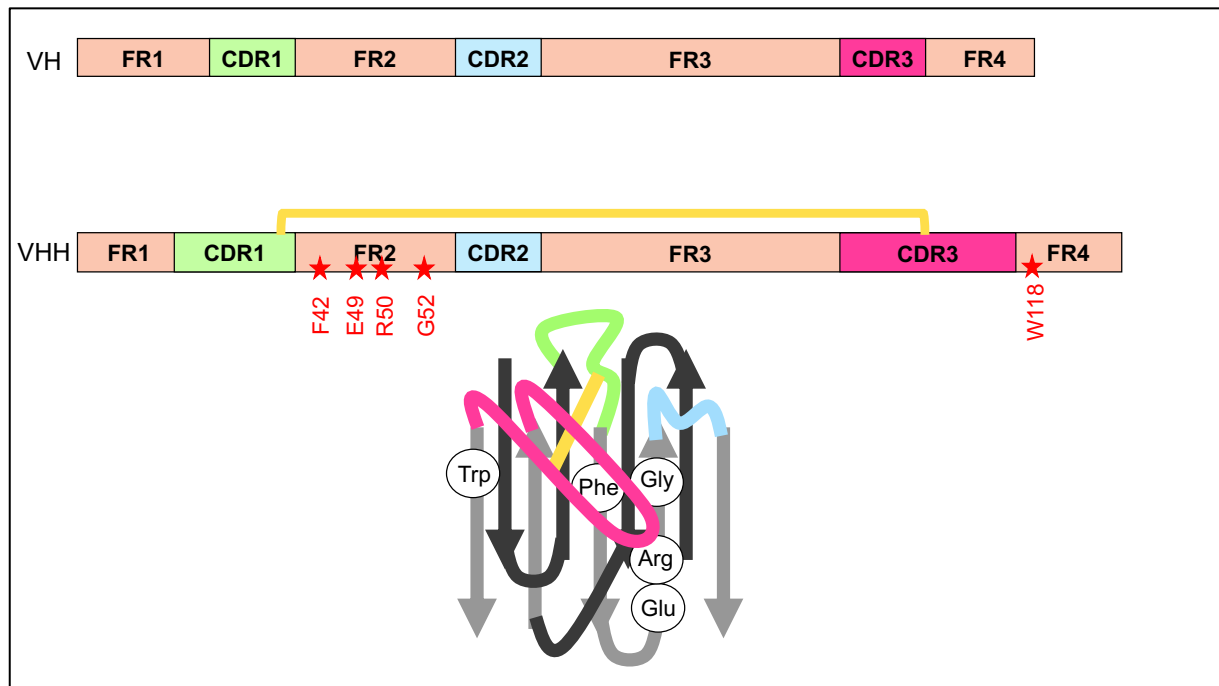


Figure 22 : Comparaison des séquences de V_H et V_HH et structure tertiaire des V_HH

Les V_H et V_HH sont composés de quatre régions FR et trois régions CDR de tailles différentes. Les étoiles rouges représentent les résidus conservés chez les V_HH. Un pont disulfure représenté en jaune relie parfois le CDR1 et le CDR3 des V_HH. *Inspiré de Muyldermans, 2013, Annual Review of Biochemistry.*

III- Réarrangement des gènes

L'impressionnante diversité du répertoire des anticorps provient du réarrangement des gènes VDJ (*Variable-Diversity-Joining*) appelé recombinaison VDJ et de l'hypermutation somatique dans les cellules B matures.

La recombinaison VDJ se produit au cours du développement des cellules B. Les immunoglobulines sont composées de chaînes lourdes et de chaînes légères contenant chacune une partie constante (C) et une partie variable (V). Les parties variables des immunoglobulines sont codées par des gènes qui comportent 3 types de segments : V, D et J. Dans les cellules souches, les chaînes lourdes sont obtenues par recombinaison des fragments V, D et J tandis que les chaînes légères sont

obtenues par recombinaison des fragments V et J, en amont des séquences codant pour les domaines constants CH₁ et CH₃.

Chez les camélidés, certains gènes sont dédiés à la production des domaines constants des immunoglobulines, qui ne sont pas les mêmes que ceux utilisés pour les anticorps conventionnels (Woolven et al., 1999).

Pour obtenir des anticorps sans chaînes légères (HCAbs), des fragments V spécifiques sont réarrangés avec des fragments D et J classiques. Chez les camélidés, la séquence nucléotidique de l'exon codant pour la région CH₁ est bel et bien présente, mais une mutation ponctuelle entraîne l'élimination de cette région par épissage de l'ARNm (Acide Ribonucléique messenger). Il semblerait que cet épissage unique ne soit pas dû à des facteurs cellulaires propres aux camélidés puisqu'il a été possible de générer des HCAbs fonctionnels dans une lignée cellulaire de souris (V. K. Nguyen et al., 2003).

Les domaines CDR3 des V_HH sont générés à la jonction des fragments V-D-J, par des fragments D et J qui sont les mêmes que ceux utilisés pour générer des V_H. Dans cette optique, il est assez surprenant que les V_HH possèdent des domaines CDR3 plus longs que les V_H. L'hypothèse la plus probable est que des V_HH avec des domaines CDR3 courts soient produits, mais qu'ils ne soient pas sélectionnés lors de l'amplification clonale des lymphocytes qui suit l'exposition à l'antigène.

Il semblerait également que les gènes codant pour les V_HH (mais pas ceux codant pour les V_H) contiennent parfois des séquences particulières (palindromes, séquences signal de recombinaison des Ig) qui sont reconnues comme instables ou qui favorisent des événements comme la recombinaison de l'ADN ou la conversion génique. Ces éléments accéléreraient l'évolution des gènes et donc l'expansion du répertoire codant pour les V_HH (V. K. Nguyen et al., 2000; V. Nguyen et al., 2002). De plus, ils seraient aussi responsables de l'édition des récepteurs des cellules B par un mécanisme de conversion génique. En effet, l'analyse des séquences d'ADNc de V_HH obtenues après *phage display* contre un antigène donné révèle parfois une redondance des séquences de la région CDR3 (donc une recombinaison V-D-J similaire) avec des domaines CDR1 et CDR2 différents.

La diversité du répertoire des anticorps est également due à l'hypermutation somatique qui intervient dans les organes lymphoïdes périphériques. Lorsque les cellules B sont exposées à un antigène, les populations d'anticorps sont soumises à des mutations ponctuelles à très haute fréquence puis sélectionnées par liaison à

l'antigène. Ce phénomène de maturation de la population d'anticorps par affinité est un mécanisme clé du système immunitaire. La région CDR1 des V_H contient des acides aminés très conservés. Dans les gènes codant pour les V_HH, certains acides aminés de la région CDR1 sont substitués, ce qui crée deux *hotspots* d'hypermutation somatique supplémentaire. Ainsi, bien qu'ils soient dépourvus de la diversité liée à la combinaison de domaines V_H et V_L, les V_HH possèdent un répertoire comparable aux immunoglobulines conventionnelles (V. K. Nguyen et al., 2000).

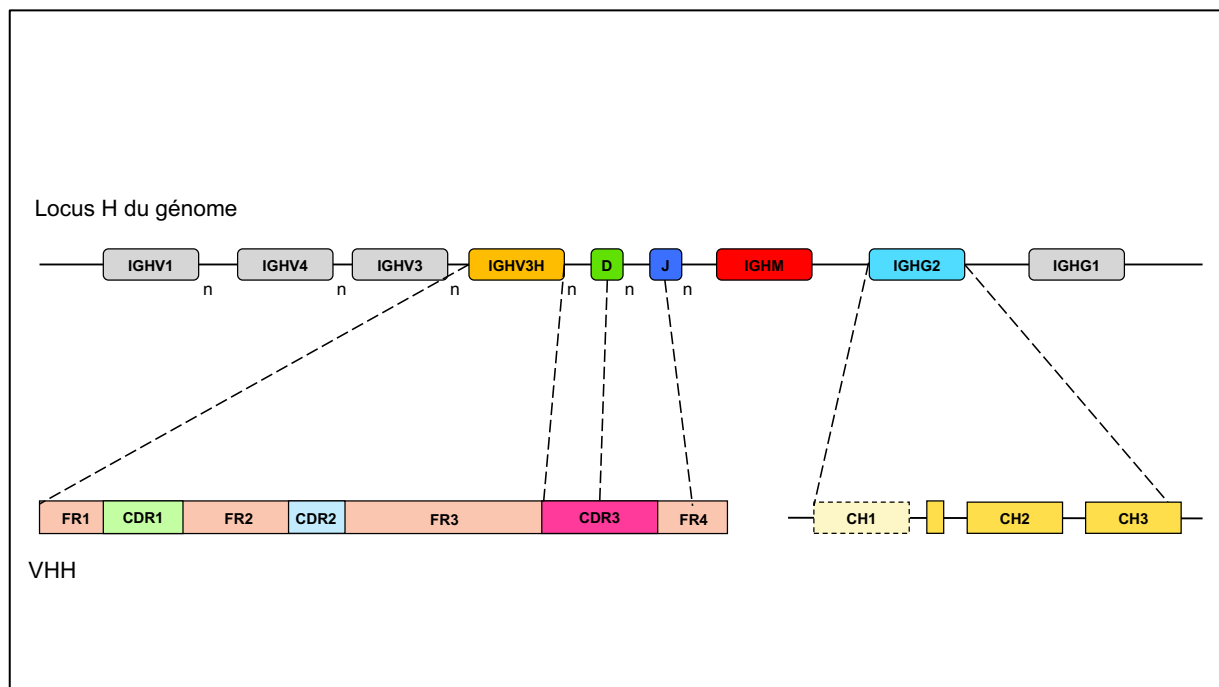


Figure 23 : Représentation schématique du locus H du génome des camélidés

Le locus H contient de multiples variants des gènes IGHV1, IGHV4 et IGHV3 qui codent pour les V_H. En aval, il y a un cluster de gènes D et J, puis les gènes codant pour les parties constantes : IGHM, IGHD (non représenté), IGHG2, IGHG1, puis IGHE et IGHA (non représentés). Durant la lymphopoïèse, un gène IGHV3H est réarrangé avec un élément D et un élément J du même locus pour former un domaine V_HH et éventuellement coexprimé avec un gène IGHG2 ou IGHG3 pour former un HCAb. L'exon CH1 est éliminé durant l'épissage de l'ARNm. *Inspiré de Muyldermans, 2013, Annual Review of Biochemistry.*

IV- Propriétés et avantages des nanobodies

Les nanobodies sont généralement obtenus après immunisation de l'animal, clonage du répertoire des gènes *V* issu des lymphocytes présents dans le sang, et sélection par *phage display*. Il est possible d'obtenir des nanobodies spécifiques à un antigène en immunisant l'animal avec des protéines utilisées comme immunogène mais aussi en utilisant d'autres stratégies comme l'injection d'ADN ou encore le *prime-boost* qui consiste à injecter l'ADN codant pour un antigène puis la protéine recombinante (Koch-Nolte et al., 2007). Étant donné leur petite taille, les V_HH sont codés par des gènes d'environ 360 paires de bases ce qui permet d'amplifier facilement par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) des banques supérieures à 10^6 clones, représentatives de la diversité du répertoire des cellules B présentes dans un échantillon de sang de 50 ml. Il est également possible d'obtenir des nanobodies spécifiques à un antigène à partir de banques naïves ou synthétiques, mais ces banques doivent être plus grandes ($> 10^9$ clones). La sélection des nanobodies spécifiques à un antigène se fait ensuite par un protocole de *phage display*, ou d'autres protocoles de sélection comme le *bacterial display*, *yeast display*, *ribosome display* ou *intracellular 2 hybrid selection* (Pellis et al., 2012). Le *phage display* est néanmoins privilégié de par la robustesse de la technique.

L'expression des nanobodies à haut niveau est également possible dans des microorganismes, des lignées cellulaires, ou des plantes. Il est possible d'exprimer les nanobodies dans des bactéries et d'utiliser un peptide signal de sécrétion dans le périplasme. L'environnement oxydant du périplasme permet le repliement correct des nanobodies et la formation des ponts disulfure. De plus, la purification avec un tag hexa-histidine est facilitée car on s'affranchit alors de la plupart des contaminants présents dans le cytoplasme. La durée de conservation des nanobodies est excellente. Ils peuvent être stockés des mois à 4°C tout en gardant pleine leur capacité de liaison à l'antigène. Des incubations à 37°C pendant plusieurs semaines sont aussi tolérées (Arbabi Ghahroudi et al., 1997). Ils résistent à la dénaturation chimique et thermique, à des hautes concentrations d'urée ou de détergents, voire à la dégradation par la pepsine ou la chymotrypsine après ajout d'un pont disulfure (Hussack et al., 2011). Cette haute stabilité a permis d'envisager des applications inaccoutumées comme leur utilisation en tant que biosenseurs pour détecter des biomarqueurs dans des tests urinaires par exemple (Leow et al., 2017).

Par ailleurs, leur petite taille, leur clairance rapide dans le sang ainsi qu'une homologie de séquence avec les V_H humains en font de faibles immunogènes comme l'attestent plusieurs études montrant l'absence de réponse immunitaire après leur injection chez l'homme ou la souris (Baral et al., 2006; Coppieters et al., 2006). Cela a permis d'envisager leur utilisation en thérapeutique humaine.

La forme convexe du paratope des nanobodies leur permet de s'associer préférentiellement avec des antigènes concaves, comme les sites actifs des enzymes. Ainsi, plusieurs nanobodies peuvent affecter l'activité catalytique des enzymes. Certains se comportent comme des inhibiteurs allostériques négatifs mais d'autres peuvent stabiliser la conformation active des enzymes et ainsi enclencher leur activité enzymatique (Oyen et al., 2011; Saerens et al., 2004; Transue et al., 1998). Leur petite taille leur permet de passer la barrière hémato-encéphalique et leur confère une pénétration tissulaire largement supérieure aux anticorps conventionnels (Smolarek et al., 2012). Ils peuvent également accéder à des épitopes dans des cavités qui sont inaccessibles pour des immunoglobulines classiques.

De plus, leur forme monomérique permet aussi de les associer sous forme de multimères. Par exemple, l'association de deux nanobodies identiques ou reconnaissant deux épitopes différents d'un même antigène permet d'augmenter l'avidité ou l'affinité. D'autre part, l'utilisation d'un tandem de deux nanobodies (*diabody*) ciblant des antigènes différents peut avoir des applications intéressantes. A titre d'exemple, l'utilisation d'un nanobody bispécifique ciblant l'albumine et un autre antigène peut permettre d'augmenter sa demi-vie dans le sang pour une utilisation en thérapeutique humaine (Bannas et al., 2017).

V- Applications des nanobodies

A- EN IMMUNOHISTOCHEMIE

La génération de nanobodies se liant à des antigènes variés avec une haute affinité permet la caractérisation de cibles cellulaires diverses allant de molécules de signalisation intracellulaire à des biomarqueurs de pathologies. Leur capacité à se lier à des épitopes inaccessibles pour des immunoglobulines classiques a permis le développement d'outils robustes en immunohistochimie, notamment en biologie des

RCPG. En effet, le manque d'anticorps spécifiques à de nombreux RCPG est criant, notamment ceux de classe A qui sont faiblement immunogènes et possèdent un domaine extracellulaire court. Le développement de nanobodies ciblant des RCPG a été rendu possible grâce aux propriétés intrinsèques de cette classe d'anticorps, qui est capable de se lier à des antigènes concaves et d'atteindre des épitopes dans des cavités accessibles grâce à leur taille dix fois inférieure à celles des anticorps conventionnels. Ainsi, la conjugaison de fluorophores ou de radioisotopes au nanobody permet la détection d'antigènes *in vitro* ou *in vivo*.

Bien qu'aucun nanobody n'ait encore été utilisé pour réaliser de l'imagerie de RCPG *in vivo*, ils ont été utilisés avec succès pour visualiser des récepteurs tyrosine kinase. Par exemple, l'utilisation de nanobodies conjugués à des fluorophores ou des radioisotopes ciblant les récepteurs EGFR ou HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) est décrite dans plusieurs études (van Driel et al., 2014; Xavier et al., 2016). Un nanobody ciblant HER2 et marqué au ^{68}Ga est d'ailleurs actuellement en essai clinique pour une utilisation en imagerie pour des patients atteints de cancer du sein (Keyaerts et al., 2016).

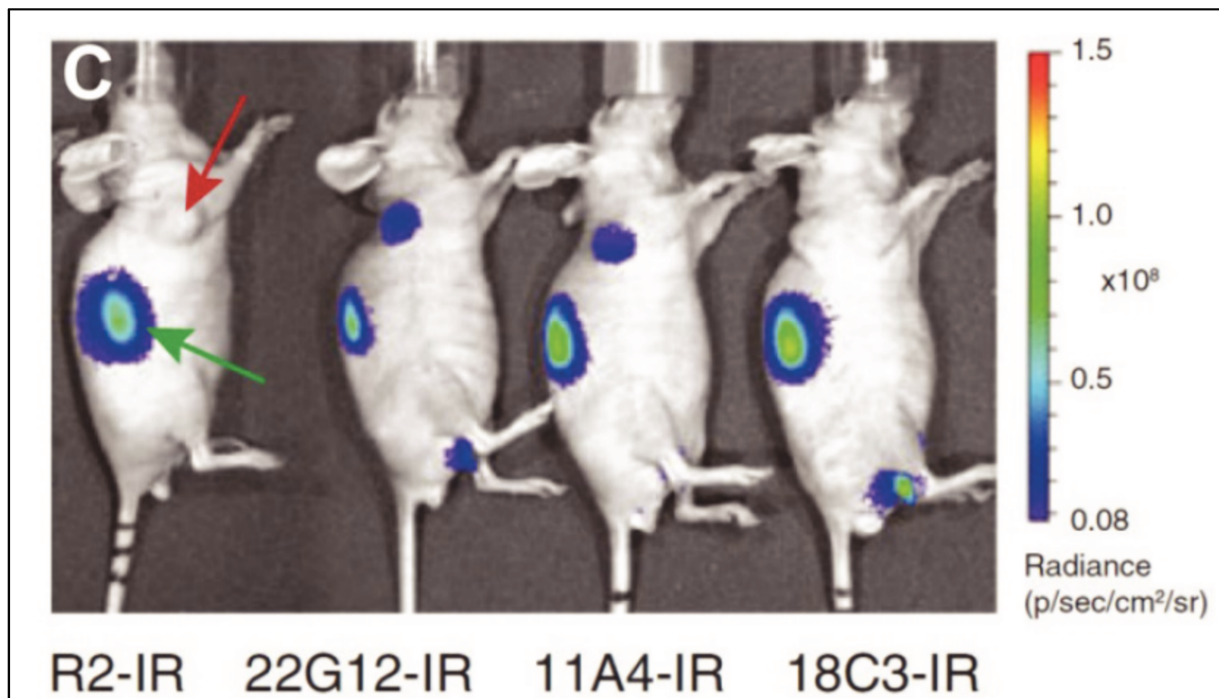


Figure 24 : Imagerie de l'expression de HER-2 avec un nanobody chez la souris

Imagerie optique *in vivo* 4 heures après injection de nanobodies luminescents spécifiques de HER-2 (22G12, 11A4, 18C3) ou d'un nanobody contrôle négatif (R2). Les tumeurs sont indiquées par la flèche rouge, et les reins par la flèche verte. D'après Chakravarty, Goel, & Cai, 2014, *Theranostics*.

Par ailleurs, des nanobodies ont été utilisés pour visualiser des RCPG *in vitro*. On peut par exemple citer les nanobodies DN10 et DN13 ciblant le récepteur mGlu2 qui permettent de visualiser le récepteur dans des cultures de neurones (Scholler et al., 2017).

Des nanobodies fusionnés à la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*), appelés *chromobodies*, ont également été utilisés pour imager de nombreuses protéines intracellulaires. De l'imagerie du cytosquelette d'actine dans le modèle du poisson-zèbre a par exemple été décrite (Panza et al., 2015).

B- EN TANT QUE CHAPERONNES DE CRISTALLISATION

Comme nous l'avons expliqué dans la première partie, les RCPG sont des molécules dynamiques qui peuvent adopter de multiples conformations. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires et les conséquences de certaines conformations de RCPG spécifiques sont cruciales pour déchiffrer les mécanismes de signalisation des RCPG et développer des molécules thérapeutiques efficaces. La cristallisation des structures de RCPG dans différentes conformations est apparue comme un moyen efficace d'obtenir des informations sur ces conformations. Néanmoins, l'hétérogénéité conformationnelle des RCPG est un des obstacles majeurs à l'obtention de structures de RCPG cristallisés à haute résolution. Généralement, l'introduction de mutations ou l'utilisation d'antagonistes à haute affinité permet de résoudre ces problèmes.

Grâce à leur taille et leur structure tridimensionnelle, les nanobodies sont connus pour se lier à des épitopes conformationnels plus facilement que les anticorps classiques. De plus, leur grande solubilité réduit le risque d'obtention des cristaux de nanobodies non complexés à leur cible. De nombreuses études montrent l'utilisation avec succès de nanobodies pour stabiliser des conformations spécifiques de RCPG ce qui a permis leur cristallisation et l'élucidation de plusieurs nouvelles structures de RCPG. Un des exemples les plus marquants de la dernière décennie concerne le récepteur β_2 -AR. En 2007, la première structure du récepteur β_2 -AR en complexe avec l'agoniste inverse carazolol a été publiée (Søren G.F. Rasmussen et al., 2007). Dans le but d'obtenir la conformation active du récepteur β_2 -AR, les auteurs ont essayé de le stabiliser avec un fragment d'anticorps Fab se liant à la boucle intracellulaire i3, mais la cristallisation du complexe Fab-récepteur en combinaison avec des agonistes ne fut

pas concluante. Pour stabiliser la conformation active du récepteur, les auteurs ont généré une banque de nanobodies qu'ils ont sélectionnée et criblée contre le récepteur β_2 -AR lié à son agoniste et purifié dans des liposomes. Un *hit* a permis de sélectionner le nanobody Nb80 dont la région CDR3 se lie spécifiquement au récepteur β_2 -AR sous sa forme active, ce qui lui confère des propriétés similaires à une protéine G. La structure cristallisée du récepteur β_2 -AR en complexe avec l'agoniste BI-167107 et le nanobody Nb80 a été ainsi publiée (Søren G.F. Rasmussen et al., 2011). Par la suite, les structures de la conformation active des récepteurs M_2 , κ -opioïd et μ -opioïd ont été résolues en utilisant la même stratégie (Che et al., 2018; W. Huang et al., 2015; Kruse et al., 2013). Cette méthodologie peut être utilisée pour d'autres applications en biologie structurale comme en *single-particle electron microscopy* (Westfield et al., 2011).

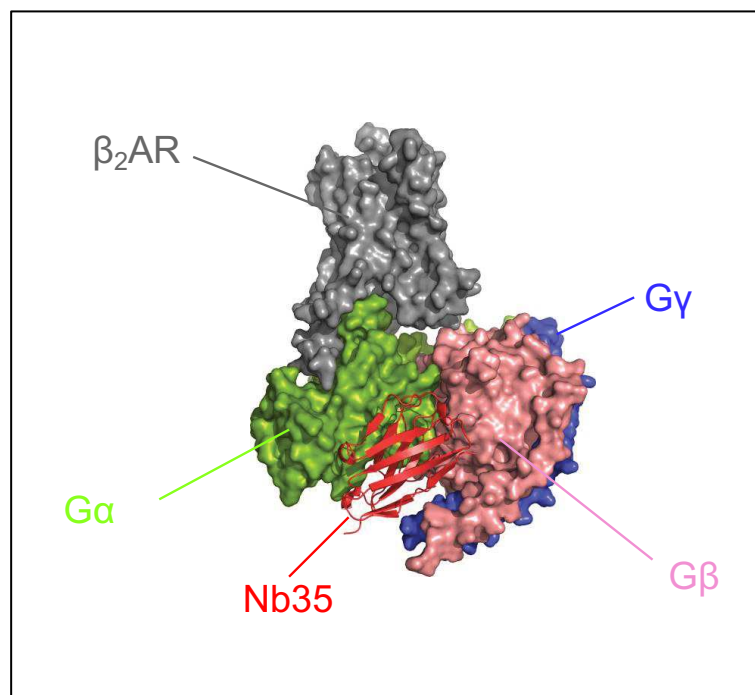


Figure 25 : Structure du complexe β_2 -AR-G $_s$ résolu par cristallographie à rayons X

Représentation de l'état actif du complexe ternaire formé du récepteur β_2 -AR et l'hétérotrimère G $_s$. Le nanobody Nb35 se lie à l'interface des sous-unités G α et G β . D'après Pardon et al., 2014, *Nature Protocols*.

Au-delà du champ des RCPG, les nanobodies ont aussi été utilisés pour achever la cristallisation de protéines récalcitrantes. En bloquant le domaine N-terminal flexible

de la protéine PrP du prion humain, les nanobodies ont permis la résolution de sa structure par cristallographie (Abskharon et al., 2014). La publication de protocoles décrivant en détail les étapes nécessaires à la génération de tels nanobodies permettent en théorie leur production en six à douze mois (Pardon et al., 2014).

C- EN TANT QU'OUTILS PHARMACOLOGIQUES

A l'instar des anticorps utilisés comme modulateurs de la signalisation des RCPG, les nanobodies sont également des outils intéressants dans ce domaine. Ils peuvent être utilisés pour cibler des épitopes extracellulaires mais aussi être administrés dans le milieu intracellulaire, soit en étant exprimés à l'intérieur de la cellule, soit en pénétrant à l'intérieur de la cellule : ce sont des intrabodies.

Comme exemple de nanobodies ciblant la partie extracellulaire d'un RCPG, on peut citer ceux générés contre le récepteur CXCR4. Ces clones témoignent de la possibilité de générer des nanobodies ciblant un épitope sur la partie extracellulaire d'un RCPG de classe A, malgré la petite taille du domaine N-terminal et des boucles e1, e2 et e3. Deux clones agissant en tant qu'antagonistes ont ainsi été générés et sont capables bloquer complètement la liaison du ligand CXCL12 au récepteur, ainsi que la signalisation induite (Jähnichen et al., 2010). De plus, la construction d'un nanobody biparatopique (un tandem ciblant deux épitopes sur le même antigène) a permis d'augmenter l'affinité et des propriétés d'agoniste inverse ont même été observées.

Les nanobodies ciblant les récepteurs mGlu2 (DN10 et DN13) sont des modulateurs allostériques positifs. Leur liaison au récepteur augmente la puissance de l'agoniste LY379268. De plus, le nanobody DN10, mais pas le DN13, peuvent partiellement activer le récepteur mGlu2. Ces deux clones se lient à des épitopes différents, bien qu'ils soient partiellement chevauchants (Scholler et al., 2017).

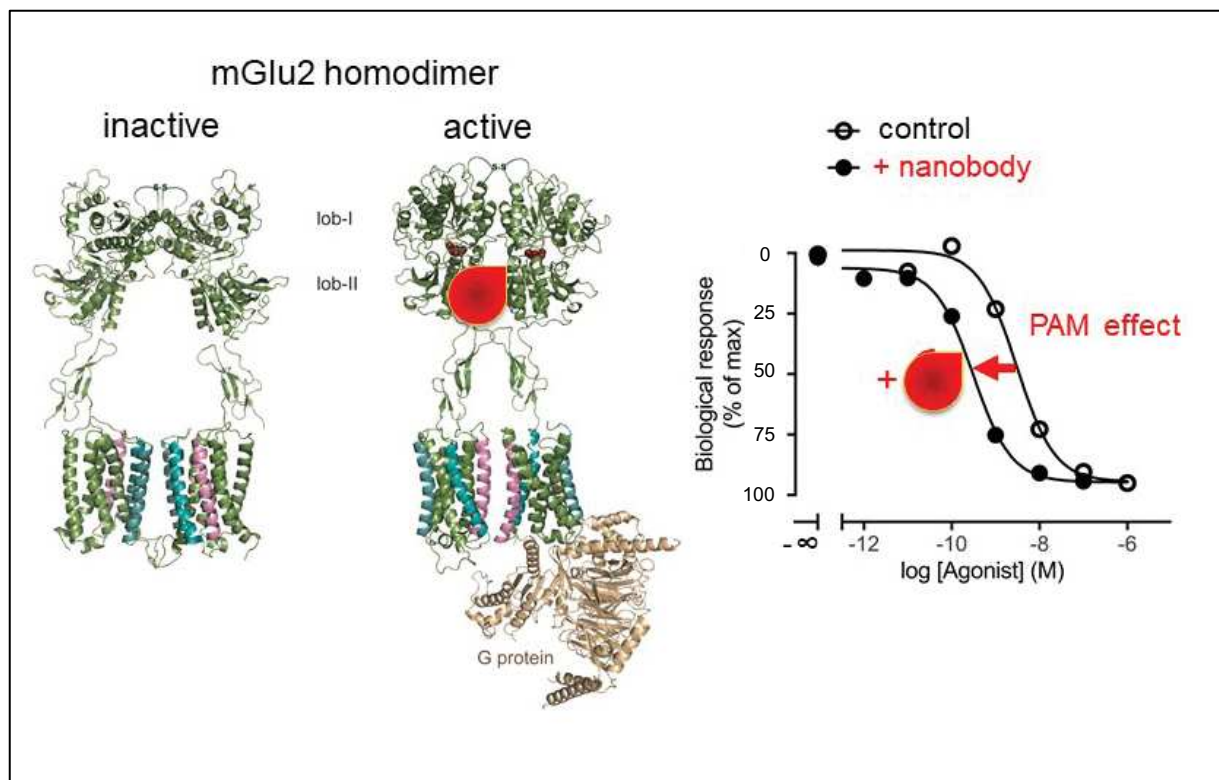


Figure 26 : Effet du nanobody dirigé contre le récepteur mGlu2

Le nanobody est un modulateur allostérique positif puisqu'il augmente l'affinité de l'agoniste pour le récepteur mGlu2. D'après Scholler et al., 2017, *Nature Communications*.

Étant donné que les nanobodies peuvent être exprimés dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, des études récentes ont utilisés des nanobodies stabilisateurs de conformation active pour tracer les changements conformationnels des récepteurs au sein de cellules vivantes. Par exemple, une étude montre l'utilisation du nanobody Nb80 fusionné à une GFP pour suivre l'activation du récepteur β_2 -AR par son agoniste l'isoprotérénol. Grâce à cet outil, les auteurs ont montré que le récepteur β_2 -AR était capable d'activer les protéines G dans les endosomes précoces. Ces récepteurs internalisés seraient apparemment capables de contribuer à l'augmentation d'AMPc intracellulaire observée dans les minutes suivant l'ajout d'agoniste (Irannejad et al., 2017). Dans d'autres études similaires, ces intrabodies seraient capables d'inhiber l'activation de la protéine G, le recrutement de la β -arrestine, l'internalisation du récepteur ainsi que la phosphorylation du récepteur par les GRK. Ces effets fonctionnels seraient soit provoqués par un blocage stérique des interactions avec les effecteurs, soit par la stabilisation d'une conformation spécifique qui ne permet pas l'association avec ces interacteurs (Staus et al., 2014b).

Un nanobody ciblant le dimère $G\beta\gamma$ (Nb5) a également été généré et est capable de

se lier à plusieurs sous-types de $G\beta\gamma$, ce qui inhibe la liaison de protéines régulatrices de $G\beta\gamma$. Ce nanobody peut inhiber la signalisation GIRK médiée par le complexe $G\beta\gamma$ dans les neurones de striatum après activation des récepteurs D_2 et M_4 . Il peut aussi moduler la signalisation PI3K-Akt dépendante du récepteur de l'apeline. De manière intéressante, le Nb5 n'a pas d'effet sur la signalisation des protéines G_s et G_q (Gulati et al., 2018).

Avec l'objectif de pouvoir délivrer des nanobodies dans le milieu intracellulaire pour une utilisation thérapeutique, d'autres équipes ont tenté de les faire pénétrer à travers la membrane de la cellule. Dans cette optique, l'incorporation de liens polycationiques comme la polyarginine rend possible la pénétration cellulaire de plusieurs protéines (Stanzl et al., 2013). Dans une étude, des auteurs sont parvenus à faire pénétrer des nanobodies à l'intérieur de cellules vivantes pour relocaliser deux protéines dans le noyau : p53 et PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Pour ce faire, ils ont attaché des peptides pénétrants, riches en arginine, cycliques et clivables (Herce et al., 2017). D'autres stratégies visent à modifier la structure des nanobodies par mutagénèse afin de créer des propriétés pénétrantes par resurfaçage polycationique au sein des régions FR (Bruce et al., 2016).

D- INTERET THERAPEUTIQUE DES NANOBODIES

De par leur taille, leur facilité de production, leur affinité ainsi que leur stabilité, les nanobodies sont des outils de premier choix dans les domaines du diagnostic et de la thérapeutique. La grande taille des anticorps conventionnels les empêche parfois d'accéder à des épitopes cachés et essentiels sur des agents pathogènes comme les virus, bactéries ou les parasites. Dans ce sens, les nanobodies sont plus avantageux en tant qu'agents thérapeutiques.

Dans le domaine du diagnostic, des tests ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilisant des nanobodies se sont multipliés. Facilement manipulables, il est possible de les modifier pour les fusionner à des protéines rapporteuses, d'augmenter leur valence ou bien d'orienter leur immobilisation sur un support. A titre d'exemple, un test ELISA pour la détection du virus H5N1 de la grippe et utilisant une stratégie en double sandwich avec deux nanobodies a été mis au point (Zhu et al., 2014). Une autre étude rapporte l'utilisation d'un nanobody dirigé contre une protéine de la salive de la mouche tsé-tsé dans un test ELISA par compétition dans le but de l'utiliser pour

détecter des piqûres sur les mammifères (Caljon et al., 2015).

Dans le domaine thérapeutique, plusieurs nanobodies sont en cours de développement afin d'atteindre les essais cliniques. Un nanobody dirigé contre le facteur von Willebrand pour soigner des patients atteints de purpura thrombotique thrombocytopénique est déjà engagé dans un essai clinique de phase II (Holz, 2012). Leur capacité à se lier facilement à des sites actifs d'enzymes a entraîné le développement de plusieurs nanobodies ciblant des venins et des toxines (Darvish et al., 2015; Hussack et al., 2018). Par ailleurs, la propension des nanobodies à passer la barrière hémato-encéphalique, grâce à leur taille et la présence de résidus hydrophiles dans la région FR2, en font des candidats-médicaments pour les maladies neurodégénératives. Par exemple, des nanobodies stabilisant les protofibrilles d'A β et empêchant la formation de fibrilles matures d'A β ont été identifiés (Habicht et al., 2007; Lafaye et al., 2009). Le Nb BI 1034020, un autre nanobody biparatopique ciblant deux épitopes différents sur les peptides A β à haute affinité a été généré. L'objectif est de réduire les niveaux d'A β circulants dans le plasma pour prévenir la formation de nouvelles plaques amyloïdes et laisser le temps à l'organisme de nettoyer les plaques existantes. Dans une étude préclinique utilisant un modèle de souris Alzheimer, le Nb BI 1034020 a réduit de manière significative les peptides A β présents dans le plasma. Une étude de phase I chez des volontaires sains a été initiée pour évaluer la tolérance, la sécurité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique d'injections de BI 1034020. Malheureusement, l'étude a été interrompue en raison d'un événement indésirable grave (EIG) lié à l'administration des nanobodies. D'autre part, des nanobodies ciblant la β -sécrétase BACE-1 ont été générés et brevetés ("US20110091446A1 - Single domain antibodies capable of modulating bace activity - Google Patents," n.d.). Enfin, un nanobody sous forme trimérique dirigé contre le virus respiratoire syncytial (VRS) est encore plus proche d'obtenir une autorisation de mise sur le marché étant donné son engagement dans une étude clinique de phase III par la société *Ablynx* (Detalle et al., 2016). Encore une fois, les propriétés de résistance et de stabilité des nanobodies ont permis d'envisager l'utilisation d'un nébuliseur afin de délivrer le nanobody trimérique dans les poumons des patients.

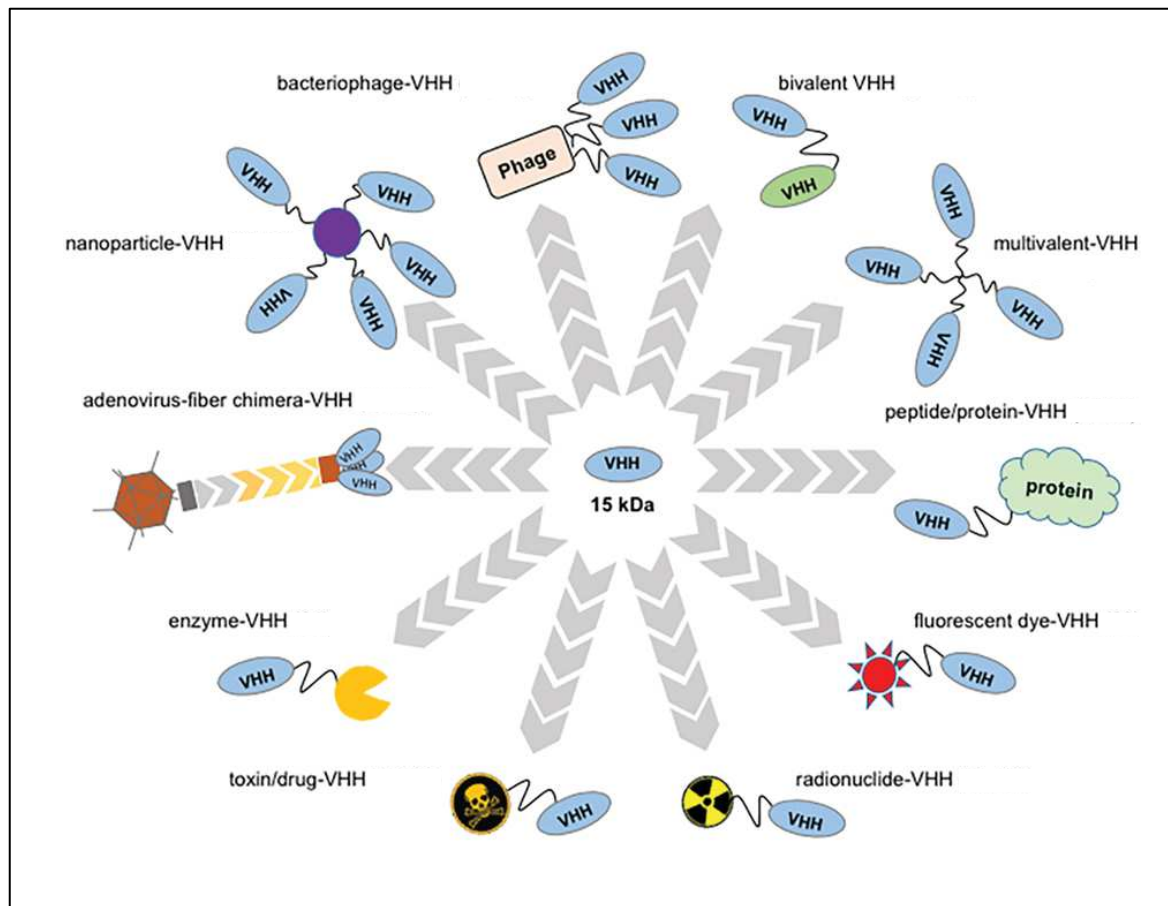


Figure 27 : Stratégies d'association des V_HH pour une utilisation thérapeutique
D'après (Iezzi et al., 2018)

De la même manière que les conjugués anticorps-médicaments, la fusion de toxines aux nanobodies présente un intérêt pour éradiquer des cellules tumorales. L'utilisation de nanobodies dans ce domaine est un avantage grâce à leur clairance rapide de la circulation sanguine et leur pénétration tumorale élevée. Des études rapportent l'utilisation de toxines qui interfèrent avec la polymérisation de la tubuline (auristatines) ou des toxines bactériennes dérivées de *pseudomonas* ou de plantes (PE38, ricine, cucurmosine) (Dosio et al., 2011). Un nanobody dirigé contre le récepteur VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) fusionné à la toxine PE38 a été capable d'inhiber la prolifération cellulaire à des concentrations subnanomolaires (Behdani et al., 2013). Un autre nanobody anti-EGFR a été fusionné à la cucurmosine et peut induire une toxicité cellulaire, en inhibant la synthèse protéique sur des lignées cellulaires (Deng et al., 2017).

Les nanobodies sont donc d'un intérêt au vu de leur potentiel thérapeutique dans des modèles cellulaires et d'animaux de pathologies variées et de l'engagement dans des essais cliniques de certains candidats.

Objectifs

Comme expliqué dans l'introduction, les RCPG sont des acteurs de la communication cellulaire dont la régulation est extrêmement précise et élaborée. Il existe notamment des complexes protéiques associés à ces récepteurs qui jouent un rôle crucial dans la modulation de leur signalisation.

Les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆ constituent des cibles thérapeutiques intéressantes dans le contexte de la maladie d'Alzheimer de par leur capacité à interagir avec l'APP et à favoriser le clivage non-amyloïdogène pour les uns, et de par les effets procognitifs liés à leur inactivation pour les autres.

Néanmoins, les mécanismes sous-jacents à ces effets ne sont pas encore bien caractérisés. De plus, les réseaux de protéines interagissant avec le récepteur 5-HT₄ n'ont pas été décryptés à ce jour. Par ailleurs, bien que les molécules pharmacologiques à disposition pour étudier ces récepteurs ne manquent pas, une nécessité de développer des outils en immunohistochimie se fait ressentir. Enfin, il apparaît nécessaire de continuer le développement pharmacologique de molécules innovantes agissant sur ces récepteurs, afin de disposer d'une batterie d'agents d'intérêt thérapeutique potentiel contre la maladie d'Alzheimer.

En conséquence, les objectifs de cette étude sont :

- De développer une stratégie pour générer des nanobodies dirigés contre les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆.
- D'identifier les réseaux de protéines (GIP) associées au récepteur 5-HT₄ en utilisant une approche de protéomique et de valider l'interaction entre le récepteur et les partenaires majeurs du réseau.
- De sélectionner des partenaires du réseaux qui pourraient moduler l'action du récepteur 5-HT₄ dans le contexte de la maladie d'Alzheimer et de caractériser leur rôle dans la signalisation médiée par le récepteur.
- D'évaluer *in vitro* l'efficacité de ligands multi-cibles dirigés contre les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆.

Résultats

I- Développement technologique d'un procédé pour générer des nanobodies contre les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆

A- STRATEGIE UTILISEE POUR GENERER LA BANQUE DE PHAGES

La difficulté de générer des anticorps contre les RCPG de classe A provient en partie de la faible immunogénicité du domaine extracellulaire qui est de petite taille. Pour maximiser les chances d'obtenir un clone de nanobody se liant au récepteur, l'équipe a décidé d'injecter au lama des membranes de cellules COS-7 et HEK-293 exprimant respectivement soit le récepteur 5-HT₄, soit le récepteur 5-HT₆. Le choix de la lignée cellulaire a été motivé par le bon rendement connu de ces cellules en termes d'expression de ces deux récepteurs sérotoninergiques. L'expression des récepteurs a ensuite été vérifiée par des expériences de *binding* (densités de récepteur de 2 pmol/mg de protéines pour le récepteur 5-HT₄ et 2,5 pmol/mg de protéines pour le récepteur 5-HT₆).

Les préparations membranaires ont été réalisées à l'aide d'un Potter-Elvehjem puis resuspendues dans un tampon permettant de garder une bonne intégrité des membranes et compatible avec l'injection *in vivo* (50 mM HEPES, pH 7,4). Un lama a été immunisé avec ces préparations membranaires et une banque d'ADNc issu de ses lymphocytes et codant pour les nanobodies ainsi générés a été sous-clonée dans le bactériophage M13. L'intérêt d'immuniser le lama avec des membranes de cellules exprimant les récepteurs repose sur la possibilité de générer non seulement des nanobodies se liant aux domaines extracellulaires des récepteurs mais également des nanobodies reconnaissant les domaines intracellulaires des récepteurs (intrabodies). Théoriquement, cela favorise aussi les chances d'obtenir un clone positif puisque le domaine intracellulaire des RCPG de classe A est de taille plus importante que le domaine extracellulaire et donc potentiellement plus immunogène. De plus, il semblerait que les nanobodies se liant à la partie intracellulaire des RCPG possèdent souvent des propriétés intéressantes pour moduler la signalisation des récepteurs grâce à leur capacité à mimer la protéine G (Pardon et al., 2014).

Avant le démarrage de la thèse, un lama a été immunisé à 4 reprises (Jours 0, 9, 18 et 28) par injection sous-cutanée de membranes de cellules COS-7 et HEK-293 exprimant les récepteurs 5-HT₄ murins et 5-HT₆ humains, ainsi qu'avec le récepteur sérotoninergique 5-HT_{2A} humain et les récepteurs HA-PKR₁ et FLAG-PKR₂ (*Prokineticin Receptor 1 and 2*). Ces immunisations et la construction des banques de phages, à 28 et 42 jours post-immunisation, ont été réalisées par la plateforme NANOBOODIES dirigée par Daniel Baty et hébergée par le Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM, www.crcm-marseille.fr/equipes/plateformestechnologiques/nanobodies/). Les séquences codant pour les V_HH ont ainsi été amplifiées par PCR à partir des ADNc correspondants aux ARNm contenus dans les lymphocytes B isolés du sang du lama. Les séquences d'ADN ont été insérées dans le phagemid pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991) (Figure 28). Les séquences codant pour les V_HH sont placées sous le contrôle d'un promoteur de transcription pLac et sont encadrées en amont par une séquence signal *pelB* d'adressage du nanobody vers le periplasme d'*E.coli* et en aval par deux séquences *c-myc-tag* et *6-His-tag*, qui serviront respectivement à détecter les nanobodies et à les purifier. Un codon stop Ambre sépare les tags du gène phagique gIII ce qui permet d'exprimer les nanobodies fusionnés à la protéine de capsid pIII dans la souche bactérienne suppressive TG1 et de les exposer à la surface des phages produits en réponse à l'infection par le *phage helper* KM13. Après transformation de la souche TG1 d'*E.coli*, une banque a été obtenue et titrée à 10⁸ transformants, ce qui est suffisant pour représenter l'intégralité de la diversité du répertoire immunitaire simple chaîne cloné (Serge Muyldermans et al., 2001).

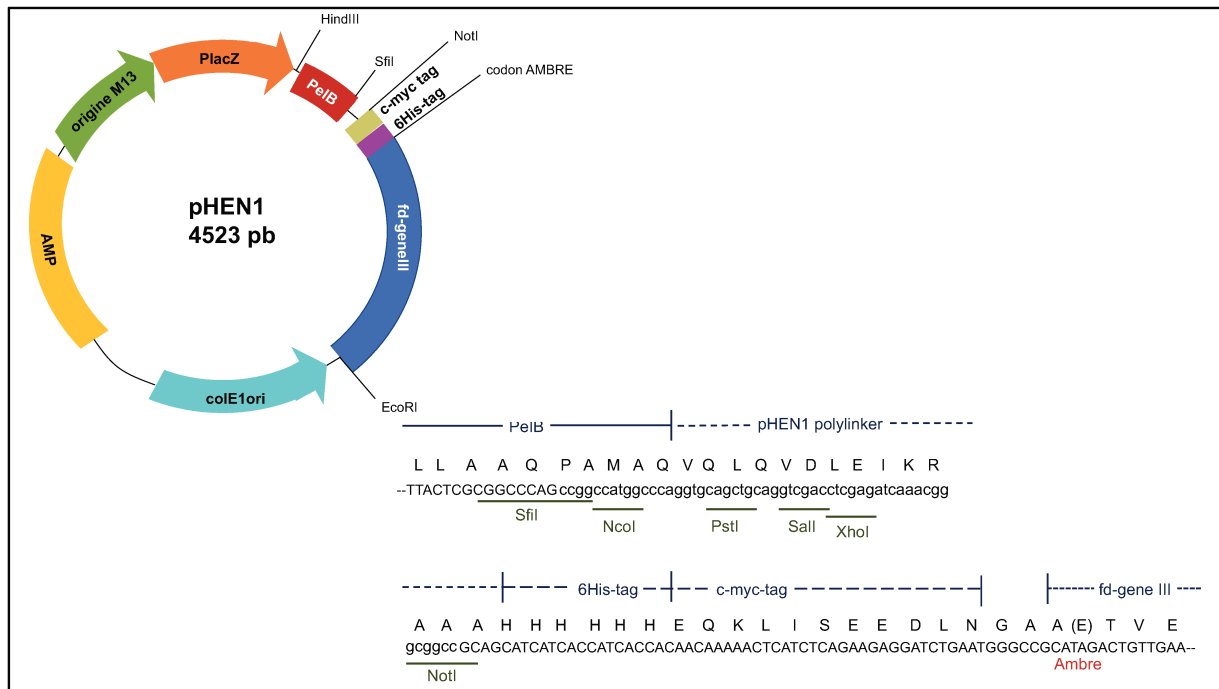


Figure 28 : Carte du phagemide PHEN1

D'après Hoogenboom et al., 1991, Nucleic Acid Research.

B- SELECTION DES NANOBODIES PAR PHAGE DISPLAY

Un système performant de sélection des nanobodies est nécessaire pour obtenir des clones qui reconnaissent spécifiquement un antigène donné. La stratégie la plus efficace à l'heure actuelle est l'utilisation de la technologie du *phage display*. Le principe repose sur l'expression des nanobodies à la surface des phages qui contiennent la séquence d'ADN codant pour le nanobody considéré. Ainsi, tout au long du processus, un lien entre les propriétés de reconnaissance des nanobodies et leur séquence codante est maintenu, ce qui permet non seulement d'isoler la protéine mais aussi sa séquence associée.

Pour ce faire, l'utilisation du bactériophage M13 est privilégiée. Ce phage infecte spécifiquement les souches à Gram négatif contenant le facteur F qui code pour la synthèse des pili sexuels. Au cours du cycle infectieux, le bactériophage M13 va se fixer via la protéine pIII à l'extrémité du F-pilus de la bactérie *E. coli*. L'ADN est encapsidé à l'intérieur du bactériophage par un assemblage hélicoïdal de plusieurs protéines de capsid : pIII, pVI, pVII, pVIII et pIX. On choisit la protéine pIII pour présenter l'antigène à la surface des bactériophages car il est possible d'y insérer de grandes protéines sans perturber sa localisation. A la manière d'un virus, le

bactériophage va ensuite transférer son génome simple brin dans le cytoplasme de la bactérie, où il est converti par une polymérase de l'hôte en une forme répliquative double-brin circulaire qui sert de matrice pour sa réplication et pour l'expression des protéines virales. Par la suite, la bactérie va initier l'assemblage des protéines au niveau de la membrane cytoplasmique via un cycle dit lysogénique, c'est-à-dire que la cellule hôte intègre le génome viral sans entrer en cycle lytique, ce qui permet la sécrétion des phages néo-synthétisés dans le milieu extracellulaire où ils pourront ultérieurement être récupérés. Étant donné que le phagemide ainsi formé est incapable d'induire à lui seul la formation de particules, il est nécessaire d'utiliser un phage auxiliaire (*phage helper*) qui contient le génome complet d'un phage sauvage mais présente une mutation dans son origine de réplication empêchant son encapsidation. Ainsi seuls les phages produits à partir du phagemide seront encapsidés correctement. De plus, le *phage helper* codant pour une version sauvage de la protéine pIII, les capacités maximales d'infection des phages sont maintenues car les phages produits ont une enveloppe formée d'un mélange de protéines pIII sauvages et de protéines pIII fusionnées au nanobody. Les informations génétiques de la protéine de fusion pIII-nanobody sont codées par le phagemide encapsidé.

Le principal avantage du *phage display* est de pouvoir enrichir par affinité les nanobodies exposés *via* une procédure appelée *panning*. Plusieurs cycles de capture, de lavages, d'élution et d'amplification bactérienne sont effectués de manière à conserver et de produire les phages les plus aptes à se lier à l'antigène d'intérêt. Dans le but de pouvoir sélectionner des intrabodies et n'ayant pas en notre possession les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆ purifiés, les étapes de *panning* ont été effectuées en déposant des membranes de cellules HEK-293 et COS-7 exprimant ou non les récepteurs d'intérêt dans des boîtes dont les puits ont été traités pour présenter une forte efficacité d'adsorption des protéines (Figure 29). Un tour de *panning* se découpe ainsi en 2 passages sur membranes de cellules COS-7 naïves, 1 passage sur cellules HEK-293 naïves et un passage sur cellules COS-7 exprimant le récepteur d'intérêt. Trois cycles au total ont été effectués contre 10 µg de membranes de cellules COS-7 exprimant les récepteurs 5-HT₄ ou 5-HT₆ adsorbés sur plaques ELISA Maxisorp 96 puits. Après chaque cycle, le facteur d'enrichissement a été évalué en comparant le titre des phages retenus en présence des récepteurs d'après le nombre d'unités formant des colonies après infection (Zhu et al., 2014). Chaque cycle a permis un

enrichissement de 10 fois en nanobodies spécifiques des récepteurs et le criblage a été effectué à partir de la banque issue du troisième tour de *panning*.

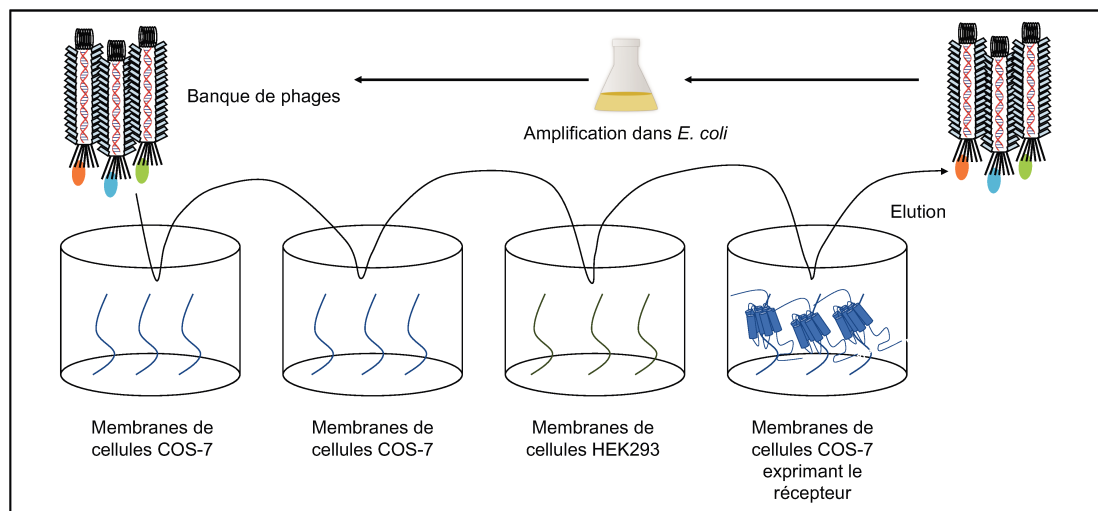


Figure 29 : Schéma d'un tour de *panning*

La banque de phage issue de l'immunisation du lama a été successivement déplétée dans des puits contenant des membranes de cellules COS-7 et HEK-293 avant incubation dans un puits contenant des membranes de cellules exprimant les récepteurs m5-HT₄ ou h5-HT₆. Après une vingtaine de lavages, les phages ont été élués avec une solution contenant de la trypsine, réamplifiés dans la bactérie *E. coli*, puis précipités avec du PEG (Polyéthylène Glycol) avant un nouveau cycle d'enrichissement.

C- CRIBLAGE DES NANOBODIES PAR CYTOMETRIE DE FLUX

1) Préparation des *masterblocks*

A l'issue du 3^{ème} tour de *panning*, des dilutions en cascade des bactéries infectées par les phages ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant de l'Ampicilline. Ensuite, 94 colonies individuelles ont été prélevées aléatoirement dans une boîte contenant des colonies individualisées afin d'être mises en culture dans des *masterblocks* 96 puits. Après une croissance sur la nuit à 37°C, des *masterblocks* « stock » ont été préparés en mélangeant une partie de la culture bactérienne avec du glycérol pour être conservés à -80°C. Pour toutes les étapes de criblage, des extraits périplasmiques obtenus à partir de ces *masterblocks* « stock » et dont la préparation est détaillée dans la partie « Matériels et méthodes » ont été utilisés.

Plusieurs criblages utilisant la technique de PE-ELISA (*Periplasmic Extract - Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sur membranes de cellules adsorbées ont été effectués mais n'ont pas permis d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, l'utilisation des membranes générant un bruit de fond trop important (résultats non montrés). Il a alors

été décidé de mettre au point une technique de criblage par cytométrie de flux, potentiellement plus robuste et communément utilisée pour réaliser du criblage d'anticorps conventionnels. Seuls les résultats concernant le récepteur m5-HT₄ seront présentés ci-après.

2) Criblage par FACS

Un criblage par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) a été mis au point en utilisant des cellules HEK-293 exprimant transitoirement le récepteur m5-HT₄. Les cellules ont été incubées en présence des nanobodies, puis d'un anticorps de souris dirigé contre le tag 6-His présent sur les nanobodies et d'un anticorps anti-souris fluorescent (Matériels et méthodes et Figure 30). On peut voir sur la figure 30B une augmentation de l'intensité de fluorescence et un décalage vers la droite du pic de fluorescence dans les cellules exprimant le récepteur 5-HT₄ taggué 6-His, utilisé comme contrôle positif.

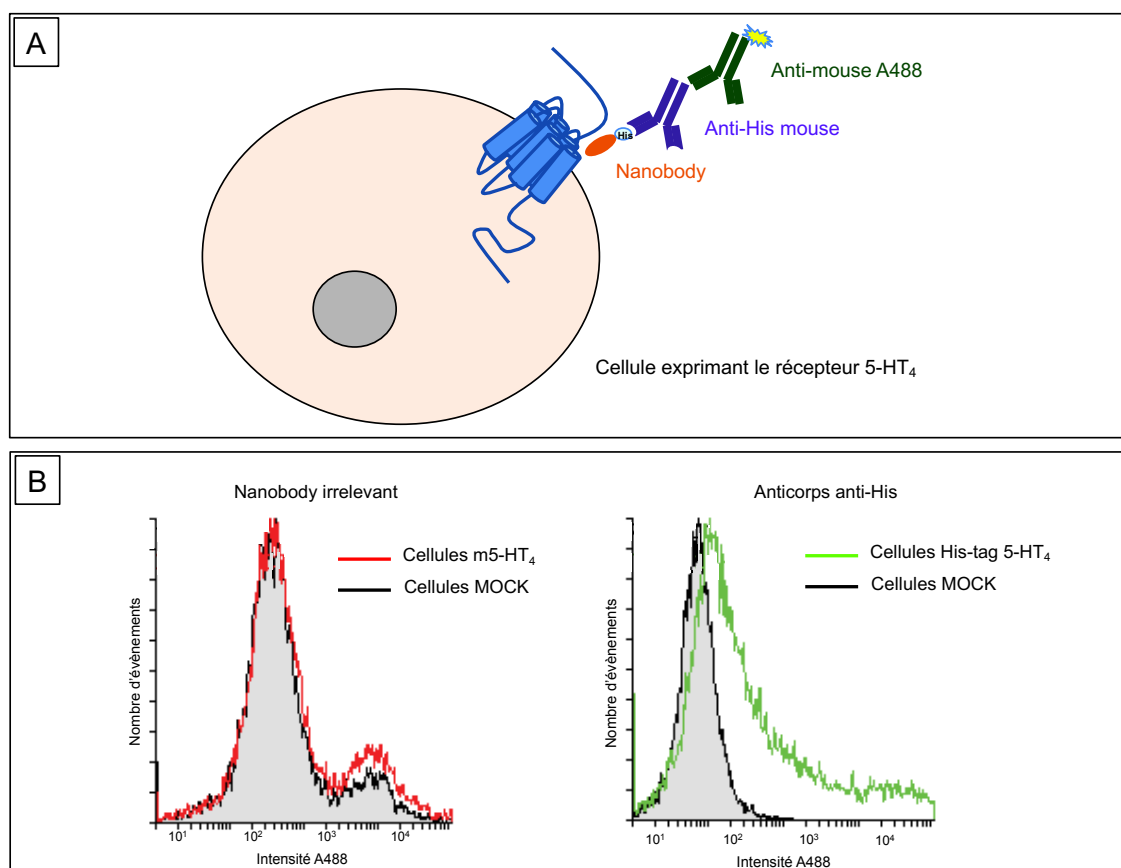


Figure 30 : Mise au point d'un criblage par FACS

A : Stratégie générale utilisée pour cribler les nanobodies.

B : Exemple de profil obtenu dans le contrôle négatif (nanobody ne se liant pas au récepteur) et dans le contrôle positif (utilisation d'un récepteur taggué His).

Les 94 nanobodies présents dans le *masterblock* ont ainsi été incubés en présence de cellules non-perméabilisées exprimant le récepteur 5-HT₄ et leur profil de fluorescence a été comparé avec un nanobody négatif (Figure 31). Les résultats montrent que certains nanobodies induisent un décalage vers la droite du pic de fluorescence par rapport au nanobody négatif ce qui suggère qu'ils se lient au récepteur.

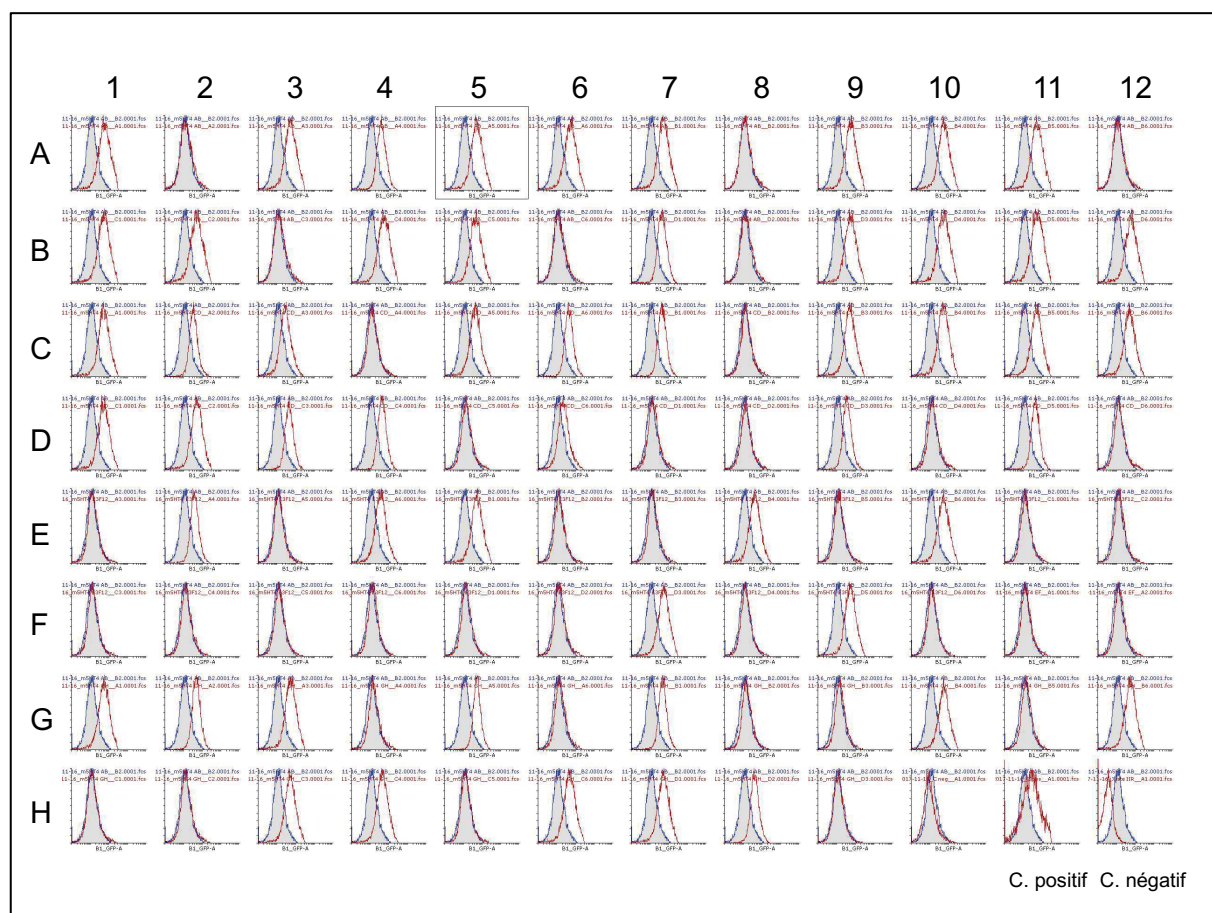


Figure 31 : Criblage du *masterblock* 96 puits par FACS

Par la suite, plusieurs clones au profil positif (ou négatif à des fins de contrôle) ont été criblés une nouvelle fois mais en les incubant cette fois-ci soit avec des cellules n'exprimant pas le récepteur (cellules MOCK), soit avec des cellules exprimant le récepteur 5-HT₄. Ce procédé a permis de se rendre compte que les nanobodies induisaient un bruit de fond propre à chaque clone, et qu'il était donc nécessaire de comparer systématiquement le profil obtenu à la fois sur des cellules MOCK et des cellules exprimant le récepteur 5-HT₄ (Figure 32). Par ailleurs, l'utilisation de iodure de propidium (IP) a également permis de marquer les cellules perméabilisées (mortes)

qui génèrent une fluorescence importante, et de les soustraire du total des cellules comptabilisées comme positives.

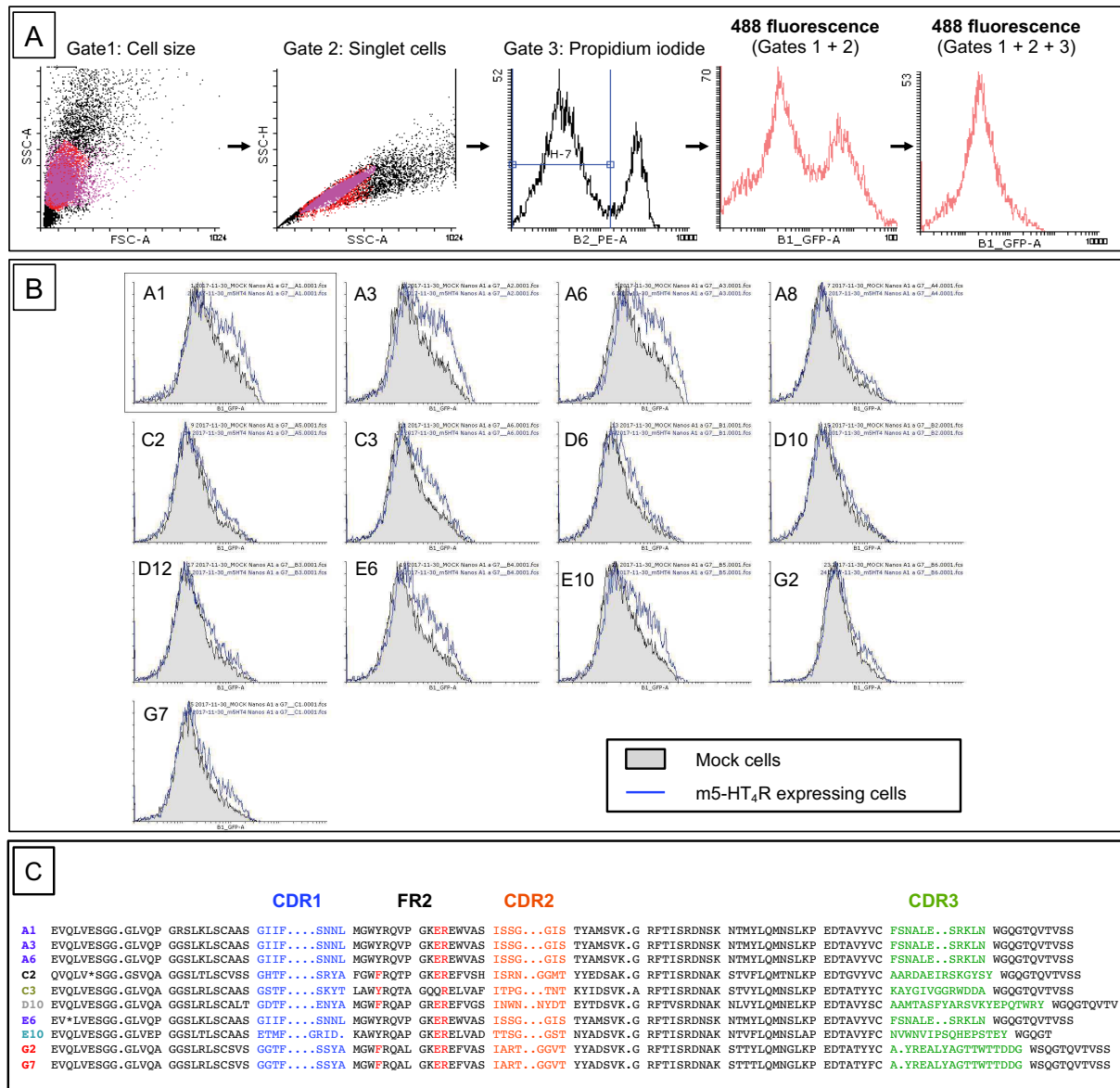


Figure 32 : Criblage des nanobodies issus de la première expérience

A : Le paramètre FSC évalue la taille des cellules et le paramètre SSC donne une mesure de la granularité de la cellule. Les paramètres FSC et SSC sont donc grossièrement proportionnels à la taille et à la complexité des cellules. En faisant un tri sur ces paramètres, nous décidons ici de sélectionner des cellules au profil standard, c'est-à-dire avec une taille et une granularité représentatives de la moyenne des cellules de l'échantillon. Par la suite nous sélectionnons les cellules qui ne sont pas fluorescentes dans la longueur d'onde d'émission de l'iodure de propidium afin d'éliminer les cellules mortes. Nous obtenons ainsi, à la longueur d'onde de 488nm (émission de l'anticorps secondaire utilisé pour la détection), un pic de fluorescence représentatif de l'ensemble des cellules vivantes de morphologie standard auxquelles se sont liés les anticorps successivement ajoutés.

B : Profil de fluorescence obtenu avec certains des nanobodies sélectionnés après la première expérience. Le signal obtenu sur les cellules exprimant le récepteur m5-HT₄ (en bleu) est superposé au signal obtenu avec la population de cellules MOCK (en gris).

C : Alignement des séquences des nanobodies présentés. Pour la plupart des clones, on identifie dans leur région FR2 la plupart des résidus hydrophiles conservés des V_HH : F42, E49 et R50.

Ces expériences permettent de tirer plusieurs conclusions. D'une part, certains nanobodies identifiés comme négatifs dans la première expérience (les clones A8 et D10) ressortent une nouvelles fois négatifs dans cette seconde expérience. D'autre part, certains clones identifiés comme positifs dans le premier criblage ont un profil négatif dans ce second criblage (clone G2 par exemple). Ils apparaissaient comme positifs dans la première expérience car elle ne permettait pas d'évaluer le bruit de fond propre au nanobody. Par ailleurs, les clones A1, A3 et A6 ont un profil positif dans la première et la seconde expérience. Les résultats de séquençage montrent qu'ils possèdent la même séquence qui semble avoir été fortement enrichie à l'issue du tour 3 du *panning* puisque 40% des clones séquencés possèdent cette séquence.

Ces résultats de FACS étant reproductibles, et cette séquence ayant été enrichie au cours du *panning* de manière importante, nous avons décidé de purifier le nanobody correspondant afin de valider sa liaison au récepteur 5-HT₄ et de caractériser cette interaction. Le clone A6 a ainsi été sélectionné pour les étapes de production.

Il est également important de noter que ces premiers résultats proviennent d'un criblage où l'extrait périplasmique a été utilisé. La concentration en nanobody n'est donc pas équivalente pour chaque clone étant donné la forte disparité qui existe dans l'efficacité de la production des nanobodies en bactéries ainsi que les différences liées à la quantité de bactéries présentes dans l'inoculum de départ.

D-Characterisation du clone de nanobody A6

1) Purification et validation par FACS

Le phagemide A6-pHEN1 isolé de la culture bactérienne du clone A6 a été transformé dans une souche *E. coli* BL21(DE3), adaptée à la production de protéines recombinantes en grande quantité. Les nanobodies A6 ont été produits par sécrétion périplasmique puis extraits par choc osmotique, avant d'être purifiés par chromatographie d'affinité sur résine de Nickel-NTA (Ni-NTA). Après purification, ils ont été passés sur une colonne de désalage afin d'éliminer l'imidazole utilisé pour l'élution et resuspendus dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) (Figure 33A). Le rendement de production avoisine les 9 mg de protéine pure par litre de culture, ce qui

est dans la fourchette haute du rendement de production moyen des nanobodies périplasmiques (situé entre 1 et 10 mg par litre de culture) (Hussack et al., 2011). La séquence du nanobody A6 étant surreprésentée parmi les séquences isolées, et son rendement de purification étant élevé, il est possible que son apparente positivité soit liée à son excellente capacité à être produit en bactéries. En effet, l'un des points négatifs de la technologie du *phage display* est qu'elle tend à sélectionner les nanobodies dont l'efficacité de production est la plus grande au détriment des autres, en raison de limitations au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Cet effet de « contre-sélection » des nanobodies qui sont faiblement produits aboutit à une perte de diversité en nanobodies spécifiques à chaque cycle d'enrichissement (Miyazaki et al., 2015). Néanmoins, cela permet de favoriser la sélection des nanobodies les plus adaptés à une expression bactérienne. Il faut donc bien considérer que des facteurs autres que l'affinité des nanobodies pour leur antigène permettent de les sélectionner au cours du *panning*, tels que leur efficacité de production, leur repliement, ou encore leur éventuelle toxicité pour la cellule.

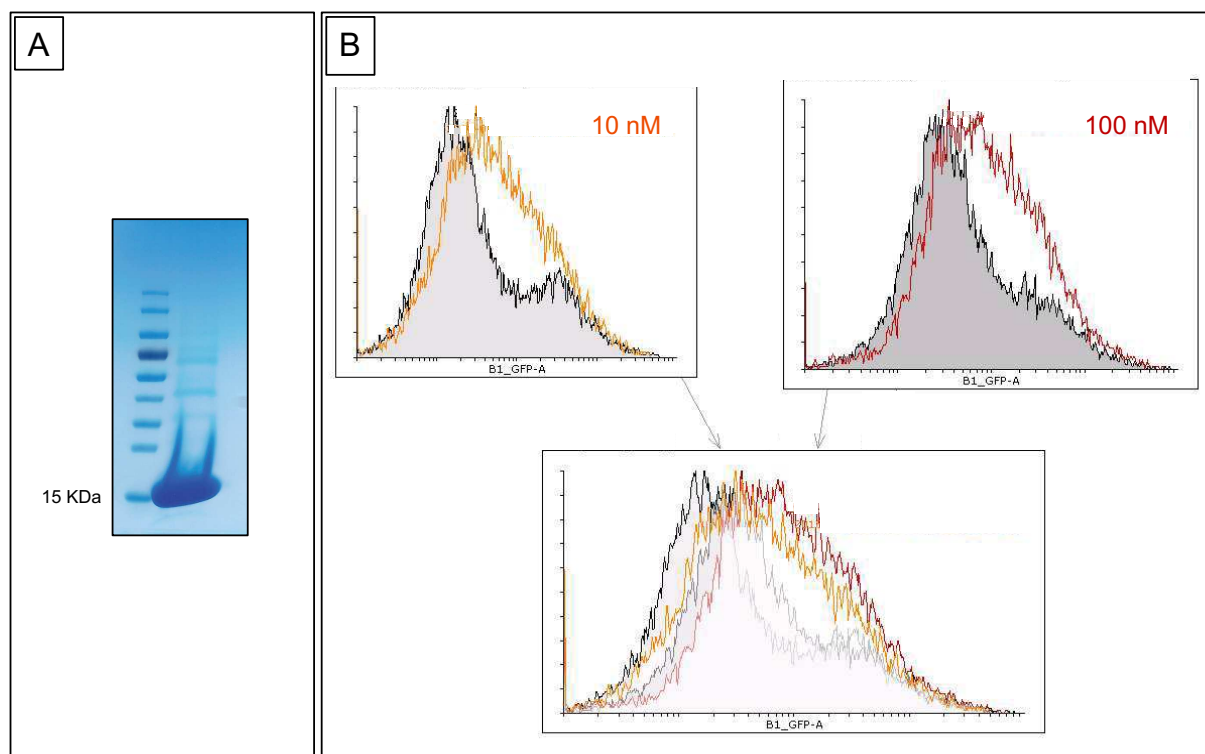


Figure 33 : Purification du clone A6 et validation par FACS

A : Analyse par SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie de 22,5 µg de nanobody A6 purifié.
B : Évaluation du nanobody A6 purifié par FACS. Le nanobody A6 a été incubé à deux concentrations différentes avec des cellules MOCK (gris) ou des cellules transfectées avec le récepteur 5-HT₄ (orange/rouge).

Une expérience de cytométrie de flux effectuée avec le nanobody A6 purifié montre une intensité de fluorescence plus importante que celle observée avec les extraits périplasmiques, ce qui semble confirmer que le nanobody est spécifique du récepteur 5-HT₄ (Figure 33B). Par ailleurs, le signal associé au bruit de fond est également plus important lorsque l'on augmente la concentration du nanobody.

2) Caractérisation fonctionnelle du nanobody A6

Les nanobodies dirigés contre les RCPG possédant souvent des propriétés pharmacologiques, nous avons évalué l'effet du nanobody A6 sur 2 voies de signalisation du récepteur 5-HT₄ : la voie dépendante de la protéine Gs et la voie des β -arrestines. Ainsi, nous avons dosé la quantité d'AMPc produite après stimulation du récepteur avec son ligand, la 5-HT, en présence ou non du nanobody A6 (ainsi que des nanobodies C3 et D6 qui avaient été purifiés en parallèle) (Figure 34A). Nous avons également évalué la capacité du récepteur à recruter la β -arrestine 2 après stimulation à la 5-HT en présence ou non du nanobody A6 par la technique du BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) (Figure 34B-C).

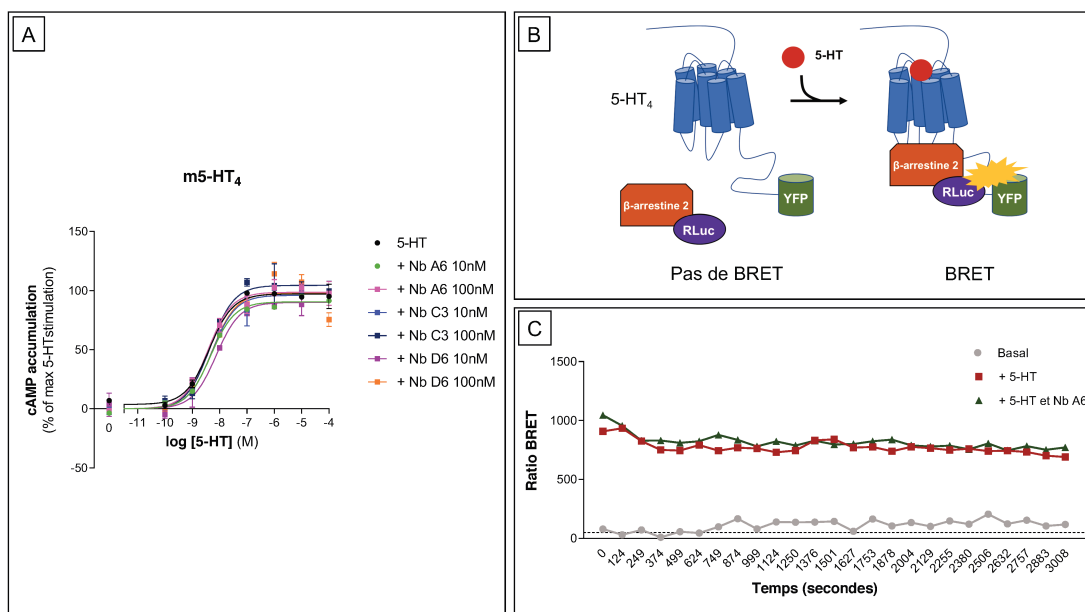


Figure 34 : Caractérisation fonctionnelle des nanobodies A6, C3 et D6

A : Évaluation de la production d'AMPc par HTRF® (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) de cellules COS-7 exprimant transitoirement le récepteur m5-HT₄ et stimulées avec des concentrations croissantes de 5-HT, en présence ou non des nanobodies A6, C3 et D6 à deux concentrations différentes. B : Schéma de l'expérience de BRET. Des cellules HEK-293 ont été transfectées avec un récepteur m5-HT₄-YFP et la β -arrestine 2 fusionnée à la RLuc8. L'activation du récepteur induit un recrutement de la β -arrestine 2 qui se traduit par une augmentation du BRET. C : Évolution du ratio BRET au cours du temps après stimulation à la 5-HT et/ou incubation avec le nanobody A6.

Les résultats des expériences ci-dessus suggèrent que le nanobody A6 n'a pas d'effet pharmacologique sur les récepteurs 5-HT₄. En effet, sa présence, tout comme celle des clones C3 ou D6 purifiés, ne modifie pas la production d'AMPc liée à l'activation du récepteur (Figure 34A). De plus, alors qu'il y a bien une augmentation du ratio BRET entre l'état basal et l'état activé du récepteur en présence de sérotonine, la présence du nanobody A6 n'a aucune influence sur ce ratio au cours du temps (Figure 34C). Le nanobody A6 ne semble donc pas moduler le recrutement de la β -arrestine 2 par le récepteur 5-HT₄.

3) Évaluation du *binding* du nanobody A6 au récepteur 5-HT₄ par HTRF®

La technologie HTRF® est une combinaison du FRET et du TR (*Time-Resolved measurement*) où un signal est généré par le transfert de fluorescence entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur lorsqu'ils sont suffisamment proches l'un de l'autre.

Ne parvenant pas à valider la liaison du nanobody A6 au récepteur 5-HT₄ d'une autre manière qu'en FACS, nous avons décidé d'effectuer des expériences de binding avec la technologie HTRF® pour confirmer cette interaction. Nous avons utilisé en guise de contrôle positif le nanobody DN1 dirigé contre le récepteur mGlu2 (un RCPG de classe C) et le nanobody VUN400 dirigé contre le récepteur CXCR4 (un RCPG de classe A). Cette expérience nous a permis d'évaluer le FRET généré entre le tag HA situé à l'extrémité N-terminale des récepteurs et les nanobodies (Figure 35A).

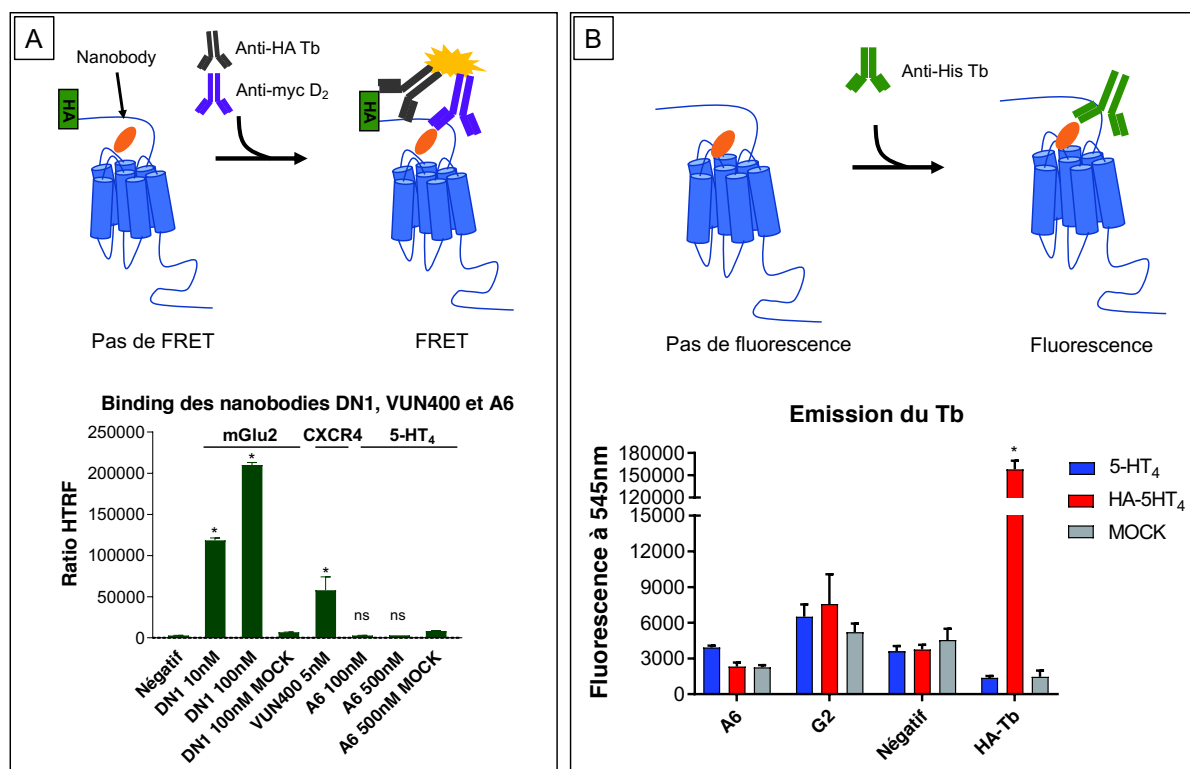


Figure 35 : Évaluation du *binding* du nanobody A6 au récepteur 5-HT₄ par HTRF®

A : Des cellules COS-7 exprimant transitoirement les récepteurs mGlu2, CXCR4 ou 5-HT₄ taggués avec l'épitope HA ont été incubées O/N à 4°C en présence du nanobody étudié, d'un anticorps anti-HA Tb (Terbium) donneur et d'un anticorps anti-myc D₂ accepteur. Le ratio HTRF® témoignant du transfert de fluorescence entre le donneur et l'accepteur a ensuite été mesuré.

B : Des cellules COS-7 exprimant transitoirement le récepteur 5-HT₄ taggué ou non avec l'épitope HA ont été incubées O/N à 4°C en présence des nanobodies A6 et G2 et d'un anticorps anti-His Tb. Pour le contrôle positif, un anticorps anti-HA Tb a été utilisé. Après lavage, la fluorescence à 545 nm du Tb a ensuite été mesurée.

Test Student *t*-test; **p* < 0.05 .

Alors que les nanobodies DN1 et VUN400 respectivement dirigés contre les récepteurs mGlu2 et CXCR4 permettent de générer un ratio HTRF significativement plus important que dans la condition contrôle, la présence du nanobody A6 ne produit pas de transfert de fluorescence entre l'anticorps anti-HA Tb et l'anticorps anti-myc D₂ (Figure 35A). Nous nous sommes alors demandés si la présence du tag HA et d'un anticorps de taille 10 fois supérieure au nanobody ne produisait pas un encombrement stérique qui pourrait expliquer l'absence de liaison du nanobody A6 au récepteur. Nous avons donc effectué une deuxième expérience en comparant la liaison du nanobody A6 sur des cellules exprimant le récepteur 5-HT₄ non taggué et de l'anticorps anti-His Tb via la mesure de la fluorescence générée par le Terbium après lavage

(Figure 35B). Le nanobody A6 ne semble pas se lier spécifiquement au récepteur 5-HT₄ étant donné que la fluorescence à 545 nm n'est pas significativement différente de celle mesurée dans la condition MOCK. Le contrôle positif montre en revanche que sur des cellules exprimant le récepteur 5-HT₄ taggué avec l'épitope HA, L'utilisation d'un anticorps anti-HA Tb génère un haut signal à 545 nm.

Les résultats présentés jusqu'à présent laissent penser que le clone A6, dont la séquence est fortement représentée au sein des clones isolés dans le *masterblock* issu du tour 3 du *panning*, est un faux positif qui ne se lie pas au récepteur m5-HT₄. En effet, il n'a pas été possible de valider par une autre méthode que la cytométrie en flux la liaison du nanobody au récepteur. De plus, le rendement de production élevé du nanobody A6 laisse penser que c'est un clone se produisant bien en système bactérien, ce qui a permis de le « contre-sélectionner » au détriment d'autres clones lors des différents cycles de *panning*.

E- CRIBLAGE DES INTRABODIES PAR HTRF®

Afin de comprendre si l'enrichissement de la séquence du nanobody A6 s'est produit entre le deuxième et le troisième tour de *panning*, et pour évaluer l'enrichissement en clones spécifiques du récepteur 5-HT₄, nous avons décidé de réaliser un *phage ELISA* sur la banque de phages d'origine ainsi que sur chaque banque obtenue après les différents tours de *panning* en utilisant un anticorps contre le bactériophage M13 comme expliqué dans la partie Matériel et méthodes (Figure 36A). Brièvement, le signal obtenu permet, à l'issue de chaque tour de *panning*, de déterminer le ratio entre quantité de phages se liant à des cellules exprimant le récepteur 5-HT₄ par rapport la quantité de phages se liant à des cellules transfectées avec un vecteur vide. Ce ratio doit être augmenté à chaque tour, démontrant un enrichissement de la population de phages capables de se fixer spécifiquement au récepteur. Nous avons effectué ces expériences en simplicat pour économiser les quantités de phages utilisées, le volume engagé étant important pour chaque condition.

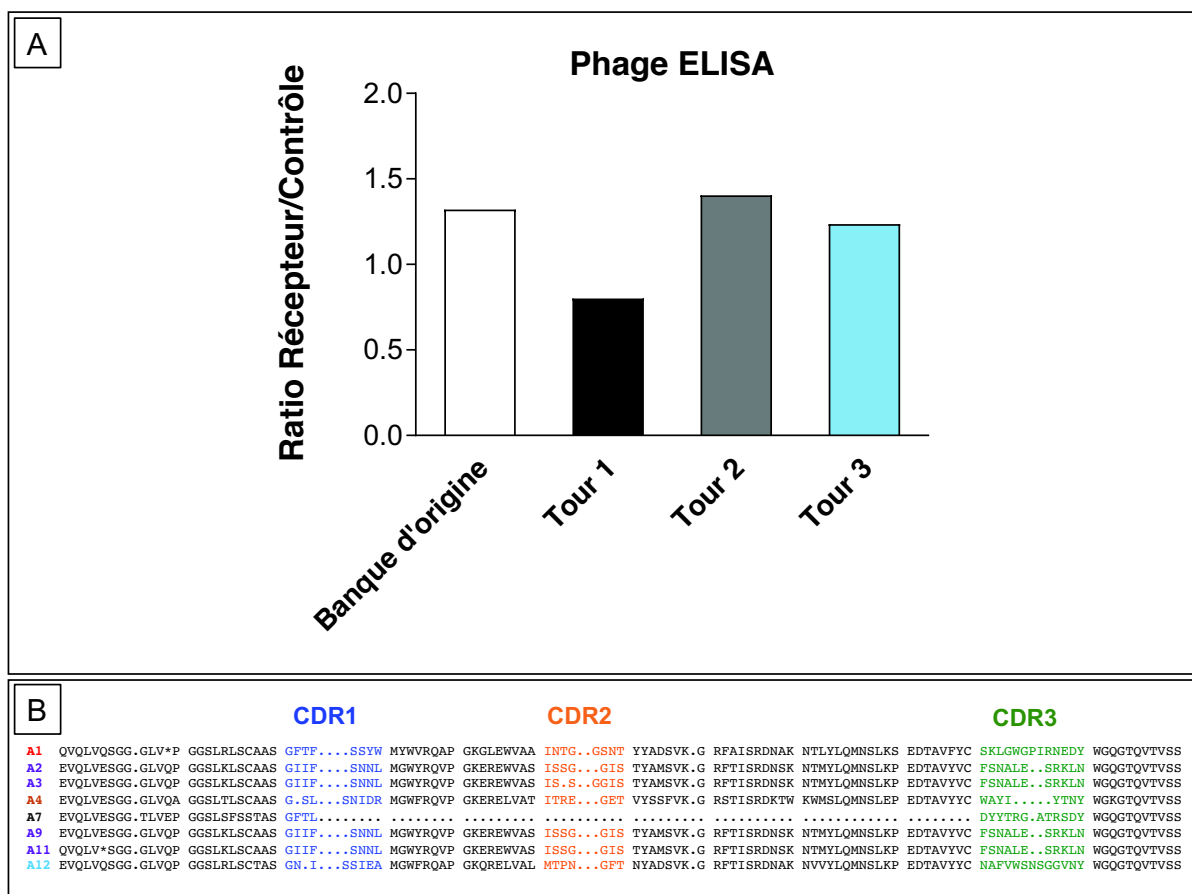


Figure 36 : Détermination de l'enrichissement en nanobodies spécifiques durant les tours du *panning*

A : Les phages des banques issues de chaque tour de *panning* (xx pfu) ont été incubés en présence de membranes de cellules exprimant ou non le récepteur m5-HT₄. Après lavages, l'absorbance a été mesurée grâce à un anticorps dirigé contre le bactériophage M13 et l'ajout d'une solution de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine).

B : Alignement des séquences de quelques clones issus du tour 2 du *panning*.

Les résultats du phage ELISA montrent un faible enrichissement des phages exprimant des nanobodies spécifiques du récepteur 5-HT₄ entre les tours 1 et 2 mais pas d'enrichissement entre les tours 2 et 3 (Figure 36A). Par ailleurs, il semblerait que les phages issus du tour 2 du *panning* contiennent le plus de clones spécifiques du récepteur. Le séquençage des clones issus du tour 2 du *panning* montre que la séquence du nanobody A6 était déjà majoritairement représentée (50% des séquences) (Figure 36B). Néanmoins, les séquences de quelques clones présents dans le tour 2 n'avaient pas encore été isolées dans le tour 3.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de mettre en place une méthode de criblage des intrabodies par HTRF® en utilisant les nanobodies du tour 2 du panning puisqu'ils semblent plus enrichis en clones spécifiques du récepteur 5-HT₄.

Nous avons donc réalisé des constructions codant pour les récepteurs m5-HT₄, h5-HT₆ et hβ₂-AR taggués avec les séquences FLAG et SNAP à l'extrémité du domaine C-terminal, afin de réaliser des expériences de TR-FRET entre le SNAP-tag (donneur) et un anticorps anti-myc D₂ (accepteur) sur des membranes de cellules (Figure 37A). Les SNAP-tag peuvent être marqués spécifiquement avec du BG (O⁶-benzylguanine) synthétique, ce qui crée une liaison thioesther stable entre un résidu cystéine réactif situé dans la séquence du tag et le BG. Le SNAP-tag devient ainsi une protéine de fusion capable d'émettre de la fluorescence sans affecter la fonction de la protéine sur laquelle il est inséré.

Des membranes de cellules transfectées avec le récepteur 5-HT₄-FLAG-SNAP ont été préparées et marquées au BG. L'utilisation d'un anticorps anti-FLAG D₂ a permis de valider la stratégie puisqu'il est possible de générer du transfert de fluorescence entre le SNAP-tag et l'anticorps anti FLAG-D₂ sur membranes (Figure 37A).

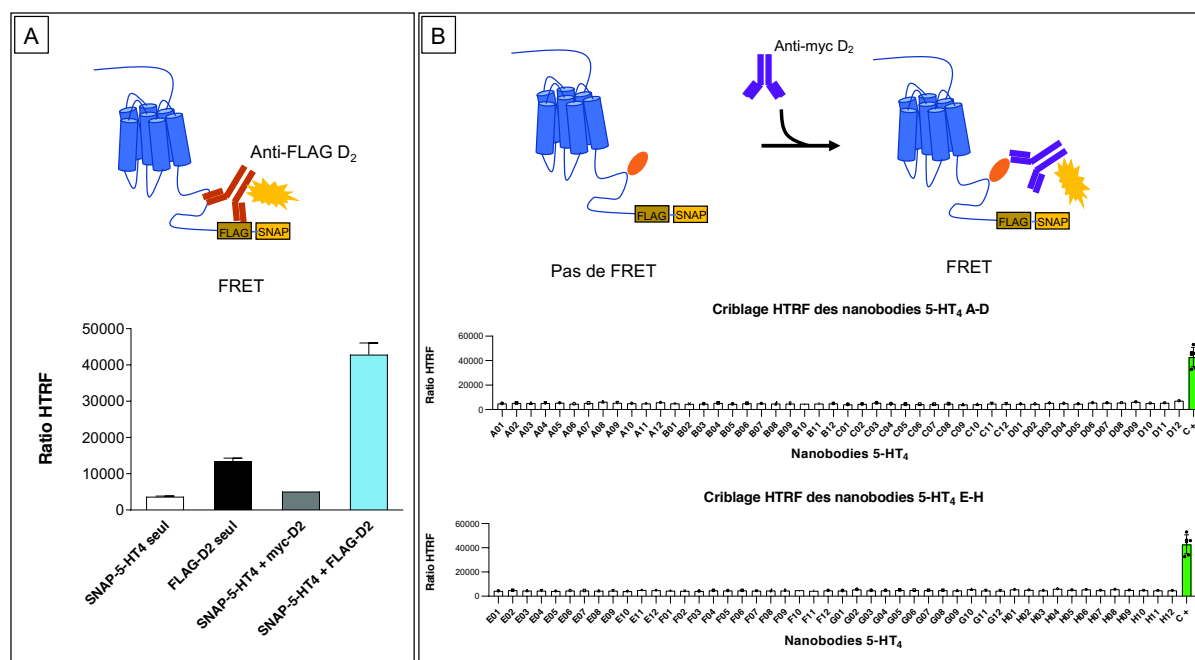


Figure 37 : Criblage des intrabodies par HTRF®

A : Validation de la méthode de criblage.

B : Criblage des nanobodies par HTRF® sur membranes. Un anticorps anti-FLAG D₂ a été utilisé comme contrôle positif.

Malheureusement, les résultats du criblage de 94 nanobodies issus du tour 2 du *panning* par HTRF® sur membranes n'a pas permis d'isoler un candidat positif comme le montrent les résultats de la figure 37B. D'autres expériences de criblage de 94 nanobodies issus du tour 3 du *panning* sur membranes et sur cellules entières en utilisant un récepteur taggué SNAP sur son domaine extracellulaire ont été réalisées en parallèle mais ce sont avérées négatives (résultats non montrés).

Néanmoins, la mise au point de cette méthode de criblage par HTRF® nous a permis d'utiliser les mêmes outils pour tester les rendements de production des extraits périplasmique en *masterblock* (Figure 38). Cette expérience a permis de mettre en évidence une forte hétérogénéité de production des différents clones. Les intrabodies Nb72 et Nb80 purifiés et dirigés contre le récepteur β_2 -AR ont également été dosés par cette méthode mais leur rendement de production a été trop faible pour qu'ils puissent être utilisés comme contrôles positifs.

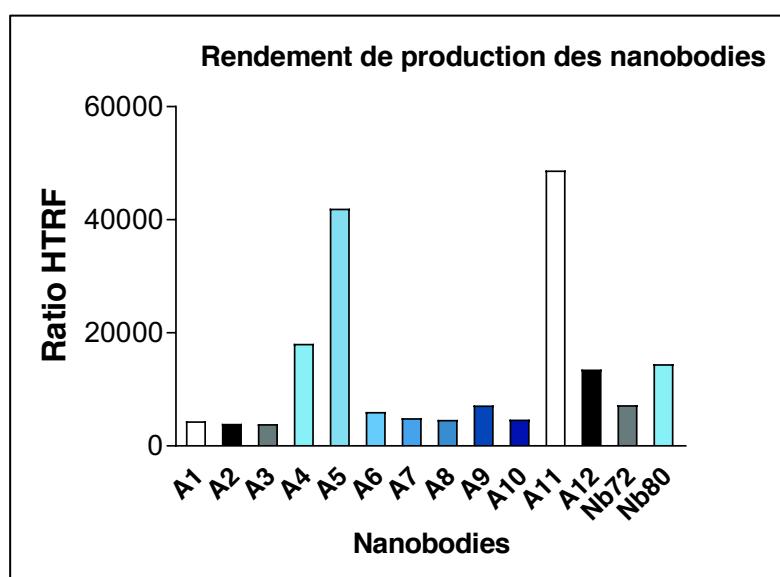


Figure 38 : Rendement de production des extraits périplasmiques en *masterblock*

L'isolement d'un nanobody se liant au récepteur 5-HT₄ s'est révélée infructueuse. Cependant, une méthode de criblage des intrabodies par TR-FRET sur membranes de cellules a été mise au point et semble adaptée à l'identification rapide de candidats se liant au domaine intracellulaire des RCPG.

II- Identification des réseaux de protéines associés au récepteur 5-HT₄ par analyse protéomique

Un concept récent dans la biologie des RCPG suggère le ciblage des GIP pour moduler la signalisation des récepteurs. Les récepteurs 5-HT₄ constituent une cible thérapeutique intéressante dans le contexte de la maladie d'Alzheimer de part leur capacité à promouvoir le clivage non-amyloïdogène de l'APP qui produit le fragment neuroprotecteur sAPP α . De plus, les résultats antérieurs de l'équipe suggèrent l'existence d'un complexe composé du récepteur 5-HT₄, de l'APP et de l'ADAM10, α -sécrétase majoritaire dans le cerveau. Ce complexe protéique serait impliqué dans le trafic intracellulaire de l'APP et dans la promotion de ce clivage non-amyloïdogène. L'objectif de ce travail a été d'identifier de nouveaux partenaires protéiques du récepteur 5-HT₄ qui moduleraient sa signalisation et pourraient constituer des cibles thérapeutiques d'intérêt pour ralentir, voire stopper l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

Nous avons d'utilisé une approche de protéomique par purification d'affinité (AP-MS) dans des cellules HEK-293 en utilisant le récepteur HA-m5-HT₄ comme appât afin d'identifier les partenaires interagissant spécifiquement avec le récepteur. Cette analyse a notamment permis d'identifier la protéine IRS4 (*Insulin Receptor Substrate 4*) comme partenaire du récepteur 5-HT₄. De manière intéressante, une dérégulation de la voie de signalisation de l'insuline dans le cerveau est depuis quelques années pointée du doigt comme un des événements majeurs impliqués dans le développement et la progression de la maladie d'Alzheimer. De plus, d'autres protéines de cette voie de signalisation comme le récepteur de l'insuline (IR) et le récepteur IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor Receptor 1*) sont identifiées dans les immunoprécipitats du récepteur en appliquant des critères de sélection moins stringents. Nous nous sommes donc intéressés à l'interaction entre le récepteur 5-HT₄ la protéine partenaire IRS4 en validant tout d'abord cette association par co-immunoprécipitation suivie d'un Western Blot et par immunofluorescence démontrant la colocalisation de ces deux protéines et la relocalisation d'IRS4 induite par l'expression du récepteur. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la caractérisation fonctionnelle de cette interaction. La modulation pharmacologique du

récepteur 5-HT₄ ne semble pas avoir d'effet sur l'état de phosphorylation de la protéine IRS4, suggérant que le récepteur 5-HT₄ n'est pas en mesure d'activer la voie de signalisation sous-jacente à la protéine IRS4. En revanche, une inhibition de l'expression de la protéine IRS4 par ARN interférence induit une surexpression du récepteur 5-HT₄ dans les cellules HEK-293, associée à une augmentation de la signalisation canonique du récepteur *via* la voie de la protéine G_s et la production d'AMPc. Diminuer l'expression d'IRS4 n'a, de façon surprenante pas d'effet sur l'activation de la voie ERK1/2 par le récepteur 5-HT₄. Une surexpression de la protéine IRS4 n'a pas d'effet significatif sur l'expression du récepteur 5-HT₄ à la membrane plasmique, ni sur sa capacité à mobiliser les voies de signalisation dépendantes de la protéines G_s et de ERK. Etant donné l'interaction connue de IRS4 avec des protéines impliquées dans l'ubiquitination, ces résultats suggèrent une implication de la protéine IRS4 dans la modulation de l'expression du récepteur 5-HT₄, *via* un processus d'ubiquitination. Un effet d'IRS4 sur la transcription du récepteur 5-HT₄ peut également être envisagé au vu de la localisation nucléaire d'IRS4 lorsque le récepteur 5-HT₄ est exprimé.

Article 1.

The protein network associated with serotonin type 4 (5-HT₄) receptor identifies Insulin Receptor Substrate 4 as a novel interacting partner.

En préparation

The protein network associated with serotonin type 4 (5-HT₄) receptor identifies Insulin Receptor Substrate 4 as a novel interacting partner

Short title: **5-HT₄R-associated network**

Hugo Payan^a, Romain Donneger^a, Elisabeth Cassier^a, Gaëlle Carrat^a, Serge Urbach^a, Oana Vigy^a, Aline Dumuis^a, Martial Seveno^a, Philippe Marin^{a*}, Sylvie Claeyssen^{a*}

^aIGF, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

*Philippe Marin and Sylvie Claeyssen contributed equally to this work.

Corresponding authors:

Philippe Marin

IGF – CNRS UMR5203 – INSERM U1191 – Univ. Montpellier

141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France

+33 434 359 242

Email: philippe.marin@igf.cnrs.fr

Sylvie Claeyssen

IGF – CNRS UMR5203 – INSERM U1191 – Univ. Montpellier

141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France

+33 434 359 215

Email: sylvie.claeyssen@igf.cnrs.fr

The authors declare no conflict of interest.

1. Introduction

G-protein coupled receptors (GPCRs) form the most important family of signaling receptors (Lefkowitz, 2005). Upon ligand binding, GPCRs activate heterotrimeric G proteins to elicit downstream signaling which fulfil numerous cellular functions. Regulation of GPCR expression and trafficking is involved in the biological effects of GPCRs. Typically, GPCR kinases (GRKs) and β -arrestins are deeply involved in the regulation of GPCR signaling by mediating GPCRs desensitization and trafficking (Freedman & Lefkowitz, 1996). Other mechanisms of GPCR regulation include ubiquitination and the association with molecular chaperones that assist the proper folding of the receptors (Kennedy & Marchese, 2015).

Serotonin 5-HT₄ receptors (5-HT₄R) are GPCRs that control numerous physiological functions such as feeding, mood behaviour, learning, memory and gastro-intestinal transit (Bockaert et al., 2008). Several compounds targeting 5-HT₄R for gastro-intestinal disorders are already commercialised.

Although targeting brain 5-HT₄R is clinically relevant for several pathologies such as feeding disorders, depression or Alzheimer's disease (Bockaert et al., 2011; Cochet et al., 2013), no ligand targeting 5-HT₄ receptor in the brain are available on the market. A recent concept in GPCR biology suggests to target GPCR-interacting proteins (GIPs) to modulate GPCR signaling in pathologies (Bockaert et al., 2010). For example, p11 protein has been identified as interacting with the 5-HT₄R (Warner-Schmidt et al., 2009). Overexpression of p11 protein increases 5-HT₄R membrane expression in heterologous cells whereas 5-HT₄R membrane expression is decreased in mouse p11 knock-out cells. Signaling of the 5-HT₄R is facilitated when p11 and 5-HT₄R are coexpressed in cells.

In this study, we identified new protein partners of the 5-HT₄R by a shotgun proteomic approach associating immunoprecipitation of the N-terminally HA-tagged receptor expressed in HEK-293 cells with systematic identification using tandem mass spectrometry. Interestingly, several proteins belonging to the insulin signaling pathway were found. IRS4, a protein partner which was strongly enriched in presence of the 5-HT₄R was further investigated and seems to regulate 5-HT₄R expression and trafficking.

2. Material and Methods

2.1. Cells

HEK-293N and COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) purchased from Gibco/Thermo Fisher Scientific (Life Technologies, Courtaboeuf, France, #41965062) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum purchased from Gibco (#10270-106) and 1% antibiotics. Cells were maintained in humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

2.2. Transfection

In HEK-293 cells, transient transfection of cDNA was performed using Polyethylenimine (PEI) from Polyscience (Issy-les-Moulineaux, France, #24765). Cells were seeded 24 h prior transfection and used 48 h after for all experiments except RNA interference (72 h after). A solution of optiMEM purchased from Gibco (#11058-021) containing the cDNA was mixed with a solution of PEI. The ratio maintained for all experiments was 4 ng PEI per ng of cDNA. The total amount of cDNA was equilibrated using empty plasmid. In Mock condition, only empty plasmid was transfected. The solution was gently mixed and, after 20 min, added to the cells. For siRNA & cDNA co-transfection, cells were transfected in suspension 48 h before the experiment using jetPRIME from Polyplus-transfection (Illkirch-Graffenstaden, France, #114-07) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cDNA, siRNA and jetPRIME reagent were gently mixed in jetPRIME buffer. After 10 min, the solution was mixed with the cells. Cells were then seeded in the wells and analyzed 48 h after. Post-transfection, the cells were grown in DMEM supplemented with 10% dialyzed foetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Saint-Louis USA, #F0392) and 1% antibiotics.

2.3. Determination of cAMP production

COS-7 or HEK-293 cells were transiently transfected by electroporation with the appropriate cDNA and plated in 96-well plates (35,000 cells/well). 24 or 48 h post-transfection, a 10-min stimulation with the appropriate concentrations of BIMU8 and 0.1 mM Ro 20-1724 (phosphodiesterase inhibitor) was performed at 37 °C in 100 µl of HEPES-buffered saline (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% glucose, and 0.1% bovine serum albumin). The same volume of Triton X-100 (1%) was added to stop the reaction, and the cells were incubated for 30 min at 37 °C. Quantification of cAMP production was performed by HTRF® (homogenous time-resolved fluorescence) using the cAMP Gs

dynamic kit (Cisbio, Codolet, France, #62AM4PEB) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Western Blotting

Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) after resolution onto 10% polyacrylamide gels or 4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels. After blockage with a 5% milk solution, membranes were immunoblotted with primary antibodies dissolved in a 5% Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, #A2153) solution overnight at 4°C. Then membranes were immunoblotted with either anti-rat (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK, #112-035-003) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody diluted 1 in 5000 in a 5% milk solution, StarBright™ Blue 700 Goat anti-rabbit IgG or StarBright™ Blue 520 Goat anti-mouse IgG secondary antibodies (Bio-Rad) diluted 1 in 10 000 in a 5% milk solution for 1 h at room temperature. Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence method (Western lightning® Plus-ECL, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) or by fluorescence on a ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad). Quantification was performed using the dedicated Bio-rad software Image Lab.

2.5. Immunofluorescence

Cells were washed once with pre-warmed DMEM at 37°C and fixed in a 4% solution of PFA in DMEM for 5 min at room temperature (RT). Excess of PFA was then quenched by washing the cells three times with a 0.1 M glycine solution in PBS. Cells were permeabilized and blocked with a blocking buffer (BB) composed of a PBS solution with 3% heat inactivated goat serum (Vector Laboratories, Peterborough UK, #S-100) and 0.1% Triton X-100 for 30 min. Primary antibodies were then incubated overnight at 4°C in BB. After extensive PBS washings, cells were incubated for 1 h at room temperature in the dark with the appropriate secondary antibodies and Hoescht 33342 (2 µM, Thermo Scientific Pierce) diluted in BB. Cells were then washed three times in PBS the coverslips were mounted onto slides by using Fluoromount mounting media (Clinisciences, Nanterre, France, #K024). Images were acquired with an SP8-UV confocal microscope (Leica Microsystems S.A.S, Nanterre, France). Images were captured with a 63X objective and zoomed 4 times. Selected Z-stacks were pooled together.

2.6. Co-immunoprecipitation

HEK-293 cells expressing either HA-5-HT₆R or HA-5-HT₄R or Mock cells were lysed in ice cold Lysis Buffer (LB) containing 4% n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside (DDM) purchased

from Anatrace (Pasadena, Canada, #D310), 20 mM TRIS (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP40, phosphatase inhibitors (Sodium Fluoride, 10 mM ; Sodium Orthovanadate, 2 mM ; Sodium Pyrophosphate, 1 mM ; and β -glycerophosphate, 50 mM), protease inhibitor cocktail EDTA-free purchased from Roche (Meylan, France, #37378900) for 1 h at 4°C under gentle mixing. Then, samples were centrifuged at 18.000 g for 15 min at 4°C. Soluble proteins were quantified by bicinchoninic acid assay (BCA) from Sigma-Aldrich (#B29643 and #C2284), then 1 mg protein per each condition was incubated with either the agarose-conjugated anti-HA antibody (Sigma-Aldrich, #A2095) or Dynabeads™ Protein G-conjugated (ThermoFisher Scientific, #100003D) anti-IRS4 antibody (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland, #sc-393207) overnight at 4°C. To preconjugate the anti-IRS4 antibody to the beads, the beads were washed three times in LB before incubation with 50 μ l of Dynabeads™/mg of protein, overnight at 4°C under gentle agitation. After immunoprecipitation, beads were washed five times with ice cold LB. Immunoprecipitated proteins were eluted in Laemmli sample buffer 2X by shaking at 70°C for 10 min.

2.7. Mass spectrometry

Proteins were separated on SDS-PAGE gels (12% polyacrylamide, Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad) and stained with Protein Staining Solution (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Gel lanes were cut into 7 gel pieces and destained with 50 mM TriEthylAmmoniumBiCarbonate (TEABC) and three washes in 100% acetonitrile. After protein reduction (with 10 mM dithiothreitol in 50 mM TEABC at 60°C for 30 min) and alkylation (55 mM iodoacetamide TEABC at room temperature for 60 min) proteins were digested in-gel using trypsin (500 ng/band, Gold, Promega, Charbonnières les Bains, France) as previously described (Thouvenot et al., 2008). Digest products were dehydrated in a vacuum centrifuge and reduced to 3 μ l. The generated peptides were analysed online by nano-flowHPLC-nanoelectrospray ionization using an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentration of samples were performed on-line on a Pepmap® pre-column (0.3 mm x 10 mm, Dionex™, Thermo Fisher Scientific). A gradient consisting of 0-40% A for 60 min and 80% B for 15 min (A = 0.1% formic acid, 2% acetonitrile in water ; B = 0.1% formic acid in acetonitrile) at 300 nl/min was used to elute peptides from capillary reverse-phase column (0.075 mm x 150 mm, Acclaim Pepmap 100® C18, Thermo Fisher Scientific). Eluted peptides were electrosprayed online at a voltage of 1.8 kV into an Orbitrap Elite mass spectrometer. A cycle of one full-scan mass spectrum (400 - 2,000 m/z) at a resolution of 120,000 (at 400 m/z),

followed by 20 data-dependent MS/MS spectra was repeated continuously throughout the nanoLC separation. All MS/MS spectra were recorded using normalised collision energy (33%, activation Q 0.25 and activation time 10 ms) with an isolation window of 2 m/z. Data were acquired using the Xcalibur software (v 2.2). For all full scan measurements with the Orbitrap detector a lock-mass ion from ambient air (m/z 445.120024) was used as an internal calibrant as described (Olsen et al., 2005). Analysis of MS data was performed using MaxQuant software package (v 1.5.5.1) as described by J. Cox and M. Mann (Cox & Mann, 2008). Tandem mass spectra (MS/MS) were searched by the Andromeda search engine (Cox et al., 2011) against the UniProtKB Reference proteome UP000005640 database for Homo sapiens (release 2017_01) with addition of the isoform 2 of Htr4 mouse (Uniprot_5HT4 Mouse Iso_2_2017_01) using the following parameters: enzyme specificity was set as Trypsin/P, and a maximum of two missed cleavages and a mass tolerance of 0.5 Da for fragment ion were applied. A second database of known contaminants provided with the Max Quant suite was also employed. The « match between runs », « iBAQ » and « LFQ » options were checked. Oxidation (M) was specified as a variable modification and a carbamidomethylation (C) as a fixed modification. Database searches were performed with a mass tolerance of 20 ppm for precursor ion for mass calibration, and with a 4.5 ppm tolerance after calibration. The maximum false peptide and protein discovery rate (FDR) was specified as 0.01. Seven amino acids were required as minimum peptide length. The MaxQuant software generates several output files that contain information about identified peptides and proteins. The « proteinGroups.txt » file is dedicated to identified proteins : each single row collapses into protein groups all protein that cannot be distinguished based on identified proteins. An in-house bioinformatics tool have been developed to automatically select a representative protein ID in each protein group. First, protein with the most identified peptides are isolated in a so called « match group » (proteins from the « Proteins IDs » column with the maximum number of « peptides counts (all) »). For 1% of the remaining match groups where more than one protein ID existed, the « leading » protein has been chosen as the best annotated protein according to the number of Gene Ontology annotations (retrieved performed from UniProtKB 01/2017). The Perseus software (v 1.6.1.1) (Tyanova et al., 2016) enabled protein quantification (Label Free Quantification) *via* the intensity values and performed subsequent statistical analysis of these data. Quantification were performed using LFQ values for further analysis, after elimination of reverse and contaminant entries. Experiments were repeated three times to assess biological reproducibility.

2.8. Analysis MS data

Co-IP data were analysed and compared to Mock cells using Perseus v 1.6.1.1. Proteins identified only by site and labelled as contaminant were eliminated. Log₂(LFQ intensities) were used for the analysis and only proteins identified in all three biological replicates in at least one group (5-HT₄R or Mock) were maintained. For the statistical analysis missing values were substituted with the minimum LFQ value quantified in the remaining list. The proteins were considered statistically significant using a *t*-test conducted on both sides setting the number of randomization at 250, the False Discovery Rate at 0.01 and the S0436 at 0.1.

3. Results

3.1. Identification of 5-HT₄R interactome in HEK-293N cells by AP-MS

5-HT₄R interacting proteins were identified in human embryonic kidney HEK-293N cells transiently expressing hemagglutinin (HA)-tagged 5-HT₄R using an affinity purification coupled to mass spectrometry (AP-MS) proteomic strategy. Proteins interacting with 5-HT₄R were immunoprecipitated using an anti-HA monoclonal antibody immobilized onto agarose beads and resolved by SDS-PAGE. 5-HT₄R interacting proteins were identified by nano-flow liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Two experimental conditions were compared: cells transfected with HA-5-HT₄R and cells transfected with empty plasmid (Mock). After band cutting and trypsin digestion, 2,042 proteins were identified by mass spectrometry. The number was reduced to 440 after filtering out the proteins with a MS/MS ratio < 4, without at least 2 unique peptides identified in the MS nor identified in at least two biological replicates in at least one group (5-HT₄R or Mock). Label-free quantification (LFQ) of the relative protein abundances in immunoprecipitates obtained from 5-HT₄R expressing cells and Mock cells showed that 61 proteins were significantly enriched in immunoprecipitates from cells expressing 5-HT₄R, using a *t*-test conducted on both sides and setting a stringent False Discovery Rate (FDR) of 1% with Mock condition.

5-HT₄R, which was the bait protein, was obviously the most enriched one (Table 1). We also identified G protein subunits G α_{i1} , G α_{i3} and G β_2 but surprisingly not any G α_s subunit to which 5-HT₄R is canonically coupled to. Consistent with 5-HT₄R trafficking and internalisation, we identified several protein partners involved in these processes such as Vps35, a member of the retromer complex that participate to the recruitment of GPCRs at the plasma membrane (Choy et al., 2014), or AP-2 and clathrin subunits involved in the clathrin-mediated internalisation of

the receptor (Miller & Lefkowitz, 2001; Wagener et al., 2009). We also identified known modulators of G proteins such as Unconventional myosin I and small GTPases like Rab-5 or Rab-11 that modulate GPCR signaling (Esseltine & Ferguson, 2013). Diverse proteins involved in the ubiquitination process have also been identified. This post-translational modification play a role in the regulation of GPCR trafficking and signaling (Kennedy & Marchese, 2015; Shenoy & Lefkowitz, 2003). Others scaffold proteins containing PDZ domains and known for their regulation of brain GPCRs has also been identified such as DLG1 (also known as SAP97), IQGAP1 or MPP6 (Civciristov et al., 2019; Dunn & Ferguson, 2015; Nooh et al., 2014). Interestingly, several Ephrin receptors seem to be interacting partners of the 5-HT₄ receptor. These tyrosine kinase receptors play an important role in axon guidance and long-term potentiation which is consistent with the role of 5-HT₄R in learning and memory (Egea & Klein, 2007; Kulla & Manahan-Vaughan, 2002; Kullander & Klein, 2002). One of the most enriched protein is IRS4, an effector of the insulin signaling pathway. Because previous work in our team showed that 5-HT₄R modulates the Amyloid Precursor Protein (APP) trafficking and processing and that 5-HT₄R targeting is of interest in the context of Alzheimer's Disease (AD) (Baranger et al., 2017; Cochet et al., 2013), we decided to focus our work on the interaction between 5-HT₄R and IRS4. Indeed, dysregulation of the insulin signaling pathway is one of the major hallmarks of AD. Whereas IRS1 and IRS2 are ubiquitously expressed, the expression of IRS4 is more localised in the brain (Fantin et al., 1999; Numan & Russell, 1999), in regions where 5-HT₄R is also expressed such as in the hypothalamus (Medhurst et al., 2001). Moreover, a study report that the *IRS4* gene is the most downregulated gene in the early stages of the APP^{swe}/PSEN1^{dE9} model, a mouse model of AD (Jackson et al., 2013). In humans, labeling of post mortem brain tissue with radioligands showed decreased 5-HT₄R expression in patients with Alzheimer's disease (Reynolds et al., 1995) whereas another suggested that the receptor is upregulated in the preclinical stage of the disease (Madsen et al., 2011). In addition, preliminary data of a recent study support an interaction between APP and IRS4 (Letronne et al., 2016). They share at least a common interactor, Grb2, which is also recruited by EphA2 receptor, a protein immunoprecipitated by 5-HT₄R according to our experiments, and which also interacts with APP (Fantin et al., 1998; Nizzari et al., 2007; Pratt & Kinch, 2002).

Protein names	UniProtID	Gene names	Difference	p value
5-hydroxytryptamine receptor 4 (5-HT4) (Serotonin receptor 4)	P97288-2	Htr4	9,04	3,31
Band 4.1-like protein 2	O43491	EPB41L2	7,1	3,04
Uncharacterized protein KIAA0195	Q12767	KIAA0195	6,76	3,33
Inactive tyrosine-protein kinase 7	Q13308	PTK7	6,7	3,22
Solute carrier family 12 member 2	P55011	SLC12A2	6,66	3,38
Desmoglein-2	Q14126	DSG2	6,44	3,72
Insulin receptor substrate 4	O14654	IRS4	6,39	1,84
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	P46940	IQGAP1	6,22	2,22
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	P20020	ATP2B1	5,86	2,83
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Q96QK1	VPS35	5,72	2,51
Extended synaptotagmin-1	Q9BSJ8	ESYT1	5,55	2,44
Band 4.1-like protein 3	Q9Y2J2	EPB41L3	5,38	2,14
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	P08754	GNAI3	5,1	2,72
Serine/threonine-protein kinase N2	Q16513	PKN2	4,87	1,99
Ephrin type-A receptor 2	P29317	EPHA2	4,8	2,6
Clathrin heavy chain 1	Q00610	CLTC	4,8	2,05
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	P62879	GNB2	4,73	3,29
Ephrin type-A receptor 7	Q15375	EPHA7	4,68	3,57
Lethal(2) giant larvae protein homolog 1	Q15334	LLGL1	4,68	4
Extended synaptotagmin-2	A0FGR8	ESYT2	4,54	2,76
Ras-related protein Rab-9A	P51151	RAB9A	4,46	2,41
WD repeat-containing protein 44	Q5JSH3	WDR44	4,43	2,76
Rabankyrin-5	Q9P2R3	ANKFY1	4,37	4,59
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	P04899	GNAI2	4,3	2,47
4F2 cell-surface antigen heavy chain	P08195	SLC3A2	4,3	2,06
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	P10586	PTPRF	4,12	2,05
Carboxypeptidase D	O75976	CPD	4,09	2,68
Tyrosine-protein kinase Yes	P07947	YES1	4,09	2,28
Catenin alpha-1	P35221	CTNNA1	4,05	2,16
Unconventional myosin-Ic	O00159	MYO1C	3,98	2,24
Plexin-B2	O15031	PLXNB2	3,98	2,06
Unconventional myosin-IId	O94832	MYO1D	3,92	2,03
Oxysterol-binding protein-related protein 8	Q9BZF1	OSBPL8	3,83	2,05
WD repeat-containing protein 6	Q9NNW5	WDR6	3,77	3,79
Multidrug resistance protein 1	P08183	ABCB1	3,75	1,99
Golgi resident protein GCP60	Q9H3P7	ACBD3	3,75	1,91
MAGUK p55 subfamily member 6	Q9NZW5	MPP6	3,73	3,74
Disks large homolog 1	Q12959	DLG1	3,69	3,23
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	P63096	GNAI1	3,67	2,38
Protein 4.1	P11171	EPB41	3,64	3,33
Unconventional myosin-Ib	O43795	MYO1B	3,44	2,62
Latrophilin-2	O95490	LPHN2	3,34	2,05

Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Q9P2J5	LARS	3,13	2,9
Pleckstrin homology domain-containing family A member 5	Q9HAU0	PLEKHA5	3,02	2,24
Vinculin	P18206	VCL	3	2,01
Protocadherin-7	O60245	PCDH7	3	2,23
Leucyl-cystinyl aminopeptidase	Q9UIQ6	LNPEP	2,99	2,63
AP-2 complex subunit alpha-2	O94973	AP2A2	2,93	2,21
E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	Q96PU5	NEDD4L	2,89	2,75
Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	GDI2	2,86	2,48
CD276 antigen	Q5ZPR3	CD276	2,83	3,69
Ras-related protein Rab-11B	Q15907	RAB11B	2,63	2,24
Multidrug resistance-associated protein 1	P33527	ABCC1	2,61	3,02
C2 domain-containing protein 5	Q86YS7	C2CD5	2,6	2,51
Transmembrane protein 2	Q9UHN6	TMEM2	2,6	2,22
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Q7Z2W4	ZC3HAV1	2,47	3,03
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P62979	RPS27A	2,41	2,98
Coatomer subunit alpha	P53621	COPA	2,41	2,54
Annexin A2	P07355	ANXA2	2,37	3,53
Erlin-2	O94905	ERLIN2	2,06	3,88
Rho-related GTP-binding protein RhoG	P84095	RHOG	1,83	2,94

Table 1. List of proteins interacting specifically with 5-HT₄R in HEK-293N cells

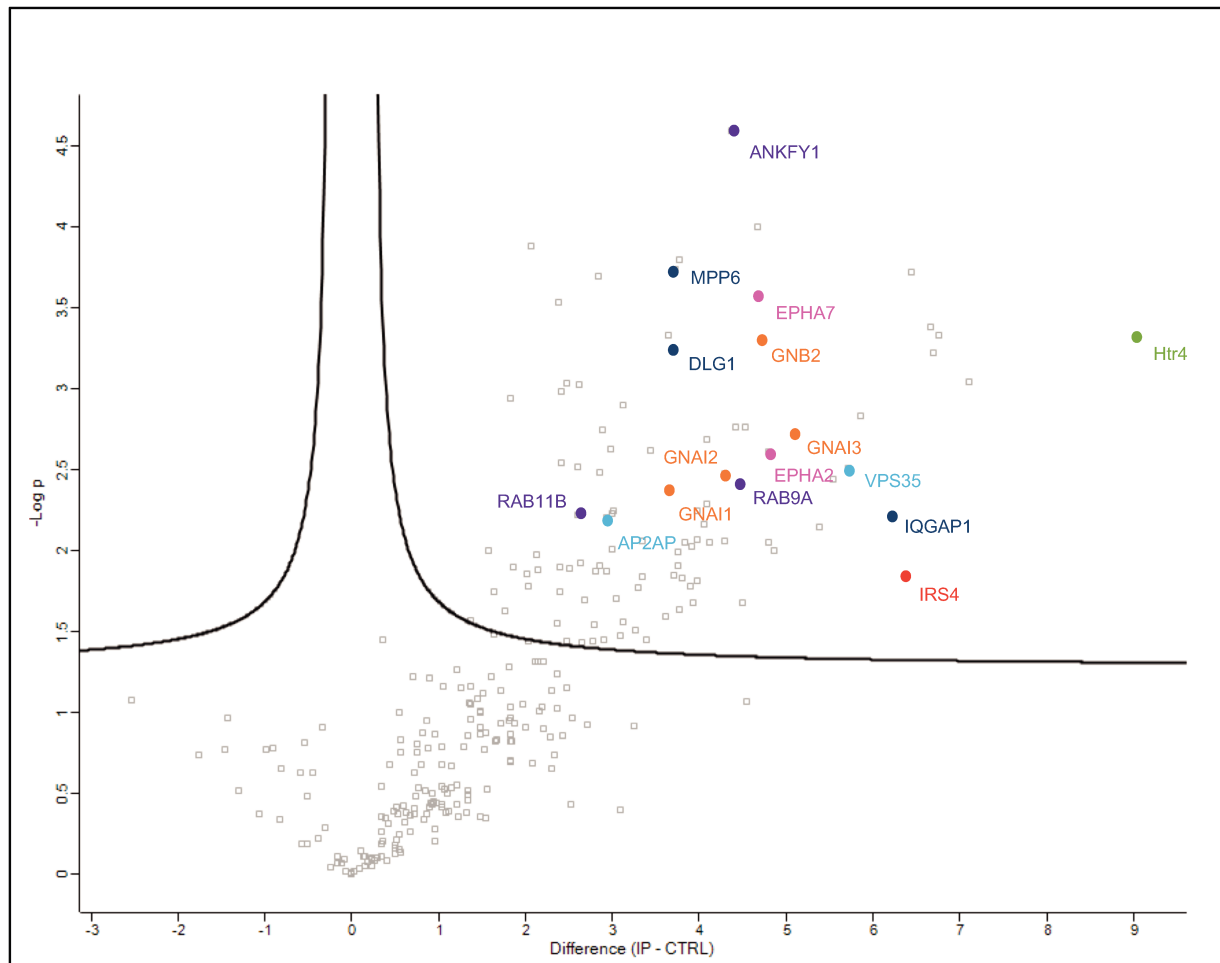


Figure 1. 5-HT₄R interacting proteins identified in HEK-293N cells and their relative abundance in immunoprecipitates from 5-HT₄R-expressing cells vs Mock cells.

Three distinct biological replicates of an HA co-immunoprecipitation followed by nanoLC-MS/MS were performed in HEK-293N cells transiently expressing either HA-tagged 5-HT₄R or empty plasmid (Mock). Log transformed intensities, obtained by Label Free Quantification (LFQ), of proteins identified in all three biological replicates in at least one set of cultured cells were then used for the comparison. The volcano plot was obtained plotting the differences of LFQ values between 5-HT₄R and Mock cells (X axis) vs. -log of P value (Y axis). The right and left parts of the graph include plotted proteins with large differences in abundance between the two conditions whereas the upper part includes protein with a high inter-replicate reproducibility. The more the proteins are on the right, the more they are enriched in the 5-HT₄R condition. The proteins were considered statistically significant using a *t*-test conducted on both sides setting the number of randomizations at 250, the False Discovery Rate (FDR) at 0.01 and the S0 at 0.1. Thus, all the proteins above the line are significantly enriched. In green, 5-HT₄R, which is the bait, is represented (Htr4). In dark blue, scaffold proteins known to interact with GPCRs are highlighted. In orange are represented the different G proteins found in the 5-HT₄R interactome. In purple, the Rab proteins known to modulate GPCR signaling are depicted. In light blue are the protein involved in the trafficking of the 5-HT₄R. The two Ephrin receptors found in the mass spectrometry analysis are represented in pink. IRS4, the partner protein characterised in this study is highlighted in red.

3.2. IRS4 interacts preferentially with 5-HT₄R compared to 5-HT₆R

According to the literature, 5-HT₄R and IRS4 share APP as a common interactor (Letronne et al., 2016). Despite APP was not found in our proteomic screen, a less stringent analysis (including the proteins identified in at least 2 experiments out of 3) revealed interactions of 5-HT₄R with other proteins belonging to the insulin signaling pathway such as Insulin receptor (IR) or Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R). These results reinforce the interest to study the interaction between IRS4 and 5-HT₄R. We first confirmed the interaction between the two proteins by immunoprecipitation of HA-tagged 5-HT₄R followed by Western blotting and detection of IRS4. IRS4 was immunoprecipitated with the receptor and this interaction was independent of the activation state of the receptor (Fig. 2A). To assess for the specificity of the interaction, we evaluated the ability of IRS4 to recruit 5-HT₆R, another serotonin receptor close to the 5-HT₄R. Immunoprecipitation of IRS4 followed by detection of the HA-tag show that 5-HT₄R was preferentially immunoprecipitated compared to 5-HT₆R (Fig 2B). Interestingly, the expression of the 5-HT₄R seemed to strongly reduce the amount of immunoprecipitated IRS4. This result could be explained by a conformational change of IRS4 when 5-HT₄R is present that would impair the binding between anti-IRS4 antibody and IRS4 protein.

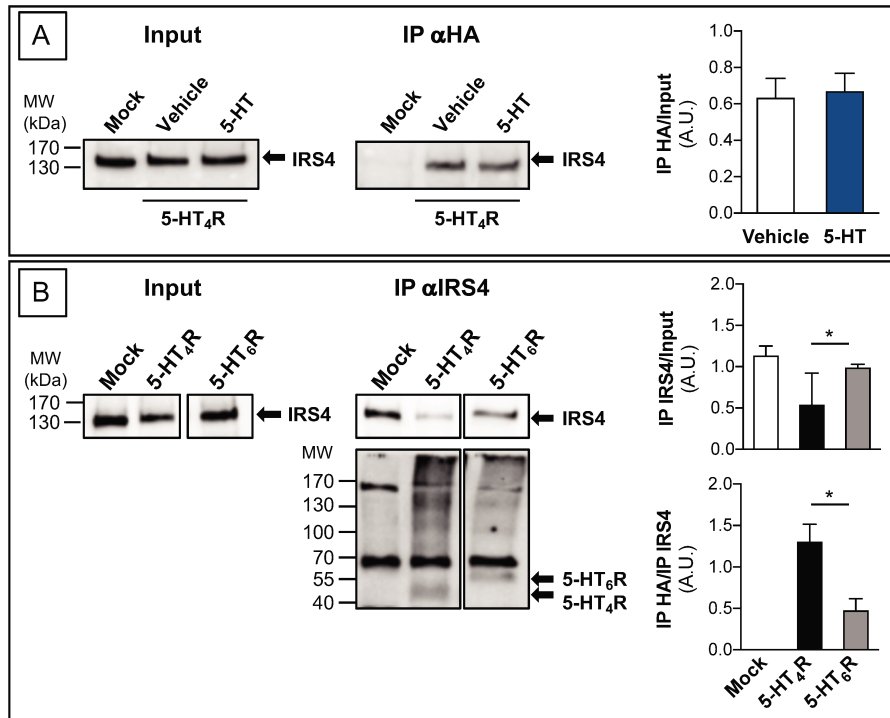


Figure 2. Association of IRS4 with 5-HT₄R is independent of receptor conformational state. (A) Co-immunoprecipitation (co-IP) of native IRS4 with HA-5-HT₄R transiently expressed in HEK-293 cells, treated with vehicle or 10 μ M 5-HT during 10 min. (B) Co-immunoprecipitation of HA-5-HT₄R or HA-5-HT₆R transiently expressed in HEK-293 cells with native IRS4. Histograms represent the results of densitometric analyses of three independent experiments. Data are means \pm SEM. Inputs represent 2% of the total protein amount used for immunoprecipitations (IPs). Representative blots of three independent experiments are illustrated. Mock: cells transfected with empty plasmid. MW, molecular mass. Paired Student *t*-test; **p* < 0.05 vs 5-HT₄R condition.

3.3. IRS4 colocalizes with 5-HT₄R in HEK-293 cells

The previous findings showed that overexpressed 5-HT₄R interacted with IRS4 in HEK-293 cells. When expressed, 5-HT₄R is preferentially localized at the plasma membrane. Little is known about the subcellular localization of IRS4, although this protein is expected to be enriched at the plasma membrane regarding its known interaction with IR and IGF-1R. The subcellular localization of IRS4 was explored in presence or not of the 5-HT₄R using confocal imaging. Staining of IRS4 protein showed that its expression is widely distributed within the cell (Fig. 3, upper panel). As expected, the labelling of the HA-5-HT₄R showed that it was preferentially expressed at the plasma membrane. Expression of HA-5-HT₄R seemed to relocate the native IRS4 protein at the plasma membrane where it colocalized with the receptor (Fig. 3, lower panel). Moreover, an increased expression of IRS4 in the nucleus was observed in cells expressing HA-5-HT₄R. Indeed, in the Mock condition and in the non-transfected cells of the HA-5-HT₄R condition, we observed few IRS4 staining in the nucleus, where IRS4 staining (green) was poorly overlapping with nucleus Hoechst staining (blue). In HA-5-HT₄R expressing cells, IRS4 staining was more intense in the nucleus of cells expressing the receptor. Collectively, these results indicated that the expression of the 5-HT₄R in HEK-293 cells relocated IRS4 at the plasma membrane where the two proteins probably interact, but induced also an increase in the presence of IRS4 in the nucleus where it could play a role related to the transcription of DNA.

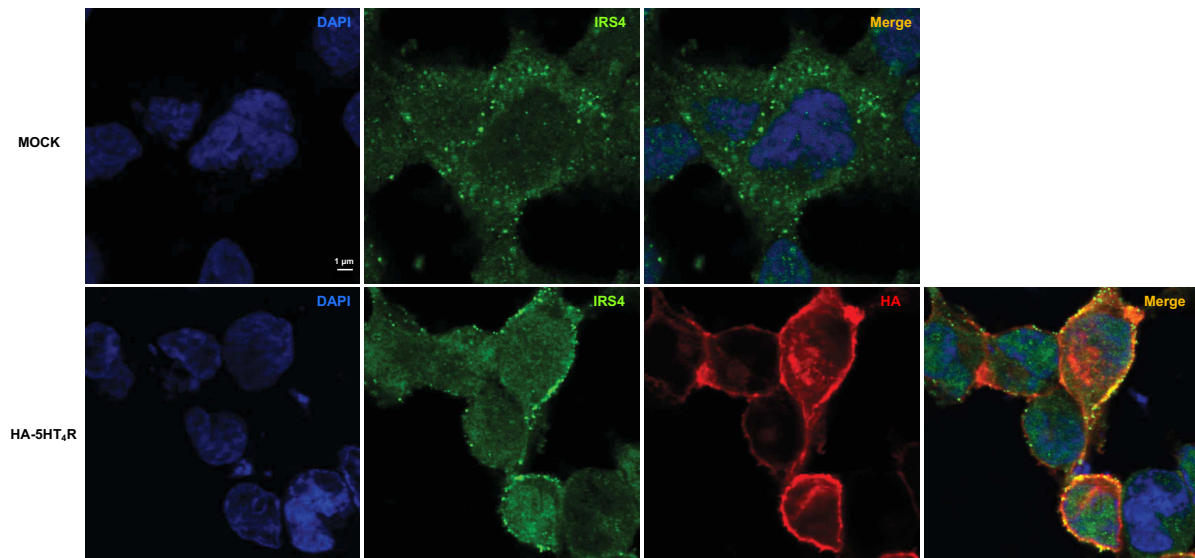


Figure 3. IRS4 and HA-5-HT₄R expression in HEK-293 cells

Representative confocal pictures of HEK-293 cells transiently expressing HA-5-HT₄R or empty plasmid (Mock). HA-5-HT₄R was detected using anti-HA antibody (red), endogenous IRS4 was labelled using anti-IRS4 antibody (green). nucleus were detected using Hoechst staining (blue). Scale bar = 1 µm.

3.4. Downregulation of IRS4 strongly increases 5-HT₄R expression and related G_s-activation in HEK-293 cells

As IRS4 is natively well expressed in HEK-293 cells, we first evaluated the impact of its downregulation on the signaling of 5-HT₄R. Thus, we took advantage of the RNA interference technology to downregulate IRS4 protein. HEK-293 cells have been co-transfected with a plasmid encoding HA-5-HT₄R receptor and 50 nM of either a siRNA targeting IRS4 or a non-targeting siRNA (control siRNA). Unexpectedly, the downregulation of IRS4 strongly increased total 5-HT₄R expression as quantified by Western blotting using an anti-HA antibody (Fig. 4A). In line with this result, we demonstrated that this boost in 5-HT₄R expression impacted the G_s-dependent signaling of the receptor. Indeed, the downregulation of IRS4 protein amplified the cAMP response elicited by increasing concentrations of the specific 5-HT₄R agonist BIMU8, with a decrease of the EC₅₀ and an increase in the maximum response (Fig. 4B). Surprisingly, this enhancement of the G_s pathway was not transmitted to the downstream activation of ERK1/2, a signaling pathway shared by IR, IGF-1R and 5-HT₄R. When IRS4 is downregulated, the phosphorylation of ERK at 5 min was similar to the activation observed in control condition (Figure 4C).

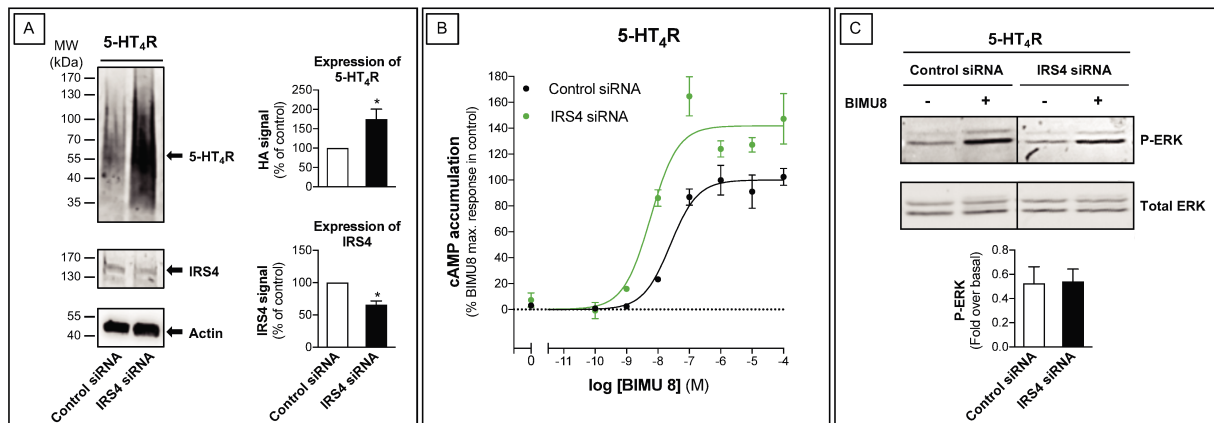


Figure 4. IRS4 downregulation enhances 5-HT₄R expression and G_s pathway but not ERK activation in HEK-293 cells. HEK-293 cells were co-transfected with HA-5-HT₄R and 50nM of either a siRNA targeting IRS4 or a non-targeting siRNA (control siRNA) and analysed 48 h post transfection. (A) 5-HT₄R, IRS4 and actin expression levels in whole cell lysates. (B) Dose-response curve of cAMP accumulation elicited by increasing concentrations of BIMU8 during 10 min. (C) ERK phosphorylation induced by 5-min treatment with vehicle or BIMU8 (10⁻⁵M). Receptor expression and functionality were assessed by immunoblotting using an anti-HA antibody, and by sequential immunoblotting with the antibody recognizing phosphor-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (P-ERK) and total ERK1/2 (Total-ERK). Representative data of three independent experiments are illustrated. Histograms represent the results of densitometric analyses of three independent experiments. Data are means ± SEM. MW, molecular mass. Paired Student *t*-test; *p < 0.05 vs Control-siRNA condition.

3.5. Overexpression of IRS4 does not impact significantly 5-HT₄R expression nor receptor-dependent signaling in HEK-293 cells.

To assess the impact of IRS4 overexpression, FLAG-IRS4 and HA-5HT₄R were co-transfected in HEK-293 cells. IRS4 overexpression did not affect significantly the total expression of 5-HT₄R as shown by Western blot experiments (Fig. 5A). In accordance with this observation,

The overexpression of IRS4 did not change the accumulation of cAMP induced by 10-min activation of the receptor using the full agonist BIMU8 (Fig. 5B). The integrative ERK1/2 pathway was also unaffected by IRS4 overexpression (Fig. 5C). Collectively, these findings suggest that native IRS4 expression is sufficient to exert its modulatory role regarding 5-HT₄R-dependent signaling, as the overexpression of IRS4 had no effect on the two signaling pathways tested: one protein G-dependent (activation of adenylate cyclase) and one protein G-independent (activation of the MAPK pathway).

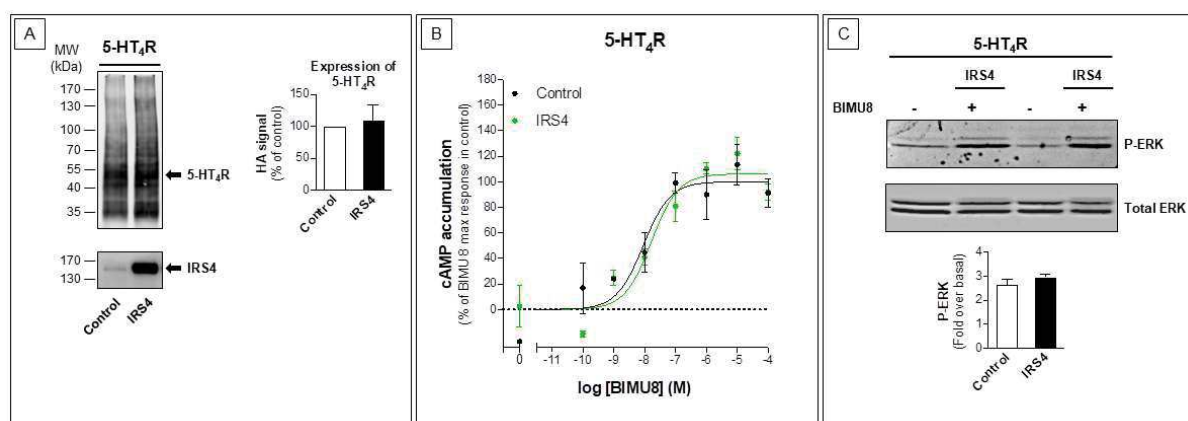


Figure 5. IRS4 overexpression did not impact 5-HT₄R-dependent signaling.

HEK-293 cells were transiently transfected with plasmids encoding HA-tagged 5-HT₄R alone or in combination with FLAG-IRS4, and analyzed 48 h post transfection. (A) 5-HT₄R and IRS4 expression levels in whole cell lysates. (B) Dose-response curve of cAMP accumulation elicited by increasing concentrations of BIMU8 during 10 min. (C) ERK phosphorylation induced by 5-min treatment with vehicle or BIMU8 (10⁻⁵M). Receptor expression and functionality were assessed by immunoblotting using an anti-HA antibody, and by sequential immunoblotting with the antibody recognizing phosphor-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (P-ERK) and total ERK1/2 (Total-ERK). Representative data of three independent experiments are illustrated. Histograms represent the results of densitometric analyses of three independent experiments. Data are means \pm SEM. MW, molecular mass. Paired Student *t*-test; **p* < 0.05 vs Control condition.

4. Discussion

Since its discovery, the 5-HT₄ receptor has gained major attention for his role in numerous brain functions such as learning and memory and its implication in several brain disorders such as feeding-associated diseases or depression (Bockaert et al., 2011). More recently, our team has identified the 5-HT₄ receptor as a relevant therapeutic target in the context of Alzheimer's disease. Indeed, the receptor physically interacts with APP and the α -secretase ADAM10 and its activation promotes the non-amyloidogenic cleavage of APP (Cochet et al., 2013). Moreover, the 5-HT₄R-APP-ADAM10 complex seems to be already formed in the endoplasmic reticulum and these three proteins traffic together to the plasma membrane. Therefore, the 5-HT₄ receptor can modulate APP trafficking and processing but the mechanisms underlying these effects remain largely understood. In order to decipher these processes, we decided to study the 5-HT₄R interactome using an AP-MS proteomic strategy. Thus, we immunoprecipitated an HA-tagged 5-HT₄R expressed in HEK-293 cells and we systematically identified the co-immunoprecipitating proteins by mass spectrometry.

Analysis of the 5-HT₄R network based on Label Free Quantification (LFQ) and setting a stringent False Discovery Rate (FDR) of 1% revealed 61 proteins specifically co-immunoprecipitated with the receptor. Nevertheless, the interacting proteins identified following AP-MS protocols, especially when performed in cells overexpressing the protein of interest, must be considered as potential partners whose interactions must be further validated *via* other assays including functional ones.

However, the relevance of our co-immunoprecipitation strategy used for affinity-purification of partners is validated by the identification of HA-5-HT₄R, the bait, as the most abundant protein in the Co-IP. Moreover, several proteins known to interact with GPCRs such as clathrin complexes, Rab-5 and Rab-11, Vps35, or PDZ-containing proteins (SAP97, MPP6 and IQGAP1) were retrieved in 5-HT₄R complexes.

Regarding the difficulty to identify the majority of transmembrane proteins in proteomic experiments, because of the need of an optimum balance between hydrophilic and lipophilic environment which varies with different proteins, we could not retrieve neither APP, nor ADAM10 in our proteomic analysis (Rabilloud, 2009). However, a less stringent analysis of the potential 5-HT₄R partners identify APP interactors such as CASK, a PDZ-domain containing protein or Nicastrin, a member a the γ -secretase complex that cleaves APP (Mueller et al., 2000; Schenk, 2000). SAP97 is also an interesting interacting partner of the 5-HT₄R, as

SAP97 is known to associate with ADAM10 and to control its synaptic location, which further reinforces the relevance of the 5-HT₄R-APP-ADAM10 complex (Saraceno et al., 2014).

IRS4 was one of the 61 proteins identified as potential 5-HT₄R-interacting proteins in our proteomic screen. IRS4 is a 134 kDa protein that mediates the signaling between tyrosine kinase receptors such as Insulin receptors (IR) or IGF-1 receptor (IGF-1R) and signaling molecules containing SH2 domains. When activated by their ligand, IR and IGF-1R autophosphorylate their C-terminal domain, leading to a change in the receptor conformation that allows the recruitment of IRS proteins, including IRS4, which are in-turn phosphorylated on their phosphotyrosine domain. This activation induce the phosphorylation of downstream signaling substrates, the most well known being PI3K and Akt proteins. IRS4 protein expression is restricted to specific regions, including the brain, whereas IRS1 and IRS2 proteins are more ubiquitously expressed. Furthermore, the role of IRS4 in the brain remain largely unexplored although a role in brain metabolism is suggested (Sadagurski et al., 2014).

To date, no study suggested a possible functional link between 5-HT₄R and IRS4, but a study identified IRS4 as a cleavage target of ADAM30 by COFRADIC (COmbined FRActional DIagonal Chromotography) and a potential interacting partner of APP (Letronne et al., 2016). In addition, transcriptomic study identify the downregulation of the *Irs4* gene as the major event in the transition from the first to the second pathological stage in an APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease (Jackson et al., 2013). A less stringent analysis (including the proteins identified in at least 2 experiments out of 3) of the proteins co-immunoprecipitating with 5-HT₄R in our proteomic experiments revealed an probable interaction of the receptor with Insulin receptor (IR) and Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R). Because accumulating evidence suggests that disrupted brain insulin signaling is involved in the development and progression of AD, we decided to focus our study on the interaction between 5-HT₄R and IRS4.

Although IRS4 protein is highly expressed in HEK-293 cells where it has been discovered (Lavan et al., 1997), it is one of the most enriched proteins in our proteomic screen (D = 6.39, P = 1.84). We confirmed the interaction by Western blotting of co-immunoprecipitations showing that IRS4 preferentially interacts with 5-HT₄R compared to 5-HT₆R, and that this interaction is independent of the activation state of the receptor. We then performed immunofluorescence experiments in HEK-293 cells to identify the subcellular compartments where IRS4 and 5-HT₄R colocalize, and whether the expression of 5-HT₄R could affect the localization of IRS4. Our data show that IRS4 and 5-HT₄R colocalize at the plasma membrane

in clusters where IRS4 is relocalized upon 5-HT₄R expression. These results strongly suggest a functional link between 5-HT₄R and IRS4. The intriguing increase in IRS4 location within the nucleus of 5-HT₄R expressing cells, requires further experiments to understand what could be the roles of IRS4 in the nucleus.

In a first set of experiments, we assessed whether activation of the 5-HT₄R could affect the phosphorylation state of IRS4, indicating an activation or an inhibition of the protein, by immunoprecipitation and Western blotting using an antibody able to detect the phosphorylation of IRS4 on tyrosines (data not shown). We concluded that stimulation of the 5-HT₄R with agonists or treatment with inverse agonists did not change the phosphorylation state of IRS4. We then hypothesized that IRS4 could play a role in 5-HT₄R expression or signaling, acting like a scaffold protein. The overexpression of IRS4 had no effect on the total level of 5-HT₄R co-expressed in HEK-293 cells. Moreover, this overexpression had no impact on two signaling pathways, one G-protein dependent (cAMP production) and one G-protein independent (ERK1/2 activation). HEK-293 cells already expressing high amount of IRS4 protein, this could explain the moderate effects on 5-HT₄R addressing to the plasma membrane and the absence of effects on 5-HT₄R signaling. It would be interesting to look in native cells expressing endogenously the receptor, such as colliculi neurons in primary culture (Dumuis et al., 1988), whether IRS4 is expressed and if an overexpression can have an impact on 5-HT₄R signaling.

We then downregulated IRS4 expression in HEK-293 cells using RNA interference and evaluated 5-HT₄R expression, cAMP production and ERK phosphorylation upon activation of the receptor by BIMU8, a selective 5-HT₄R full agonist. Surprisingly, a 30% downregulation of IRS4 expression was able to strongly increase total 5-HT₄R expression (80% increase). As a consequence, cAMP production increased in presence of IRS4 siRNA. These results clearly suggest a role of IRS4 either on the traduction of the 5-HT₄R or on its degradation. Several studies showed a link between IRS4 and ubiquitin-dependent degradation pathways. A pioneer work studied the interactome of IRS4 by performing co-immunoprecipitation of IRS4 in HEK-293 cells followed by mass spectrometry. Among the proteins identified in this proteomic screen, two of the most enriched in IRS4 immunoprecipitates were a deubiquitinating enzyme and Hsp70, a chaperonne protein involved in protein degradation by addressing uncorrectly folded proteins to the proteasome (Sano et al., 2002). Another study identified IRS4 as a novel ubiquitin-specific protease 18 (USP18)-binding protein (Jiao et al., 2017). Thus, it should be of interest to study the ubiquitination state of the 5-HT₄R in the presence or in the absence of IRS4.

Another intriguing result is the fact that despite an increase in total 5-HT₄R amount, the ERK1/2 activation was unaffected. This may reflect either a saturating effect of downstream ERK phosphorylation, or compensatory mechanisms, as ERK is a signal integrator from many actors belonging to the insulin signaling pathway. A time-course assessment of ERK activation would also be required to monitor precisely the effect of IRS4 on this pathway.

Regarding the second hypothesis, where IRS4 could be a regulator of 5-HT₄R traduction, the immunofluorescence experiments show a nuclear localization of IRS4 when the 5-HT₄R is expressed which is not the case in the control condition (Mock cells). This nuclear localization of IRS4 is consistent with a role of IRS4 as a regulator of 5-HT₄R DNA transcription, where it could interact with proteins involved in this process. Indeed, a well described role of the insulin signaling pathway is to regulate protein traduction (Virkamäki et al., 1999).

To conclude, the current study describing the identification of the 5-HT₄R-associated network by AP-MS, reinforces the connections of the receptor with proteins involved in APP trafficking and point out novel partners connecting the receptor with the insulin signaling that is deregulated in Alzheimer's disease. Further work is needed to decipher whether acting pharmacologically on the receptor could alleviate defects of this signaling in the disease.

5. References

- Baranger, K., Giannoni, P., Girard, S. D., Girot, S., Gaven, F., Stephan, D., ... Roman, F. S. (2017). Chronic treatments with a 5-HT₄ receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 126, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.031>
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2008). 5-HT₄ receptors: History, molecular pharmacology and brain functions. *Neuropharmacology*, 55(6), 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.013>
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2011). 5-HT₄ receptors, a place in the sun: Act two. *Current Opinion in Pharmacology*, Vol. 11, pp. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.01.012>
- Bockaert, J., Perroy, J., Bécamel, C., Marin, P., & Fagni, L. (2010). GPCR Interacting Proteins (GIPs) in the Nervous System: Roles in Physiology and Pathologies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 89–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105705>
- Choy, R. W. Y., Park, M., Temkin, P., Herring, B. E., Marley, A., Nicoll, R. A., & Von Zastrow, M. (2014). Retromer mediates a discrete route of local membrane delivery to dendrites. *Neuron*, 82(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.018>
- Civciristov, S., Huang, C., Liu, B., Marquez, E. A., Gondin, A. B., Schittenhelm, R. B., ... Halls, M. L. (2019). Ligand-dependent spatiotemporal signaling profiles of the μ -opioid receptor are controlled by distinct protein-interaction networks. *Journal of Biological Chemistry*, 294(44), 16198–16213. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008685>
- Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., ... Claeysen, S. (2013). 5-HT₄ receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(1), 130–140. <https://doi.org/10.1021/cn300095t>
- Cox, Jürgen, & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Cox, Jürgen, Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., & Mann, M. (2011). Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>

- Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., Cory, R., & Bockaert, J. (1988). A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Molecular Pharmacology*, 34(6).
- Dunn, H. A., & Ferguson, S. S. G. (2015, October 1). PDZ protein regulation of g protein-coupled receptor trafficking and signaling pathways. *Molecular Pharmacology*, Vol. 88, pp. 624–629. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098509>
- Egea, J., & Klein, R. (2007, May). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in Cell Biology*, Vol. 17, pp. 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.03.004>
- Esseltine, J. L., & Ferguson, S. S. G. (2013). Regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling by Rab GTPases. *Small GTPases*, Vol. 4, pp. 132–135. <https://doi.org/10.4161/sgtp.24304>
- Fantin, V. R., Lavan, B. E., Wang, Q., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., ... Lienhard, G. E. (1999). Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology*, 140(3), 1329–1337. <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6578>
- Fantin, V. R., Sparling, J. D., Slot, J. W., Keller, S. R., Lienhard, G. E., & Lavan, B. E. (1998). Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10726–10732. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10726>
- Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Progress in Hormone Research*, 51, 319–351. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1440>
- Jackson, H. M., Soto, I., Graham, L. C., Carter, G. W., & Howell, G. R. (2013). Clustering of transcriptional profiles identifies changes to insulin signaling as an early event in a mouse model of Alzheimer's disease. *BMC Genomics*, 14, 831. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-831>
- Jiao, B., Shi, X., Chen, Y., Ye, H., Yao, M., Hong, W., ... Chen, L. (2017). Insulin receptor substrate-4 interacts with ubiquitin-specific protease 18 to activate the Jak/STAT signaling pathway. *Oncotarget*, 8(62), 105923–105935. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22510>
- Kennedy, J. E., & Marchese, A. (2015). Regulation of GPCR trafficking by ubiquitin. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 132, 15–38. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.02.005>
- Kulla, A., & Manahan-Vaughan, D. (2002). Modulation by serotonin 5-HT₄ receptors of long-term potentiation and depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Cerebral*

- Cortex*, 12(2), 150–162. <https://doi.org/10.1093/cercor/12.2.150>
- Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 3, pp. 475–486.
<https://doi.org/10.1038/nrm856>
- Lavan, B. E., Fantin, V. R., Chang, E. T., Lane, W. S., Keller, S. R., & Lienhard, G. E. (1997). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21403–21407. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21403>
- Lefkowitz, R. J. (2005). Summary of Wenner-Gren international symposium receptor-receptor interactions among heptaspanning membrane receptors: from structure to function. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 26(2–3), 293–294.
<https://doi.org/10.1385/JMN:26:2-3:293>
- Letronne, F., Laumet, G., Ayral, A. M., Chapuis, J., Demiautte, F., Laga, M., ... Lambert, J. C. (2016). ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation in Alzheimer's Disease. *EBioMedicine*, 9, 278–292.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.002>
- Madsen, K., Neumann, W. J., Holst, K., Marner, L., Haahr, M. T., Lehel, S., ... Hasselbalch, S. G. (2011). Cerebral serotonin 4 receptors and amyloid- β in early Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(3), 457–466. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110056>
- Medhurst, A. D., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., Middlemiss, D. N., & Sanger, G. J. (2001). Quantitative mRNA analysis of five C-terminal splice variants of the human 5-HT₄ receptor in the central nervous system by TaqMan real time RT-PCR. *Molecular Brain Research*, 90(2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00095-X)
- Miller, W. E., & Lefkowitz, R. J. (2001). Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2), 139–145. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00190-3](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00190-3)
- Mueller, H. T., Borg, J. P., Margolis, B., & Turner, R. S. (2000). Modulation of amyloid precursor protein metabolism by X11 α /Mint-1: A deletion analysis of protein-protein interaction domains. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39302–39306.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008453200>
- Nizzari, M., Venezia, V., Repetto, E., Caorsi, V., Magrassi, R., Gagliani, M. C., ... Russo, C. (2007). Amyloid precursor protein and presenilin1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK1,2 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13833–13844.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M610146200>

- Nooh, M. M., Chumpia, M. M., Hamilton, T. B., & Bahouth, S. W. (2014). Sorting of β 1-adrenergic receptors is mediated by pathways that are either dependent on or independent of type i PDZ, protein kinase A (PKA), and SAP97. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 2277–2294. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513481>
- Numan, S., & Russell, D. S. (1999). Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 72(1), 97–102. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(99\)00160-6](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(99)00160-6)
- Olsen, J. V., de Godoy, L. M. F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., ... Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(12), 2010–2021. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200>
- Pratt, R. L., & Kinch, M. S. (2002). Activation of the EphA2 tyrosine kinase stimulates the MAP/ERK kinase signaling cascade. *Oncogene*, 21(50), 7690–7699. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205758>
- Rabilloud, T. (2009, June). Membrane proteins and proteomics: Love is possible, but so difficult. *Electrophoresis*, Vol. 30. <https://doi.org/10.1002/elps.200900050>
- Reynolds, G. P., Mason, S. L., Meldrum, A., De Keczer, S., Parties, H., Eglen, R. M., & Wong, E. H. F. (1995). 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *British Journal of Pharmacology*, 114(5), 993–998. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13303.x>
- Sadagurski, M., Dong, X. C., Myers, M. G., & White, M. F. (2014). Irs2 and Irs4 synergize in non-LepRb neurons to control energy balance and glucose homeostasis. *Molecular Metabolism*, 3(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.004>
- Sano, H., Liu, S. C. H., Lane, W. S., Piletz, J. E., & Lienhard, G. E. (2002). Insulin receptor substrate 4 associates with the protein IRAS. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19439–19447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111838200>
- Saraceno, C., Marcello, E., Di Marino, D., Borroni, B., Claeysen, S., Perroy, J., ... Di Luca, M. (2014). SAP97-mediated ADAM10 trafficking from Golgi outposts depends on PKC phosphorylation. *Cell Death and Disease*, 5(11). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.492>
- Schenk, D. (2000, September). Alzheimer's disease: A partner for presenilin. *Nature*, Vol. 407, pp. 34–35. <https://doi.org/10.1038/35024194>
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2003). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-

coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14498–14506.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M209626200>

Thouvenot, E., Urbach, S., Dantec, C., Poncet, J., Séveno, M., Demettre, E., ... Marin, P. (2008). Enhanced detection of CNS cell secretome in plasma protein-depleted cerebrospinal fluid. *Journal of Proteome Research*, 7(10), 4409–4421.

<https://doi.org/10.1021/pr8003858>

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., ... Cox, J. (2016, August 30). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, Vol. 13, pp. 731–740.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>

Virkamäki, A., Ueki, K., & Kahn, C. R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 103, pp. 931–943. <https://doi.org/10.1172/JCI6609>

Wagener, B. M., Marjon, N. A., Revankar, C. M., & Prossnitz, E. R. (2009). Adaptor protein-2 interaction with arrestin regulates GPCR recycling and apoptosis. *Traffic*, 10(9), 1286–1300. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00957.x>

Warner-Schmidt, J. L., Flajolet, M., Maller, A., Chen, E. Y., Qi, H., Svenningsson, P., & Greengard, P. (2009). Role of p11 in cellular and behavioral effects of 5-HT₄ receptor stimulation. *Journal of Neuroscience*, 29(6), 1937–1946.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5343-08.2009>

Discussion et perspectives

I- Développement technologique d'un procédé pour obtenir des nanobodies contre les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆

Les propriétés structurales, biophysiques et fonctionnelles des nanobodies en font des outils remarquables pour étudier la biologie des récepteurs couplés aux protéines G. En effet, le manque d'anticorps efficaces pour cibler de nombreux RCPG, particulièrement ceux de classe A est depuis longtemps un frein à la recherche dans ce domaine. De plus, la capacité des nanobodies à stabiliser les régions flexibles a permis leur utilisation en tant que chaperonnes de cristallisation pour résoudre plusieurs structures de RCPG (Che et al., 2018; Sören G.F. Rasmussen et al., 2011). Ces propriétés stabilisatrices de conformations spécifiques de RCPG leur confèrent également des propriétés pharmacologiques. Leur utilisation en thérapeutique humaine est donc envisagée, plus particulièrement dans le traitement des pathologies neurologiques, grâce à leur capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique.

Les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆, RCPG de classe A faiblement immunogènes, font partie de ces récepteurs pour lesquels il n'existe pas d'anticorps fiables et efficaces disponibles sur le marché. Paradoxalement, les outils pharmacologiques pour étudier ces récepteurs ne manquent pas mais les outils immunologiques font défaut. Cet aspect est très contraignant pour leur étude en système natif. Ainsi, le marquage immunohistochimique chez la souris ou les études biochimiques dans des systèmes cellulaires exprimant les récepteurs de manière endogène est rendu impossible. La difficulté à générer des anticorps contre ces récepteurs provient de la petite taille de leur domaine extracellulaire (15 et 26 acides aminés respectivement pour les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆). Pour augmenter nos chances d'obtenir des nanobodies contre les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆, nous avons choisi d'injecter au lama des membranes de cellules transfectées, afin que son système immunitaire soit exposé aux domaines intracellulaires et extracellulaires. Cette stratégie permettait de potentiellement obtenir des nanobodies dirigés contre la partie intracellulaire du récepteur (intrabodies), dont l'application en marquage immunologique aurait été limitée mais dont les propriétés pharmacologiques auraient été favorisées. En effet, de nombreux intrabodies ont été générés contre le récepteur β_2 -adrénergique et

possèdent tous des propriétés pharmacologiques, permettant de maintenir une conformation active ou inactive du récepteur (Staus et al., 2014b). Après immunisation du lama, en présence d'autres RCPG que les 5-HT₄ et 5-HT₆, une banque de phages contenant un répertoire de taille attendue a été obtenue (10¹² clones). La sélection a été effectuée par la technique du *panning* par *phage display*. L'avantage de cette technologie est le lien physique qui existe entre le phénotype et le génotype du phage tout au long du processus et la grande taille des répertoires générés. Le *panning* a été effectué en utilisant la même approche que pour l'immunisation du lama, c'est-à-dire l'utilisation de membranes de cellules pour sélectionner les phages. Après 3 tours de *panning*, une nouvelle banque de phages a été récupérée et utilisée pour le criblage. Après plusieurs essais en *ELISA* sur cellules ou sur membranes de cellules qui furent non-concluants, nous avons mis au point la technique de criblage par cytométrie de flux. Cette technique a permis d'identifier un clone positif du récepteur 5-HT₄ sur ce criblage, nommé A6, dont la séquence peptidique est fortement représentée dans le *masterblock* réalisé à partir de la banque de phages issue du tour 3 du *panning*. Cette surreprésentation du nanobody A6 peut s'expliquer par 2 hypothèses : soit celui-ci est effectivement un clone spécifique se liant au récepteur 5-HT₄ et il a donc été enrichi au cours du *panning*, soit c'est un clone qui se produit de manière supérieure à la moyenne. En effet, un des points négatifs du phage display est qu'il a tendance à contre-sélectionner les nanobodies dont l'efficacité de production est faible, au profit de ceux qui se produisent le mieux. Ce phénomène conduit à une perte de diversité en nanobodies spécifiques à chaque tour d'enrichissement. Etant donné qu'il n'a pas été possible de valider la liaison de ce nanobody A6 par d'autres techniques, en Western Blot, immunofluorescence (résultats non montrés), tests fonctionnels (AMPc, interaction avec la β -arrestine 2 en BRET) et TR-FRET, il semble judicieux de recribler les banques de phages obtenues lors du tour 2 voire du tour 1 du *panning*. La méthode d'exposition des phages à l'antigène est également un des éléments clés de la réussite d'un *panning* (Pardon et al., 2014). Notre méthode d'exposition des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆ n'était peut-être pas la plus optimale lors du *panning*. En effet, les cellules Sf9 par exemple, sont connues pour produire de très grandes quantités de protéines recombinantes et sont d'ailleurs utilisées en biologie structurale (Parker et al., 1991; Zhao & Wu, 2012). Leur utilisation aurait peut-être favorisé la quantité d'antigène exposée aux phages, et donc augmenté les chances de sélectionner des phages spécifiques des récepteurs. L'idéal aurait sans doute été d'utiliser des récepteurs

5-HT₄ et 5-HT₆ purifiés, permettant de s'affranchir de clones faux-positifs comme le nanobody A6. Une autre stratégie de présentation de l'antigène implique l'utilisation de virus-like particles (VLPs), qui sont des particules non-infectieuses contenant en leur cœur une protéine virale entourée d'une bicouche lipidique dans laquelle peut être insérée une protéine transmembranaire dans sa conformation native. Ces VLP sont très utilisés comme alternative aux cellules dans les procédures de *phage display* et de *yeast display*. En effet, la concentration de la protéine d'intérêt à la surface des VLP est très largement supérieure à celle retrouvée dans les cellules vivantes, ce qui fait des VLP un outil remarquablement utile pour sélectionner et cribler des nanobodies contre des cibles transmembranaires complexes telles que les RCPG (van der Woning et al., 2016). Une autre méthode pour immuniser le lama aurait été de lui inoculer de l'ADNc codant pour les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆. Cette technique, connue pour son utilisation dans la fabrication de vaccins, peut aussi être utilisée pour générer des anticorps et des nanobodies. En effet, l'immunisation avec de l'ADNc peut stimuler le système immunitaire inné et adaptatif, et ainsi générer de hauts niveaux de réponse immunitaire contre l'antigène codé par l'ADNc. Ce dernier va être produit et présenté aux lymphocytes T par le complexe majeur d'histocompatibilité, ce qui va permettre le développement de lymphocytes B spécifiques à l'antigène codé par l'ADNc. L'avantage d'utiliser cette technique pour les RCPG est que les domaines intracellulaire et extracellulaire seront tous deux exposés aux lymphocytes, générant potentiellement des nanobodies extracellulaires mais aussi des intrabodies. L'immunisation génique par injection d'ADNc codant pour le récepteur h5-HT₄ a cependant été préalablement testée dans l'équipe sur des souris, sans succès, et ce même en immunisant des souris déficientes en récepteur 5-HT₄, ce qui démontre la faible immunogénécité de ce récepteur. La combinaison de l'immunisation du lama par injection d'ADNc et le *panning* par *phage display* sur des VLP a par exemple permis la génération d'un nanobody dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur CXCR4, un RCPG de classe A ayant un domaine N-terminal de 29 acides aminés, qui possède des propriétés antagonistes (Bobkov, van der Woning, et al., 2018; Bobkov, Zarca, et al., 2018).

Une technique de criblage des intrabodies par TR-FRET a été mise au point durant ce travail de thèse qui semble adaptée à l'identification rapide de clones positifs. Il reste néanmoins à valider cette méthodologie avec un intrabody purifié comme le nanobody Nb72 ou le nanobody Nb80, des intrabodies dirigés contre le récepteur

β_2 -adrénergique (Staus et al., 2014). Nous avons réalisé des constructions codant pour ces clones à partir des séquences des CDR1, CDR2 et CDR3 publiées mais il n'a pas été possible de les produire dans les souches *E. Coli* BL21 (Staus et al., 2014). En effet, certains nanobodies ont la propriété intrinsèque de s'exprimer faiblement dans certaines souches d'*E. Coli*. Il serait donc préférable de réaliser cette purification à nouveau dans la souche WK6, qui est celle permettant généralement d'obtenir les meilleurs rendements et qui a été utilisée pour générer les nanobodies Nb72 et Nb80 (Pardon et al., 2014; Staus et al., 2014).

Enfin, il est légitime de se questionner sur la qualité de la banque de phages obtenue après immunisation du lama. Un panning et un criblage ont été effectués par une autre équipe sur le récepteur 5-HT_{2A}, avec lequel le lama a également été immunisé, mais il n'a pas été possible d'obtenir de nanobodies ciblant ce récepteur.

II- Réseaux de protéines associés au récepteur 5-HT₄

L'analyse des réseaux de protéines associés au récepteur 5-HT₄ a permis d'identifier des protéines appartenant à la voie de signalisation de l'insuline, notamment la protéine IRS4 qui interagit spécifiquement avec le récepteur et semble réguler son expression. En effet, après avoir validé l'interaction du récepteur 5-HT₄ avec IRS4 par des approches de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence, nous avons montré qu'une diminution de l'expression de IRS4 avait une influence sur l'expression et la signalisation G_s-dépendante du récepteur 5-HT₄. Ces résultats suggèrent pour IRS4 un rôle de protéine d'échaffaudage ou de contrôle qualité et de régulateur de la signalisation du récepteur 5-HT₄. Des résultats antérieurs de l'équipe ont montré l'existence d'un complexe composé du récepteur 5-HT₄, de l'APP et de l'alpha-sécrétase ADAM10 (Cochet et al., 2013). Il semblerait que ce complexe soit formé au niveau du réticulum endoplasmique et qu'il soit ensuite acheminé à la membrane plasmique. Ce complexe comporterait d'autres protéines partenaires capables de réguler le trafic intracellulaire du complexe 5-HT₄/APP/ADAM10. IRS4, de part sa capacité à moduler l'expression du récepteur 5-HT₄, pourrait être l'une de ces protéines. En effet, une étude récente suggère également que IRS4 pourrait être un interacteur de l'APP (Letronne et al., 2016). Une étude plus ancienne suggérait que les effets neurotrophiques de l'APP, qui sont désormais identifiés comme étant induits

par le sAPP α , passent par la voie de signalisation de l'insuline et notamment la protéine IRS1 (Wallace et al., 1997). Néanmoins, des expériences complémentaires restent à réaliser pour reproduire ces résultats de la littérature. Le mécanisme par lequel IRS4 module l'expression du récepteur 5-HT $_4$ ou son adressage à la membrane plasmique n'a pas encore été élucidé. Des expériences d'interaction utilisant des plasmides codant pour le récepteur 5-HT $_4$ présentant un domaine C-terminal tronqué pourraient être réalisées afin de voir si cette région est impliquée dans l'interaction avec IRS4. Par ailleurs, des réactifs capables de tracer la dé-ubiquitination par fluorescence sont disponibles et pourraient valider ou infirmer notre hypothèse concernant IRS4 (Leestemaker & Ova, 2017). D'autre part, une interaction entre IRS4 et l'APP reste à mettre en évidence par des expériences de colocalisation par immunofluorescence ou de co-immunoprécipitation.

Par ailleurs, d'autres protéines à domaine PDZ identifiées comme interacteurs du récepteur 5-HT $_4$ sont impliquées dans le trafic des RCPG et pourraient jouer un rôle dans la modulation de la localisation du complexe : IQGAP1, SAP97 ou encore MPP6. Selon plusieurs études, la protéine SAP97 serait un régulateur du trafic d'ADAM10 et promouvrait son activité (Marcello et al., 2007). Une diminution de cette interaction entre SAP97 et ADAM10 a d'ailleurs observée dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Marcello et al., 2012). Il serait intéressant de jouer sur la modulation de l'expression de ces partenaires pour voir les effets sur la localisation, la signalisation ou l'expression du récepteur 5-HT $_4$ ainsi que du complexe associé.

Une analyse moins stringente des protéines partenaires identifiées en spectrométrie de masse, c'est-à-dire, en incluant des protéines significativement enrichies dans au moins deux expériences sur trois (condition 5-HT $_4$ R vs. Mock), permet l'identification d'un enrichissement significatif en protéines ayant pour rôle biologique la modulation du trafic intracellulaire (par analyse des termes *Gene Ontology* ou GO) (Figure 40).

Ces résultats sont concordants avec la régulation fine connue des RCPG au niveau de leur localisation subcellulaire mais suggèrent également que d'autres protéines d'intérêt dans la modulation du trafic du récepteur 5-HT $_4$ et donc de son complexe restent à identifier. Cette classification des processus biologiques significativement surreprésentés suggère d'autres fonctions moins connues du récepteur 5-HT $_4$. Par exemple, plusieurs protéines associées au récepteur 5-HT $_4$ semblent impliquées dans la régulation du système immunitaire ou dans la prolifération des progéniteurs des

oligodendrocytes, cellules ayant pour fonction de former une gaine de myéline autour des axones du système nerveux central (Figure 40).

Pour conclure, ce travail de thèse mené à l'aide de deux technologies de pointe distinctes permet de proposer d'une part, une méthode de criblage innovante par HTRF® pour identifier rapidement les intrabodies se liant à des RCPG et d'autre part, de nouveaux acteurs du réseau de protéines associées au récepteur 5-HT₄. Ces derniers partenaires confirment la connection du récepteur avec des protéines associées à l'APP et dévoilent ses interactions avec la signalisation de l'insuline. Le métabolisme de l'APP et la signalisation de l'insuline étant deux mécanismes dérégulés dans la maladie d'Alzheimer, nos travaux confortent l'intérêt thérapeutique potentiel de la modulation du récepteur 5-HT₄ et de ses partenaires dans le contexte de cette pathologie.

GO processus biologique	Facteur d'enrichissement	P-value	FDR
Negative regulation of adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway involved in heart process (GO:0140199)	76.07	9.89E-04	2.52E-02
Modulation by symbiont of host defense response (GO:0052031)	76.07	9.89E-04	2.51E-02
Modulation by virus of host immune response (GO:0075528)	76.07	9.89E-04	2.51E-02
Cochlear nucleus development (GO:0021747)	50.71	1.63E-03	3.79E-02
Negative regulation of adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway (GO:0071878)	50.71	1.63E-03	3.78E-02
Modulation by symbiont of host immune response (GO:0052553)	50.71	1.63E-03	3.78E-02
Protein localization to cell leading edge (GO:1902463)	50.71	1.63E-03	3.77E-02
Regulation of adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway involved in heart process (GO:0140192)	50.71	1.63E-03	3.77E-02
Neurotransmitter receptor transport postsynaptic membrane to endosome (GO:0098968)	50.71	1.63E-03	3.76E-02
Axial mesoderm morphogenesis (GO:0048319)	50.71	1.63E-03	3.76E-02
Sphingolipid translocation (GO:0099039)	50.71	1.63E-03	3.75E-02
Positive regulation of protein localization to cell cortex (GO:1904778)	38.04	1.71E-04	5.92E-03
Positive regulation of protein localization to early endosome (GO:1902966)	33.81	1.81E-05	8.16E-04
Regulation of protein localization to early endosome (GO:1902965)	33.81	1.81E-05	8.13E-04
Cardiac muscle cell-cardiac muscle cell adhesion (GO:0086042)	32.60	2.42E-04	7.97E-03
Low-density lipoprotein particle receptor catabolic process (GO:0032802)	30.43	2.51E-05	1.08E-03
Positive regulation of early endosome to late endosome transport (GO:2000643)	28.53	3.30E-04	1.04E-02
Low-density lipoprotein receptor particle metabolic process (GO:0032799)	27.66	3.38E-05	1.40E-03
Establishment of centrosome localization (GO:0051660)	25.36	4.36E-04	1.29E-02
Positive regulation of protein localization to endosome (GO:1905668)	25.36	4.46E-05	1.78E-03
Regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation (GO:0070445)	25.36	4.36E-04	1.29E-02
Regulation of protein localization to cell cortex (GO:1904776)	25.36	4.36E-04	1.29E-02
Early endosome to Golgi transport (GO:0034498)	25.36	4.36E-04	1.29E-02
Negative regulation of calcium ion-dependent exocytosis (GO:0045955)	25.36	4.36E-04	1.28E-02
Regulation of defense response to virus by virus (GO:0050690)	23.61	1.07E-09	1.16E-07
Regulation of protein localization to endosome (GO:1905666)	23.41	5.78E-05	2.20E-03
Cytoskeletal anchoring at plasma membrane (GO:0007016)	22.82	5.61E-04	1.60E-02
Pigment granule maturation (GO:0048757)	22.82	5.61E-04	1.59E-02
Endosome to pigment granule transport (GO:0043485)	22.82	5.61E-04	1.59E-02
Endosome to melanosome transport (GO:0035646)	22.82	5.61E-04	1.59E-02

Figure 40 : Classement des 30 premiers termes GO significativement surreprésentés dans la liste des partenaires du récepteur 5-HT₄

D'après la *Gene Ontology database* de *The Gene Ontology Consortium* (www.geneontology.org)

Matériels et méthodes

I- Transfections

Dans les cellules COS-7, la transfection de l'ADNc a été réalisée par électroporation à 70-80% de confluence comme précédemment décrit (Claeysen et al., 1999). Les cellules HEK-293 étant plus fragiles, leur transfection a été réalisée avec de la Polyéthylèneimine (PEI) comme décrit dans la partie matériel et méthodes de l'article-1.

II- Préparation des membranes

Les cellules ont été lavées sur glace deux fois au PBS froid puis grattées dans 3 ml de PBS. Après une centrifugation de 5 min à 500 g (à 4°C), le surnageant a été éliminé. Le culot a été remis en suspension dans 1 ml d'une solution contenant 50 mM d'Hépès, 5 mM d'EGTA (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*), 1 mM d'EDTA (*Ethylenediaminetetraacetate*) et 10% (v/v) de sucrose puis broyé avec un Potter-Elvehjem de Kontes. Après une centrifugation de 20 min à 15000 g (à 4°C), le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 500 µl d'Hépès 50 mM, pH 7.4.

III- Panning sur membranes

La veille du premier tour de panning, 4 puits d'une plaque 96 puits Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific, #44-2404-21) ont été incubés avec 100 µg de membranes de cellules non transfectées dans du PBS pour les puits servant à dépléter la banque de phages (2 puits de membranes de cellules COS-7 et 1 puit de membranes de cellules HEK-293) et 100 µg de membranes de cellules transfectées pour les puits servant à sélectionner les phages. La plaque a été incubée à 4°C sur la nuit. Le lendemain, 10^{11} à 10^{12} phages ont été repris dans 100 µl d'une solution de PBS-lait 2%. Les puits de cellules pour la phase déplétion ont été lavés 3 fois en PBS, puis ils ont été successivement incubés avec les 100 µl de la solution de phages pendant une heure à température ambiante. Pendant ce temps, le puit servant à sélectionner les phages a été bloqué avec une solution de PBS-lait 2% (v/w). Après déplétion dans les 3 premiers puits, le puit contenant les membranes de cellules transfectées pour exprimer le récepteur d'intérêt a été incubé avec la solution de phages pendant 2 heures à température ambiante. Le puit a ensuite été lavé 20 fois avec du PBS puis

les phages ont été élués avec 100 µl d'une solution de Tris 50 mM pH 8, 1mM de CaCl₂, 1 µg/µl de trypsine pendant 30 minutes sous agitation sur une plateforme vibrante (700 rpm). Les 100 µl de phages élués ont été incubés pendant une heure à 37°C avec 200 µl de bactéries TG1 en phase exponentielle sans agitation. La culture a ensuite été centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes à température ambiante et le surnageant a été éliminé. Le culot a été repris dans 500 µl de milieu 2xTY (16 g/l de tryptone, 5 g/l de NaCl, 10 g/l d'extrait de levure) contenant 100 µg/ml d'ampiciline et 2% (v/v) de glucose et incubé la nuit à 30°C sous agitation.

Le lendemain, 20 µl de la culture ont été incubés avec 1 ml de 2xTY contenant 100 µg/ml d'ampiciline et 2% (v/v) de glucose à 37°C sous agitation. Le reste de la culture a été conservé à -80°C avec 15% (v/v) de glycérol. Après l'incubation, la culture a été infectée avec le *phage helper* M13 ajouté 20 fois en excès ($2 \cdot 10^9$ phages), puis le tube a été centrifugé à 3000 g pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 2,5 ml de 2xTY contenant 100 µg/ml d'ampiciline, 100 µg/ml d'ampiciline et 25 µg/ml de kanamycine. La culture a été incubée toute la nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain, la culture a été centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C puis le surnageant a été mélangé par retournement avec 500 µl d'une solution de PEG (Poly Ethylène Glycol) -6000 20% (v/v) et de NaCl 2,5 M avant d'être incubé sur glace pendant 30 minutes pour précipiter les phages. Le tube a ensuite été centrifugé à 10000 g pendant 10 minutes à 4°C et le PEG a été éliminé. Les phages ont été resuspendus dans 500 µl d'une solution de PBS contenant 15% (v/v) glycérol et stockés à -80°C en attendant le prochain tour de *panning*.

IV- Préparation des extraits périplasmiques des nanobodies

A partir du *masterblock* conservé à -80°C, 15µL de bactéries ont été inoculées dans 435 µl de milieu 2xTY contenant 100 µg/ml d'ampicilline dans un nouveau *masterblock* et incubées à 37°C pendant 2h30 sous agitation (jusqu'à obtenir une $DO_{600nm} = 0.5-0.7$). Pour chaque puit, 50 µL d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) dilué dans du 2xTY a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 100 µM et les *masterblocks* ont été incubés sur la nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain, le *masterblock* a été centrifugé à 3200 g pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été congelés à -20°C pendant au moins 30 minutes. Les culots ont ensuite été décongelés pendant 15 minutes à température ambiante puis entre 110 et

210 µL de PBS a été ajouté dans les puits (en fonction du volume nécessaire pour les étapes de criblage). Le *masterblock* a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante sur une plateforme vibrante (700 rpm). Les débris bactériens ont été culottés avec une centrifugation à 3200 *g* pendant 10 minutes à 4°C. A cette étape, le surnageant contient les extraits périsplasmiques de nanobodies.

V- Criblage par cytométrie en flux

48 heures après transfection, les cellules ont été lavées dans du PBS puis décollées avec 1 ml d'une solution de PBS-EDTA 5 mM. Les cellules ont été centrifugées 3 minutes à 1500 rpm et à 4°C puis ont été bloquées dans 200 µl d'une solution de PBS-BSA (*Bovine Serum Albumine*) 0,1% pendant 30 minutes sur glace. Les cellules ont été ensuite lavées dans 4 ml de PBS-BSA 0,1% puis centrifugées 3 minutes à 1500 rpm et à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été incubées avec 100 µl de la solution de PBS contenant les extraits périsplasmiques des nanobodies et 100 µl de PBS-BSA 0,1% pendant 1 heure sur glace. Après un nouveau cycle de lavage-centrifugation-élimination du surnageant, les cellules ont été incubées avec 100 µl d'anticorps anti-Histidine dilué au 1/300 dans du PBS-BSA 0,1% pendant 1 heure sur glace. Après un autre cycle de lavage-centrifugation-élimination, les cellules ont été incubées avec 100 µl d'anticorps anti-mouse Alexa 488 dilué au 1/100 dans du PBS-BSA 0,1% et 0,5 µl d'IP (Iodure de Propidium) 1X pendant 1 heure sur glace. Après un nouveau cycle de lavage-centrifugation-élimination les cellules ont été resuspendues dans 250 µl de PBS-BSA 0,1%. Les cellules ont été analysées sur un cytomètre analyseur Miltenyi Macs Quant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). 10000 cellules ont été analysées et triées en fonction des paramètres FSC (*Forward Scatter* ou faisceau incident) et SSC (*Side Scatter* ou diffusion latérale) pour sélectionner les cellules ayant une taille et une granulosité représentatives de l'échantillon. Les cellules ayant une fluorescence dans la longueur d'onde de l'IP ont été éliminées de l'analyse (cellules mortes).

VI- Criblage par HTRF® sur membranes de cellules et HTRF® sur cellules

Les membranes de cellules transfectées avec les récepteurs taggués SNAP ont été préparées comme décrit dans la partie II- et resuspendues dans 1 ml de tampon Tag-

lite® (Cisbio) contenant du BG-K2 dilué au 1/1000 puis incubées pendant 1 h à 4°C pour marquer le tag SNAP. Après 3 lavages dans du Tag-lite®, les membranes ont été resuspendues dans du Tag-lite® et réparties dans une plaque 96 puits-petit volume (Cisbio, 66PL96100) à raison de 5 µl par puit. 5 µl des extraits périplasmiques des nanobodies ont été rajoutés par puit. Les anticorps anti-FLAG D2 (dilution 1/62.5), anti-myc D2 (dilution 1/100), anti-His Tb (dilution 1/100) et anti-His D2 (dilution 1/100) ont été rajoutés à raison de 5 µl par anticorps en fonction des conditions pour un volume final de 20 µl dans le puit et la plaque a été incubée à 4°C sur la nuit. Le lendemain, le TR-FRET a été déterminé après lecture de la plaque au PHERAstar FS (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France) puis les données ont été extraites avec le logiciel Mars (BMG Labtech). Les expériences de TR-FRET sur cellules ont été faites de la même manière avec des cellules exprimant les récepteurs taggués HA et l'utilisation d'un anticorps anti-HA Tb (dilution 1/100) dans une plaque 96 puits à fond noir (Greiner Bio-one, Courtabœuf, France, #655076).

VII- Purification des nanobodies

Des bactéries *E. Coli* BL21 transformées avec les clones de nanobodies à purifier ont été mises en culture dans un volume de 1 L à 37°C jusqu'à atteindre une $DO_{600nm} = 0.5$ puis la production des nanobodies a été induite par ajout d'IPTG pour une concentration finale de 1 mM. Les bactéries ont été incubées à 28°C sur la nuit sous agitation. Le lendemain, les bactéries ont été centrifugées à 5000 *g* pendant 10 minutes et le surnageant a été éliminé. Les nanobodies contenus dans le périplasme ont été extraits par choc osmotique en les resuspendant dans une solution TES (0.2M Tris pH = 8, 0.5 mM EDTA et 0.5 M de Sucrose) puis incubés pendant une heure à 4°C sous agitation. Ils ont ensuite été incubés pendant une heure à 4°C sous agitation avec la solution TES diluée 4 fois dans de l'H₂O. Les débris bactériens ont été culottés par centrifugation à 10000 *g* pendant 30 minutes à 4°C. Les nanobodies ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité avec de la résine d'agarose Ni-NTA (Qiagen, Courtabœuf, France, #30210) selon les instructions du fabricant. L'éluat a ensuite été désalé pour enlever l'imidazole avec des colonnes de désalage PD-10 (GE Healthcare, Chiacago USA, 17085101) puis concentré avec des unités Amicon Ultra-15 centrifugal filter (*cutoff* à 3000 Dalton, Merck Millipore, Molsheim, France, #UFC900396). L'évaluation de la qualité de la purification a été effectuée par dosage

des protéines au Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific) et par coloration au Bleu de Coomassie après migration du nanobody sur un gel de polyacrylamide.

VIII- BRET

50000 cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur 5-HT₄-YFP et la RLuc8- β -arrestine 2 ont été ensemencées dans une plaque 96 puits à fond blanc (Greiner Bio One, #655074) préalablement traitée à la Poly-Ornithine 1X. Après 24 heures, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS et de la Coelenterazine a été ajoutée dans les puits pour une concentration finale de 5 μ M. Immédiatement après l'ajout du ligand ou du PBS, la plaque a été lue à 37°C sur un Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Versailles, France) qui permet l'intégration séquentielle de 2 signaux lumineux détectés avec 2 paramètres de filtres (filtre RLuc/NLuc, 485 \pm 20 nm ; filtre YFP, 530 \pm 25 nm). Les données ont été récoltées avec le logiciel MicroWin2000 (Berthold Technologies).

IX- Phage ELISA

Les puits d'une plaque Nunc MaxiSorp™ ont été incubés avec 100 μ g de membranes de cellules transfectées ou non (Mock) dans du PBS durant la nuit à 4°C. Le lendemain, les puits ont été lavés 5 fois avec du PBS et ont été bloqués avec une solution de PBS-lait 2% (w/v) pendant 2 heures à température ambiante. Les puits ont ensuite été lavés et incubés avec 10¹⁰ phages dans un volume final de 100 μ l de PBS-lait 2% pendant une heure à température ambiante. Les phages ont ensuite été éliminés et les puits ont été lavés 5 fois avec une solution de PBS-0.05% Tween 20 (v/v).

Annexes

Article 2.

Novel multi-targeted ligands targeting 5-HT₄ receptors with
in cellulo antioxydant properties as promising leads in
Alzheimer' s disease

Publié, Frontiers in Pharmacology



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's disease

Caroline Lanthier^a, Hugo Payan^b, Irene Liparulo^c, Bérénice Hatat^{a,b}, Cédric Lecoutey^a, Marc Since^a, Audrey Davis^a, Christian Bergamini^c, Sylvie Claeysen^b, Patrick Dallemagne^a, Maria-Laura Bolognesi^c, Christophe Rochais^{a,*}

^a Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, 14000, Caen, France

^b IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

^c Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, I-40126, Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2019

Received in revised form

19 July 2019

Accepted 5 August 2019

Available online 6 August 2019

Keywords:

Alzheimer's disease

5-HT₄ receptor

Antioxidant

Phenol

MTDL

ABSTRACT

Facing the complexity of Alzheimer's disease (AD), it is now currently admitted that a therapeutic pleiotropic intervention is needed to alter its progression. Among the major hallmarks of the disease, the amyloid pathology and the oxidative stress are closely related. We propose in this study to develop original Multi-Target Directed Ligands (MTDL) able to impact at the same time Aβ protein accumulation and toxicity of Reactive Oxygen Species (ROS) in neuronal cells. Such MTDL were obtained by linking on a central piperidine two scaffolds of interest: a typical aminochlorobenzophenone present in numerous 5-HT₄R agonists, and diverse antioxidant chemotypes. Interestingly, the most active compound **9g** possesses a K_i of 12.7 nM towards 5-HT₄R and an antioxidant activity *in vitro* and *in cellulo*.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and affects more than 50 million people worldwide [1]. More than a century after its discovery, AD is now characterized by synaptic dysfunction and synapse loss correlated with cognitive decline [2]. These dysfunction are supposed to be due to the presence of two peptide deposits in and around neuronal cells. The accumulation and aggregation of Aβ peptide is at the origin of the amyloid pathology whereas the neurofibrillary tangles are mainly composed of phosphorylated tau protein [3]. These lesions are generally associated with mitochondria dysfunction, an increase

inflammatory response and the presence of oxidative stress [4]. The latter was further particularly linked to the presence of amyloid aggregates which can produce Reactive Oxygen Species (ROS) in the presence of metal ions and which ultimately leads to neuronal cell death [5]. The control of ROS production is therefore of particular interest in the prevention or the treatment of AD.

Despite these progresses, the discovery and development of treatments with disease-modifying effect on AD remain one of the greatest challenges in drug discovery [6]. After numerous failures in clinical trials with compounds targeting mainly amyloid [7] or tau pathologies [8], it is now currently admitted that a pleiotropic approach is needed for this multifactorial neurodegenerative disease [9]. In order to impact several biological targets at the same time, single pleiotropic compounds, known as Multi-Target Directed Ligands (MTDLs) [10–12], have been developed during the last decade. Among them, many examples include compounds able to act on oxidative stress and on another target [13–15]. On the other hand, many examples have been described in order to limit amyloid pathology with numerous examples of MTDL acting on β-secretase inhibition [16], or inhibiting Aβ aggregation [14]. In

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; DCF, dichlorofluorescein; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; HAT, Hydrogen Atom Transfer; LA, Lipoic Acid; MTDL, multi-target directed ligands; ROS, Reactive Oxygen Species; SET, Single-Electron-Transfer; TBH, *tert*-butyl hydroxypoxide; TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

* Corresponding author.

E-mail address: christophe.rochais@unicaen.fr (C. Rochais).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>

0223-5234/© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

addition to those classical targets, the serotonergic system appears of particular interest, notably *via* the modulation of 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors [17,18]. The activation of 5-HT₄ receptors (5-HT₄R) with partial agonists, such as RS67333, is of particular interest as it can promote the non-amyloidogenic cleavage of Amyloid Protein Precursor (APP) and subsequently decrease the amyloid load in AD transgenic mice models [19,20]. In this context, we have in the past modulated the structure of RS67333 in order to introduce another target of choice for the treatment of AD such as acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity [21,22] or 5-HT₆R antagonism [23]. This two studies demonstrated that the replacement of the butyl chain of RS67333 by diverse alkyl moieties has limited impact on both the affinity and the pharmacological profile towards 5-HT₄R. A similar strategy has been recently followed in order to generate 5-HT₆R antagonists bearing antioxidant activities [24].

In this context, we would like to assess the possibility to introduce, on the central piperidine ring of the targeted structures (Fig. 1), various chemical moieties known to exhibit antioxidant activities. We postulate that such MTDL would be of particular interest combining, for the first time in a unique compound, antioxidant properties as well as 5-HT₄R agonism. Several antioxidant scaffolds were chosen for this proof of concept: polyphenol [25], hydroxycinnamic acid [26] and lipoic acid [27,28]. Following this strategy, the two pharmacophores, will be connected through a permanent linker in order to optimize the central distribution of the antioxidant moiety. Indeed, the presence of the piperidine as a linker appears essential for the 5-HT₄R activity and the generated compounds should possess physicochemical properties for CNS application.

The influence of these substitutions on 5-HT₄R affinity and the antioxidant activity of the resulting compounds could thus be assessed *in vitro* and *in cellulo*.

2. Results

2.1. Chemistry

According to our previous chemical studies, the precursor **7** appears as a central scaffold in the synthesis of RS67333 [22,23]. Compound **7** was synthesized in a three-step sequence through formation of a β -keto ester **2** by reaction between acid **1** (Scheme 1), activated *in situ* with CDI, and potassium 3-ethoxy-3-oxopropanoate [29,30]. Subsequent alkylation with a previously synthesized piperidine chain **6**, and followed by reaction with KOH in an EtOH/H₂O mixture provided a saponification-decarboxylation reaction to afford **7** [22]. From this precursor **7**, different moieties were linked, such as catechol, vanillin or isovanillin widely known for their antioxidant properties [31,32]. The first compounds **9a**, **9c**, **9d**, and **9f** were obtained by alkylation with the corresponding bromobenzyl derivatives at room temperature. A final debenzylation step was performed with HBr 33% in solution in acetic acid at

0 °C to obtain free alcohols derivatives **9b**, **9e**, and **9g** respectively.

The second goal was to link ferulic and lipoic acid (LA) described as powerful antioxidants in the literature [33–35]. In order to link LA and ferulic acid while maintaining the basicity of the nitrogen of the piperidine, an ethylamine linker was added. According to literature [23], an ethylamine linker has no influence on the 5-HT₄R affinity and allowed the availability of a free terminal amine for peptidic coupling. Once the intermediate **8** was obtained, several coupling reactions were performed with EDCI, HOBt as activators, to synthesize coupled products **10a** and **10b**. Due to the sensitivity of LA to air, light, and heat, reactions were performed in dry, cold and dark conditions.

2.2. In vitro evaluation

As previously mentioned, the main goal of our study was to discover a hit that will have sufficient antioxidant properties, as well as a good affinity toward 5-HT₄R. All the synthesized compounds, were tested on 5-HT₄R according to the Grossman et al. method [36]. The affinity toward the receptor was evaluated using a displacement assay of the tritiated ligand [³H]-GR113808, a specific and highly potent 5-HT₄R antagonist used to label specific binding sites in human brain.

Those compounds were also developed for their antioxidant properties and preliminary antioxidant *in vitro* test was also performed. Our attention was focused on two tests, DPPH, and ORAC [37]. The ORAC_H assay was conducted in an aqueous medium according to well-described procedure. It evaluates the antioxidant activity via a Hydrogen Atom Transfer (HAT) mechanism. Calculating the AUC of the fluorescence decrease for 1.5 h, quantitative and kinetic aspects are both taken into account. Here, phenol gifted compounds showed a moderate antioxidant activity compared with a TEAC ranged between Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid), the reference, and quercetin (Table 1), a natural polyphenol antioxidant. The DPPH assay was performed in an organic solvent and enabled the evaluation of antioxidant activity following a Single-Electron-Transfer (SET) mechanism. According to recent literature, our initial procedure was completed here by slight modifications to ensure a complete evaluation of our compounds. First calculation of the specific absorbance of DPPH subtracting the absorbance of others components in the solution was realized. The maximum effect was normalized using a high dose of Trolox® (375 μ M) to get the absolute EC₅₀ [38]. The kinetic analysis to reach the plateau of % DPPH RSA at infinite time was determined and EC₅₀ were calculated using linear or non-linear regression ($R^2 > 0.98$) from the dose-effect curves.

In these conditions, Trolox® and quercetin reached their maximal antioxidant activity very quickly (immediately and few minutes respectively) compared to other active compounds ($T_{1/2}$ about 30 min). Their dose-effect curve was a linear ($R^2 > 0.99$). In

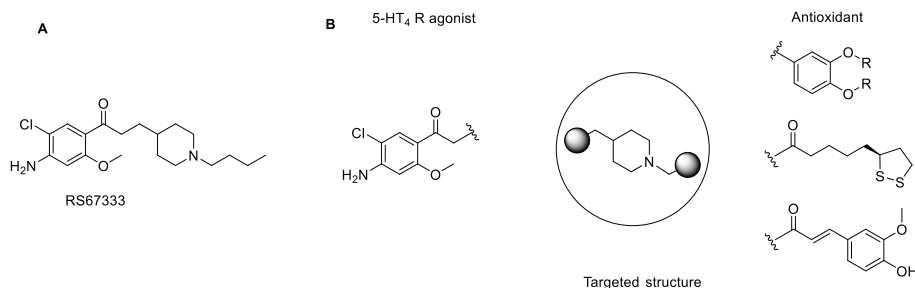
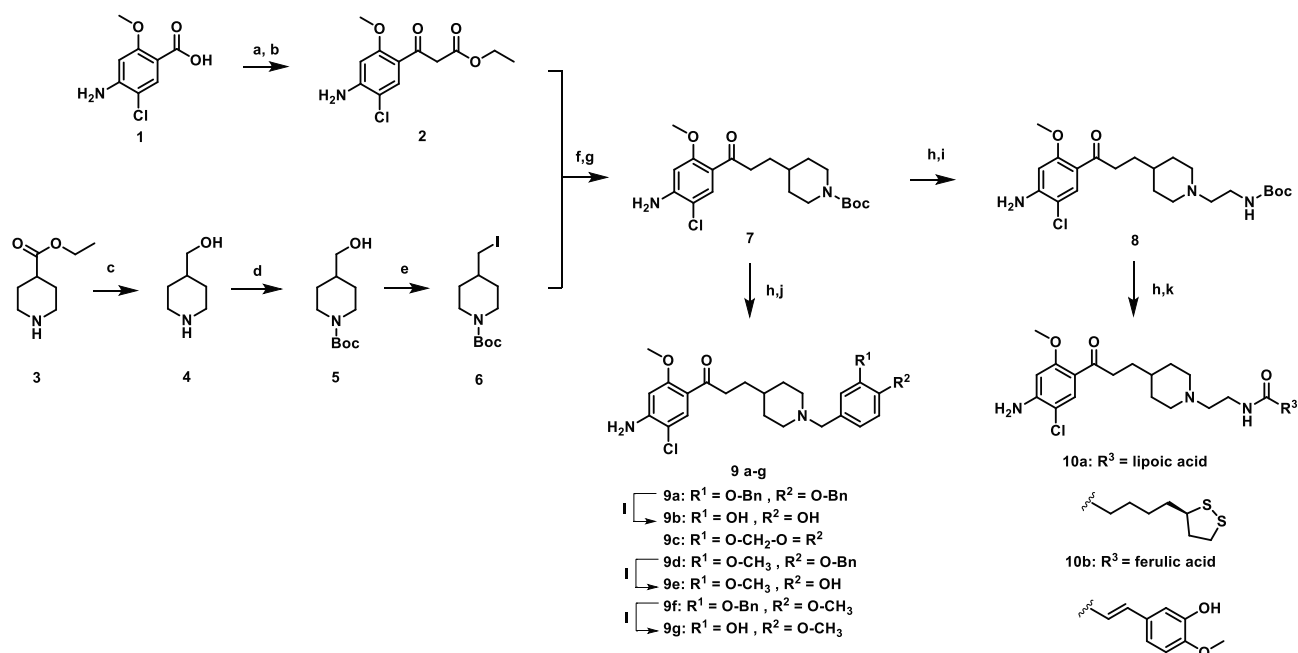


Fig. 1. Chemical structure of RS67333 **A** and targeted structure of the MTDL **B**.

**Scheme 1.** Synthesis of the final derivatives **9–10**.

^aReagents, conditions: (a) CDI, THF; (b) KO₂CCH₂CO₂Et, MgCl₂, THF, 40 °C; (c) LiAlH₄, Et₂O, reflux; (d) (Boc)₂O, DCM; (e) PPh₃, I₂, Imidazole, THF; (f) K₂CO₃, DMF; (g) KOH, EtOH/H₂O; (h) TFA, DCM; (i) tert-butyl N-(2-bromoethyl)carbamate, K₂CO₃, ACN; (j) Bromobenzylalcohol, K₂CO₃, DCM; (k) EDCl, HOBT, Et₃N, 0 °C to rt, in the dark; (l) HBr 33% in AcOH, DCM, 0 °C.

Table 1

Binding to h5-HT₄R and *in vitro* antioxidant activities of final derivatives.

Cmpd	R [1]	R [2]	R [3]	cLogP ^a	h5-HT ₄ R				DPPH		ORAC
					% inhibition at 10 ⁻⁸ M	% inhibition at 10 ⁻⁶ M	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ at 120 min (μM)	(μM _{compound} /μM Trolox®)	
9a	O-Bn	O-Bn	—	6.78	3%	89%	—	—	>250	<0.2	
9b	OH	OH	—	3.48	76%	100%	5.9 ± 0.7	7.5 ± 0.7	19.6 ± 0.8	3.40 ± 0.02	
9c	O-CH ₂ -O	—	—	3.84	22%	100%	—	—	>250	<0.2	
9d	O-CH ₃	O-Bn	—	5.55	0%	97%	—	—	>250	<0.2	
9e	O-CH ₃	OH	—	3.92	7%	95%	—	—	180.3 ± 25.5	3.88 ± 0.55	
9f	O-Bn	O-CH ₃	—	5.62	7%	88%	—	—	>250	<0.2	
9g	OH	O-CH ₃	—	3.94	64%	100%	12.7 ± 2.1	14.5 ± 5.8	85.5 ± 2.0	3.41 ± 0.59	
10a	—	—	Lipoic acid	4.98	26%	99%	—	—	>250	0.76 ± 0.11	
10b	—	—	Ferulic acid	3.65	39%	100%	101 ± 8.0	101 ± 3.6	45.5 ± 2.0	1.47 ± 0.25	
Serotonin	—	—	—	—	0%	65%	246 ± 31	323 ± 25	—	—	
Trolox	—	—	—	—	—	—	—	—	22.9 ± 0.9	1	
Quercetin	—	—	—	—	—	—	—	—	9.3 ± 1.5	6.50 ± 0.73	

^a Calculated logP with ALOGPS 2.1.

our phenol series, when DPPH EC₅₀ was calculable, EC₅₀ values obtained after 120 min were very spread from 19.6 to >250 μM, varying as a terminal chemical pattern.

2.3. In cellulo evaluation

The pharmacological profile of the selected compounds was assayed towards h5-HT₄R transiently expressed in COS-7 cells

(Fig. 2). Three compounds behaved as partial agonists of the receptor with EC₅₀ of 2.8 ± 1.3 nM, 1.4 ± 0.8 nM and 4.5 ± 2.1 nM for **9b**, **9g** and **10b**, respectively (Fig. 4). Compound **10a** also behaved as a partial agonist of the 5-HT₄R, but its irregular profile suggested that it may engage other targets in the COS-7 and no clear pharmacological profile was established. Compound **10b** presented an E_{max} of 47 ± 8% that is similar to the one of RS67333, the 5-HT₄R agonist of reference. Compounds **9b** and **9g** showed greater efficacy

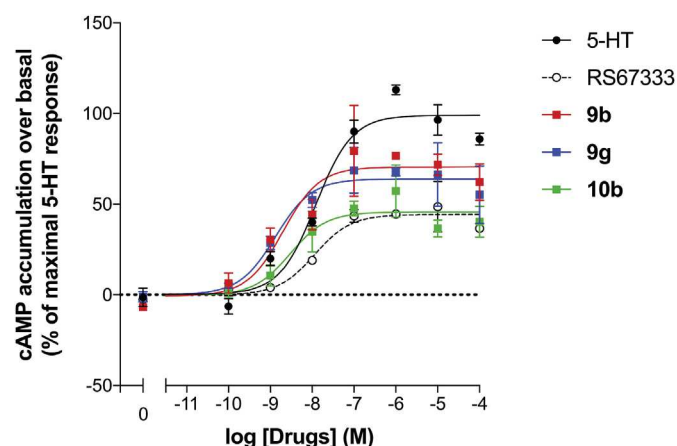


Fig. 2. Determination of the 5-HT₄R pharmacological profiles for compounds **9b**, **9g** and **10b**, by quantification of cAMP accumulation. The agonism activity of the compounds was determined with serotonin (5-HT) and the partial agonist RS67333 as references. Data presented are the mean of three independent experiments performed in duplicate.

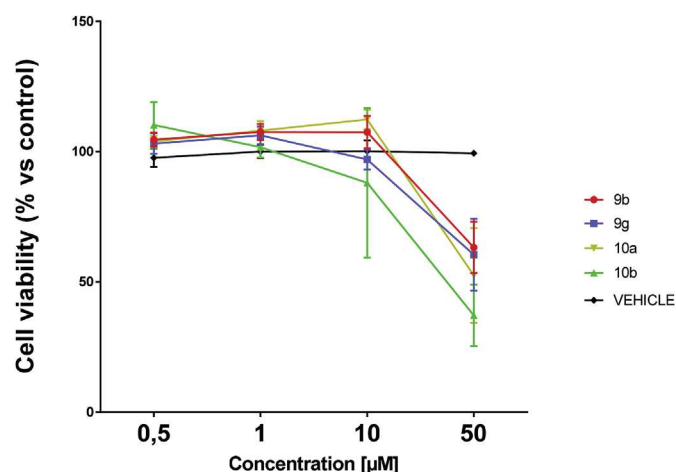


Fig. 3. Cell viability determined by MTT assay. Cells were grown into 96-well plates and treated with **9b**, **9g**, **10a** and **10b** for 24 h at the concentration of 0.5, 1, 10 and 50 μ M or vehicle (DMSO). Data are presented as percentage of viable cells in comparison with vehicle treated controls. Error bars indicate \pm SEM.

than the reference to induce cAMP production with E_{\max} of $72 \pm 10\%$ and $57 \pm 3\%$, respectively.

The first *in vitro* antioxidant assays allowed us to select **9b**, **9g**, **10a-b**, to complete their antioxidant evaluation in a cellular context. To define the suitable concentration, the cytotoxicity of **9b**, **9g**, **10a-b** was determined by MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) assay [39] in a neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. As seen on Fig. 3, treatment of the cells with compounds **9b**, **9g**, **10a** (0.5–10 μ M) did not show cytotoxicity. A little decrease of 12% of viability compared to control cells was seen with compound **10b**. While at a dose of 50 μ M all compounds seem to show a small cytotoxicity with a decreasing of 37%, 40%, 48%, 68% for **9b**, **9g**, **10a**, **10b** respectively. Therefore, a single dose of 10 μ M was chosen to perform the *in cellulo* antioxidant assay.

The antioxidant activity of selected compounds was evaluated on live SH-SY5Y cells using the fluorogenic probe H₂DFCDA. The cell-permeant H₂DFCDA passively diffuses into cells and is retained in the intracellular level after cleavage by intracellular esterases. Upon oxidation by ROS, the nonfluorescent H₂DCF is converted to

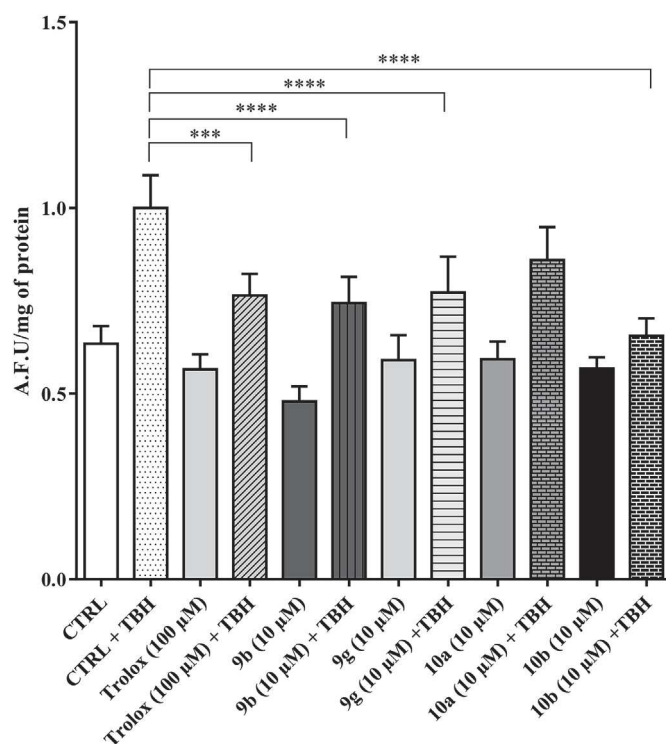


Fig. 4. Reactive oxygen species determination in live SH-SY5Y cells. Cells were grown in 96 wells plates and incubated for 24 h with compounds **9b**, **9g**, **10a** and **10b**, Trolox or vehicle (CTRL). Oxidative stress was induced by treating the cells with 100 μ M TBH for 30 min and detected by staining the cells with the fluorogenic probe H₂DCF-DA. Data are presented as Arbitrary Fluorescence Units normalized on protein content measured by Lowry method. Error bars indicate \pm SEM. *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) as described by Wang in 1999 [40]. The level of oxidative stress is directly correlated with the intensity of DCF fluorescence.

To evaluate the antioxidant activity, cells were incubated for 24 h with the selected compounds, Trolox or vehicle. Then cells were incubated with 10 μ M H₂DFCDA probe for 30 min. After this time the cells were carefully washed with PBS and the oxidative stress was induced by 30 min treatment with *tert*-butyl hydroxyl peroxide (t-BuOOH or TBH). The fluorescence intensity was normalized on protein content (Fig. 4).

3. Discussion

We have demonstrated in our previous study [22] that the introduction of a non-substituted benzyl group instead of the butyl group present in RS67333 has little impact on affinity towards the 5-HT₄R and on Acetylcholinesterase inhibition. Based on these results a first series of hydroxyl or methoxy substituted benzylated derivatives was generated. In a previous study, we have demonstrated that the replacement of the butyl substituent of the piperidine of RS67333 by benzyl or methylenecyclohexyl moiety leads to potent AChE inhibitors with good physicochemical properties and *in vivo* promnesiant activities [22]. In order to verify the impact of these modulations on drugability parameters, clogP were determined. If the protected benzylated compounds **9a**, **9d** and **9f** appear particularly lipophilic, all final compounds are compatible with optimal CNS parameters [41]. If benzyl piperidine scaffolds are well known pharmacophores for cholinesterase interaction [42], we have verified that the RS67333 analogs were selective towards butyrylcholinesterase [22]. Docking studies in AChE binding site

revealed that the orientation of those ligands was similar to Donepezil and reproduced its interactions. In particular, the benzyl moiety is located at the bottom of the aromatic gorge of AChE and engaged in a hydrophobic interaction with Trp 86. We postulate that the introduction of polar or bulky substituents on the benzyl group of our final compounds will be detrimental for their activities. In order to verify this hypothesis, all final compounds **9a-g** and **10a-b** were evaluated as inhibitors of human AChE. As expected, these modulations were particularly detrimental for the affinity of the ligands towards AChE (See Table S1 in Supporting Informations). Concerning the impact of these modulations on 5-HT₄R activity, as shown in Table 1, all compounds exhibited good inhibition rates at 10⁻⁶ M. However, the benzyl protecting group present on the scaffold of compounds **9a**, **9d** and **9f** has detrimental impact on affinity towards 5-HT₄R receptors probably due to its steric hindrance. On the contrary, smaller substituents lead to enhanced activity. In this assay only **9b**, **9g**, and **10b** exhibited more than 35% of inhibition rate at 10⁻⁸ M allowing us to calculate further data such as IC₅₀ and Ki. Surprisingly the vanillin derivative **9e** showed a decreased potency compared to the isovanillin analog **9g**. On the contrary, **9b** and **9g** are really promising with Ki values under 15 nM. According to our hypothesis, compounds **9b**, **9g** and **10a** behave as partial agonist for the 5-HT₄R, the first two being able to induce cAMP production with a greater efficiency than the reference RS67333 (Fig. 2).

All compounds were then engaged in two complementary *in vitro* antioxidant biological assays. In the DPPH assay, a SET mechanism test, hydroxylated compounds **9b**, **9e**, **9g** and **10b** were the only one to exert antioxidant activity, the catechol **9b** being the most potent. In this assay, the lipoic acid derivative **10a** did show limited antioxidant activity. In the ORAC evaluation, the antioxidant activities of all compounds were compared to Trolox®, a widely used antioxidant reference compound. The same compounds **9b**, **9e** and **9g** appeared to be 3-fold more potent than Trolox®, whereas ferulic derivative **10b** demonstrated similar activity than the reference. Both test confirm that the *in vitro* activity is clearly linked to the introduction of a phenol group as all benzylated compounds are inactive in this assay.

Based on the results we have chosen to test the *in cellulo* antioxidant activity of these compounds **9b**, **9g** and **10b**. Compound **9e** was not selected because of its lower affinity towards 5-HT₄R. As already demonstrated for prucalopride, another 5-HT₄R agonist, we have chosen to evaluate this antioxidant and neuroprotective activities in SH-SY5Y neuroblastoma cell line [43]. Lipoic acid antioxidant activity is dependent of mitochondrial activity [44] and therefore cannot be highlighted by an *in vitro* assay. For that reason, **10a** was also selected despite no sign of *in vitro* antioxidant effect.

A non-toxic dose of 10 µM was chosen for the *in cellulo* antioxidant activity assay, after a general MTT viability assay. Oxidative stress was generated using TBH and the ability of the compounds to limit ROS induction was compared with the well-known antioxidant compound Trolox® [45].

Trolox® was used at 100 µM and, as expected, exerts a significant reduction of ROS production. Used at a concentration of 10 µM in this assay, compounds **9b**, **9g** and **10b** used at a concentration of 10 µM significantly decreased ROS production by at least 50% compared to the control group. However, no activity was obtained in this assay with the lipoic acid substituted compound **10a**.

These results are in accordance with the pharmacological profile of the compounds on 5-HT₄R, towards which no clear profile was established for compound **10a**. The three other compounds demonstrated clear agonism toward the receptor with the catechol substituted compound **9b** and the isovanillin substituted compound **9g** being interesting candidates to further *in vivo* evaluation.

4. Conclusion

This study demonstrates for the time the possibility to generate a series of potent 5-HT₄R ligands with promising antioxidant activity. Among them compound **9g** appears as the best compromise with a Ki of 12.7 nM toward 5-HT₄R and an antioxidant activity *in cellulo*. If the balance of activity between the *in cellulo* or *in vitro* antioxidant assay (micro molar range) and the *in vitro* assay for 5-HT₄R affinity (nanomolar range) might be improved, these series of compound show great promises in more challenging models. In the experiment, the amount of oxidative stress needs to be high enough to be visible with DCF-DA. In the brain, the level of oxidative stress caused by AD is not properly quantified and is lower than the one induced by t-BuOOH. On the base of the obtained data, it seems plausible that, with a suitable pharmacokinetic and a proper Blood Brain Barrier crossing according to its adequate LogP, **9g** could have an antioxidant effect at a nanomolar concentration and will be tested in a near future in preclinical animal models of AD.

5. Experimental section

Chemistry. All commercially available compounds were used without further purification. Melting points were determined on a Stuart melting point apparatus (SMP50). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ on aluminium plates (Merck) and visualized with UV light (254 nm). Flash chromatography was conducted on a VWR SPOT II Essential instrument with silica gel 60 (40–63 µm). Column size and flow rate followed the manufacturer's recommendations. NMR spectra were recorded at 295 K, at 400 or 500 MHz (Bruker Avance III 400/500 MHz) for ¹H NMR and at 100 or 126 MHz for ¹³C NMR in chloroform-*d*, methanol-*d*₄ or DMSO-*d*₆ with chemical shifts (δ) given in parts per million (ppm) relative to TMS as internal standard and recorded. The following abbreviations are used to describe peak splitting patterns when appropriate: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, dt = doublet of triplet. Coupling constants *J* are reported in hertz units (Hz). Infrared spectra (IR) were obtained on a PERKIN-ELMER FT-IR spectrometer and are reported in terms of frequency of absorption (cm⁻¹) using KBr discs. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray (ESI, sampling cone 50 V, capillary 0.3 kV) on a Xevo G2-XS QToF WATERS mass spectrometer. LC-MS (ESI) analyses were realized with Waters Alliance 2695 as separating module using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H₂O, B = CH₃CN; each containing HCOOH: 0.1%; column XBridge BEH C18 2.5 µm/3.0 × 50 mm; flow rate 0.8 mL/min). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI. Mass spectrum data are reported as *m/z*.

5.1. General procedure for deprotection/alkylation of the piperidine moiety A

To a stirred solution of *tert*-butyl piperidine-1-carboxylate derivative (1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. The residue obtained (1.0 eq.) was dissolved in DCM or ACN (10 mL/mmol) and bromo-benzyl-alcohol derivatives (1.1–1.5 eq.) and K₂CO₃ (10.0 eq.) were added. The resulting mixture was stirred at RT or 70 °C depending on the product for 2–72 h, then concentrated *in vacuo*. The crude was directly purified by chromatography on silica gel

column and concentrated under reduced pressure to afford alkylated compound (isolated yields).

5.2. The general procedure to obtain unprotected cathecol B

Appropriate benzylated product (1 eq) was stirred in bromhydric acid 33% diluted in acetic acid (10 mL mmol⁻¹, 0.10 M) and DCM (50 mL mmol⁻¹, 0.02 M) at 0 °C for 1–4 h. The mixture was evaporated in vacuo at rt. Then the crude was directly purified on silica gel column (DCM/MeOH; from 100:0 to 80:20).

5.3. Ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate (2)

To a solution of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (5.00 g, 24.8 mmol, 1.0 eq.) in THF (200 mL, 0.12 M) was added CDI (4.42 g, 27.3 mmol, 1.1 eq.) portionwise. The mixture was stirred at rt for 4 h. Then, ethyl potassium malonate (5.06 g, 29.7 mmol, 1.2 eq.) and MgCl₂ (2.83 g, 29.7 mmol, 1.2 eq.) were added portionwise. The resulting mixture was stirred 16 h at 40 °C.

Solvent were evaporated under vacuum. The residue was diluted with water and then extracted with DCM three times. Organics layers were combined and washed with NaHCO₃ sat. solution, then brine, and dried over MgSO₄. Solvent was evaporated under vacuum to afford a crude product which was purified on silica gel column (Cyclohexane/EtOAc from 100:0 to 60:40). The compound was obtained as a light yellow powder (3.76 g, 60% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.92 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 4.55 (s, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 189.6, 168.6, 159.9, 148.7, 132.5, 117.3, 111.7, 97.0, 60.8, 55.4, 50.5, 14.2 MS *m/z* [M+H]⁺ 272.51 IR (neat, cm⁻¹) ν 3463, 3363, 3223, 2983, 1725, 1648, 1622, 1573, 1479, 1457 1326, 1220, 837, 654 Mp 117 °C. Spectral and analytical data matched with literature [21].

5.3.1. (Piperidin-4-yl)methanol (4)

To a solution of ethyl isonipecotatate (2 mL, 13.0 mmol, 1.0 eq.) in Et₂O (150 mL) was added portion-wise LiAlH₄ (1.48 g, 39.0 mmol, 3.0 eq.) at 0 °C and the reaction mixture was refluxed for 7 h. The mixture was then cooled to 0 °C and the reaction was then slowly quenched with 1.5 mL of water, 1.5 mL of 15% NaOH solution followed by 4.5 mL of water to afford a granular inorganic precipitate. The white solid was filtered and washed several times with EtOAc. Evaporation of the filtrate under reduced pressure provided 1.38 g (92% yield) of compound (1) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.45 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.59 (dt, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 1.96 (br s, 1H), 1.71 (m, 2H), 1.60–1.55 (m, 1H), 1.17–1.07 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 66.9, 45.9 (2C), 38.8, 29.7 (2C); IR (neat, cm⁻¹) ν 3369, 2923, 2855, 1636, 1531, 1425, 1266, 1036. Spectral and analytical data matched with literature [46].

5.3.2. *Tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (5)

To a solution of (1) (1.14 g, 9.96 mmol, 1.0 eq.) in DCM (40 mL) was added di-*tert*-butyldicarbonate (2.39 g, 10.9 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred for 15 h at room temperature. The mixture was then diluted with water and the aqueous layer was extracted several times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. The crude product was purified by chromatography on silica gel column (cyclohexane/EtOAc, gradient 100:0 to 70:30) to give 1.34 g (62% yield) of compound (2) as white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.10 (m, 2H), 3.48 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H) 2.68 (m, 2H), 1.80 (br s, 1H, OH), 1.69 (m, 2H), 1.63 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.12 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 155.0, 79.5, 67.6, 43.9

(2C), 38.9, 28.7 (2C), 28.6 (3C); MS *m/z* [M+H]⁺ 216.47; [M-Boc + H]⁺ 116.47; [M-*t*-butyl + H]⁺ 160.47; IR (neat, cm⁻¹) ν 3470, 2926, 2859, 1672, 1422, 1168, 1045, 572; Mp 85 °C.

5.3.3. *Tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate (6)

To a solution of (2) (2.25 g, 10.5 mmol, 1.0 eq.), imidazole (858 mg, 12.6 mmol, 1.2 eq.) and triphenylphosphine (3.30 g, 12.6 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) was added drop-wise a solution of iodine (3.20 g, 12.6 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The mixture was quenched with a saturated Na₂S₂O₃ solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo. The crude was several times diluted with cold Et₂O, and white crystals were filtered. After concentration of filtrate in vacuo, 3.13 g of the compound (3) was obtained as a colorless oil (92% yield).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.11 (m, 2H), 3.10 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.68 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.64–1.61 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.19–1.09 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 154.6, 79.5, 43.4 (2C), 38.6, 32.5 (2C), 28.4 (3C), 13.5; IR (neat, cm⁻¹) ν 2975, 2932, 2850, 1692, 1422, 1243, 1157, 965. Spectral and analytical data matched with literature [47].

5.3.4. *Tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (7)

To a solution of ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate (4) (3.14 g, 11.6 mmol, 1.0 eq.) in DMF (30 mL) and *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate (3) (4.14 g, 12.7 mmol, 1.1 eq.) was added K₂CO₃ (3.19 g, 23.10 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred 72 h at rt. The reaction mixture was diluted with water, and product was extracted with EtOAc. Combined organic layers were washed with water and brine and then dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent gave a crude mixture which was directly dissolved in EtOH (500 mL), H₂O (100 mL) and KOH (3.23 g, 57.5 mmol, 5.5 eq.) were added. The reaction mixture was refluxed for 3 h, EtOH was evaporated. The mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine. Evaporation of the solvent provided a crude product, which was purified by column on silica gel, eluting on DCM/EtOAc from 100:0 to 60:40 to give the product 5 as a colorless solid (3.11 g, 67% isolated yield).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.79 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.18–3.98 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.91 (dd, *J* = 8.3, 6.9 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.72–1.64 (m, 2H), 1.63–1.58 (m, 2H), 1.58–1.54 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.10 (qd, *J* = 12.4, 4.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.4 MHz) δ 198.7, 159.5, 154.9, 147.7, 132.2, 118.9, 111.3, 97.5, 79.2, 55.7, 44.0, 40.6, 35.8, 32.1, 31.1, 28.5. MS *m/z* [M+H]⁺ 397.60; [M-Boc + H]⁺ 297.51; [M-*t*-butyl + H]⁺ 341.55; IR (neat, cm⁻¹) ν 3470, 3353, 2975, 2930, 2851, 1673, 1624, 1588, 1421, 1366, 1311, 1250, 1216, 1173, 967, 738; Mp 136 °C. Spectral and analytical data matched with literature [21].

5.3.5. *Tert*-butyl *N*-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate (8)

Following procedure A with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (7) (2.37 g, 5.98 mmol, 1 eq.) and *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate (1.61 g, 7.18 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (Cyclohexane/EtOAc, gradient 100:0 to 0:100), the compound (8) was obtained as a light yellow solid (780 mg, 30% isolated yield).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.71 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.98 (br s, 1H, NH), 4.49 (s, 2H, NH₂), 3.77 (s, 3H), 3.14 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.86–2.72 (m, 4H), 2.35 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.92–1.76 (m, 2H),

1.67–1.54 (m, 2H), 1.56–1.44 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.24–1.08 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.0 MHz) δ 199.0, 159.4, 156.0, 147.7, 132.2, 118.9, 111.2, 97.5, 79.1, 57.5, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 37.4, 35.6, 32.2 (2C), 31.3, 28.5 (3C); MS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 441.8; IR (neat, cm^{-1}) ν 3486, 3376, 3325, 2980, 2925, 2855, 1690, 1625, 1573, 1467, 1367, 1311, 1175, 1216, 1114, 969, 610; Mp 119 °C; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{ClN}_3\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 440.2316, found 440.2324;

5.3.6. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dibenzyloxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (9a)

Following procedure A with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (**7**) (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) and 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (230 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at RT for 10 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), the compound (**9a**) was obtained as a light yellow solid (141 mg, 47% isolated yield).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78 (s, 1H), 7.49–7.40 (m, 4H), 7.40–7.24 (m, 6H), 7.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 2.95–2.79 (m, 4H), 1.97 (t, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.66 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.64–1.51 (m, 2H), 1.47–1.20 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 198.9, 159.54, 148.6, 148.4, 147.8, 137.3, 137.3, 132.2, 129.5, 128.5 (2C), 128.4 (2C), 127.8 (2C), 127.7 (2C), 127.5, 127.3, 122.7, 118.7, 116.6, 114.6, 111.2, 97.5, 71.3, 71.2, 62.5, 55.6, 53.3 (2C), 40.7, 35.0, 31.5 (2C), 31.0; MS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 599.7; IR (neat, cm^{-1}) ν 3482, 3368, 3220, 2921, 2847, 2798, 1618, 1585, 1508, 1453, 1419, 1257, 1214, 1184, 1015, 735, 695; Mp 104.5 °C. HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{ClN}_2\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 599.2677, found 599.2673;

5.3.7. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (9b)

From general procedure B with 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dibenzyloxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (**9a**) (125 mg, 0.21 mmol) to afford 71 mg of 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (**9b**) as a pale yellow powder with a yield of 81%. ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.66 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.85–6.80 (m, 2H), 6.45 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.39 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 2.97–2.81 (m, 4H), 1.95 (m, 2H), 1.66–1.52 (m, 3H), 1.51–1.36 (m, 2H). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ 198.78, 160.32, 150.43, 146.74, 145.57, 131.46, 122.57, 120.61, 117.59, 116.27, 115.16, 110.26, 96.64, 60.35, 54.75, 51.86 (2C), 39.86, 33.28, 30.16, 29.05 (2C); MS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 419.8; IR (neat, cm^{-1}) ν 3432, 3366, 3206, 2938, 2725, 1619, 1584, 1453, 1419, 1295, 1261, 1216, 1184. Mp 115.9 °C. HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 419.1738, found 419.1737;

5.3.8. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(1,3-benzodioxol-5-yl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (9c)

tert-butyl 4-(3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) was dissolved in 4 mL of DCM, then 1 mL of TFA was added. The solution was stirred 15 min at RT, then the solvent was reduced under pressure. The resulting yellow oil was dissolved in DMF (10 mL), then K_2CO_3 (691.0 mg, 5.00 mmol, 10 eq.) and 5-(bromomethyl)benzo[d][1,3]dioxole (129.4 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.) were added dropwisely. The reaction mixture was warmed at 110 °C for 3 h.

Then water was added and the solution was extracted three times with EtOAc, then dried over MgSO_4 , concentrated under vacuum to afford a crude product which was purified on neutral alumine column with a 100% DCM isocratic gradient. The product

was obtained as a yellowish powder (65 mg, 30% isolated yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.77 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.46 (br s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.38 (s, 2H), 2.93–2.80 (m, 4H), 1.90 (m, 2H), 1.87 (m, 1H), 1.66 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 1.58 (dd, $J = 7.2, 6.4$ Hz, 2H), 1.31–1.15 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 199.1, 159.5, 147.7, 147.5, 146.4, 132.5, 132.2, 122.3, 118.9, 111.2, 109.6, 107.8, 100.8, 97.5, 63.3, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 35.6, 32.3 (2C), 31.3; MS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 431.6; IR (neat, cm^{-1}) ν 3470, 3358, 3216, 3013, 2922, 2873, 2854, 2810, 2775, 1715, 1642, 1619, 1573, 1440, 1421, 1332, 1312, 1261, 1214, 1178, 986, 932, 738, 567; Mp 124 °C. HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 431.1738, found 431.1747.

5.3.9. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-[(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)propan-1-one (9d)

Following procedure A with **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) and 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene (185 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at RT for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), the compound (**9d**) was obtained as a light yellow oil (74 mg, 28% isolated yield).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78 (s, 1H), 7.49–7.28 (m, 5H), 6.96–6.88 (m, 1H), 6.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.75 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.98–2.78 (m, 4H), 1.92 (s, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 199.1, 159.5, 149.4, 147.7, 147.2, 137.3, 132.2, 129.5, 128.5 (2C), 127.78, 127.23 (2C), 121.4, 118.9, 113.5, 112.9, 111.2, 97.5, 71.1, 63.2, 56.1, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 35.6, 32.2 (2C), 31.3. MS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 523.6; IR (neat, cm^{-1}) ν 3449, 2919, 2853, 2788, 1616, 1586, 1463, 1450, 1414, 1261, 1216, 1177, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{ClN}_2\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 523.2364, found 523.2363.

5.3.10. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl]propan-1-one (9e)

From general procedure B with **9d** (80 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) to afford **9e** as yellow powder with a yield of 85%. ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.66 (s, 1H), 7.10 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.13 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.40 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H), 3.00–2.79 (m, 4H), 1.96 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 1.62 (m, 3H), 1.46 (m, 2H). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ 198.78, 160.3, 150.4, 148.0, 147.9, 131.5, 124.0, 120.5, 116.3, 115.1, 114.0, 110.3, 96.7, 60.5, 55.1, 54.8, 51.9 (2C), 39.9, 33.3, 30.2, 29.1 (2C); MS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 432.8; MP: 120.5 °C; IR (neat, cm^{-1}) ν 3360, 3220, 2932, 2855, 1620, 1586, 1420, 1254, 1216, 1177, 1136, 1084, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{ClN}_2\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 433.1894, found 433.1894.

5.3.11. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-[(3-(benzyloxy)-4-hydroxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)propan-1-one (9f)

Following procedure A with **7** (200 mg, 0.05 mmol, 1 eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (185 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), the compound (**9f**) was obtained as a light yellow oil (100 mg, 38% isolated yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 2.87 (m, 4H), 1.96–1.84 (m, 2H), 1.65 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H), 1.62–1.56 (m, 2H), 1.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 199.0, 159.5, 149.0, 147.9, 147.7, 137.1, 132.1, 129.3, 128.5 (2C), 127.8, 127.5 (2C), 122.3, 118.7, 115.5, 111.4, 111.2, 97.5, 70.9, 62.7, 56.0, 55.7, 53.4 (2C), 40.8, 35.2, 31.7 (2C), 31.1; MS m/z

z [M+H]⁺ 523.6; IR (neat, cm⁻¹) ν 3360, 2923, 2834, 2788, 1618, 1587, 1463, 1450, 1414, 1261, 1216, 1177, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for C₃₀H₃₆ClN₂O₄ [M+H]⁺ 523.2364, found 523.2365;

5.3.12. 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-{1-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one (9g)

From general procedure B with **9f** (80 mg, 0.16 mmol, 1 eq.) to afford acetate salt of **9g** as a pale yellow powder with a yield of 70%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.76 (s, 1H), 6.95 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.86–6.76 (m, 2H), 6.26 (s, 1H), 4.54 (br s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 3.16 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.87 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 11.5 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.74–1.72 (m, 2H), 1.62–1.60 (m, 2H), 1.54–1.43 (m, 2H), 1.37 (m, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.5, 176.9, 159.6, 147.9, 147.1, 145.9, 132.2, 125.78, 122.2, 118.6, 116.8, 111.3, 110.7, 97.5, 61.0, 55.9, 55.7, 52.1 (2C), 40.4, 34.2, 30.5, 30.1 (2C), 22.9; MS m/z [M+H]⁺ 432.8; MP: 80.8 °C; IR (neat, cm⁻¹) ν 3360, 3220, 2932, 2855, 1620, 1586, 1420, 1254, 1216, 1177, 1136, 1084, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for C₂₃H₃₁ClN₂O₄ [M+H]⁺ 433.1894, found 433.1894.

5.3.13. N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)-5-[(3R)-1,2-dithiolan-3-yl]pentanamide (10a)

To a stirred solution of **8** (125 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of LA (53 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were successively added hydroxybenzotriazole (HOBt) (42 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.) and 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDCI) (49 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.), the mixture was stirred at 0 °C in the dark for 30 min, then the free amine was added, and the reaction was stirred at rt for 16 h. Solvent was evaporated under vacuum then the product was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (97.5:2.5:0.25), **10a** was obtained as white powder with a yield of 44%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.81 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.59 (dq, J = 8.5, 6.5 Hz, 1H), 3.35 (q, J = 5.7 Hz, 2H), 3.24–3.07 (m, 2H), 2.97–2.82 (m, 4H), 2.47 (m, 3H), 2.24–2.17 (m, 2H), 2.01–1.90 (m, 3H), 1.76–1.65 (m, 6H), 1.62 (dt, J = 8.5, 6.5 Hz, 2H), 1.57–1.42 (m, 2H), 1.33–1.17 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.9, 172.7, 159.5, 147.7, 132.2, 118.9, 111.3, 97.6, 56.87, 56.5, 55.7, 53.7 (2C), 40.9, 40.3, 38.5, 36.5, 36.1, 35.6, 34.7, 32.3, 31.2 (2C), 28.9, 25.5; MS m/z [M+H]⁺ 527.8; MP: 122.5 °C; IR (neat, cm⁻¹) ν 3217, 2926, 2844, 1642, 1586, 1462, 1419, 1316, 1254, 1250, 1170; HRMS/ESI: m/z calcd. for C₂₃H₃₉ClN₃O₃S₂ [M+H]⁺ 528.2121, found 528.2118.

5.3.14. (2E)-N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enamide (10b)

Following the same procedure as **10a**, from N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate (**8**) (125 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) and ferulic acid (39 mg, 0.20 mmol, 1. eq.) with EDCI, HOBt, and Et₃N. The crude was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (92.5:7.5:0.75) to afford a bright yellow powder with a yield of 42%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.72 (s, 1H), 7.43 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.37 (br s, 1H), 6.23–6.07 (m, 2H), 4.40 (br s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.46–3.41 (m, 2H), 2.91 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 2.86–2.82 (m, 2H), 2.51 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.45–2.43 (m, 1H), 1.98–1.96 (m, 3H), 1.67 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 1.57–1.51 (m, 2H), 1.27 (s, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.8, 166.2, 159.5, 147.7, 147.4, 146.8, 140.7, 132.2, 127.4, 122.3, 118.9, 118.3, 114.8, 111.3, 109.5, 97.5,

57.1, 55.9, 55.7, 53.8 (2C), 40.7, 36.0, 35.3, 31.8 (2C), 31.0; MS m/z [M+H]⁺ 515.77; MP: 85 °C; IR (neat, cm⁻¹) ν 3435, 2938, 2837, 1647, 1616, 1585, 1511, 1459, 1419, 1264, 1214, 1156; HRMS/ESI: m/z calcd. for C₂₇H₃₅ClN₃O₅ [M+H]⁺ 516.2265, found 516.2264.

5.4. In vitro evaluation

5.4.1. DPPH radical scavenging activity

The antiradical activity of the tested compounds was assessed using a miniaturized DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay [48,49]. The tested compounds were diluted from stock solution in absolute ethanol and incubated in the presence of 100 μ M DPPH (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution at room temperature in a 96-wells microplate (Sterilin®, Fisher Scientific SAS, Illkirsh, France) in the dark. The absorbance at 517 nm was then measured every 10 min using Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and used to calculate the specific absorbance of DPPH in each solution subtracting absorbance of all other components in the solution as following:

$$A_{\max}^{\text{DPPH}} = \text{Abs}_{\text{DPPH alone}} - \text{Abs}_{\text{blank}}$$

$$A_{\text{sample}}^{\text{DPPH}} = \text{Abs}_{\text{mix DPPH/compound}} - \text{Abs}_{\text{compound}}$$

$$A_{\min}^{\text{DPPH}} = \text{Abs}_{\text{mix DPPH/Trolox at 375 } \mu\text{M}} - \text{Abs}_{\text{Trolox at 375 } \mu\text{M}}$$

where A_{max}^{DPPH} is the maximal absorbance of DPPH alone, A_{sample}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a tested compound at given concentration, A_{min}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a Trolox® from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) at 375 μ M considered as the minimal absorbance. Then, the DPPH radical scavenging activity were calculated according to the following formula:

$$\% \text{ DPPH RSA} = \frac{A_{\max}^{\text{DPPH}} - A_{\text{sample}}^{\text{DPPH}}}{A_{\max}^{\text{DPPH}} - A_{\min}^{\text{DPPH}}} \times 100$$

Assays were conducted in triplicate at 10 concentration levels (0, 10, 12.5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250 μ M) of the tested compound. Absorbance calculations were carried out using Microsoft Excel and regressions were performed using GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). The kinetic absorbance data were fitted with a one-phase exponential association model allowing us to calculate the time of half-reaction and the plateau of the maximum effect at each concentration. The EC₅₀ values (concentrations required to obtain 50% scavenging effect) were calculated plotting concentration versus % DPPH RSA at 60, 120, plateau and fitting the data with linear model for Trolox®, one or two-phase exponential association model for other compounds. EC₅₀ and SD values were the mean of two independent experiments. Trolox® was tested as positive control.

5.4.2. ORAC assay

The antioxidant activity of the synthesized compounds was assessed using the Fluorescein Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORACFI) assay [48–50]. Trolox® (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and other compounds stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO and diluted in 10 mM phosphate buffer to obtain working solution at 6 concentration levels. 25 μ L of buffer or Trolox® or compounds solution were mixed in a black microplate with 150 μ L of fluorescein (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 8 nM and incubated 30 min at 37 °C in a multimodal microplate reader (Synergy 2, Biotek, Winooski, VT, USA). Then, 25 μ L of AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide))

dihydrochloride, Sigma-Aldrich) solution at 75 mM were added and mixed in each well before the kinetic. Measurements of fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 485/20$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 520/20$ nm) were performed every minute during 2 h. Each point was measured in triplicate. The AUC and the Net AUC of the standards and samples were determined using Gen 5 Data Analysis Software using equations (1) and (2) respectively.

$$AUC = \frac{F_1}{F_1} + \frac{F_2}{F_1} + \frac{F_3}{F_1} + \dots + \frac{F_n}{F_1} \quad (1)$$

$$NetAUC = AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{blank}} \quad (2)$$

where F_1 is the fluorescence reading at the initiation of the reaction and F_n is the last measurement. The standard curve was obtained by plotting the Net AUC of different compound concentrations against their concentration using GraphPad® Prism statistical software (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). ORAC values of samples were then calculated dividing the slope of standard curve of each compounds by value obtained for Trolox®. ORAC value are given as mean \pm standard deviation of three independent experiments.

5.4.3. Affinity as regards 5-HT₄ receptors

For competition studies, 2.5 μ g of proteins (5-HT₄B membrane preparations, HTS110 M, Eurofins. Eurofins's 5-HT₄B membrane preparations are crude membrane preparations made by use of their proprietary stable recombinant cell lines to ensure high-level of GPCR surface expression.) were incubated in duplicate at 25 °C for 60 min in the absence or the presence of 10^{−6} or 10^{−8} M of each compound together with 0.2 nM [³H]-GR 113 808 (NET 1152, PerkinElmer) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25 °C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) presoaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 1 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4 °C). Non-specific binding was evaluated in parallel, in the presence of 30 μ M serotonin.

For some of these compounds, affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the GraphPad Prism 6 software and expressed as $K_i \pm$ SD.

5.5. In cellulo experiment

5.5.1. Cell lines

SH-SY5Y cells (ATCC, UK) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Euroclone, Milan, Italy) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (supplements were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA). Cells were grown in a humidified incubator with 95% air and 5% CO₂ at 37 °C.

5.5.2. Determination of cAMP production

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected by electroporation with plasmid encoding HA-tagged 5-HT₄R (100 ng/10⁶ cells), then seeded in 96-well plates (35 000 cells/well). 24 h after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₄R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO201724, at 37 °C in 100 μ L of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂; 0.1% glucose; 0.1% BSA). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%). Quantification of cAMP

production was performed by HTRF® by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

5.5.3. MTT assay

The effect of **9b**, **9g**, **10a**, **10b** on the growth of SH-SY5Y cell line was assessed by MTT-based cell viability test, previously described by Mosmann [39]. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂ in humidified atmosphere to allow adhesion. After this time, cells were treated for 24 h with the compounds or vehicle (DMSO) at different concentrations, ranging from 0.5 μ M to 50 μ M, dissolved in complete DMEM.

Then, cells were carefully washed with PBS and treated with 300 μ M MTT dissolved in DMEM and incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. Then, the aqueous solution was removed and the intracellular formazan salts were dissolved in DMSO for 15 min at room temperature. Finally, the formazan absorbance from each well was measured at $\lambda = 570$ nm, using a microplate reader (Victor 2 1420 multilabel counter, PerkinElmer).

5.5.4. ROS assay

SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates (OptiPlate black, PerkinElmer) at 5×10^3 cells/well and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂ to allow adhesion in complete culture medium. After this time, cells were treated for 24 h with 10 μ M **9f**, **9g**, **10a**, **10b**, 100 μ M Trolox or vehicle (DMSO). After this time, cells were washed with PBS and stained for 30 min with 10 μ M H₂DCFDA probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Thermo Fisher) for ROS detection. Then, cells were carefully washed and treated for 30 min with 100 μ M TBH (*tert*-Butyl hydroperoxide solution, Luperox, Sigma-Aldrich) to induce oxidative stress. After this time, cells were washed with PBS and stained for 30 min with 10 μ M H₂DCFDA probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Thermo Fisher) for ROS detection.

Finally, cells were washed three times with PBS supplemented with Glucose 5 mM and CaCl₂ 1 mM. The DCF fluorescence was measured ($\lambda_{\text{exc}} = 485$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm) with a plate reader (Enspire, PerkinElmer). Data were normalized on protein content determined by Lowry method.

Associated content

Synthesis and spectroscopic characterization of intermediates and analytical analysis of final compounds.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgment

This work was supported by funding from the Fondation Alzheimer (AAP2015 Project TRIAD 016) and the Fondation Vaincre Alzheimer (#FR-15072). The authors gratefully acknowledge the Conseil Régional de Normandie, as well as the European Community (FEDER) for their contribution to the CERMN's analytical platform. European COST action CA15135 (Multi-Target Paradigm for Innovative Ligand Identification in the Drug Discovery Process, MuTaLig) supports this article with the funding of a Short Term Scientific Mission attributed to CL.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>.

References

- [1] A. Martin Prince, A. Wimo, M. Guerchet, M. Gemma-Claire Ali, Y.-T. Wu, M. Prina, K. Yee Chan, Z. Xia, World Alzheimer Report 2015 the Global Impact of Dementia an Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends, 2015.
- [2] S. Forner, D. Baglietto-Vargas, A.C. Martini, L. Trujillo-Estrada, F.M. LaFerla, Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony, *Trends Neurosci.* 40 (2017) 347–357.
- [3] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen, Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 3030–3059.
- [4] E. Tonnes, E. Trushina, Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 57 (2017) 1105–1121.
- [5] C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, P. Hureau, F. Collin, Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biol.* 14 (2018) 450–464.
- [6] J.L. Cummings, T. Morstorf, K. Zhong, Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures, *Alzheimer's Res. Ther.* 6 (2014) 37.
- [7] E. Karran, B. De Strooper, The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J. Neurochem.* 139 (2016) 237–252.
- [8] E.E. Congdon, E.M. Sigurdsson, Tau-targeting therapies for Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurol.* 14 (2018) 399–415.
- [9] S.A. Frautschy, G.M. Cole, Why pleiotropic interventions are needed for Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.* 41 (2010) 392–409.
- [10] A. Cavalli, M.L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini, C. Melchiorre, Multi-target-Directed ligands to combat neurodegenerative diseases, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 347–372.
- [11] M. Rosini, E. Simoni, A. Minarini, C. Melchiorre, Multi-target design strategies in the context of Alzheimer's disease: acetylcholinesterase inhibition and NMDA receptor antagonism as the driving forces, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 1914–1923.
- [12] R. Leon, A.G. Garcia, J. Marco-Contelles, Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease, *Med. Res. Rev.* 33 (2013) 139–189.
- [13] M.J. Matos, F. Rodríguez-Enríquez, F. Borges, L. Santana, E. Uriarte, M. Estrada, M.I. Rodríguez-Franco, R. Laguna, D. Viña, 3-Amidocoumarins as potential multifunctional agents against neurodegenerative diseases, *Chem. Med. Chem.* 10 (2015) 2071–2079.
- [14] S. Lee, X. Zheng, J. Krishnamoorthy, M.G. Savelieff, H.M. Park, J.R. Brender, J.H. Kim, J.S. Derrick, A. Kochi, H.J. Lee, C. Kim, A. Ramamoorthy, M.T. Bowers, M.H. Lim, Rational design of a structural framework with potential use to develop chemical reagents that target and modulate multiple facets of Alzheimer's disease, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 299–310.
- [15] C. Oliveira, D. Bagetta, F. Cagide, J. Teixeira, R. Amorim, T. Silva, J. Garrido, F. Remião, E. Uriarte, P.J. Oliveira, S. Alcaro, F. Ortuso, F. Borges, Benzoic acid-derived nitrones: a new class of potential acetylcholinesterase inhibitors and neuroprotective agents, *Eur. J. Med. Chem.* 174 (2019) 116–129.
- [16] F. Prati, A. De Simone, P. Bisignano, A. Armirotti, M. Summa, D. Pizzirani, R. Scarpelli, D.I. Perez, V. Andrisano, A. Perez-Castillo, B. Monti, F. Massenzio, L. Polito, M. Racchi, A.D. Favia, G. Bottegoni, A. Martinez, M.L. Bolognesi, A. Cavalli, Multitarget drug discovery for Alzheimer's disease: triazinones as BACE-1 and GSK-3 β inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 1578–1582.
- [17] S. Claeys, J. Bockaert, P. Giannoni, Serotonin: a new hope in Alzheimer's disease? *ACS Chem. Neurosci.* 6 (2015) 940–943.
- [18] J. Lalut, D. Karila, P. Dallemagne, C. Rochais, Modulating 5-HT 4 and 5-HT 6 receptors in Alzheimer's disease treatment, *Future Med. Chem.* 9 (2017) 781–795.
- [19] M. Cachard-Chastel, F. Lezoualc'h, I. Dewachter, C. Delomé, S. Croes, H. Devijver, M. Langlois, F. Van Leuven, S. Sicsic, A.M. Gardier, 5-HT4 receptor agonists increase sAPPalpha levels in the cortex and Hippocampus of male C57BL/6j mice, *Br. J. Pharmacol.* 150 (2007) 883–892.
- [20] M. Cochet, R. Donnegre, E. Cassier, F. Gaven, S.F. Lichtenthaler, P. Marin, J. Bockaert, A. Dumuis, S. Claeys, Chronic treatments with a 5-HT4 receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Neuropharmacology* 126 (2017) 128–141.
- [21] C. Lecoutey, D. Hedou, T. Freret, P. Giannoni, F. Gaven, M. Since, V. Bouet, C. Ballandonne, S. Corvaisier, A. Malzert Fréon, S. Mignani, T. Cresteil, M. Boulouard, S. Claeys, C. Rochais, P. Dallemagne, Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) E3825–E3830.
- [22] C. Rochais, C. Lecoutey, F. Gaven, P. Giannoni, K. Hamidouche, D. Hedou, E. Dubost, D. Genest, S. Yahiaoui, T. Freret, V. Bouet, F. Dauphin, J. Sopkova-de Oliveira Santos, C. Ballandonne, S. Corvaisier, A. Malzert-Freon, R. Legay, M. Boulouard, S. Claeys, P. Dallemagne, Novel multi-target directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 3172–3187.
- [23] S. Yahiaoui, K. Hamidouche, C. Ballandonne, A. Davis, J.S. de Oliveira Santos, T. Freret, M. Boulouard, C. Rochais, P. Dallemagne, 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 (2016) 283–293.
- [24] M. Marcinkowska, A. Bucki, D. Panek, A. Siwek, N. Fajkis, M. Bednarski, M. Zygmunt, J. Godyń, A. Del Rio Valdivieso, M. Kotańska, M. Kołaczowski, A. Więckowska, Anti-Alzheimer's multitarget-directed ligands with serotonin 5-HT6 antagonist, butyrylcholinesterase inhibitory, and antioxidant activity, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 352 (2019), e1900041.
- [25] C. Spagnuolo, M. Napolitano, I. Tedesco, S. Moccia, A. Mito, G.L. Russo, Neuroprotective role of natural polyphenols, *Curr. Top. Med. Chem.* 16 (2016) 1943–1950.
- [26] X. Zhang, X. He, Q. Chen, J. Lu, S. Rapposelli, R. Pi, A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 26 (2018) 543–550.
- [27] M.L. Bolognesi, A. Minarini, V. Tumiatti, C. Melchiorre, Lipoic acid, a lead structure for multi-target-directed drugs for neurodegeneration, *Mini Rev. Med. Chem.* 6 (2006) 1269–1274.
- [28] M.L. Bolognesi, A. Cavalli, C. Bergamini, R. Fato, G. Lenaz, M. Rosini, M. Bartolini, V. Andrisano, C. Melchiorre, Toward a rational design of multitarget-directed antioxidants: merging memquin and lipoic acid molecular frameworks, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 7883–7886.
- [29] W. Yang, Z. Ruan, Y. Wang, K. Van Kirk, Z. Ma, B.J. Arey, C.B. Cooper, R. Seethala, J.H.M. Feyen, J.K. Dickson, Discovery and Structure–Activity relationships of trisubstituted pyrimidines/pyridines as novel calcium-sensing receptor antagonists, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1204–1208.
- [30] J. Kaspi, O. Lerman, O. Arad, M. Alnabari, Y. Sery, Process for the preparation of donepezil, *Eur. Pat. Appl.* (2004). EP 1386607 A1.
- [31] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (4) (1997) 152–159.
- [32] A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, H. Ito, Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays, *Biochim. Biophys. Acta* 1810 (2011) 170–177.
- [33] Y.-H. Zhang, D.-W. Wang, S.-F. Xu, S. Zhang, Y.-G. Fan, Y.-Y. Yang, S.-Q. Guo, S. Wang, T. Guo, Z.-Y. Wang, C. Guo, α -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S tau transgenic mice, *Redox Biol.* 14 (2018) 535–548.
- [34] R. Sultana, A. Ravagna, H. Mohammad-Abdul, V. Calabrese, D.A. Butterfield, Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity, *J. Neurochem.* 92 (2005) 749–758.
- [35] M. Perluigi, G. Joshi, R. Sultana, V. Calabrese, C. De Marco, R. Coccia, C. Cini, D.A. Butterfield, In vivo protective effects of ferulic acid ethyl ester against amyloid-beta peptide 1–42-induced oxidative stress, *J. Neurosci. Res.* 84 (2006) 418–426.
- [36] C.J. Grossman, G.J. Kilpatrick, K.T. Bunce, Development of a radioligand binding assay for 5-HT4 receptors in Guinea-pig and rat brain, *Br. J. Pharmacol.* 109 (1993) 618–624.
- [37] S. Gunesch, S. Schramm, M. Decker, Natural antioxidants in hybrids for the treatment of neurodegenerative diseases: a successful strategy? *Future Med. Chem.* 9 (2017) 711–713.
- [38] J.L. Sebaugh, Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation - sebaugh - 2011 - pharmaceutical statistics, *Pharm. Stat.* 10 (2011) 128–134.
- [39] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [40] H. Wang, J.A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate Reader11Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States department of agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (5) (1999) 612–616.
- [41] Z. Rankovic, CNS drug design: balancing physicochemical properties for optimal brain exposure, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 2584–2608.
- [42] M. Bajda, A. Więckowska, M. Hebda, N. Guziar, C.A. Sottriffer, B. Malawska, Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (3) (2013) 5608–5632.
- [43] F. Bianco, E. Bonora, D. Natarajan, M. Vargiolu, N. Thapar, F. Torresan, F. Giancola, E. Boschetti, U. Volta, F. Bazzoli, M. Mazzoni, M. Seri, P. Clavanzani, V. Stanghellini, C. Sternini, R. De Giorgio, Prucalopride exerts neuroprotection in human enteric neurons, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310 (2016) G768–G775.
- [44] L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler, Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 227–250.
- [45] M.L. da Frota Junior, A.S. Pires, F. Zeidán-Chuliá, I.J. Bristot, F.M. Lopes, M.A. de Bittencourt Pasquali, A. Zanutto-Filho, G.A. Behr, F. Klamt, D.P. Gelain, J.C. Moreira, In vitro optimization of retinoic acid-induced neurogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox, *Mol. Cell. Biochem.* 358 (2011) 325–334.
- [46] N. Boyer, P. Gloanec, G. De Nanteuil, P. Jubault, J.C. Quirion, Synthesis of α , α -difluoro- β -amino esters or gem-difluoro- β -lactams as potential metalloproteinase inhibitors, *Eur. J. Org. Chem.* (2008) 4277–4295.

- [47] A. Villalobos, J.F. Blake, C.K. Biggers, T.W. Butler, D.S. Chapin, Y.L. Chen, J.L. Ives, S.B. Jones, D.R. Liston, A.A. Nagel, D.M. Nason, J.A. Nielsen, J.A. Shalaby, W.F. White, Novel benzisoxazole derivatives as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 2721–2734.
- [48] R. Apak, S. Gorinstein, V. Bohm, K.M. Schaich, M. Ozyürek, K. Güçlü, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 85 (2013) 957–998.
- [49] K.M. Schaich, X. Tian, J. Xie, Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays, *J. Funct. Foods* 14 (2015) 111–125.
- [50] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619–4626.

Article 3.

Rational design of novel benzisoxazole derivatives with acetylcholinesterase inhibitory and serotonergic 5-HT₄ receptors activities for the treatment of Alzheimer's disease

Accepté, Scientific Reports

Rational design of novel benzisoxazole derivatives with acetylcholinesterase inhibitory and serotonergic 5-HT₄ receptors activities for the treatment of Alzheimer's disease

Julien Lalut,¹ Hugo Payan,² Audrey Davis,¹ Cédric Lecoutey,¹ Rémi Legay,¹ Jana Sopkova-de Oliveira Santos,¹ Sylvie Claeysen,² Patrick Dallemagne¹ & Christophe Rochais¹

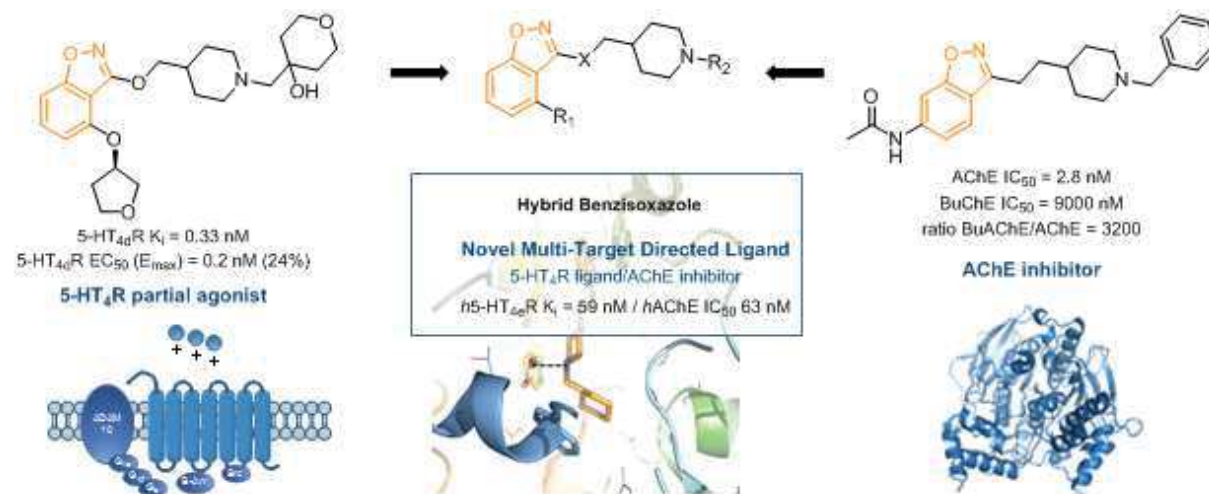
¹ Normandie Univ, UNICAEN, Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Caen, France.

² IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R. (email: christophe.rochais@unicaen.fr)

Abstract.

A rigidification strategy was applied to the preclinical candidate donecopride, an acetylcholinesterase inhibitor possessing 5-HT₄R agonist activity. Inspired by promising bioactive benzisoxazole compounds, we have conducted a pharmacomodulation study to generate a novel series of multitarget directed ligands. The chemical synthesis of the ligand was optimized and compounds were evaluated in vitro against each target and in cellulo. Structure-activity relationship was supported by docking analysis in human acetylcholinesterase binding site. Among the synthesized compounds, we have identified a novel hybrid **32a** (3-[2-[1-(cyclohexylmethyl)-4-piperidyl]ethyl]-4-methoxy-1,2-benzisoxazole) able to display nanomolar acetylcholinesterase inhibitory effects and nanomolar *K_i* for 5-HT₄R.



Introduction.

As people live longer, the number of people with dementia in low- and middle-income countries and estimates of prevalence raised rapidly and are constantly being revised upwards. In 2018, 50 million people are living with dementia worldwide and this number will increase to 152 million by 2050.¹ Currently ranked in the first places leading causes of death for older people, the most common dementia,

Alzheimer's disease (AD), is a progressive and irreversible brain disorder characterized by a slowly decline in memory and thinking skills up to the inability to carry out the simplest everyday tasks.² The histological diagnosis of AD is based on the presence in abnormally high quantities of two types of lesions in the central nervous system: the senile plaques formed by aggregation of β -amyloid protein ($A\beta$) and the neurofibrillary tangles due to hyperphosphorylation of tau protein.³

For more than 20 years, therapeutic approaches, focused on the neuronal dysfunction, only allowed to develop treatment with symptomatic benefits for patients, by regulating neurotransmitters.⁴ Except memantine, an NMDA receptor antagonist approved to regulate the glutamatergic activity, the three other drugs authorized by the FDA (donepezil, rivastigmine and galanthamine) are acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. Usually used to treat mild to moderate forms of AD, AChE inhibitors (AChEIs) reduce, by inhibiting the catalytic active site (CAS) of the enzyme, the excessive degradation of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter involved in many physiological processes including memory and learning and thus restore cholinergic transmission. However, these drugs only work for a limited time and do not change the underlying disease process.

The multifactorial origin of AD has led researchers to develop a new approach that could exert a disease-modifying effect, aimed at slowing down, stopping or reversing the progression of AD, by direct actions on pathophysiological pathways as early as possible.⁵ While disease modifying strategies have not yet allowed any marketing authorization despite many preclinical and clinical trials (ineffectiveness, side effects, lack of selectivity)⁶ the development of a selective compound against a single AD target does not seem to be the best-suited strategy to the complex AD puzzle.

In order to target several molecular causes implicated in the pathogenesis of AD disease, a new concept emerged about 10 years ago: the development of Multi-Target Directed Ligands (MTDLs).^{7,8} This innovative and promising drug discovery approach allows the design of ligands targeting, from a single active compound, several pharmacological targets involved in the pathogenesis of a same disease and showing a more synergistic effect. Compared to traditional pharmacological approaches (multiple-medication therapy or multiple-compound medication) used for multifactorial diseases, this concept has advantages such as a simplified clinical development (pharmacokinetic study and optimization of ADME-Tox properties) and a lower risk of drug-drug interactions or poor patient compliance avoided. Based on the benefit that could be the synergy of several therapeutic effects obtained from different pharmacological targets on clinical efficacy, Morphy *et al.* have nevertheless reported the difficulty of adjusting the ratio of activities towards the various targets.⁷

Many MTDLs have been developed for the inhibition of AChE, and more particularly dual-binding site (DBS) AChE inhibitors targeting simultaneously the two sites of the enzyme, the CAS and the peripheral

anionic site (PAS).^{9,10} Indeed, it has been shown that the PAS could form a toxic complex with A β favoring the formation of fibrils and consequently their aggregation into senile plaques.^{11,12,13}

The interaction with both sites allows the restoration of the cholinergic deficit by blocking the CAS activity and, in addition to preventing the access of ACh to the active site, the inhibition of PAS disrupts amyloid aggregation. Other MTDLs have been developed by adding another activity to the AChE inhibition (BACE1 or MAOs inhibitors, metal chelators, antioxidants...) ^{14,15} or by combining different rational therapeutic activities without targeting the enzyme.¹⁶

Our laboratory has published data on several chemical families of MTDLs useful for treating AD.^{17,18,19} Among them, donecopride, based on a structural compromise between donepezil, an AChEI drug, and RS67333, a serotonin subtype 4 receptor (5-HT₄R) agonist, seems to be a promising drug candidate with excellent *in vitro* activities (*h*AChE IC₅₀ = 16 nM and 5-HT₄R K_i = 8.5 nM, 48% of control agonist response) and *in vivo* effects (improvement of memory performances on the object recognition test in mice).²⁰ Donecopride, the first MTDL described in the literature associating these both complementary activities, is actually engaged in preclinical trials.

Located in the CNS, 5-HT₄Rs are involved in cognitive functions (learning, memory...) and their stimulation leads to an improvement in the release of neurotransmitters and an increase in their concentration in brain areas.^{21,22,23} The partial agonist RS67333 showed an improvement of cognitive performances in animals.²⁴ The increased release of ACh in combination with decreased breakdown due to inhibition of AChE is particularly interesting to counteract memory deficits as in AD. Additionally, activation of 5-HT₄Rs promotes the non-amyloidogenic cleavage of amyloid precursor protein (APP), producing the soluble and neurotrophic fragment sAPP α to the detriment of A β production.²⁵ We have earlier demonstrated that the co-modulation of those two targets (AChE inhibition and 5-HT₄R agonism with two reference compounds) appears synergistic in *in vivo* models of memory deficit.²⁶ The published results obtained with donecopride demonstrated the potential of this strategy. We would also like to explore novel heterocyclic scaffold in order to verify if this combination of activities is transposable to novel chemical series that could combine a symptomatic action (restoration of the cholinergic activity) and a disease-modifying effect (promotion of sAPP α , inhibition of the AChE-induced A β aggregation) that seems to be a relevant approach to treat AD.

Villalobos *et al.* have reported the development of a series of *N*-benzylpiperidine benzisoxazoles as potent and selective AChEI.²⁷ While keeping a benzylated piperidine, the benzisoxazole ring was investigated as a suitable bioisostere to replace the benzoylamino scaffold present in a class of AChE inhibitors previously described.²⁸ All benzisoxazoles synthesized displayed submicromolar *h*AChE IC₅₀s. The most promising *N*-acetyl derivative **[B]** (Figure 1) showed an excellent AChE inhibition activity with an IC₅₀ of 2.8 nM and a favorable profile *in vivo* (a dose-dependent elevation of ACh in mouse and a reversion of amnesia in a mouse passive avoidance model). According to the docking realized for this AChEI, the compound seems able to interact with the PAS of the enzyme. More recently, Brodney *et al.* have identified 5-HT₄R partial agonists with a similar benzisoxazole scaffold.²⁹ By exploring various alkoxyl substituents in position C3 of the benzisoxazole ring and two different substituents on the piperidine ring, the resulting compounds displayed a nanomolar affinity towards 5-HT₄R. Many ADME parameters (clearance from human liver microsomes, passive permeability, cyclic AMP production, neuropharmacokinetic parameters...) have been studied and two compounds, among them the benzisoxazole **[A]** (Figure 1) with a 5-HT₄R *K_i* of 9.6 nM, were chosen to continue in preclinical trials.

On the basis of these encouraging results for the development of AChE inhibitors on one hand and 5-HT₄R agonists on the other, we decided to synthesize new benzisoxazole MTDLs while keeping a structure close to donecopride (Figure 1). Based on a structural compromise between the two chemical series already described, this work should allow us to rigidify the structure of the latter to study the impact of this new heterocycle on the two pharmacological targets.

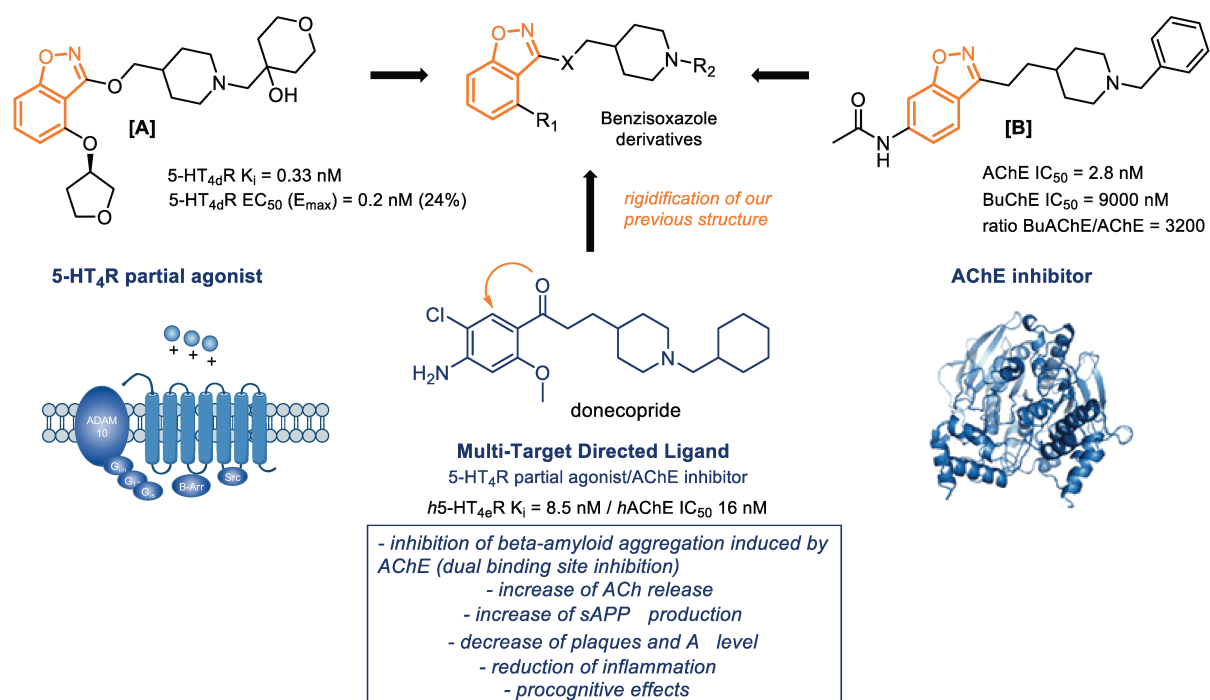


Figure 1. Rational design of novel MTDLs with acetylcholinesterase inhibition and serotonergic 5-HT₄ receptors activity, guided by previous works in the literature.

Results.

Chemistry. Many chemical reactions have been reported in literature concerning the formation of the 1,2-benzoxazole ring, substituted or not in position C3. To summarize some of them, we can quote non-exhaustively the concomitant formation of a C–C bond and an O–C bond by a [3+2] cycloaddition of nitrile oxides and arynes,³⁰ the formation of a O–N bond from readily accessible *ortho*-hydroxyaryl N–H ketimines through a N–Cl imine³¹ or the formation of a N=C bond *via* an intramolecular transoximation.³²

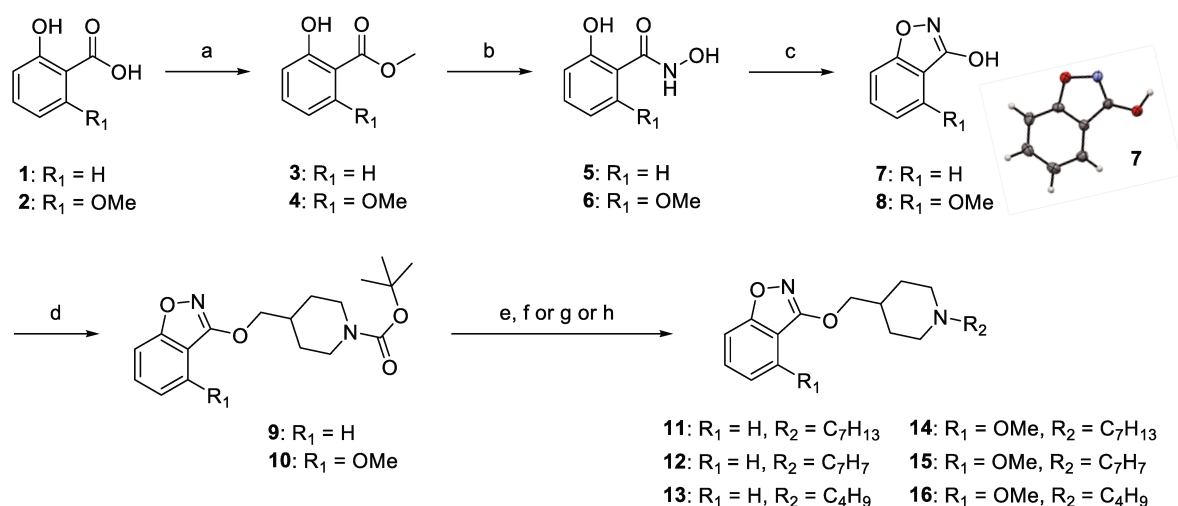


Figure 2. Synthesis of C3 substituted-benzisoxazole by a C–O bond with a hydrogen or a methoxy group in C4. Reagents and conditions: (a) conc. H₂SO₄, MeOH, reflux, 48 h, 92–94% (b) NH₂OH.HCl, NaOH, H₂O/dioxane (3:1), 1 h, rt then 15 h, 40 °C, 65–93% (c) CDI, dry THF, reflux, 3 h, 74–94% (d) *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate, DEAD, PPh₃, dry THF, reflux, 19 h, 44–65% (e) TFA, CH₂Cl₂, rt, 1 h (f) bromomethylcyclohexane, K₂CO₃, DMF, 110 °C, 3 h, 22–45% (2 steps) (g) bromomethylbenzene, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 15 h, 26–86% (2 steps) (h) 1-iodo-2-methyl-propane, Et₃N, EtOH, reflux, 48 h, 23–36% (2 steps).

We first focused on the synthesis of compounds **11–16**, substituted by a C–O bond in position C3 and bearing a hydrogen or a methoxy group in position C4, from an intermediate *N*,2-dihydroxybenzamide. The latter can be obtained in particular according from the Angeli-Rimini reaction between an aldehyde and *N*-hydroxybenzenesulfonamide. In our case, the synthesis of hydroxamic acids **5** and **6** began by an esterification reaction of benzoic acids **1–2** under classical acidic conditions, followed by treatment of esters **3–4** with hydroxylamine in the presence of sodium hydroxide.³³ Cyclization of **5–6** with 1,1'-carbonyldiimidazole in anhydrous THF under reflux for 3 h led to build the benzisoxazole ring. The precipitation of the crude in water by addition of HCl allowed to afford derivatives **7–8** after suction filtration. The compound **7** was obtained in 94% yield and its structure was confirmed by X-ray diffraction of obtained crystals (Figure 2). In the second case, the compound **8** was obtained in mixture with the compound **8'** having a 1,3-benzoxazole ring (see Supporting Information). This reaction was repeated several times and the expected product **8** with a 1,2-benzoxazole ring has nevertheless still been obtained as the major compound. The formation of the byproduct **8'** seems to be explained by the

Lossen rearrangement, already described in the literature and allowing the conversion of an activated hydroxamic acid to isocyanate under the action of a base or a thermal activation.³⁴ The isocyanate can then easily react with an alcohol-containing compound. A reaction, according to the classical conditions described by Mitsunobu *et al.*, then allows the conversion of the primary alcohols of the cyclized products **7–8** into ether links.³⁵ Compound **7** and the mixture **8–8'** (known ratio) were reacted with a hydroxylated piperidine chain in the presence of PPh₃ and DEAD in dry THF to lead to the derivative **9** in 44% yield and to the mixture **10–10'** in 79% yield. The separation of the both 1,2- and 1,3-benzoxazole **10–10'** was then carried out after this step (see Supporting Information). The piperidines **9–10** were deprotected under acidic conditions and we introduced several chains by an *N*-alkylation reaction using halogenated derivatives and a base according various conditions, leading to the desired compounds **11–16** in 22–45% yields over two steps (Figure 2).

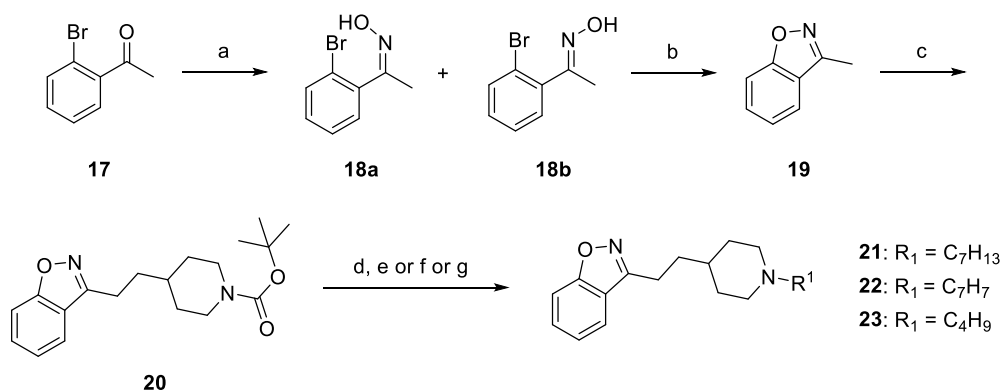


Figure 3. Synthesis of C3 substituted-benzisoxazole by a C-C bond. Reagents and conditions: (a) NH₂OH.HCl, NaOAc, H₂O/EtOH (3:2), 1 h, rt then 2 h, reflux, 90% (mixture of isomers *E/Z* 2:1) (b) *t*-BuONa, cat. DMEDA, cat. CuI, dry THF, 1 h, rt, 27% (c) LDA 1.0 M sol., dry THF, -78 °C then *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate, 1 h, -78 °C, 22% (d) TFA, CH₂Cl₂, rt, 1 h (e) bromomethylcyclohexane, K₂CO₃, DMF, 110 °C, 3 h, 50% (2 steps) (f) bromomethylbenzene, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 15h, 38% (2 steps) (g) 1-iodo-2-methyl-propane, Et₃N, DMF, 110 °C, 3 h, 15% (2 steps).

We then decided to evaluate the influence of a methylene linker in position C3 instead of a C-O bond following a similar chemical strategy as that developed by Villalobos *et al.*, namely the formation of the C-C bond by deprotonation of the 3-methyl-1,2-benzoxazole derivative using a lithiated base and subsequent reaction with an electrophile.²⁷ Synthesis of the expected methylated compound **19** began by a reaction between the *o*-bromoacetophenone and hydroxylamine in the presence of sodium acetate to obtain the mixture of oximes **18a–18b** (*E/Z*, 2:1) in 90% yield. A cyclization of these 2-bromophenyl ketoxime, engaged without separation of the both isomers according to the conditions reported by Udd and co-workers, allowed to form quickly and at room temperature the 3-methyl-1,2-benzoxazole **19**.³⁶ The overall yield was 27%, but the copper-catalyzed cyclization of *o*-brominated aromatic oximes was reported as being effective only for oximes of (*Z*) configuration (65% yield for the only *Z* isomer). Deprotonation of methylated compound **19** occurred at -78 °C in anhydrous THF using a lithium diisopropylamide solution and was followed by the addition of a (iodomethyl)piperidine chain to obtain

the derivative **20**. Finally, the cleavage of the *tert*-butoxycarbonyl group was performed using trifluoroacetic acid and the deprotected piperidines was subsequently reacted with halogenated derivatives to afford the target compounds **21–23** in 15-50% yields over two steps (Figure 3).

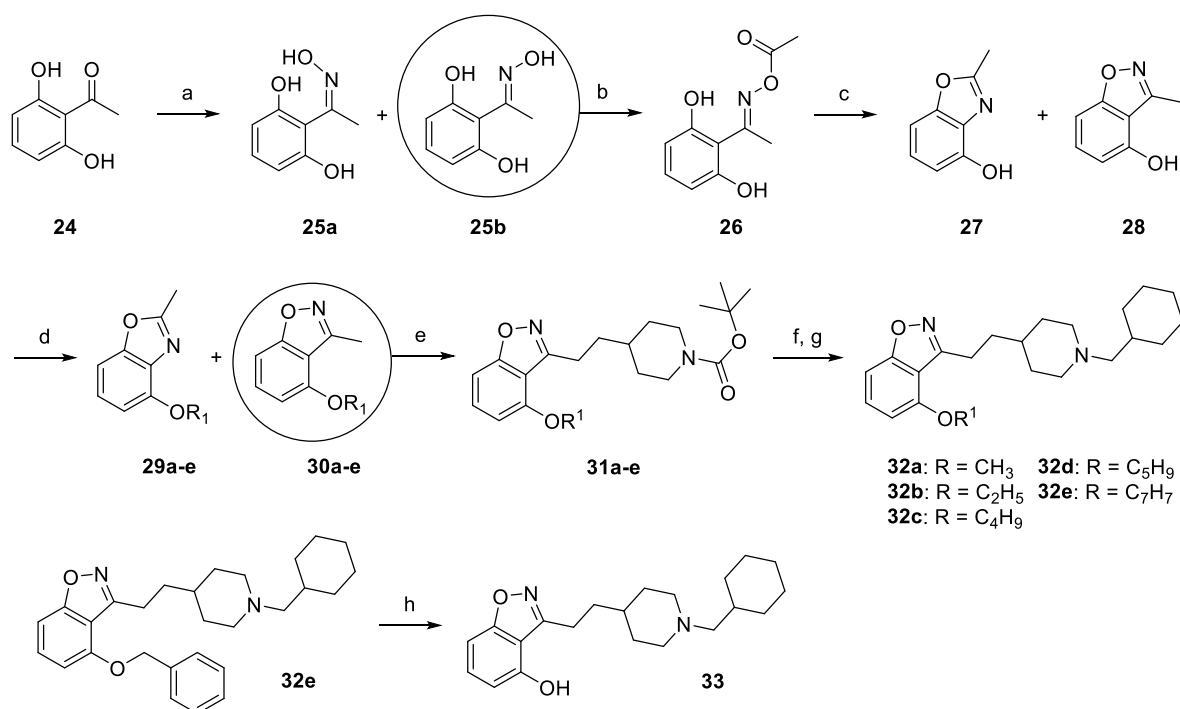


Figure 4. Synthesis of C3 substituted-benzisoxazole by a C-C bond with various ether groups or a hydroxyl group in C4. Reagents and conditions: (a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (3:2), 1 h, rt then 3 h, reflux, quantitative yield (mixture of isomers *E/Z* 4:1) (b) Ac_2O , 1 h, rt, 83% (c) pyridine, 1 h, reflux, 71% (mixture **27/28** 3:7) (d) halogenated derivatives, K_2CO_3 , rt, 15-48h or reflux, 3 h, 32-98% (e) LDA 1.0 M sol., dry THF, -78°C then *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate, 1 h, -78°C , 21-47% (f) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h (g) bromomethylcyclohexane, K_2CO_3 , DMF, 110°C , 3 h, 23-79% (2 steps) (h) HBr sol. (33 wt.% in AcOH), 50°C , 3 h, 85%.

Our last synthesized chemical series consisted in the study of the influence of the C4 substitution by various alkoxy, while maintaining a C–C bond in C3. The mixture of oximes **25a–25b** was prepared in quantitative yield (*Z/E* 1:4) using a condensation reaction between the dihydroxyacetophenone and hydroxylamine. After separation of the both isomers, the ketoxime **25b** was firstly reacted with PPh_3 and DDQ in dry THF at room temperature for 1 h but we obtained the undesired 2-methyl-1,3-benzoxazol-4-ol **27**.³⁷ Its structure was confirmed by X-ray diffraction of obtained crystals (see Supporting Information), The formation of **27** seems to be explained by the Beckmann rearrangement, allowing oximes to rearrange into substituted amides. The ketoxime **25b** was finally transformed into the corresponding activated oxime **26** by treatment with acetic anhydride for 1 h in 83% yield.³⁸ The acetylated intermediate was cyclized in pyridine to form the mixture of 1,3- and 1,2-benzoxazole **27–28** (3:7). At this stage, we introduced various alkyl groups (cyclo-, linear or branched alkyls) or benzyl on the hydroxyl group of the latter mixture **27–28** to obtain 1,3-benzoxazole **29a–e** and 1,2-benzoxazole **30a–e**, which were separated. The desired compounds **32a–e** were synthesized, under the same conditions as previously described, in a four-step sequence through the lithiation reaction of methylated

compounds **30a–e**, the subsequent addition of the (iodomethyl)piperidine chains, the deprotection of the Boc groups before alkylating the piperidines by a methylcyclohexyl group (Figure 4). Additionally, the compound **33** was obtained by *O*-debenzylation of the derivative **32e** using hydrobromic acid in acetic acid in 85% yield.

In vitro evaluation. Compounds **11–16**, **21–23**, **32a–e** and **33** were evaluated *in vitro* for their capacity to inhibit *hAChE* using the spectrometric Ellman method³⁹ and to bind to human 5-HT₄R (*h*5-HT₄R) in competition studies⁴⁰ with the tritiated ligand [³H]–GR113808, a specific and highly potent 5-HT₄R antagonist (Table 1). The 5-HT₄R pharmacological profile was also determined for some compounds by quantification of cAMP production (Figure 6).

Discussion.

Correlating well with the results reported by Brodney *et al.*,²⁹ the first unsubstituted 1,2-benzoxazoles **11–13** with an ether link displayed potent *in vitro* affinity towards 5-HT₄R (similar to donecopride with a *K_i* of 9.6 nM for the benzisoxazole analogue **11**) but showed a loss of inhibition of the enzyme (Table 1).

Villalobos *et al.* have reported that, in comparison with unsubstituted compounds, an increase of AChE inhibition was observed by substitution of the benzisoxazole ring with electron-donating and some electron-withdrawing groups.²⁷ In accordance with these comments and in order to design donecopride-inspired compounds, the substitution of the benzisoxazole ring by a methoxy group in position C4 led to compounds **14** and **15** presenting a slight activity with a range of submicromolar inhibition of AChE (respectively 441 nM and 939 nM). The isobutyl-substituted piperidine derivative **16** did not show any inhibition of the enzyme. This isobutyl group probably cannot interact with AChE *via* the hydrophobic interaction conventionally observed with the tryptophan residue in the anionic subsite of the active site (residue Trp86 for *hAChE*). The introduction of the methoxy group also increased the *in vitro* capacity of derivatives **14–16** to bind to human 5-HT₄R with an affinity of less than 5 nM.

Thanks to the pharmacomodulations of donecopride, we demonstrated that the modulation of the linker chain between the aromatic ring and the piperidine has an important impact on both pharmacological activities. Indeed, an amide or ester bond causes loss of AChE inhibition, while improving the affinity for 5-HT₄R in comparison with two-carbon methylene bridge. Docking work has revealed a difference in the interaction of an amide or ester compound with the enzyme due to the rigidity induced by these structures (loss of one of the interactions).⁴¹

The synthesis of compounds **21–22**, with a two-carbon methylene link, seems to confirm this hypothesis because the compounds showed, in comparison with the ether analogues **11–13**, much better AChE inhibition activity with respectively IC₅₀s of 240 nM and 36 nM. The modification of an ether bond

between the benzisoxazole and piperidine rings to a two-carbon methylene bond allows to increase flexibility and freedom of rotation of our structures, and to implement an AChE inhibition property. However, these structures presented in return a decrease in affinity towards 5-HT₄R.

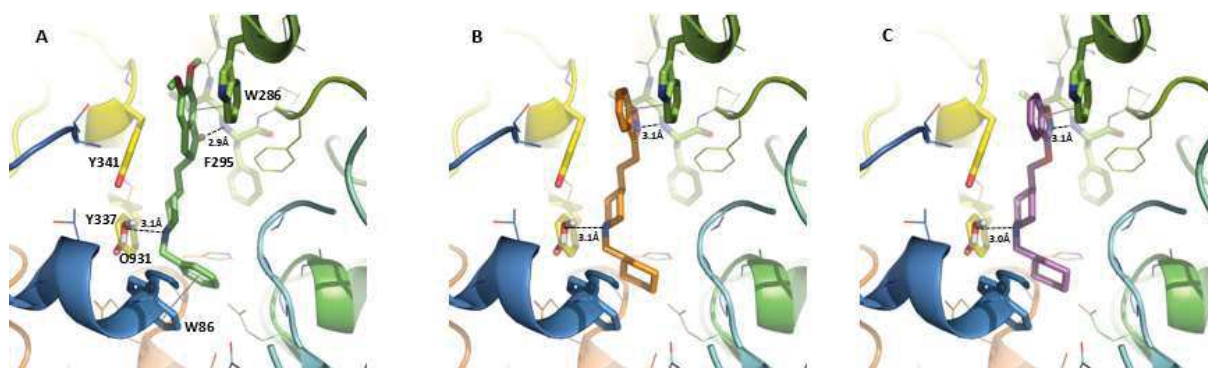


Figure 5. (A) Donepezil co-crystallized in the hAChE (PDB ED: 4EY7). Docking poses of the compound **21** (B) and the compound **11** (C) in hAChE binding sites. The compounds and the side chains of the binding site residues are in stick and the protein in ribbon representation. This figure was made with PYMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, USA).

In order to better understand this difference docking studies of compounds **11** and **21** were performed into a human AChE structure co-crystallised with donepezil (PDB ED: 4EY7,⁴² Figure 5A) using the GOLD software.^{43,44} Firstly, compound **11** and **21** were built using Discovery Studio⁴⁵ and protonated on piperidine ring following the ChemAxon software prediction (<http://www.chemaxon.com/>).

During the docking of compound **11** and **21** into human AChE a water molecule interacting with protonated piperidine ring of donepezil was conserved (residue number 931). In the selected best scoring pose for compound **21** (Figure 1B, ChemPLP Score = 101.62) its orientation was closed to the donepezil one. Indeed, compound **21** reproduced well the donepezil interactions: (i) the charged nitrogen of the piperidine ring is oriented in a position suitable for interacting with the water molecule slotting between Tyr337 and Tyr341, (ii) the nitrogen atom of benzisoxazole ring was close to NH of the Phe295 backbone and formed with it a hydrogen bond and in the same time the benzisoxazole ring was positioned in a parallel way with respect to the Trp286 indole ring of the PAS at a 3.1 Å distance to favor the π -stacking interaction. (iii) the cyclohexane ring occupied the donepezil benzyl ring place in neighboring of Trp86 and when the cyclohexane ring was replaced by benzyl one (compound **22**) the AChE inhibition activities increased got closer to the donepezil one.

However, the best docked pose of compound **11** (ChemPLP Score = 98.21) does not allow us to lighten its worst AChE activity compared to the compound **21**. The three attachment points observed for compound **21** were well reproduced in the compound **11** docking pose (see Figure 5C). We could however postulate that the replacement of the methylene linker present in compound **21** by an oxygen atom in compound **11** could increase its rigidity due to its mesomeric effect as earlier described in Donecopride analog.⁴¹ This rigidity might affect its binding within human AChE binding site.

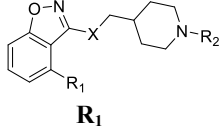




















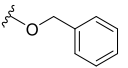


Compound				IC ₅₀ <i>hAChE</i> (nM) % inhibition at 10 ⁻⁶ M	K _i <i>h5-HT₄R</i> (nM) % inhibition at 10 ⁻⁶ M/10 ⁻⁸ M
	X	R ₁	R ₂		
	donecopride			16 ± 5 (n = 2)	8.5 ± 0.3 (n = 3)
11	O	H		n.d. 24%	9.6 ± 1.6 (n = 3) 100% / 67%
12	O	H		n.d. 33%	42.4 ± 12.2 (n = 3) 99% / 29%
13	O	H		n.d. 8%	20.8 ± 12.5 (n = 3) 100% / 59%
14	O			441 ± 63 (n = 2) 82%	2.7 ± 0.4 (n = 3) 100% / 99%
15	O			939 ± 40 (n = 2) 82%	3.0 ± 0.4 (n = 3) 100% / 94%
16	O			n.d. 23%	4.1 ± 0.4 (n = 3) 100% / 100%
21	CH ₂	H		240 ± 59 (n = 2) 84%	139 ± 9 (n = 3) 89% / 4%
22	CH ₂	H		35.7 ± 9.4 (n = 2) 96%	263 ± 11 (n = 3) 78% / 8%
23	CH ₂	H		n.d. 11%	n.d. 87% / 8%
32a	CH ₂			63.5 ± 19.2 (n = 2) 94%	59 ± 8.5 (n = 3) 100% / 13%
32b	CH ₂			200 ± 32 (n = 2) 87%	80.5 ± 9.9 (n = 3) 100% / 16%
32c	CH ₂			n.d. 42%	219 ± 65 (n = 3) 100% / 4%
32d	CH ₂			1001 ± 84 (n = 2) 52%	616 ± 67 (n = 3) 100% / 0%
32e	CH ₂			n.d. 10%	2920 ± 781 (n = 3) 96% / 0%
33	CH ₂	OH		97.3 ± 1.5 (n = 2) 87%	37 ± 10.5 (n = 3) 100% / 29%

Table 1. *hAChE* inhibitory activity and *h5-HT₄R* affinity for benzisoxazole derivatives **11–16**, **21–23**, **32a–e** and **33**.

Finally, the last chemical series was synthesized with both the two-carbon methylene link and various alkoxy groups in position C4. The compounds **32a–32e** demonstrated in most of the cases a correlation between the steric effect of the alkyl group and the results of both pharmacological activities. Except for the compound **32c** without AChE inhibition, the increasing bulk of the alkoxy group (*O*-benzyl **32e** > *O*-cyclopentyl **32d** > *O*-isobutyl **32c** > *O*-ethyl **32b** > *O*-methyl **32a**) results in less % 5-HT₄R affinity and AChE inhibition are interesting. The methoxy **32a** and the alcohol **33** were the most promising of all benzisoxazoles synthesized in this work, with respectively IC₅₀ values of 63.5 nM and 97.3 nM towards AChE and K_i values of 59 nM and 37 nM for the 5-HT₄R.

On the basis of these results, the two benzisoxazoles **32a** and **33** were selected to determine the 5-HT₄R pharmacological profile of our compounds. In these assays both behaved as antagonists (Figure 6) with IC₅₀ of 97.2 ± 17.2 nM and 883.0 ± 597.8 nM, respectively. This profile is not in accordance with our objective. We determined also the 5-HT₄ pharmacological profile of the compound **16** with an ether link and the compound also behaved as a highly potent antagonist (IC₅₀ of 5.6 ± 2.2 nM).

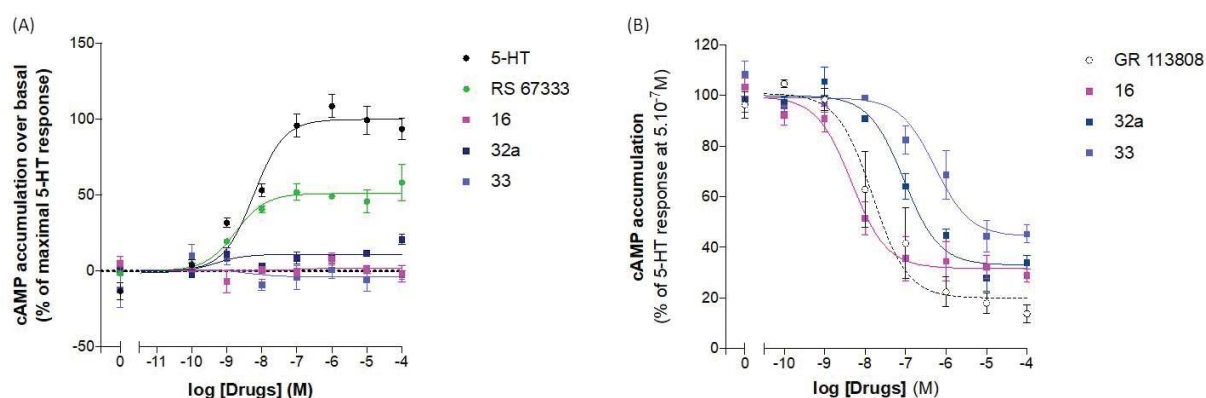


Figure 6. Determination of the 5-HT₄ pharmacological profiles for compounds **16**, **32a** and **33** by quantification of cAMP production. (A) Assay to determine the agonism activity (with serotonin and the partial agonist RS-67333 as references) (B) Assay to determine the antagonism activity (with the antagonist GR113808 as reference). Data presented are the mean of three independent experiments performed in duplicate.

In order to better understand their profile, docking studies were performed in a homology model of the 5-HT₄ receptor. The docking of compound **32a** was compared to Donecopride,⁴¹ and appear similar which could explain their affinities for the 5-HT₄R (Figure 7). For both compounds the basic piperidine nitrogen interacts with Asp100 on the transmembrane helix 3 (consistent with the constraint used during docking) and the aromatic rings are oriented towards the transmembrane helix 5 (TM5) (in yellow in Figure 7). However two differences can be underlined between both compounds poses: i) lack of an H-bond interaction for compound **32a** with Ser197 and ii) lack of an electrostatic interaction for compound **32a** with Thr104. One of these two interactions could therefore be responsible for 5-HT₄R agonism/antagonism profile.

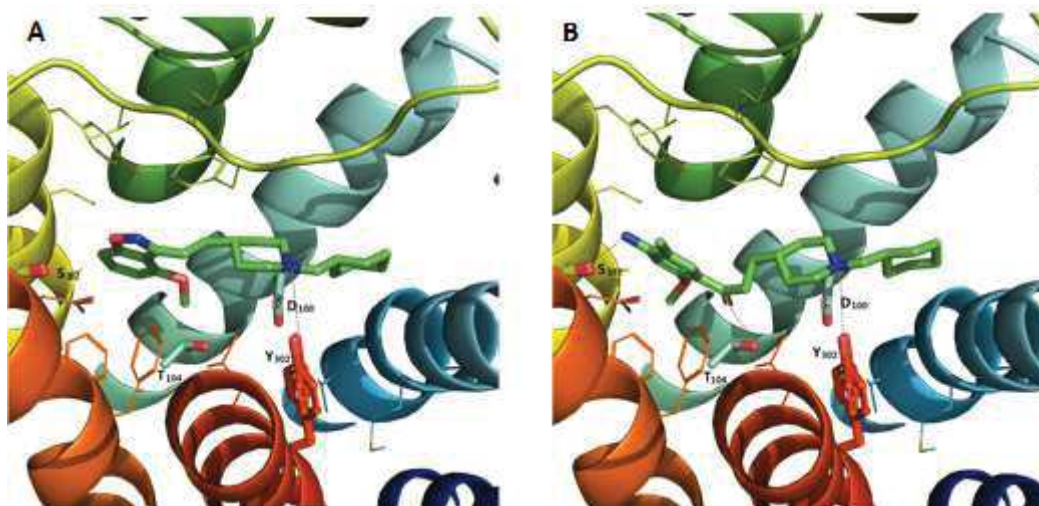


Figure 7. Compound **32a** (A) and Donecopride (B) positioned in the 5-HT₄R binding sites from docking studies. The compound and the side chains of the binding site residues are in stick and the protein in ribbon representation. This figure was made with PYMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, USA).

On the basis of this docking study, we could postulate that further modulation of the benzisoxazole moiety, either by introducing novel substituent or by modulation of the methoxy group will be needed to obtain a 5-HT₄R agonist. Such modulation should reproduce one or the two missing H-bonds with Ser197 or Thr104 to reproduce the agonist profile of Donecopride⁴¹ or compound [A].²⁹

Conclusion

To briefly summarize, all benzisoxazoles synthesized allowed to establish structure-activity relationships and to study the impact of a pharmacomodulation of each part of the structure on the pharmacological results. In general, compounds with an ether link promote the affinity for 5-HT₄R, whereas compounds with a two-carbon methylene link promote the inhibition of AChE. Several compounds have shown good activities *in vitro* on both targets and constitute a real basis for further works, in particular the compounds **32a** and **33**. It is necessary to combine all pharmacomodulations that have been performed to achieve the design of compounds meeting the selected criteria to belong to this MTDL family.

Methods

Chemistry. All commercially available compounds were used without further purification. Melting points were determined on a K f ler apparatus. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ on aluminium plates (Merck) and visualized with UV light (254 nm). Flash chromatography was conducted on a VWR SPOT II Essential instrument with silica gel 60 (40-63 m). Column's size and flow rate were used according to manufacturer's recommendation. NMR spectra were recorded at 400 or 500 MHz (Bruker Avance III 400/500 MHz) for ¹H NMR and at 100 or 125 MHz for ¹³C NMR in chloroform-*d*, methanol-*d*₄ or DMSO-*d*₆ with chemical shift ( ) given in parts per million (ppm) relative to TMS as internal standard and recorded at 295K. The following

abbreviations are used to describe peak splitting patterns when appropriate: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, dt = doublet of triplet. Coupling constants J are reported in hertz units (Hz). Infrared spectra (IR) were obtained on a PERKIN-ELMER FT-IR spectrometer and are reported in terms of frequency of absorption (cm^{-1}) using KBr discs. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electronic impact (HRMS/EI), or by electrospray (HRMS/ESI) on a Bruker maXis mass spectrometer. LC-MS (ESI) analyses were realized with Waters Alliance 2695 as separating module using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H_2O , B = CH_3CN ; each containing HCOOH : 0.1 %; column XBridge C18 2.5 μm /4.6x50 mm; flow rate 0.8 mL/min). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI. Mass spectrum data are reported as m/z . X-ray diffraction experiments were performed with graphite-monochromatized Mo $K\alpha$ radiation on a Bruker-Nonius Kappa CCD area detector diffractometer either at 298K or at 150K IUPAC nomenclature was used for all compounds. For the description of NMR spectra, the numbering used for hydrogens can be different than the IUPAC numbering. Compounds, that are not fully characterized, may already have been described in the literature, according to the references cited. Yields refer to chromatographically and spectroscopically (^1H NMR) homogeneous materials and are mostly unoptimized. NMR spectroscopy (^1H) was used to determine the proportions of mixture.⁴¹

Representative procedure for the synthesis of 11-16, 21-23 and 32a-e. To a stirred solution of *tert*-butyl piperidine-1-carboxylate derivative (1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. The residue obtained (1.0 eq.) was dissolved in the appropriate solvent (MeOH, DCM or EtOH, 10 mL/mmol), an alkyl-halogenated derivative (1.1 eq.) and a base (2.0–10.0 eq.) were then added. The resulting mixture was stirred at the appropriate temperature (room temperature, 80 °C or 110 °C) for 3–48 h, then concentrated *in vacuo*. Ethyl acetate was added, the organic layer was washed several times with brine, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding alkylated compound.⁴¹

3-[[1-(cyclohexylmethyl)-4-piperidyl]methoxy]-1,2-benzoxazole (11). The compound was prepared from *tert*-butyl 4-(1,2-benzoxazol-3-yloxymethyl)piperidine-1-carboxylate **9** (100 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.), bromomethylcyclohexane (47 μL , 0.33 mmol, 1.1 eq.) and K_2CO_3 (415 mg, 3.0 mmol, 10.0 eq.) in DMF according to the representative procedure (**E**) and stirring the reaction for 3 h at 110 °C. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) to give **11** as a yellow oil (22 mg, 22% yield over two steps); ^1H NMR (CDCl_3 - d , 400 MHz) δ 7.65 (dt, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = ^5J = 1.0$ Hz, 1H), 7.52 (ddd, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H), 7.43 (dt, $^3J = 8.5$

Hz, $^4J = ^5J = 0.8$ Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 4.29 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 2H), 2.92 (m, 2H), 2.12 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 2H), 1.94–1.89 (m, 3H), 1.84–1.62 (m, 7H), 1.50–1.44 (m, 3H), 1.27–1.14 (m, 3H), 0.88 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 -*d*, 100 MHz) δ 166.7, 163.9, 130.4, 122.9, 120.9, 114.4, 110.2, 74.8, 66.2, 53.9 (2C), 35.8, 35.3, 32.1 (2C), 28.8 (2C), 26.8, 26.2 (2C); LC-MS (ESI) $t_R = 3.65$ min; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 329.59; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 329.2224, found 329.2224; IR (neat, cm^{-1}) ν 2925, 2848, 2801, 2763, 1614, 1538, 1449, 1361, 1237, 1158, 989, 922, 751.

Docking studies (hAChE).

For each docked compound a preliminary calculation on its protonation state at pH 7.4 was carried out using standard tools of the ChemAxon Package (Marvin 16.1.4.0, 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com/>) and the majority protonated microspecies at this pH was built by Discovery Studio software (Discovery Studio Modeling Environment, release 3.5, San Diego, CA: 2012) for docking studies.

The crystallographic coordinates of human acetylcholinesterase used for docking studies were obtained from X-ray structure of the donepezil/AChE complex (PDB ID 4EY7, a structure refined to 2.35 Å with an R factor of 17.7 %).⁴²

The docking of the compounds into the hAChE was carried out with the GOLD program (v5.6.3) using the default parameters.^{43,44} This program applies a genetic algorithm to explore conformational spaces and ligand binding modes. To evaluate the proposed ligand positions, the ChemPLP fitness function was applied in these docking studies. The binding site in the hAChE model was defined as a 7 Å sphere from the co-crystallized ligand donepezil and a water molecule interacting with protonated piperidine ring of donepezil was conserved during the docking (residue number 931).

Docking studies (5-HT₄R).

In this study, the 3D model of the human 5-HT₄R built previously by homology sequence approach⁴⁶ was used. This model was generated using the crystal structure (PDB: 2RH1) of the human β_2 adrenergic receptor-T4 lysozyme fusion protein complexed with the carazolol⁴⁷ as a template. The docking of the **32a** compound and donecopride into the generated model was carried out with the GOLD program (v5.7.3) using the default parameters^{43,44} and the proposed ligand positions were evaluated by the ChemPLP fitness function. The binding site in the 5-HT₄R model was defined as a 10 Å sphere centred on the aspartic acid residue Asp100. As the mutagenesis studies have shown that the interaction between the positively ionisable amine of ligands and Asp100 of 5-HT₄R is crucial for ligand binding, a hydrogen bond constraint between positively ionisable amine ligand and OD atom of Asp100 was used during the docking.⁴⁸ Furthermore, special attention was paid during the docking procedure to the following amino acids in the binding site, which were kept flexible: Arg96, Asp100, Thr104, Tyr192, Ser197 and Trp294.

Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT₄R. The method was validated from saturation studies: six concentrations of [^3H]GR113808 were used to give final concentrations of 0.0625–2 nM, and nonspecific binding of [^3H]GR113808 was defined in the presence of 30 μM serotonin to

determine the K_d and the B_{max} . The competition studies used membrane preparations made from proprietary stable recombinant cell lines expressing the 5-HT_{4(b)} receptor to ensure high-level of GPCR surface expression (HTS110M, Millipore). Membranes (2.5 μ g protein) were incubated in duplicate at 25 °C for 60 min in the absence or the presence of 10^{-6} or 10^{-8} M of each drug and 0.2 nM [³H]-GR 113808 (VT 240, ViTrax) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25°C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) pre-soaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 4 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4 °C). Non-specific binding was evaluated in parallel in the presence of 30 μ M serotonin.

For some of these compounds, affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the EBDA-Ligand software and expressed as $K_i \pm SD$.⁴¹

***In vitro* tests of AChE biological activity.** Inhibitory capacity of compounds on AChE biological activity was evaluated through the use of the spectrometric method of Ellman.³⁹ Acetylthiocholine and 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) were purchased from Sigma Aldrich. AChE from human erythrocytes (buffered aqueous solution, ≥ 500 units/mg protein (BCA), Sigma Aldrich) was diluted in 20 mM HEPES buffer pH 8, 0.1% Triton X-100 such as to have enzyme solution with 0.25 unit/mL enzyme activity. In the procedure, 100 μ L of 0.3 mM DTNB dissolved in phosphate buffer pH 7.4 were added into the 96 wells plate followed by 50 μ L of test compound solution and 50 μ L of enzyme (0.05 U final). After 5 min of preincubation at 25 °C, the reaction was then initiated by the injection of 50 μ L of 10 mM acetylthiocholine iodide solution. The hydrolysis of acetylthiocholine was monitored by the formation of yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as the result of the reaction of DTNB with thiocholine, released by the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine, at a wavelength of 412 nm using a 96-well microplate plate reader (TECAN Infinite M200, Lyon, France). Test compounds were dissolved in analytical grade DMSO. Donepezil was used as a reference standard. The rate of absorbance increase at 412 nm was followed every minute for 10 min. Assays were performed with a blank containing all components except acetylthiocholine, in order to account for non-enzymatic reaction. The reaction slopes were compared and the percent inhibition due to the presence of test compounds was calculated by the following expression: $100 - (v_i/v_0 \times 100)$ where v_i is the rate calculated in the presence of inhibitor and v_0 is the enzyme activity.

First screening of AChE activity was carried out at a 10^{-6} or 10^{-5} M concentration of compounds under study. For the compounds with significant inhibition ($\geq 50\%$), IC_{50} values were determined graphically by plotting the % inhibition versus the logarithm of six inhibitor concentrations in the assay solution using the Origin software.

Determination of cAMP production. COS-7 cells were purchased from ATCC (ATCC® CRL-1651; LGC STANDARTS, Molsheim, France). They were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected with plasmid encoding HA-tagged human 5-HT₄ receptor, then seeded in 96-well plates (35,000 cells/well). 24 hrs after transfection, cells were washed once with 200 µl of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂; 0.1% glucose; 0.1% BSA) and, after HBS removal, exposed to the indicated concentrations of 5-HT₄R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO-20-1724, at 37°C in 100 µl of HBS. After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%) during 30 min at 37°C. The competition assay in antagonist mode was performed as follows: after one wash in 200 µl of HBS, cells were exposed to 5-HT₄R ligands at twice the indicated concentration, at 37°C in 50 µl of HBS. After 7 min, serotonin (final concentration of 5.10⁻⁷M) was added in 50 µl of HBS in the presence of the phosphodiesterase inhibitor RO-20-1724 (final concentration of 0.1 mM). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%) during 30 min at 37°C. Quantification of cAMP production was performed by HTRF® by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions

Acknowledgements

This work was supported by funding from the French Agence Nationale de la Recherche Projects MALAD ANR-12-JS007-0012-01. The authors gratefully acknowledge the Conseil Régional de Normandie, as well as the European Community (FEDER) for their contribution to the CERMN's analytical platform. European COST action CA15135 (Multi-Target Paradigm for Innovative Ligand Identification in the Drug Discovery Process, MuTaLig) supports this article. This work was also supported by funding from the Fondation Alzheimer (AAP2015 Project TRIAD 016). Part of this work was performed using computing resources of CRIANN (Normandy, France) as well as the European Community (FEDER) for the molecular modeling software.

Author Contributions

SC, PD and CR designed the research and the manuscript was written through contributions of JL, SC, JSdOS, and CR. JL performed the synthesis and HP, AD, CL and RL performed the experiments. JSdOS performed the docking experiments. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

References

¹ World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research: New frontiers. (2018). <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>

-
- ² Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **8**, 429–431, <https://doi.org/10.1002/ca.980080612> (1995).
- ³ Bird, T. D. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* **10**, 231–239, <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31816b64dc> (2008).
- ⁴ Melnikova, I. Therapies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 341–342, <https://doi.org/10.1038/nrd2314> (2007).
- ⁵ Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Zhong, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res Ther* **6**, 37, <https://doi.org/10.1186/alzrt269> (2014).
- ⁶ Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* **9**, 702–716, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70119-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70119-8) (2010).
- ⁷ Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* **48**, 6523–6543, <https://doi.org/10.1021/jm058225d> (2005).
- ⁸ Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **51**, 347–372, <https://doi.org/10.1021/jm7009364> (2008).
- ⁹ Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed* **41**, 1053–1057, [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020315\)41:6<1053::AID-ANIE1053>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020315)41:6<1053::AID-ANIE1053>3.0.CO;2-4) (2002).
- ¹⁰ Garcia-Palomero, E.; Munoz, P.; Usan, P.; Garcia, P.; Delgado, E.; De Austria, C.; Valenzuela, R.; Rubio, L.; Medina, M.; Martinez, A. Potent beta-amyloid modulators. *Neurodegener Dis* **5**, 153–156, <https://doi.org/10.1159/000113688> (2008).
- ¹¹ Inestrosa, N. C.; Sagal, J. P.; Colombres, M. Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Subcell Biochem* **38**, 299–317, https://doi.org/10.1007/0-387-23226-5_15 (2005).
- ¹² Alvarez, A. *et al.* Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J Neurosci* **18**, 3213–3223, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03213.1998> (1998).
- ¹³ Reyes, A. E.; Chacon, M. A.; Dinamarca, M. C.; Cerpa, W.; Morgan, C.; Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. *Am J Pathol* **164**, 2163–2174, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63774-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63774-1) (2004).
- ¹⁴ Agis-Torres, A.; Sollhuber, M.; Fernandez, M.; Sanchez-Montero, J. M. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* **12**, 2–36, <https://doi.org/10.2174/1570159X113116660047> (2014).
- ¹⁵ Kowal, N.M.; Indurthi, D.C.; Ahring, P.K.; Chebib, M.; Olafsdottir, E.S.; Balle, T. Novel Approach for the Search for Chemical Scaffolds with Activity at Both Acetylcholinesterase and the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor: A Perspective on Scaffolds with Dual Activity for the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Molecules* **24**, 446; <https://doi.org/10.3390/molecules24030446> (2019).
- ¹⁶ Lalut, J.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Multiple Ligands in Neurodegenerative Diseases, *Drug Selectivity – An Evolving Concept in Drug Discovery*, Book series “Methods and Principles in Medicinal Chemistry”, Wiley-VCH Publishing House. <https://doi.org/10.1002/9783527674381.ch16> (2017).
- ¹⁷ Lecoutey, C. *et al.* Synthesis of dual AChE/5-HT₄ receptor multi-target directed ligands. *Med Chem Commun* **3**, 627–634. <https://doi.org/10.1039/c2md20063e> (2012).
- ¹⁸ Jourdan, J.-P. *et al.* Novel benzylidenephénylpyrrolizinones with pleiotropic activities potentially useful in Alzheimer's disease treatment. *Eur J Med Chem* **114**, 365–379, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.023> (2016).
- ¹⁹ Lalut, J. *et al.* Novel Multitarget-Directed Ligands Targeting Acetylcholinesterase and $\sigma 1$ Receptors as Lead Compounds for Treatment of Alzheimer's Disease: Synthesis, Evaluation, and Structural Characterization of their Complexes with Acetylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* **162**, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.064> (2019).

- ²⁰ Lecoutey, C. *et al.* Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *Proc Natl Acad Sci US* **111**, E3825–E3830, <https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111> (2014).
- ²¹ Bockaert, J.; Claeyssen, S.; Compan, V.; Dumuis, A. 5-HT(4) receptors: history, molecular pharmacology and brain functions. *Neuropharmacology* **55**, 922–931, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.013> (2008).
- ²² Matsumoto, M.; Togashi, H.; Mori, K.; Ueno, K.; Ohashi, S.; Kojima, T.; Yoshioka, M. Evidence for involvement of central 5-HT(4) receptors in cholinergic function associated with cognitive processes: Behavioral, electrophysiological, and neurochemical studies. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 676–682 (2001).
- ²³ Consolo, S.; Arnaboldi, S.; Giorgi, S.; Russi, G.; Ladinsky, H. 5-HT₄ receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. *Neuroreport* **5**, 1230–1232, <https://doi.org/10.1097/00001756-199406020-00018> (1994).
- ²⁴ Lamirault, L.; Simon, H. Enhancement of place and object recognition memory in young adult and old rats by RS67333, a partial agonist of 5-HT₄ receptors. *Neuropharmacology* **41**, 844–853, [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00123-X) (2001).
- ²⁵ Russo, O. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of new 5-HT₄ receptor agonists: application as amyloid cascade modulators and potential therapeutic utility in Alzheimer's disease. *J Med Chem* **52**, 2214–2225, <https://doi.org/10.1021/jm801327q> (2009).
- ²⁶ Freret, T. Synergistic effect of acetylcholinesterase inhibition (donepezil) and 5-HT₄ receptor activation (RS67333) on object recognition in mice. A new hope to design a treatment for Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.*, **230**, 304–308, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.012> (2012).
- ²⁷ Villalobos, A. *et al.* Novel Benzisoxazole Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J Med Chem* **37**, 2721–2734, <https://doi.org/10.1021/jm00043a012> (1994).
- ²⁸ Sugimoto, H. *et al.* Novel Piperidine Derivatives. Synthesis and Anti-Acetylcholinesterase Activity of 1-Benzyl-4-[2-(N-benzoylamino)ethyl]piperidine Derivatives. *J Med Chem* **33**, 1880–1887, <https://doi.org/10.1021/jm00169a008> (1990).
- ²⁹ Brodney, M. A. *et al.* Identification of Multiple 5-HT₄ Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **55**, 9240–9254, <https://doi.org/10.1021/jm300953p> (2012).
- ³⁰ Dubrovskiy, A. V. & Larock, R. C. Synthesis of Benzisoxazoles by the [3 + 2] Cycloaddition of in situ Generated Nitrile Oxides and Arynes. *Org Lett* **12**, 1180–1183, <https://doi.org/10.1021/ol902921s> (2010).
- ³¹ Chen, C.-y. *et al.* A Divergent and Selective Synthesis of Isomeric Benzoxazoles from a Single N–Cl Imine. *Org Lett* **13**, 6300–6303, <https://doi.org/10.1021/ol202844c> (2011).
- ³² Shutske, G. M. A new synthesis of 3-phenyl-1,2-benzisoxazoles: sterically constrained 3-phenyl-1,2-benzisoxazoles by intramolecular carbon:nitrogen bond formation at a hindered carbonyl group. *J Org Chem* **49**, 180–183, <https://doi.org/10.1021/jo00175a042> (1984).
- ³³ Liu, W. *et al.* Benzimidazolones: a new class of selective peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) modulators. *J Med Chem* **54**, 8541–8554, <https://doi.org/10.1021/jm201061j> (2011).
- ³⁴ Hoare, D. G. *et al.* The reaction of hydroxamic acids with water-soluble carbodiimides. A lossen rearrangement. *J Am Chem Soc* **90**, 1638–1643, <https://doi.org/10.1021/ja01008a040> (1968).
- ³⁵ Mitsunobu, O. & Yamada, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *Bull Chem Soc Jpn* **40**, 2380–2382, <https://doi.org/10.1246/bcsj.40.2380> (1967).
- ³⁶ Udd, S. *et al.* Copper-catalyzed cyclization of Z-oximes into 3-methyl-1,2-benzisoxazoles. *Tetrahedron Lett* **51**, 1030–1033, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.12.070> (2010).
- ³⁷ Iranpoor, N. *et al.* A novel method for the highly efficient synthesis of 1,2-benzisoxazoles under neutral conditions using the Ph₃P/DDQ system. *Tetrahedron Lett* **47**, 8247–8250, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.09.120> (2006).
- ³⁸ Alvaro, G.; Dambrosio, P.; Marasco, A.; Tommasi, S.; Decor, A.; Large, C. Dérivés d'hydantoïne utiles en tant qu'inhibiteurs de kv3. WO 2012/076877 A1, **2012**.
- ³⁹ Ellman, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**, 88–95, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9) (1961).

-
- ⁴⁰ Grossman, C. J. *et al.* Development of a radioligand binding assay for 5-HT₄ receptors in guinea-pig and rat brain. *Br J Pharmacol* **109**, 618–624, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13617.x> (1993).
- ⁴¹ Rochais, C. *et al.* Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J. Med. Chem.* **58**, 3172–3187, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00115> (2015).
- ⁴² Cheung, J. *et al.* Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem* **55**, 10282–10286, <https://doi.org/10.1021/jm300871x> (2012).
- ⁴³ Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* **245**, 43–53, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(95\)80037-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(95)80037-9) (1995).
- ⁴⁴ Jones, G. *et al.* Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking *J Mol Biol* **267**, 727–748, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897> (1997).
- ⁴⁵ *Discovery Studio Modeling Environment*, release 4.5, San Diego, CA: 2012.
- ⁴⁶ Dubost, E. *et al.* Synthesis and Structure-Affinity Relationships of Selective High-Affinity 5-HT₄ Receptor Antagonists: Application to the Design of New Potential Single Photon Emission Computed Tomography Tracers. *J Med Chem* **55**, 9693–9707, <https://doi.org/10.1021/jm300943r> (2012).
- ⁴⁷ Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265, <https://doi.org/10.1126/science.1150577> (2007).
- ⁴⁸ Rivail, L. *et al.* New insights into the human 5-HT₄ receptor binding site: Exploration of a hydrophobic pocket. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 361–370, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705950> (2004).

Références

- Abskharon, R. N. N., Giachin, G., Wohlkonig, A., Soror, S. H., Pardon, E., Legname, G., & Steyaert, J. (2014). Probing The N-Terminal B-Sheet Conversion In The Crystal Structure Of The Human Prion Protein Bound To A Nanobody. *Journal Of The American Chemical Society*, 136(3), 937–944.
- Agnati, L. F., Fuxe, K., Zini, I., Lenzi, P., & Hökfelt, T. (1980). Aspects On Receptor Regulation And Isoreceptor Identification. *Medical Biology*, 58(4), 182–187.
- Akekawatchai, C., Holland, J. D., Kochetkova, M., Wallace, J. C., & Mccoll, S. R. (2005). Transactivation Of CXCR4 By The Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) In Human MDA-MB-231 Breast Cancer Epithelial Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(48), 39701–39708.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., ... Durroux, T. (2010). Time-Resolved FRET Between GPCR Ligands Reveals Oligomers In Native Tissues. *Nature Chemical Biology*, 6(8), 587–594.
- Andrade, R., & Chaput, Y. (1991). 5-Hydroxytryptamine₄-Like Receptors Mediate The Slow Excitatory Response To Serotonin In The Rat Hippocampus. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 257(3), 930–937.
- Andrade, Rodrigo, Barnes, N. M., Baxter, G., Bockaert, J., Branchek, T., Butler, A., ... Yocca, F. (2019). 5-Hydroxytryptamine Receptors (Version 2019.4) In The Iuphar/Bps Guide To Pharmacology Database. *Iuphar/Bps Guide To Pharmacology Cite*, 2019(4).
- Andressen, K. W., Ulsund, A. H., Krobert, K. A., Lohse, M. J., Bünemann, M., & Levy, F. O. (2018). Related GPCRs Couple Differently To Gs: Preassociation Between G Protein And 5-HT₇ Serotonin Receptor Reveals Movement Of Gas Upon Receptor Activation. *Faseb Journal*, 32(2), 1059–1069.
- Ango, F., Robbe, D., Tu, J. C., Xiao, B., Worley, P. F., Pin, J. P., ... Fagni, L. (2002). Homer-Dependent Cell Surface Expression Of Metabotropic Glutamate Receptor Type 5 In Neurons. *Molecular And Cellular Neuroscience*, 20(2), 323–329.
- Ansanay, H., Dumuis, A., Sebben, M., Bockaert, J., & Fagni, L. (1995). Camp-Dependent, Long-Lasting Inhibition Of A K⁺ Current In Mammalian Neurons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 92(14), 6635–6639.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., & Muyldermans, S. (1997). Selection And Identification Of Single Domain Antibody Fragments From Camel Heavy-Chain Antibodies. *Febs Letters*, 414(3), 521–526.

- Archbold, J. K., Flanagan, J. U., Watkins, H. A., Gingell, J. J., & Hay, D. L. (2011, October). Structural Insights Into Ramp Modification Of Secretin Family G Protein-Coupled Receptors: Implications For Drug Development. *Trends In Pharmacological Sciences*, Vol. 32, Pp. 591–600.
- Artigas, F., Nutt, D. J., & Shelton, R. (2002). Mechanism Of Action Of Antidepressants. *Psychopharmacology Bulletin*, Pp. 123–132.
- Asakawa, A., Ueno, N., Katagi, M., Ijuin, Y., Morita, Y., Mizuno, S., ... Uemoto, M. (2006). Mosapride Improves Food Intake, While Not Worsening Glycemic Control And Obesity, In Ob/Ob Obese Mice With Decreased Gastric Emptying. *Journal Of Diabetes And Its Complications*, 20(1), 56–58.
- Atri, A., Frölich, L., Ballard, C., Tariot, P. N., Molinuevo, J. L., Boneva, N., ... Cummings, J. L. (2018). Effect Of Idalopirdine As Adjunct To Cholinesterase Inhibitors On Change In Cognition In Patients With Alzheimer Disease Three Randomized Clinical Trials. *Jama - Journal Of The American Medical Association*, 319(2), 130–142.
- Azenha, D., Alves, M., Matos, R., Santa, J. F., Silva, B., Cordeiro, C., ... Ambrosio, A. M. (2009). Male Specific Association Between The 5-HTR6 Gene 267c/T Snp And Suicide In The Portuguese Population. *Neuroscience Letters*, 466(3), 128–130.
- Baker, L. P., Nielsen, M. D., Impey, S., Metcalf, M. A., Poser, S. W., Chan, G., ... Storm, D. R. (1998). Stimulation Of Type 1 And Type 8 Ca²⁺/Calmodulin-Sensitive Adenylyl Cyclases By The G(S)-Coupled 5-Hydroxytryptamine Subtype 5-Ht(7a) Receptor. *Journal Of Biological Chemistry*, 273(28), 17469–17476.
- Balasubramanian, S., Fam, S. R., & Hall, R. A. (2007). GABAB Receptor Association With The PdZ Scaffold MUPP1 Alters Receptor Stability And Function. *The Journal Of Biological Chemistry*, 282(6), 4162–4171.
- Bannas, P., Hambach, J., & Koch-Nolte, F. (2017, November 22). Nanobodies And Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Frontiers In Immunology*, Vol. 8.
- Baral, T. N., Magez, S., Stijlemans, B., Conrath, K., Vanhollebeke, B., Pays, E., ... De Baetselier, P. (2006). Experimental Therapy Of African Trypanosomiasis With A Nanobody-Conjugated Human Trypanolytic Factor. *Nature Medicine*, 12(5), 580–584.
- Baranger, K., Giannoni, P., Girard, S. D., Girot, S., Gaven, F., Stephan, D., ... Roman, F. S. (2017). Chronic Treatments With A 5-Ht₄ Receptor Agonist Decrease

- Amyloid Pathology In The Entorhinal Cortex And Learning And Memory Deficits In The 5xfad Mouse Model Of Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology*, 126, 128–141.
- Barbash, S., Lorenzen, E., Persson, T., Huber, T., & Sakmar, T. P. (2017). Gpcrs Globally Coevolved With Receptor Activity-Modifying Proteins, Ramps. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 114(45), 12015–12020.
- Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X.-R., Milligan, G., & Lefkowitz, R. J. (2005). B-Arrestin 1 And G_{Aq/11} Coordinately Activate Rhoa And Stress Fiber Formation Following Receptor Stimulation. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(9), 8041–8050.
- Barthet, G., Carrat, G., Cassier, E., Barker, B., Gaven, F., Pillot, M., ... Dumuis, A. (2009). B-Arrestin1 Phosphorylation By GRK5 Regulates G Protein-Independent 5-HT₄ Receptor Signalling. *Embo Journal*, 28(18), 2706–2718.
- Barthet, G., Framery, B., Gaven, F., Pellissier, L., Reiter, E., Claeysen, S., ... Dumuis, A. (2007). 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Activation Of The Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Depends On Src Activation But Not On G Protein Or Beta-Arrestin Signaling. *Molecular Biology Of The Cell*, 18(6), 1979–1991.
- Barthet, G., Gaven, F., Framery, B., Shinjo, K., Nakamura, T., Claeysen, S., ... Dumuis, A. (2005). Uncoupling And Endocytosis Of 5-Hydroxytryptamine₄ Receptors: Distinct Molecular Events With Different GRK2 Requirements. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(30), 27924–27934.
- Bassotti, G., Usai Satta, P., & Bellini, M. (2019, March 4). Prucalopride For The Treatment Of Constipation: A View From 2015 And Beyond. *Expert Review Of Gastroenterology And Hepatology*, Vol. 13, Pp. 257–262.
- Baud, V., Chisoe, S. L., Viegas-Pequignot, E., Diriong, S., N'guyen, V. C., Roe, B. A., & Lipinski, M. (1995). EMR1, An Unusual Member In The Family Of Hormone Receptors With Seven Transmembrane Segments. *Genomics*, 26(2), 334–344.
- Baxter, G. S., Craig, D. A., & Clarke, D. E. (1991). 5-Hydroxytryptamine₄ Receptors Mediate Relaxation Of The Rat Oesophageal Tunica Muscularis Mucosae. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*, 343(5), 439–446.
- Becamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., ... Ullmer, C. (2001). Interaction Of Serotonin 5-Hydroxytryptamine Type 2c Receptors With PDZ10 Of The Multi-Pdz Domain Protein MUPP1. *The Journal Of Biological*

- Chemistry*, 276(16), 12974–12982.
- Behdani, M., Zeinali, S., Karimipour, M., Khanahmad, H., Schoonooghe, S., Aslemarz, A., ... Muyldermans, S. (2013). Development Of VEGFR2-Specific Nanobody Pseudomonas Exotoxin A Conjugated To Provide Efficient Inhibition Of Tumor Cell Growth. *New Biotechnology*, 30(2), 205–209.
- Benovic, J. L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1987). Functional Desensitization Of The Isolated Beta-Adrenergic Receptor By The Beta-Adrenergic Receptor Kinase: Potential Role Of An Analog Of The Retinal Protein Arrestin (48-KDa Protein). *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 84(24), 8879–8882.
- 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. *Molecular Biology Of The Cell*, 19(4), 1540–1547.
- Bernstein, L. S., Ramineni, S., Hague, C., Cladman, W., Chidiac, P., Levey, A. I., & Hepler, J. R. (2004). RGS2 Binds Directly And Selectively To The M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Third Intracellular Loop To Modulate Gq/11alpha Signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(20), 21248–21256.
- Bertaso, F., Zhang, C., Scheschonka, A., De Bock, F., Fontanaud, P., Marin, P., ... Lerner-Natoli, M. (2008). Pick1 Uncoupling From mGluR7a Causes Absence-Like Seizures. *Nature Neuroscience*, 11(8), 940–948.
- Berthouze, M., Ayoub, M., Russo, O., Rivail, L., Sicsic, S., Fischmeister, R., ... Lezoualc'h, F. (2005). Constitutive Dimerization Of Human Serotonin 5-HT4 Receptors In Living Cells. *Febs Letters*, 579(14), 2973–2980.
- Binienda, A., Storr, M., Fichna, J., & Salaga, M. (2017). Efficacy And Safety Of Serotonin Receptor Ligands In The Treatment Of Irritable Bowel Syndrome: A Review. *Current Drug Targets*, 19(15), 1774–1781.
- Birkeland, J. A. K., Swift, F., Tovsrud, N., Enger, U., Lunde, P. K., Qvigstad, E., ... Sjaastad, I. (2007). Serotonin Increases L-Type Ca²⁺ Current And Sr Ca²⁺ Content Through 5-HT₄ Receptors In Failing Rat Ventricular Cardiomyocytes. *American Journal Of Physiology - Heart And Circulatory Physiology*, 293(4).
- Blumer, J. B., Cismowski, M. J., Sato, M., & Lanier, S. M. (2005, September). Ags Proteins: Receptor-Independent Activators Of G-Protein Signaling. *Trends In Pharmacological Sciences*, Vol. 26, Pp. 470–476.

- Boakye, P. A., Stenkamp-Strahm, C., Bhattarai, Y., Heckman, M. D., Brierley, S. M., Pasilis, S. P., & Balemba, O. B. (2012). 5-HT(3) And 5-HT(4) Receptors Contribute To The Anti-Motility Effects Of Garcinia Buchananii Bark Extract In The Guinea-Pig Distal Colon. *Neurogastroenterology And Motility : The Official Journal Of The European Gastrointestinal Motility Society*, 24(1), E27-40.
- Bobkov, V., Van Der Woning, B., & De Haard, H. (2018). Display Technologies For Generation Of Ig Single Variable Domains. In *Methods In Molecular Biology* (Vol. 1827, Pp. 129–144).
- Bobkov, V., Zarca, A. M., Van Hout, A., Arimont, M., Doijen, J., Bialkowska, M., ... Smit, M. J. (2018). Nanobody-Fc Constructs Targeting Chemokine Receptor Cxcr4 Potently Inhibit Signaling And Cxcr4-Mediated Hiv-Entry And Induce Antibody Effector Functions. *Biochemical Pharmacology*, 158, 413–424.
- Bockaert, J., Sebben, M., & Dumuis, A. (1990). Pharmacological Characterization Of 5-Hydroxytryptamine₄(5-HT₄) Receptors Positively Coupled To Adenylate Cyclase In Adult Guinea Pig Hippocampal Membranes: Effect Of Substituted Benzamide Derivatives. *Molecular Pharmacology*, 37(3), 408–411.
- Bockaert, J., Claeyssen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2004, February). 5-HT₄ Receptors. *Current Drug Targets: Cns And Neurological Disorders*, Vol. 3, Pp. 39–51.
- Bockaert, J., Claeyssen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2008). 5-HT₄ Receptors: History, Molecular Pharmacology And Brain Functions. *Neuropharmacology*, 55(6), 922–931.
- Bockaert, J., Claeyssen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2011). 5-HT₄ Receptors, A Place In The Sun: Act Two. *Current Opinion In Pharmacology*, Vol. 11, Pp. 87–93.
- Bockaert, J., Claeyssen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2012). Les Recepteurs Serotoninergiques 5-HT₄. In *Serotonine: Aspects Biologiques Et Cliniques* (Lavoisier, Pp. 128–129).
- Bockaert, J., Fozard, J. R., Dumuis, A., & Clarke, D. E. (1992). The 5-HT₄ Receptor: A Place In The Sun. *Trends In Pharmacological Sciences*, Vol. 13, Pp. 141–145.
- Boess, F. G., Monsma, F. J., Carolo, C., Meyer, V., Rudler, A., Zwingelstein, C., & Sleight, A. J. (1997). Functional And Radioligand Binding Characterization Of Rat 5-HT₆ Receptors Stably Expressed In Hek293 Cells. *Neuropharmacology*, 36(4–5), 713–720.

- Bonhomme, N., De Deurwaerdere, P., Le Moal, M., & Spampinato, U. (1995). Evidence For 5-HT₄ Receptor Subtype Involvement In The Enhancement Of Striatal Dopamine Release Induced By Serotonin: A Microdialysis Study In The Halothane-Anesthetized Rat. *Neuropharmacology*, 34(3), 269–279.
- Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tscherter, A., ... Pisani, A. (2007). Endogenous Serotonin Excites Striatal Cholinergic Interneurons Via The Activation Of 5-HT_{2c}, 5-HT₆, And 5-HT₇ Serotonin Receptors: Implications For Extrapyrimal Side Effects Of Serotonin Reuptake Inhibitors. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1840–1854.
- Bos, J. L., De Bruyn, K., Enserink, J., Kuiperij, B., Rangarajan, S., Rehmann, H., ... Zwartkruis, F. (2003). The Role Of Rap1 In Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Biochemical Society Transactions*, 31(1), 83–86.
- Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Huganir, R. L., Worley, P., & Craig, A. M. (2000). Presynaptic Clustering Of mGluR7a Requires The PICK1 PDZ Domain Binding Site. *Neuron*, 28(2), 485–497.
- 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(1–2), 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 Research*, 1660, 10–19.
- Bruce, V. J., Lopez-Islas, M., & Mcnaughton, B. R. (2016). Resurfaced Cell-Penetrating Nanobodies: A Potentially General Scaffold For Intracellularly Targeted Protein Discovery. *Protein Science*, 25(6), 1129–1137.
- Bruchas, M. R., Macey, T. A., Lowe, J. D., & Chavkin, C. (2006). Kappa Opioid Receptor Activation Of P38 MAPK Is GRK3- And Arrestin-Dependent In Neurons And Astrocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281(26), 18081–18089.
- Bruning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., ... Kahn, C. R. (2000). Role Of Brain Insulin Receptor In Control Of Body Weight And Reproduction. *Science*, 289(5487), 2122–2125.
- Burgdorf, J., Zhang, X. L., Colechio, E. M., Ghoreishi-Haack, N., Gross, A., Kroes, R. A., ... Moskal, J. R. (2016). Insulin-Like Growth Factor I Produces An Antidepressant-Like Effect And Elicits N-Methyl-D-Aspartate Receptor Independent Long-Term Potentiation Of Synaptic Transmission In Medial

- Prefrontal Cortex And Hippocampus. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 19(2).
- Butcher, A. J., Prihandoko, R., Kong, K. C., McWilliams, P., Edwards, J. M., Bottrill, A., ... Tobin, A. B. (2011). Differential G-Protein-Coupled Receptor Phosphorylation Provides Evidence For A Signaling Bar Code. *The Journal Of Biological Chemistry*, 286(13), 11506–11518.
- Cachard-Chastel, M., Lezoualc'h, F., Dewachter, I., Delomenie, C., Croes, S., Devijver, H., ... Gardier, A. M. (2007). 5-HT₄ Receptor Agonists Increase Sappα Levels In The Cortex And Hippocampus Of Male C57bl/6j Mice. *British Journal Of Pharmacology*, 150(7), 883–892.
- Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Gagliani, M. C., De Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., ... Lohse, M. J. (2009). Persistent Camp-Signals Triggered By Internalized G-Protein-Coupled Receptors. *Plos Biology*, 7(8).
- Caljon, G., Hussain, S., Vermeiren, L., & Van Den Abbeele, J. (2015). Description Of A Nanobody-Based Competitive Immunoassay To Detect Tsetse Fly Exposure. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9(2), E0003456.
- Castañeda-Corral, G., Rocha-Gonzalez, H. I., Araiza-Saldaña, 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(2), 444–452.
- Castello, J., Lefrancois, B., Flajolet, M., Greengard, P., Friedman, E., & Rebholz, H. (2018). Ck2 Regulates 5-Ht₄ Receptor Signaling And Modulates Depressive-Like Behavior. *Molecular Psychiatry*, 23(4), 872–882.
- Castro, L., Mialet-Perez, J., Guillemeau, A., Stillitano, F., Zolk, O., Eschenhagen, T., ... Fischmeister, R. (2005). Differential Functional Effects Of Two 5-HT₄ Receptor Isoforms In Adult Cardiomyocytes. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 39(2), 335–344.
- Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., & Ammendola, R. (2014, October 29). Cell-Surface Receptors Transactivation Mediated By G Protein-Coupled Receptors. *International Journal Of Molecular Sciences*, Vol. 15, Pp. 19700–19728.
- Chakravarty, R., Goel, S., & Cai, W. (2014). Nanobody: The “Magic Bullet” For Molecular Imaging? *Theranostics*, 4(4), 386–398.
- Chapin, E. M., Haj-Dahmane, S., Torres, G., & Andrade, R. (2002). The 5-Ht(4)

- Receptor-Induced Depolarization In Rat Hippocampal Neurons Is Mediated By Camp But Is Independent Of I(H). *Neuroscience Letters*, 324(1), 1–4.
- Chasseigneaux, S., & Allinquant, B. (2012, January). Functions Of A β , Sapp α And Sapp β : Similarities And Differences. *Journal Of Neurochemistry*, Vol. 120, Pp. 99–108.
- Che, T., Majumdar, S., Zaidi, S. A., Ondachi, P., Mccorvy, J. D., Wang, S., ... Roth, B. L. (2018). Structure Of The Nanobody-Stabilized Active State Of The Kappa Opioid Receptor. *Cell*, 172(1–2), 55–67.E15.
- Chen, H., Hong, F., Chen, Y., Li, J., Yao, Y. S., Zhang, Y., ... Zhu, J. X. (2016a). Activation Of Islet 5-HT₄ Receptor Regulates Glycemic Control Through Promoting Insulin Secretion. *European Journal Of Pharmacology*, 789, 354–361.
- Chen, H., Hong, F., Chen, Y., Li, J., Yao, Y. S., Zhang, Y., ... Zhu, J. X. (2016b). Activation Of Islet 5-HT₄receptor Regulates Glycemic Control Through Promoting Insulin Secretion. *European Journal Of Pharmacology*, 789, 354–361.
- Claeysen, S., Faye, P., Sebben, M., Lemaire, S., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1997). Cloning And Expression Of Human 5-HT(4s) Receptors. Effect Of Receptor Density On Their Coupling To Adenylyl Cyclase. *Neuroreport*, 8(15), 3189–3196.
- Claeysen, S., Joubert, L., Sebben, M., Bockaert, J., & Dumuis, A. (2003). A Single Mutation In The 5-HT₄ Receptor (5-HT₄-R D100(3.32)A) Generates A Gs-Coupled Receptor Activated Exclusively By Synthetic Ligands (Rassl). *Journal Of Biological Chemistry*, 278(2), 699–702.
- Claeysen, S., Sebben, M., Becamel, C., Eglen, R. M., Clark, R. D., Bockaert, J., & Dumuis, A. (2000). Pharmacological Properties Of 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Antagonists On Constitutively Active Wild-Type And Mutated Receptors. *Molecular Pharmacology*, 58(1), 136–144.
- Claeysen, S., Sebben, M., Journot, L., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1996). Cloning, Expression And Pharmacology Of The Mouse 5-HT(4L) Receptor. *Febs Letters*, 398(1), 19–25.
- Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., ... Claeysen, S. (2013). 5-HT₄ Receptors Constitutively Promote The Non-Amyloidogenic Pathway Of APP Cleavage And Interact With ADAM10. *Acs Chemical Neuroscience*, 4(1), 130–140.
- Compan, V., Zhou, M., Grailhe, R., Gazzara, R. A., Martin, R., Gingrich, J., ... Hen, R. (2004). Attenuated Response To Stress And Novelty And Hypersensitivity To

- Seizures In 5-HT₄ Receptor Knock-Out Mice. *Journal Of Neuroscience*, 24(2), 412–419.
- Conductier, G., Dusticier, N., Lucas, G., Cote, F., Debonnel, G., Daszuta, A., ... Compan, V. (2006). Adaptive Changes In Serotonin Neurons Of The Raphe Nuclei In 5-HT₄ Receptor Knock-Out Mouse. *European Journal Of Neuroscience*, 24(4), 1053–1062.
- Conner, D. A., & Mansour, T. E. (1990). Serotonin Receptor-Mediated Activation Of Adenylate Cyclase In The Neuroblastoma NCB.20: A Novel 5-Hydroxytryptamine Receptor. *Molecular Pharmacology*, 37(5), 742–751.
- Conrath, K. E., Wernery, U., Muyldermans, S., & Nguyen, V. K. (2003). Emergence And Evolution Of Functional Heavy-Chain Antibodies In Camelidae. *Developmental And Comparative Immunology*, 27(2), 87–103.
- Consolo, S., Arnaboldi, S., Giorgi, S., Russi, G., & Ladinsky, H. (1994). 5-HT₄ receptor Stimulation Facilitates Acetylcholine Release In Rat Frontal Cortex. *Neuroreport*, 5(10), 1230–1232.
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., De Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., ... Rottiers, P. (2006). Formatted Anti-Tumor Necrosis Factor A Vhh Proteins Derived From Camelids Show Superior Potency And Targeting To Inflamed Joints In A Murine Model Of Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis And Rheumatism*, 54(6), 1856–1866.
- Cottet, M., Faklaris, O., Falco, A., Trinquet, E., Pin, J. P., Mouillac, B., & Durroux, T. (2013). Fluorescent Ligands To Investigate GPCR Binding Properties And Oligomerization. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 148–153.
- Cowburn, D. (1997). Peptide Recognition By PTB And PDZ Domains. *Current Opinion In Structural Biology*, 7(6), 835–838.
- Cowen, D. S. (2007, June). Serotonin And Neuronal Growth Factors - A Convergence Of Signaling Pathways. *Journal Of Neurochemistry*, Vol. 101, Pp. 1161–1171.
- D'agostino, G., Condino, A. M., Gallinari, P., Franceschetti, G. P., & Tonini, M. (2006). Characterization Of Prejunctional Serotonin Receptors Modulating [3h]Acetylcholine Release In The Human Detrusor. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 316(1), 129–135.
- Darblade, B., Behr-Roussel, D., Gorny, D., Lebrete, T., Benoit, G., Hieble, J. P., ... Giuliano, F. (2005). Piboserod (Sb 207266), A Selective 5-HT₄ Receptor Antagonist, Reduces Serotonin Potentiation Of Neurally-Mediated Contractile

- Responses Of Human Detrusor Muscle. *World Journal Of Urology*, 23(2), 147–151.
- Darvish, M., Behdani, M., Shokrgozar, M. A., Pooshang-Bagheri, K., & Shahbazzadeh, D. (2015). Development Of Protective Agent Against Hottentotta Saulcyi Venom Using Camelid Single-Domain Antibody. *Molecular Immunology*, 68(2), 412–420.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role Of Transactivation Of The EGF Receptor In Signalling By G-Protein-Coupled Receptors. *Nature*, 379(6565), 557–560.
- Dawson, L. A., & Li, P. (2003). Effects Of 5-HT₆ Receptor Blockade On The Neurochemical Outcome Of Antidepressant Treatment In The Frontal Cortex Of The Rat. *Journal Of Neural Transmission*, 110(6), 577–590.
- De Genst, E., Saerens, D., Muyldermans, S., & Conrath, K. (2006). Antibody Repertoire Development In Camelids. *Developmental And Comparative Immunology*, 30(1–2), 187–198.
- Debruine, Z. J., Xu, H. E., & Melcher, K. (2017). Assembly And Architecture Of The Wnt/B-Catenin Signalosome At The Membrane. *British Journal Of Pharmacology*, 174(24), 4564–4574.
- Defea, K. A., Vaughn, Z. D., O'bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O., & Bunnett, N. W. (2000). The Proliferative And Antiapoptotic Effects Of Substance P Are Facilitated By Formation Of A Beta -Arrestin-Dependent Scaffolding Complex. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 97(20), 11086–11091.
- Delcourt, N., Thouvenot, E., Chanrion, B., Galeotti, N., Jouin, P., Bockaert, J., & Marin, P. (2007). PACAP Type I Receptor Transactivation Is Essential For IGF-1 Receptor Signalling And Antiapoptotic Activity In Neurons. *The Embo Journal*, 26(6), 1542–1551.
- Deng, C., Xiong, J., Gu, X., Chen, X., Wu, S., Wang, Z., ... Xie, J. (2017). Novel Recombinant Immunotoxin Of EGFR Specific Nanobody Fused With Cucurmosin, Construction And Antitumor Efficiency In Vitro. *Oncotarget*, 8(24), 38568–38580.
- Derakhshan, F., & Toth, C. (2013). Insulin And The Brain. *Current Diabetes Reviews*, 9(2), 102–116.
- Detalle, L., Stohr, T., Palomo, C., Piedra, P. A., Gilbert, B. E., Mas, V., ... Depla, E. (2016). Generation And Characterization Of ALX-0171 , A Potent Novel Therapeutic Nanobody For The Treatment Of Respiratory Syncytial Virus

- Infection. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 60(1), 6–13.
- Dosio, F., Brusa, P., & Cattell, L. (2011). Immunotoxins And Anticancer Drug Conjugate Assemblies: The Role Of The Linkage Between Components. *Toxins*, 3(7), 848–883.
- Drews, J. (2000, March 17). Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*, Vol. 287, Pp. 1960–1964.
- Druey, K. M. (2017). Emerging Roles Of Regulators Of G Protein Signaling (RGS) Proteins In The Immune System. In *Advances In Immunology* (Vol. 136, Pp. 315–351).
- Duhr, F., Deleris, P., Raynaud, F., Seveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury La Cour, C., ... Chaumont-Dubel, S. (2014). Cdk5 Induces Constitutive Activation Of 5-HT₆ Receptors To Promote Neurite Growth. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 590–597.
- Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., Cory, R., & Bockaert, J. (1988). A Nonclassical 5-Hydroxytryptamine Receptor Positively Coupled With Adenylate Cyclase In The Central Nervous System. *Molecular Pharmacology*, 34(6).
- Dupre, D. J., Hammad, M. M., Holland, P., & Wertman, J. (2012). Role Of Chaperones In G Protein Coupled Receptor Signaling Complex Assembly. *Sub-Cellular Biochemistry*, 63, 23–42.
- Eglen, R. M., Bonhaus, D. W., Johnson, L. G., Leung, E., & Clark, R. D. (1995). Pharmacological Characterization Of Two Novel And Potent 5 - HT₄ Receptor Agonists, Rs 67333 And Rs 67506, In Vitro And In Vivo. *British Journal Of Pharmacology*, 115(8), 1387–1392.
- Eglen, R. M., Wong, E. H., Dumuis, A., & Bockaert, J. (1995). Central 5-HT₄ Receptors. *Trends In Pharmacological Sciences*, 16(11), 391–398.
- El-Shewy, H. M., Johnson, K. R., Lee, M.-H., Jaffa, A. A., Obeid, L. M., & Luttrell, L. M. (2006). Insulin-Like Growth Factors Mediate Heterotrimeric G Protein-Dependent ERK1/2 Activation By Transactivating Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281(42), 31399–31407.
- Ellisdon, A. M., & Halls, M. L. (2016). Compartmentalization Of GPCR Signalling Controls Unique Cellular Responses. *Biochemical Society Transactions*, 44(2), 562–567.
- Erspamer, V. (1946). No Title. *Archo Sci Biol.*, 31(86).
- Fagni, L., Dumuis, A., Sebben, M., & Bockaert, J. (1992). The 5 - HT₄ Receptor

- Subtype Inhibits K⁺ Current In Colliculi Neurones Via Activation Of A Cyclic Amp - Dependent Protein Kinase. *British Journal Of Pharmacology*, 105(4), 973–979.
- Fan, G., Shumay, E., Malbon, C. C., & Wang, H. (2001). C-Src Tyrosine Kinase Binds The B2-Adrenergic Receptor Via Phospho-Tyr-350, Phosphorylates G-Protein-Linked Receptor Kinase 2, And Mediates Agonist-Induced Receptor Desensitization. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(16), 13240–13247.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T. A., & Bourne, H. R. (1994). cAMP And Beta Gamma Subunits Of Heterotrimeric G Proteins Stimulate The Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway In COSs-7 Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, 269(11), 7851–7854.
- Feinstein, T. N., Yui, N., Webber, M. J., Wehbi, V. L., Stevenson, H. P., King, J. D., ... Vilardaga, J. P. (2013). Noncanonical Control Of Vasopressin Receptor Type 2 Signaling By Retromer And Arrestin. *Journal Of Biological Chemistry*, 288(39), 27849–27860.
- Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H. P., & Sadee, W. (1999). The Venus Flytrap Of Periplasmic Binding Proteins: An Ancient Protein Module Present In Multiple Drug Receptors. *Aaps Pharmsci*, 1(2), 1–20.
- 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. *Biological Psychiatry*, 63(2), 207–213.
- Ferrandon, S., Feinstein, T. N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J. T., ... Vilardaga, J. P. (2009). Sustained Cyclic AMP Production By Parathyroid Hormone Receptor Endocytosis. *Nature Chemical Biology*, 5(10), 734–742.
- Flajnik, M. F., Deschacht, N., & Muyldermans, S. (2011). A Case Of Convergence: Why Did A Simple Alternative To Canonical Antibodies Arise In Sharks And Camels? *Plos Biology*, 9(8).
- Follett, J., Bugarcic, A., Yang, Z., Ariotti, N., Norwood, S. J., Collins, B. M., ... Teasdale, R. D. (2016). Parkinson Disease-Linked Vps35 R524W Mutation Impairs The Endosomal Association Of Retromer And Induces A-Synuclein Aggregation. *Journal Of Biological Chemistry*, 291(35), 18283–18298.
- Follett, J., Norwood, S. J., Hamilton, N. A., Mohan, M., Kovtun, O., Tay, S., ... Teasdale, R. D. (2014). The Vps35 D620N Mutation Linked To Parkinson's Disease Disrupts The Cargo Sorting Function Of Retromer. *Traffic*, 15(2), 230–

- Ford, A. P. D. W., Baxter, G. S., Eglen, R. M., & Clarke, D. E. (1992). 5-Hydroxytryptamine Stimulates Cyclic AMP Formation In The Tunica Muscularis Mucosae Of The Rat Oesophagus Via 5-HT₄ Receptors. *European Journal Of Pharmacology*, 211(1), 117–120.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., & Palczewski, K. (2003). Rhodopsin Dimers In Native Disc Membranes. *Nature*, 421(6919), 127–128.
- Foxx-Orenstein, A. E., Kuemmerle, J. F., & Grider, J. R. (1996). Distinct 5-HT Receptors Mediate The Peristaltic Reflex Induced By Mucosal Stimuli In Human And Guinea Pig Intestine. *Gastroenterology*, 111(5), 1281–1290.
- Franco, R., Martinez-Pinilla, E., Lanciego, J. L., & Navarro, G. (2016, March 31). Basic Pharmacological And Structural Evidence For Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization. *Frontiers In Pharmacology*, Vol. 7.
- Frassetto, A., Zhang, J., Lao, J. Z., White, A., Metzger, J. M., Fong, T. M., & Chen, R. Z. (2008). Reduced Sensitivity To Diet-Induced Obesity In Mice Carrying A Mutant 5-HT₆ Receptor. *Brain Research*, 1236, 140–144.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors In The Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, And Fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272.
- Freitas, R. L., Ferreira, C. M. Dos R., Urbina, M. A. C., Mariño, A. U., Carvalho, A. D., Butera, G., ... Coimbra, N. C. (2009). 5-HT_{1A/1B}, 5-HT₆, And 5-HT₇ Serotonergic Receptors Recruitment In Tonic-Clonic Seizure-Induced Antinociception: Role Of Dorsal Raphe Nucleus. *Experimental Neurology*, 217(1), 16–24.
- Gales, C., Kowalski-Chauvel, A., Dufour, M. N., Seva, C., Moroder, L., Pradayrol, L., ... Silvente-Poirot, S. (2000). Mutation Of ASN-391 Within The Conserved NPxxY Motif Of The Cholecystokinin B Receptor Abolishes G(Q) Protein Activation Without Affecting Its Association With The Receptor. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(23), 17321–17327.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., & Pei, G. (2004). Identification Of B-Arrestin2 As A G Protein-Coupled Receptor-Stimulated Regulator Of NF-KB Pathways. *Molecular Cell*, 14(3), 303–317.
- Gasparini, L., Gouras, G. K., Wang, R., Gross, R. S., Beal, M. F., Greengard, P., & Xu, H. (2001). Stimulation Of B-Amyloid Precursor Protein Trafficking By Insulin

- Reduces Intraneuronal B-Amyloid And Requires Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Journal Of Neuroscience*, 21(8), 2561–2570.
- Ge, J., & Barnes, N. M. (1996). 5-HT₄ Receptor-Mediated Modulation Of 5-HT Release In The Rat Hippocampus In Vivo. *British Journal Of Pharmacology*, 117(7), 1475–1480.
- Georgoussi, Z., Leontiadis, L., Mazarakou, G., Merkouris, M., Hyde, K., & Hamm, H. (2006). Selective Interactions Between G Protein Subunits And RGS4 With The C-Terminal Domains Of The Mu- And Delta-Opioid Receptors Regulate Opioid Receptor Signaling. *Cellular Signalling*, 18(6), 771–782.
- Gerald, C., Adham, N., Kao, H. T., Olsen, M. A., Laz, T. M., Schechter, L. E., ... Branchek, T. A. (1995). The 5-HT₄ Receptor: Molecular Cloning And Pharmacological Characterization Of Two Splice Variants. *The Embo Journal*, 14(12), 2806–2815.
- Gershon, M. D. (2005). Nerves, Reflexes, And The Enteric Nervous System: Pathogenesis Of The Irritable Bowel Syndrome. *Journal Of Clinical Gastroenterology*, 39(5 Suppl. 3).
- Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C. D., Wang, S., ... Lefkowitz, R. J. (2006). Distinct Beta-Arrestin- And G Protein-Dependent Pathways For Parathyroid Hormone Receptor-Stimulated Erk1/2 Activation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281(16), 10856–10864.
- Giannoni, P., Gaven, F., De Bundel, D., Baranger, K., Marchetti-Gauthier, E., Roman, F. S., ... Claeysen, S. (2013). Early Administration Of RS 67333, A Specific 5-HT₄ Receptor Agonist, Prevents Amyloidogenesis And Behavioral Deficits In The 5XFAD Mouse Model Of Alzheimer's Disease. *Frontiers In Aging Neuroscience*, 5(Dec).
- Golebiewska, U., & Scarlata, S. (2008). Gαq Binds Two Effectors Separately In Cells: Evidence For Predetermined Signaling Pathways. *Biophysical Journal*, 95(5), 2575–2582.
- Gonzalez-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., Lopez-Gimenez, J. F., ... Sealfon, S. C. (2008). Identification Of A Serotonin/Glutamate Receptor Complex Implicated In Psychosis. *Nature*, 452(7183), 93–97.
- Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1995). A New Antigen Receptor Gene Family That Undergoes Rearrangement And Extensive Somatic Diversification In Sharks. *Nature*, 374(6518), 168–173.

- Gross, M. (2008). *The Birds, The Bees And The Platypuses : Crazy, Sexy And Cool Stories From Science*.
- Guillaume, J.-L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., ... Jockers, R. (2008). The PDZ Protein MUPP1 Promotes Gi Coupling And Signaling Of The MT1 Melatonin Receptor. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283(24), 16762–16771.
- Gulati, S., Jin, H., Masuho, I., Orban, T., Cai, Y., Pardon, E., ... Palczewski, K. (2018). Targeting G Protein-Coupled Receptor Signaling At The G Protein Level With A Selective Nanobody Inhibitor. *Nature Communications*, 9(1).
- Guo, Y., Zhang, L., Zhang, J., Du, C. X., Lv, S. X., Wang, T., ... Liu, J. (2019). Activation And Blockade Of Serotonin4 Receptors In The Lateral Habenula Improve Working Memory In Unilateral 6-Hydroxydopamine-Lesioned Parkinson's Rats. *Neurological Research*, 41(7), 585–593.
- Ha, C. M., Park, D., Kim, Y., Na, M., Panda, S., Won, S., ... Chang, S. (2015). SNX14 Is A Bifunctional Negative Regulator For Neuronal 5-HT6 Receptor Signaling. *Journal Of Cell Science*, 128(9), 1848–1861.
- Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R. P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., ... Fändrich, M. (2007). Directed Selection Of A Conformational Antibody Domain That Prevents Mature Amyloid Fibril Formation By Stabilizing Aβ Protofibrils. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 104(49), 19232–19237.
- Haddjeri, N., Blier, P., & De Montigny, C. (1998). Long-Term Antidepressant Treatments Result In A Tonic Activation Of Forebrain 5-HT(1a) Receptors. *Journal Of Neuroscience*, 18(23), 10150–10156.
- Hadi, T., Barrichon, M., Mourtialon, P., Wendremaire, M., Garrido, C., Sagot, P., ... Lirussi, F. (2013). Biphasic Erk1/2 Activation Sequentially Involving Gs And Gi Signaling Is Required In Beta3-Adrenergic Receptor-Induced Primary Smooth Muscle Cell Proliferation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(5), 1041–1051.
- Hague, C., Bernstein, L. S., Ramineni, S., Chen, Z., Minneman, K. P., & Hepler, J. R. (2005). Selective Inhibition Of Alpha1a-Adrenergic Receptor Signaling By RGS2 Association With The Receptor Third Intracellular Loop. *The Journal Of Biological Chemistry*, 280(29), 27289–27295.
- Hajjhussein, H., Gardner, L. A., Fujii, N., Anderson, N. M., & Bahouth, S. W. (2013). The Hydrophobic Amino Acid Cluster At The Cytoplasmic End Of Transmembrane

- Helix III Modulates The Coupling Of The β 1-Adrenergic Receptor To Gs. *Journal Of Receptors And Signal Transduction*, 33(2), 79–88.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., ... Lefkowitz, R. J. (1998). The B2-Adrenergic Receptor Interacts With The Na(+)/H+-Exchanger Regulatory Factor To Control Na(+)/H+ Exchange. *Nature*, 392(6676), 626–630.
- Ham, B.-J., Kim, Y.-H., Choi, M.-J., Cha, J.-H., Choi, Y.-K., & Lee, M.-S. (2004). Serotonergic Genes And Personality Traits In The Korean Population. *Neuroscience Letters*, 354(1), 2–5.
- Hamann, J., Aust, G., Araç, D., Engel, F. B., Formstone, C., Fredriksson, R., ... Schiöth, H. B. (2015). International Union Of Basic And Clinical Pharmacology. Xciv. Adhesion G Protein-Coupled Receptors. *Pharmacological Reviews*, 67(2), 338–367.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., ... Hammers, R. (1993). Naturally Occurring Antibodies Devoid Of Light Chains. *Nature*, 363(6428), 446–448.
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018, May 1). Understanding The Diversity Of Membrane Lipid Composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 19, Pp. 281–296.
- Hashimoto, G., Sakurai, M., Teich, A. F., Saeed, F., Aziz, F., & Arancio, O. (2012). 5-HT4 Receptor Stimulation Leads To Soluble A β PP α Production Through MMP-9 Upregulation. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 32(2), 437–445.
- Hay, D. L., & Pioszak, A. A. (2016). Receptor Activity-Modifying Proteins (RAMPS): New Insights And Roles. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 56(1), 469–487.
- Heng, B. C., Aubel, D., & Fussenegger, M. (2013, December). An Overview Of The Diverse Roles Of G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) In The Pathophysiology Of Various Human Diseases. *Biotechnology Advances*, Vol. 31, Pp. 1676–1694.
- Herce, H. D., Schumacher, D., Schneider, A. F. L., Ludwig, A. K., Mann, F. A., Fillies, M., ... Hackenberger, C. P. R. (2017). Cell-Permeable Nanobodies For Targeted Immunolabelling And Antigen Manipulation In Living Cells. *Nature Chemistry*, 9(8), 762–771.
- Hirst, W. D., Abrahamsen, B., Blaney, F. E., Calver, A. R., Aloj, L., Price, G. W., & Medhurst, A. D. (2003). Differences In The Central Nervous System Distribution

- And Pharmacology Of The Mouse 5-Hydroxytryptamine-6 Receptor Compared With Rat And Human Receptors Investigated By Radioligand Binding, Site-Directed Mutagenesis, And Molecular Modeling. *Molecular Pharmacology*, 64(6), 1295–1308.
- Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., ... Lein, E. S. (2019). Conserved Cell Types With Divergent Features In Human Versus Mouse Cortex. *Nature*, 573(7772), 61–68.
- Holz, J. B. (2012). The Titan Trial - Assessing The Efficacy And Safety Of An Anti-Von Willebrand Factor Nanobody In Patients With Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Transfusion And Apheresis Science*, 46(3), 343–346.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., & Winter, G. (1991). Multi-Subunit Proteins On The Surface Of Filamentous Phage: Methodologies For Displaying Antibody (Fab) Heavy And Light Chains. *Nucleic Acids Research*, 19(15), 4133–4137.
- Hu, J., Wang, Y., Zhang, X., Lloyd, J. R., Li, J. H., Karpiak, J., ... Wess, J. (2010). Structural Basis Of G Proteing-Coupled Receptorg-G Protein Interactions. *Nature Chemical Biology*, 6(7), 541–548.
- Hu, L. A., Tang, Y., Miller, W. E., Cong, M., Lau, A. G., Lefkowitz, R. J., & Hall, R. A. (2000). Beta 1-Adrenergic Receptor Association With PSD-95. Inhibition Of Receptor Internalization And Facilitation Of Beta 1-Adrenergic Receptor Interaction With N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(49), 38659–38666.
- Huang, P., Steplock, D., Weinman, E. J., Hall, R. A., Ding, Z., Li, J., ... Liu-Chen, L. Y. (2004). K Opioid Receptor Interacts With Na⁺/H⁺-Exchanger Regulatory Factor-1/Ezrin-Radixin-Moesin-Binding Phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) To Stimulate Na⁺/H⁺ Exchange Independent Of Gi/Go Proteins. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(24), 25002–25009.
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrishnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., ... Kobilka, B. K. (2015). Structural Insights Into M-Opioid Receptor Activation. *Nature*, 524(7565), 315–321.
- Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (2007). 5-Hydroxytryptamine Induces A Protein Kinase A/Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated And Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase Of Long-Term Potentiation In The Amygdala. *Journal Of Neuroscience*, 27(12), 3111–3119.

- Hussack, G., Hirama, T., Ding, W., Mackenzie, R., & Tanha, J. (2011). Engineered Single-Domain Antibodies With High Protease Resistance And Thermal Stability. *Plos One*, 6(11).
- Hussack, G., Ryan, S., Van Faassen, H., Rossotti, M., Roger Mackenzie, C., & Tanha, J. (2018). Neutralization Of Clostridium Difficile Toxin B With VHH-Fc Fusions Targeting The Delivery And Crops Domains. *Plos One*, 13(12).
- Huynh, J., Thomas, W. G., Aguilar, M.-I., & Pattenden, L. K. (2009). Role Of Helix 8 In G Protein-Coupled Receptors Based On Structure-Function Studies On The Type 1 Angiotensin Receptor. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 302(2), 118–127.
- Hyung-Mun, Y., Sunoh, K., Hyun-Ji, K., Evi, K., Jae, I. K., Jae, Y. S., ... Hyewhon, R. (2007). The Novel Cellular Mechanism Of Human 5-HT₆ Receptor Through An Interaction With Fyn. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(8), 5496–5505.
- Iezzi, M. E., Policastro, L., Werbach, S., Podhajcer, O., & Canziani, G. A. (2018, February 19). Single-Domain Antibodies And The Promise Of Modular Targeting In Cancer Imaging And Treatment. *Frontiers In Immunology*, Vol. 9.
- Inoue, A., Raimondi, F., Kadji, F. M. N., Singh, G., Kishi, T., Uwamizu, A., ... Russell, R. B. (2019). Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity Of GPCRs. *Cell*, 177(7), 1933-1947.E25.
- Irannejad, R., Pessino, V., Mika, D., Huang, B., Wedegaertner, P. B., Conti, M., & Von Zastrow, M. (2017). Functional Selectivity Of GPCR-Directed Drug Action Through Location Bias. *Nature Chemical Biology*, 13(7), 799–806.
- Ishii, T., Kinoshita, K. I., & Muroi, Y. (2019). Serotonin 5-HT₄ Receptor Agonists Improve Facilitation Of Contextual Fear Extinction In An MPTP-Induced Mouse Model Of Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(21).
- 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 (Cambridge)*, 141(17), 3370–3377.
- Jähnichen, S., Blanchetot, C., Maussang, D., Gonzalez-Pajuelo, M., Chow, K. Y., Bosch, L., ... Smit, M. J. (2010). Cxcr4 Nanobodies (Vhh-Based Single Variable Domains) Potently Inhibit Chemotaxis And HIV-1 Replication And Mobilize Stem Cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 107(47), 20565–20570.

- Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L., & Saini, D. K. (2018). ERK Activation Pathways Downstream Of GPCRs. In *International Review Of Cell And Molecular Biology* (Vol. 338, Pp. 79–109).
- Jeanneteau, F., Guillin, O., Diaz, J., Griffon, N., & Sokoloff, P. (2004). GIPC Recruits GAIP (RGS19) To Attenuate Dopamine D2 Receptor Signaling. *Molecular Biology Of The Cell*, 15(11), 4926–4937.
- Jin, J. G., Foxx-Orenstein, A. E., & Grider, J. R. (1999). Propulsion In Guinea Pig Colon Induced By 5-Hydroxytryptamine (Ht) Via 5-HT₄ And 5-HT₃ Receptors. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 288(1), 93–97.
- Johnson, D. E., Drummond, E., Grimwood, S., Sawant-Basak, A., Miller, E., Tseng, E., ... Siok, C. J. (2012). The 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Agonists Prucalopride And PRX-03140 Increase Acetylcholine And Histamine Levels In The Rat Prefrontal Cortex And The Power Of Stimulated Hippocampal Θ Oscillations. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 341(3), 681–691.
- Joubert, L., Hanson, B., Barthet, G., Sebben, M., Claeyssen, S., Hong, W., ... Bockaert, J. (2004). New Sorting Nexin (SNX27) And NHERF Specifically Interact With The 5-HT₄(A) Receptor Splice Variant: Roles In Receptor Targeting. *Journal Of Cell Science*, 117, 5367–5379.
- Joyal, J.-S., Bhosle, V. K., & Chemtob, S. (2015). Subcellular G-Protein Coupled Receptor Signaling Hints At Greater Therapeutic Selectivity. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, 19(6), 717–721.
- Kang, D. S., Tian, X., & Benovic, J. L. (2013). B-Arrestins And G Protein-Coupled Receptor Trafficking. In *Methods In Enzymology* (Vol. 521, Pp. 91–108).
- Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., ... Ma, L. (2005). A Nuclear Function Of B-Arrestin1 In GPCR Signaling: Regulation Of Histone Acetylation And Gene Transcription. *Cell*, 123(5), 833–847.
- Kano, H., Toyama, Y., Imai, S., Iwahashi, Y., Mase, Y., Yokogawa, M., ... Shimada, I. (2019). Structural Mechanism Underlying G Protein Family-Specific Regulation Of G Protein-Gated Inwardly Rectifying Potassium Channel. *Nature Communications*, 10(1), 2008.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., & Seino, S. (2001). Critical Role Of cAMP-GeFII·RIM2 Complex In Incretin-Potentiated Insulin Secretion. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(49), 46046–46053.
- Kato, S. (2013). Role Of Serotonin 5-HT₃ Receptors In Intestinal Inflammation.

- Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 36(9), 1406–1409.
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-Function Of The G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 53, 531–556.
- Kaumann, A J. (1990). Piglet Sinoatrial 5-HT Receptors Resemble Human Atrial 5-HT₄-Like Receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*, 342(5), 619–622.
- Kaumann, A J, & Sanders, L. (1994). 5-Hydroxytryptamine Causes Rate-Dependent Arrhythmias Through 5-HT₄ Receptors In Human Atrium: Facilitation By Chronic Beta-Adrenoceptor Blockade. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*, 349(4), 331–337.
- Kaumann, Alberto J. (1993). Blockade Of Human Atrial 5 - HT₄ Receptors By GR 113808. *British Journal Of Pharmacology*, 110(3), 1172–1174.
- Kaumann, Alberto J., & Levy, F. O. (2006, September). 5-Hydroxytryptamine Receptors In The Human Cardiovascular System. *Pharmacology And Therapeutics*, Vol. 111, Pp. 674–706.
- Kemp, A., & Manahan-Vaughan, D. (2005). The 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Exhibits Frequency-Dependent Properties In Synaptic Plasticity And Behavioural Metaplasticity In The Hippocampal CA1 Region In Vivo. *Cerebral Cortex*, 15(7), 1037–1043.
- Kerchner, K. R., Clay, R. L., Mccleery, G., Watson, N., Mcintire, W. E., Myung, C.-S., & Garrison, J. C. (2004). Differential Sensitivity Of Phosphatidylinositol 3-Kinase P110gamma To Isoforms Of G Protein Betagamma Dimers. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(43), 44554–44562.
- Keyaerts, M., Xavier, C., Heemskerk, J., Devoogdt, N., Everaert, H., Ackaert, C., ... Lahoutte, T. (2016). Phase I Study Of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody For PET/CT Assessment Of HER2 Expression In Breast Carcinoma. *Journal Of Nuclear Medicine*, 57(1), 27–33.
- Kilander, M. B., Dijksterhuis, J. P., Ganji, R. S., Bryja, V., & Schulte, G. (2011). Wnt-5a Stimulates The GDP/GTP Exchange At Pertussis Toxin-Sensitive Heterotrimeric G Proteins. *Cellular Signalling*, 23(3), 550–554.
- 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(3).
- 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. *Experimental Neurobiology*, 28(1), 17–29.
- Kindlundh-Högberg, A. M. S., Svenningsson, P., & Schiöth, H. B. (2006). Quantitative Mapping Shows That Serotonin Rather Than Dopamine Receptor mRNA Expressions Are Affected After Repeated Intermittent Administration Of MDMA In Rat Brain. *Neuropharmacology*, 51(4), 838–847.
- Kniazeff, J., Prezeau, L., Rondard, P., Pin, J. P., & Goudet, C. (2011). Dimers And Beyond: The Functional Puzzles Of Class C GPCRs. *Pharmacology And Therapeutics*, Vol. 130, Pp. 9–25.
- Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schößow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., ... Goldbaum, F. A. (2007). Single Domain Antibodies From Llama Effectively And Specifically Block T Cell ECTO-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 In Vivo. *Faseb Journal*, 21(13), 3490–3498.
- Kotanska, M., Lustyk, K., Bucki, A., Marcinkowska, M., Sniecikowska, J., & Kolaczowski, M. (2018). Idalopirdine, A Selective 5-HT₆ Receptor Antagonist, Reduces Food Intake And Body Weight In A Model Of Excessive Eating. *Metabolic Brain Disease*, 33(3), 733–740.
- Koval, A., & Katanaev, V. L. (2011). Wnt3a Stimulation Elicits G-Protein-Coupled Receptor Properties Of Mammalian Frizzled Proteins. *Biochemical Journal*, 433(3), 435–440.
- Kozono, N., Ohtani, A., & Shiga, T. (2017). Roles Of The Serotonin 5-HT₄ Receptor In Dendrite Formation Of The Rat Hippocampal Neurons In Vitro. *Brain Research*, 1655, 114–121.
- Kruse, A. C., Ring, A. M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., ... Kobilka, B. K. (2013). Activation And Allosteric Modulation Of A Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Nature*, 504(7478), 101–106.
- Kulla, A., & Manahan-Vaughan, D. (2002). Modulation By Serotonin 5-HT₄ Receptors Of Long-Term Potentiation And Depotentiation In The Dentate Gyrus Of Freely Moving Rats. *Cerebral Cortex*, 12(2), 150–162.
- Kuna, R. S., Girada, S. B., Asalla, S., Vallentyne, J., Maddika, S., Patterson, J. T., ... Mitra, P. (2013). Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Mediated Endosomal Camp Generation Promotes Glucose-Stimulated Insulin Secretion In Pancreatic B-Cells.

- American Journal Of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 305(2).
- Kutuzov, M. A., Andreeva, A. V., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2007). Regulation Of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Degradation By Gα13. *Faseb Journal*, 21(13), 3727–3736.
- Lafaye, P., Achour, I., England, P., Duyckaerts, C., & Rougeon, F. (2009). Single-Domain Antibodies Recognize Selectively Small Oligomeric Forms Of Amyloid B, Prevent Aβ-Induced Neurotoxicity And Inhibit Fibril Formation. *Molecular Immunology*, 46(4), 695–704.
- Langer, I., Tikhonova, I. G., Boulegue, C., Esteve, J.-P., Vatinel, S., Ferrand, A., ... Fourmy, D. (2009). Evidence For A Direct And Functional Interaction Between The Regulators Of G Protein Signaling-2 And Phosphorylated C Terminus Of Cholecystokinin-2 Receptor. *Molecular Pharmacology*, 75(3), 502–513.
- Lee, M.-H., Appleton, K. M., Strungs, E. G., Kwon, J. Y., Morinelli, T. A., Peterson, Y. K., ... Luttrell, L. M. (2016). The Conformational Signature Of B-Arrestin2 Predicts Its Trafficking And Signalling Functions. *Nature*, 531(7596), 665–668.
- Leestemaker, Y., & Ovaa, H. (2017, December 1). Tools To Investigate The Ubiquitin Proteasome System. *Drug Discovery Today: Technologies*, Vol. 26, Pp. 25–31.
- Lefebvre, H., Gonzalez, K. N., Contesse, V., Delarue, C., Vaudry, H., & Kuhn, J. M. (1998). Effect Of Prolonged Administration Of The Serotonin₄ (5-HT₄) Receptor Agonist Cisapride On Aldosterone Secretion In Healthy Volunteers. *Endocrine Research*, 24(3–4), 749–752.
- Lefkowitz, R. J. (2005). Summary Of Wenner-Gren International Symposium Receptor-Receptor Interactions Among Heptaspanning Membrane Receptors: From Structure To Function. *Journal Of Molecular Neuroscience : Mn*, 26(2–3), 293–294.
- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction Of Receptor Signals By Beta-Arrestins. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), 512–517.
- Leng, A., Ouagazzal, A., Feldon, J., & Higgins, G. A. (2003). Effect Of The 5-HT₆ Receptor Antagonists RO04-6790 And RO65-7199 On Latent Inhibition And Prepulse Inhibition In The Rat: Comparison To Clozapine. *Pharmacology, Biochemistry, And Behavior*, 75(2), 281–288.
- Leontiadis, L. J., Papakonstantinou, M. P., & Georgoussi, Z. (2009). Regulator Of G Protein Signaling 4 Confers Selectivity To Specific G Proteins To Modulate Mu- And Delta-Opioid Receptor Signaling. *Cellular Signalling*, 21(7), 1218–1228.

- Leow, C., Fischer, K., Leow, C., Cheng, Q., Chuah, C., & McCarthy, J. (2017). Single Domain Antibodies As New Biomarker Detectors. *Diagnostics*, 7(4), 52.
- Lester-Coll, N., Rivera, E. J., Soscia, S. J., Doiron, K., Wands, J. R., & De La Monte, S. M. (2006). Intracerebral Streptozotocin Model Of Type 3 Diabetes: Relevance To Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 9(1), 13–33.
- Letronne, F., Laumet, G., Ayral, A. M., Chapuis, J., Demiautte, F., Laga, M., ... Lambert, J. C. (2016). ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation In Alzheimer's Disease. *Ebiomedicine*, 9, 278–292.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L., Couturier, C., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2006). The Orphan GPR50 Receptor Specifically Inhibits MT1 Melatonin Receptor Function Through Heterodimerization. *Embo Journal*, 25(13), 3012–3023.
- Lezoualc'h, F. (2007). 5-HT₄ Receptor And Alzheimer's Disease: The Amyloid Connection. *Experimental Neurology*, Vol. 205, Pp. 325–329.
- Li, Zairong, Benard, O., & Margolskee, R. F. (2006). Ggamma13 Interacts With PDZ Domain-Containing Proteins. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281(16), 11066–11073.
- Li, Zhu, Huang, M., Prus, A. J., Dai, J., & Meltzer, H. Y. (2007). 5-HT₆ Receptor Antagonist SB-399885 Potentiates Haloperidol And Risperidone-Induced Dopamine Efflux In The Medial Prefrontal Cortex Or Hippocampus. *Brain Research*, 1134(1), 70–78.
- Licht, C. L., Marcussen, A. B., Wegener, G., Overstreet, D. H., Aznar, S., & Knudsen, G. M. (2009). The Brain 5-HT₄ Receptor Binding Is Down-Regulated In The Flinders Sensitive Line Depression Model And In Response To Paroxetine Administration. *Journal Of Neurochemistry*, 109(5), 1363–1374.
- Ling, X., Martins, R. N., Racchi, M., Craft, S., & Helmerhorst, E. (2002). Amyloid Beta Antagonizes Insulin Promoted Secretion Of The Amyloid Beta Protein Precursor. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 4(5), 369–374.
- Liu, M. T., Kuan, Y. H., Wang, J., Hen, R., & Gershon, M. D. (2009). 5-HT₄ Receptor-Mediated Neuroprotection And Neurogenesis In The Enteric Nervous System Of Adult Mice. *Journal Of Neuroscience*, 29(31), 9683–9699.
- Loo, L. S., Tang, N., Al-Haddawi, M., Stewart Dawe, G., & Hong, W. (2014). A Role For Sorting Nexin 27 In Ampa Receptor Trafficking. *Nature Communications*, 5.
- Lucas, G. (2009). Serotonin Receptors, Type 4: A New Hope? *Current Drug Targets*,

10(11), 1085–1095.

- Lucas, G., Rymar, V. V., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., Manta, S., ... Debonnel, G. (2007). Serotonin₄ (5-HT₄) Receptor Agonists Are Putative Antidepressants With A Rapid Onset Of Action. *Neuron*, 55(5), 712–725.
- Luttrell, L. M., Daaka, Y., & Lefkowitz, R. J. (1999). Regulation Of Tyrosine Kinase Cascades By G-Protein-Coupled Receptors. *Current Opinion In Cell Biology*, 11(2), 177–183.
- Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The Role Of B-Arrestins In The Termination And Transduction Of G-Protein-Coupled Receptor Signals. *Journal Of Cell Science*, 115(3), 455–465.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., & Wieland, T. (2005). The Guanine Nucleotide Exchange Factor p63RhoGEF, A Specific Link Between Gq/11-Coupled Receptor Signaling And RhoA. *The Journal Of Biological Chemistry*, 280(12), 11134–11139.
- Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M. R., Vettel, C., ... Tesmer, J. J. G. (2007). Structure Of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA Complex Reveals A Pathway For The Activation Of RhoA By GPCRs. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1923–1927.
- Lyra E Silva, N. De M., Lam, M. P., Soares, C. N., Munoz, D. P., Milev, R., & De Felice, F. G. (2019). Insulin Resistance As A Shared Pathogenic Mechanism Between Depression And Type 2 Diabetes. *Frontiers In Psychiatry*, Vol. 10.
- Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., ... Lezoualc'h, F. (2003). Crosstalk Between Rap1 And Rac Regulates Secretion Of SAPP α . *Nature Cell Biology*, 5(7), 633–639.
- Malbon, C. C., Tao, J., & Wang, H. Y. (2004, April 1). Akaps (A-Kinase Anchoring Proteins) And Molecules That Compose Their G-Protein-Coupled Receptor Signalling Complexes. *Biochemical Journal*, Vol. 379, Pp. 1–9.
- Manzke, T., Guenther, U., Ponimaskin, E. G., Haller, M., Dutschmann, M., Schwarzacher, S., & Richter, D. W. (2003). 5-HT₄(A) Receptors Avert Opioid-Induced Breathing Depression Without Loss Of Analgesia. *Science*, 301(5630), 226–229.
- Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Schmid, L., ... Lucacchini, A. (2012). Distribution Of Serotonin Receptor Of Type 6 (5-HT₆) In Human Brain Post-Mortem. A Pharmacology, Autoradiography And

- Immunohistochemistry Study. *Neurochemical Research*, 37(5), 920–927.
- Marcello, E., Epis, R., Saraceno, C., Gardoni, F., Borroni, B., Cattabeni, F., ... Di Luca, M. (2012). SAP97-Mediated Local Trafficking Is Altered In Alzheimer Disease Patients' Hippocampus. *Neurobiology Of Aging*, 33(2), 422.E1-422.E10.
- Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., ... Di Luca, M. (2007). Synapse-Associated Protein-97 Mediates A-Secretase ADAM10 Trafficking And Promotes Its Activity. *Journal Of Neuroscience*, 27(7), 1682–1691.
- Marchetti, E., Dumuis, A., Bockaert, J., Soumireu-Mourat, B., & Roman, F. S. (2000). Differential Modulation Of The 5-HT(4) Receptor Agonists And Antagonist On Rat Learning And Memory. *Neuropharmacology*, 39(11), 2017–2027.
- Marciniak, T. A., & Serebruany, V. (2019, May 1). Should We Use Tegaserod For Irritable Bowel Syndrome? *American Journal Of Therapeutics*, Vol. 26, Pp. E417–E420.
- Marcos, B., Chuang, T. T., Gil-Bea, F. J., & Ramirez, M. J. (2008). Effects Of 5-HT 6 Receptor Antagonism And Cholinesterase Inhibition In Models Of Cognitive Impairment In The Rat. *British Journal Of Pharmacology*, 155(3), 434–440.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2000). A Trafficking Checkpoint Controls GABA(B) Receptor Heterodimerization. *Neuron*, 27(1), 97–106.
- Margolis, K. G., Li, Z., Stevanovic, K., Saurman, V., Israelyan, N., Anderson, G. M., ... Gershon, M. D. (2016). Serotonin Transporter Variant Drives Preventable Gastrointestinal Abnormalities In Development And Function. *Journal Of Clinical Investigation*, 126(6), 2221–2235.
- Massotte, D., & Kieffer, B. L. (2005). Structure—Function Relationships In G Protein-Coupled Receptors. In *The G Protein-Coupled Receptors Handbook* (Pp. 3–31).
- Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.-L., Bourrier, E., Ayoub Mohammed, A., ... Pin, J.-P. (N.D.). *Cell-Surface Protein-Protein Interaction Analysis With Time-Resolved Fret And Snap-Tag Technologies: Application To GPCR Oligomerization*.
- Maurice, P., Daulat, A. M., Turecek, R., Ivankova-Susankova, K., Zamponi, F., Kamal, M., ... Jockers, R. (2010). Molecular Organization And Dynamics Of The Melatonin MT₁ Receptor/RGS20/G(i) Protein Complex Reveal Asymmetry Of Receptor Dimers For RGS And G(i) Coupling. *The Embo Journal*, 29(21), 3646–3659.
- Mcdonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., ...

- Lefkowitz, R. J. (2000). Beta -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold For The Activation Of JNK3. *Science*, 290(5496), 1574–1577.
- Mclatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., ... Foord, S. M. (1998). Ramps Regulate The Transport And Ligand Specificity Of The Calcitonin- Receptor-Like Receptor. *Nature*, 393(6683), 333–339.
- Mclean, P. G., & Coupar, I. M. (1996). Stimulation Of Cyclic Amp Formation In The Circular Smooth Muscle Of Human Colon By Activation Of 5-HT₄-Like Receptors. *British Journal Of Pharmacology*, 117(2), 238–239.
- McLennan, G. P., Kiss, A., Miyatake, M., Belcheva, M. M., Chambers, K. T., Pozek, J. J., ... Coscia, C. J. (2008). Kappa Opioids Promote The Proliferation Of Astrocytes Via Gβγ And B-Arrestin 2-Dependent Mapk-Mediated Pathways. *Journal Of Neurochemistry*, 107(6), 1753–1765.
- Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury La Cour, C., Loiseau, F., Watson, D. J. G., Dekeyne, A., ... Marin, P. (2012). 5-HT₆ Receptor Recruitment Of Mtor As A Mechanism For Perturbed Cognition In Schizophrenia. *Embo Molecular Medicine*, 4(10), 1043–1056.
- Mendez-David, I., David, D. J., Darcet, F., Wu, M. V, Kerdine-Römer, S., Gardier, A. M., & Hen, R. (2014). Rapid Anxiolytic Effects Of A 5-HT₄ Receptor Agonist Are Mediated By A Neurogenesis-Independent Mechanism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication Of The American College Of Neuropsychopharmacology*, 39(6), 1366–1378.
- Mendzelevski, B., Ausma, J., Chanter, D. O., Robinson, P., Kerstens, R., Vandeplasse, L., & Camm, J. (2012). Assessment Of The Cardiac Safety Of Prucalopride In Healthy Volunteers: A Randomized, Double-Blind, Placebo- And Positive-Controlled Thorough Qt Study. *British Journal Of Clinical Pharmacology*, 73(2), 203–209.
- Meneses, A. (2001). Effects Of The 5-HT(6) Receptor Antagonist Ro 04-6790 On Learning Consolidation. *Behavioural Brain Research*, 118(1), 107–110.
- Meng, E. C., & Bourne, H. R. (2001). Receptor Activation: What Does The Rhodopsin Structure Tell Us? *Trends In Pharmacological Sciences*, 22(11), 587–593.
- Merriam, L. A., Baran, C. N., Girard, B. M., Hardwick, J. C., May, V., & Parsons, R. L. (2013). Pituitary Adenylate Cyclase 1 Receptor Internalization And Endosomal Signaling Mediate The Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide-Induced Increase In Guinea Pig Cardiac Neuron Excitability. *Journal Of*

- Neuroscience*, 33(10), 4614–4622.
- Messina, D., Annesi, G., Serra, P., Nicoletti, G., Pasqua, A., Annesi, F., ... Quattrone, A. (2002). Association Of The 5-HT₆ Receptor Gene Polymorphism C267t With Parkinson's Disease. *Neurology*, 58(5), 828–829.
- Meyer, D., Bonhoeffer, T., & Scheuss, V. (2014). Balance And Stability Of Synaptic Structures During Synaptic Plasticity. *Neuron*, 82(2), 430–443.
- Micale, V., Marco Leggio, G., Mazzola, C., & Drago, F. (2006). Cognitive Effects Of SI65.0155, A Serotonin 5-HT₄ Receptor Partial Agonist, In Animal Models Of Amnesia. *Brain Research*, 1121(1), 207–215.
- Michel, P. P., & Agid, Y. (1996). Chronic Activation Of The Cyclic AMP Signaling Pathway Promotes Development And Long-Term Survival Of Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Journal Of Neurochemistry*, 67(4), 1633–1642.
- Milano, S. K., Kim, Y.-M., Stefano, F. P., Benovic, J. L., & Brenner, C. (2006). Nonvisual Arrestin Oligomerization And Cellular Localization Are Regulated By Inositol Hexakisphosphate Binding. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281(14), 9812–9823.
- Miller, P. S., & Aricescu, A. R. (2014). Crystal Structure Of A Human GABAA Receptor. *Nature*, 512(7514), 270–275.
- Miller, W. E., Houtz, D. A., Nelson, C. D., Kolattukudy, P. E., & Lefkowitz, R. J. (2003). G-Protein-Coupled Receptor (Gpcr) Kinase Phosphorylation And Beta-Arrestin Recruitment Regulate The Constitutive Signaling Activity Of The Human Cytomegalovirus US28 GPCR. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278(24), 21663–21671.
- Milligan, G. (2003, February 1). Principles: Extending The Utility Of [35s]GTPγS Binding Assays. *Trends In Pharmacological Sciences*, Vol. 24, Pp. 87–90.
- Mitchell, E. S., & Neumaier, J. F. (2008). 5-HT₆ Receptor Antagonist Reversal Of Emotional Learning And Prepulse Inhibition Deficits Induced By Apomorphine Or Scopolamine. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, 88(3), 291–298.
- Miyazaki, N., Kiyose, N., Akazawa, Y., Takashima, M., Hagihara, Y., Inoue, N., ... Ito, Y. (2015). Isolation And Characterization Of Antigen-Specific Alpaca (*Lama Pacos*) VHH Antibodies By Biopanning Followed By High-Throughput Sequencing. *Journal Of Biochemistry*, 158(3), 205–215.
- Mlinar, B., Mascalchi, S., Mannaioni, G., Morini, R., & Corradetti, R. (2006). 5-HT₄ Receptor Activation Induces Long-Lasting Epsp-Spike Potentiation In CA1

- Pyramidal Neurons. *European Journal Of Neuroscience*, 24(3), 719–731.
- Mnie-Filali, O., Amraei, M. G., Benmbarek, S., Archer-Lahlou, E., Peñas-Cazorla, R., Vilaro, M. T., ... Piñeyro, G. (2010). Serotonin 4 Receptor (5-HT₄R) Internalization Is Isoform-Specific: Effects Of 5-HT And RS67333 On Isoforms A And B. *Cellular Signalling*, 22(3), 501–509.
- Mohler, E. G., Shacham, S., Noiman, S., Lezoualc'h, F., Robert, S., Gastineau, M., ... Ragozzino, M. E. (2007). VRX-03011, A Novel 5-HT₄ Agonist, Enhances Memory And Hippocampal Acetylcholine Efflux. *Neuropharmacology*, 53(4), 563–573.
- Monferini, E., Gaetani, P., Rodriguez Y Baena, R., Giraldo, E., Parenti, M., Zocchetti, A., & Rizzi, C. A. (1993). Pharmacological Characterization Of The 5-Hydroxytryptamine Receptor Coupled To Adenylyl Cyclase Stimulation In Human Brain. *Life Sciences*, 52(9).
- Monte, S. M. De La. (2014). Type 3 Diabetes Is Sporadic Alzheimer's Disease. *European Neuropsychopharmacology : The Journal Of The European College Of Neuropsychopharmacology*, 24(12), 1954.
- Morairty, S. R., Hedley, L., Flores, J., Martin, R., & Kilduff, T. S. (2008). Selective 5ht_{2a} And 5HT₆ Receptor Antagonists Promote Sleep In Rats. *Sleep*, 31(1), 34–44.
- Moser, P. C., Bergis, O. E., Jegham, S., Lohead, A., Duconseille, E., Terranova, J. P., ... Scatton, B. (2002). SL65.0155, A Novel 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Partial Agonist With Potent Cognition-Enhancing Properties. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 302(2), 731–741.
- Murat, S., Bigot, M., Chapron, J., König, G. M., Kostenis, E., Battaglia, G., ... Vandermoere, F. (2019). 5-HT_{2A} Receptor-Dependent Phosphorylation Of mGlu₂ Receptor At Serine 843 Promotes mGlu₂ Receptor-Operated Gi/o Signaling. *Molecular Psychiatry*, 24(11), 1610–1626.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. R. G., & Hamers, R. (1994). Sequence And Structure Of VH Domain From Naturally Occurring Camel Heavy Chain Immunoglobulins Lacking Light Chains. *Protein Engineering, Design And Selection*, 7(9), 1129–1135.
- Muyldermans, S., Baral, T. N., Retamozzo, V. C., De Baetselier, P., De Genst, E., Kinne, J., ... Saerens, D. (2009). Camelid Immunoglobulins And Nanobody Technology. *Veterinary Immunology And Immunopathology*, 128(1–3), 178–183.
- Muyldermans, Serge, Cambillau, C., & Wyns, L. (2001, April 1). Recognition Of Antigens By Single-Domain Antibody Fragments: The Superfluous Luxury Of

- Paired Domains. *Trends In Biochemical Sciences*, Vol. 26, Pp. 230–235.
- Nadim, W. D., Chaumont-Dubel, S., Madouri, F., Cobret, L., De Tauzia, M. L., Zajdel, P., ... Morisset-Lopez, S. (2016). Physical Interaction Between Neurofibromin And Serotonin 5-HT₆ Receptor Promotes Receptor Constitutive Activity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 113(43), 12310–12315.
- Nawoschik, S. P., Olsen, M., Smith, D. L., & Khawaja, X. (2007). Stable Expression Of Adenylyl Cyclase 2 Leads To The Functional Rescue Of Human 5-HT₆ Receptor In A CHODukx Cell Line. *Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods*, 55(3), 323–331.
- Ng, G. Y. K., Clark, J., Coulombe, N., Ethier, N., Hebert, T. E., Sullivan, R., ... O'Neill, G. P. (1999). Identification Of A GABA(B) Receptor Subunit, GB2, Required For Functional GABA(B) Receptor Activity. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(12), 7607–7610.
- Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., & Muyldermans, S. (2000). Camel Heavy-Chain Antibodies: Diverse Germline V(H)H And Specific Mechanisms Enlarge The Antigen-Binding Repertoire. *Embo Journal*, 19(5), 921–930.
- Nguyen, V. K., Muyldermans, S., & Hamers, R. (1998). The Specific Variable Domain Of Camel Heavy-Chain Antibodies Is Encoded In The Germline. *Journal Of Molecular Biology*, 275(3), 413–418.
- Nguyen, V. K., Zou, X., Lauwereys, M., Brys, L., Brüggemann, M., & Muyldermans, S. (2003). Heavy-Chain Only Antibodies Derived From Dromedary Are Secreted And Displayed By Mouse B Cells. *Immunology*, 109(1), 93–101.
- Nguyen, V., Su, C., Muyldermans, S., & Van Der Loo, W. (2002). Heavy-Chain Antibodies In Camelidae; A Case Of Evolutionary Innovation. *Immunogenetics*, 54(1), 39–47.
- Nichols, A. S., Floyd, D. H., Bruinsma, S. P., Narzinski, K., & Baranski, T. J. (2013). Frizzled Receptors Signal Through G Proteins. *Cellular Signalling*, 25(6), 1468–1475.
- Nobles, M., Benians, A., & Tinker, A. (2005). Heterotrimeric G Proteins Precouple With G Protein-Coupled Receptors In Living Cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 102(51), 18706–18711.
- Norum, J. H., Dawood, H., Mattingly, R. R., Sandnes, D., & Levy, F. O. (2007). EPAC- And Rap-Independent ERK1/2 Phosphorylation Induced By Gs-Coupled Receptor

- Stimulation In HEK293 Cells. *Febs Letters*, 581(1), 15–20.
- Norum, J. H., Hart, K., & Levy, F. O. (2003). Ras-Dependent Erk Activation By The Human Gs-Coupled Serotonin Receptors 5-HT₄(B) And 5-HT₇(A). *Journal Of Biological Chemistry*, 278(5), 3098–3104.
- Nurgali, K., Furness, J. B., & Stebbing, M. J. (2003). Analysis Of Purinergic And Cholinergic Fast Synaptic Transmission To Identified Myenteric Neurons. *Neuroscience*, 116(2), 335–347.
- O'hayre, M., Degese, M. S., & Gutkind, J. S. (2014, April). Novel Insights Into G Protein And G Protein-Coupled Receptor Signaling In Cancer. *Current Opinion In Cell Biology*, Vol. 27, Pp. 126–135.
- Ohno, Y., Imaki, J., Mae, Y., Takahashi, T., & Tatara, A. (2011). Serotonergic Modulation Of Extrapyrmidal Motor Disorders In Mice And Rats: Role Of Striatal 5-HT₃ And 5-HT₆ Receptors. *Neuropharmacology*, 60(2–3), 201–208.
- Ohno, Y., Shimizu, S., Tokudome, K., Kunisawa, N., & Sasa, M. (2015, November 1). New Insight Into The Therapeutic Role Of The Serotonergic System In Parkinson's Disease. *Progress In Neurobiology*, Vol. 134, Pp. 104–121.
- Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Detera-Wadleigh, S. D., Toyota, T., Shimizu, H., Yamada, K., ... Arinami, T. (2002). Association Between Serotonin 4 Receptor Gene Polymorphisms And Bipolar Disorder In Japanese Case-Control Samples And The Nih Genetics Initiative Bipolar Pedigrees. *Molecular Psychiatry*, 7(9), 954–961.
- Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W.-Y. L., Kong, H., Chao, M. V., & Wood, J. N. (2002). Annexin I Light Chain Regulates Sensory Neuron-Specific Sodium Channel Expression. *Nature*, 417(6889), 653–656.
- Oligny-Longpre, G., Corbani, M., Zhou, J., Hogue, M., Guillon, G., & Bouvier, M. (2012). Engagement Of B-Arrestin By Transactivated Insulin-Like Growth Factor Receptor Is Needed For V2 Vasopressin Receptor-Stimulated Erk1/2 Activation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 109(17).
- Orlandi, C., Cao, Y., & Martemyanov, K. A. (2013). Orphan Receptor GPR179 Forms Macromolecular Complexes With Components Of Metabotropic Signaling Cascade In Retina On-Bipolar Neurons. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(10), 7153–7161.
- Oyen, D., Srinivasan, V., Steyaert, J., & Barlow, J. N. (2011). Constraining Enzyme

- Conformational Change By An Antibody Leads To Hyperbolic Inhibition. *Journal Of Molecular Biology*, 407(1), 138–148.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., ... Miyano, M. (2000). Crystal Structure Of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, 289(5480), 739–745.
- Pan, H., & Galligan, J. J. (1994). 5-HT_{1A} And 5-HT₄ Receptors Mediate Inhibition And Facilitation Of Fast Synaptic Transmission In Enteric Neurons. *American Journal Of Physiology - Gastrointestinal And Liver Physiology*, 266(2 29-2).
- Panza, P., Maier, J., Schmees, C., Rothbauer, U., & Söllner, C. (2015). Live Imaging Of Endogenous Protein Dynamics In Zebrafish Using Chromobodies. *Development (Cambridge)*, 142(10), 1879–1884.
- Papageorgiou, A., & Denef, C. (2007). Estradiol Induces Expression Of 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄, 5-HT₅, And 5-HT₆ Receptor Messenger Ribonucleic Acid In Rat Anterior Pituitary Cell Aggregates And Allows Prolactin Release Via The 5-HT₄ Receptor. *Endocrinology*, 148(3), 1384–1395.
- Papazoglou, I., Berthou, F., Vicaire, N., Rouch, C., Markaki, E. M., Bailbe, D., ... Gerozissis, K. (2012). Hypothalamic Serotonin-Insulin Signaling Cross-Talk And Alterations In A Type 2 Diabetic Model. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 350(1), 136–144.
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlkönig, A., Ruf, A., ... Steyaert, J. (2014). A General Protocol For The Generation Of Nanobodies For Structural Biology. *Nature Protocols*, 9(3), 674–693.
- Parker, E. M., Kameyama, K., Higashijima, T., & Ross, E. M. (1991). Reconstitutionally Active G Protein-Coupled Receptors Purified From Baculovirus-Infected Insect Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 266(1), 519–527.
- Parton, R. G., & Del Pozo, M. A. (2013). Caveolae As Plasma Membrane Sensors, Protectors And Organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(2), 98–112.
- Pascual-Brazo, J., Castro, E., Diaz, A., Valdizan, E. M., Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., ... Pazos, A. (2012). Modulation Of Neuroplasticity Pathways And Antidepressant-Like Behavioural Responses Following The Short-Term (3 And 7 Days) Administration Of The 5-HT₄ Receptor Agonist RS67333. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 15(5), 631–643.
- Pellis, M., Pardon, E., Zolghadr, K., Rothbauer, U., Vincke, C., Kinne, J., ... Conrath,

- K. (2012). A Bacterial-Two-Hybrid Selection System For One-Step Isolation Of Intracellularly Functional Nanobodies. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 526(2), 114–123.
- Pellissier, L. P., Barthet, G., Gaven, F., Cassier, E., Trinquet, E., Pin, J. P., ... Claeyssen, S. (2011). G Protein Activation By Serotonin Type 4 Receptor Dimers: Evidence That Turning On Two Protomers Is More Efficient. *Journal Of Biological Chemistry*, 286(12), 9985–9997.
- Perroy, J., El Far, O., Bertaso, F., Pin, J. P., Betz, H., Bockaert, J., & Fagni, L. (2002). PICK1 Is Required For The Control Of Synaptic Transmission By The Metabotropic Glutamate Receptor 7. *The Embo Journal*, 21(12), 2990–2999.
- Pierce, K. L., & Lefkowitz, R. J. (2001). Classical And New Roles Of Beta-Arrestins In The Regulation Of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(10), 727–733.
- Pindon, A., Van Hecke, G., Van Gompel, P., Lesage, A. S., Leysen, J. E., & Jurzak, M. (2002). Differences In Signal Transduction Of Two 5-HT₄ Receptor Splice Variants: Compound Specificity And Dual Coupling With Gas- And Gai/O-Proteins. *Molecular Pharmacology*, 61(1), 85–96.
- Ponimaskin, E., Dumuis, A., Gaven, F., Barthet, G., Heine, M., Glebov, K., ... Oppermann, M. (2005). Palmitoylation Of The 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Regulates Receptor Phosphorylation, Desensitization, And B-Arrestin-Mediated Endocytosis. *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1434–1443.
- Ponimaskin, E. G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D. W., & Voynoy-Yasenetskaya, T. A. (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(A) Receptor Is Coupled To The G α Subunit Of Heterotrimeric G13 Protein. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(23), 20812–20819.
- Poole-Wilson, P. A., Swedberg, K., Cleland, J. G. F., Di Lenarda, A., Hanrath, P., Komajda, M., ... Skene, A. (2003). Comparison Of Carvedilol And Metoprolol On Clinical Outcomes In Patients With Chronic Heart Failure In The Carvedilol Or Metoprolol European Trial (Comet): Randomised Controlled Trial. *Lancet*, 362(9377), 7–13.
- Povsic, T. J., Kohout, T. A., & Lefkowitz, R. J. (2003). Beta-Arrestin1 Mediates Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Activation Of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) And Anti-Apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278(51), 51334–51339.
- Poyner, D. R., Sexton, P. M., Marshall, I., Smith, D. M., Quirion, R., Born, W., ... Foord, C. (2002). A Bacterial-Two-Hybrid Selection System For One-Step Isolation Of Intracellularly Functional Nanobodies. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 526(2), 114–123.

- S. M. (2002). International Union Of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene-Related Peptides, Adrenomedullin, Amylin, And Calcitonin Receptors. *Pharmacological Reviews*, Vol. 54, Pp. 233–246.
- Prosser, R. S., Ye, L., Pandey, A., & Oraziotti, A. (2017). Activation Processes In Ligand-Activated G Protein-Coupled Receptors: A Case Study Of The Adenosine A2A Receptor. *Bioessays: News And Reviews In Molecular, Cellular And Developmental Biology*, 39(9), 1700072.
- Qin, K., Dong, C., Wu, G., & Lambert, N. A. (2011). Inactive-State Preassembly Of G(q)-Coupled Receptors And G(q) Heterotrimers. Qin, K., Dong, C., Wu, G., & Lambert, N. A. (2011). Inactive-State Preassembly Of G(q)-Coupled Receptors And G(q) Heterotrimers. *Nature Chemical Biology*, 7(10), 740–7. Doi:10.1038. *Nature Chemical Biology*, 7(10), 740–747.
- Rajagopal, K., Lefkowitz, R. J., & Rockman, H. A. (2005, November). When 7 Transmembrane Receptors Are Not G Protein-Coupled Receptors. *Journal Of Clinical Investigation*, Vol. 115, Pp. 2971–2974.
- Rasmussen, Søren G.F., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., ... Kobilka, B. K. (2011). Structure Of A Nanobody-Stabilized Active State Of The B2 Adrenoceptor. *Nature*, 469(7329), 175–181.
- Rasmussen, Søren G.F., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., ... Kobilka, B. K. (2007). Crystal Structure Of The Human B2 Adrenergic G-Protein-Coupled Receptor. *Nature*, 450(7168), 383–387.
- Rasmussen, Søren G.F., Devree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., ... Kobilka, B. K. (2011). Crystal Structure Of The B 2 Adrenergic Receptor-Gs Protein Complex. *Nature*, 477(7366), 549–557.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K., & Lefkowitz, R. J. (2012). Molecular Mechanism Of B-Arrestin-Biased Agonism At Seven-Transmembrane Receptors. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 52(1), 179–197.
- Riento, K., & Ridley, A. J. (2003). Rocks: Multifunctional Kinases In Cell Behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), 446–456.
- Robbins, M. J., Calver, A. R., Filippov, A. K., Hirst, W. D., Russell, R. B., Wood, M. D., ... Pangalos, M. N. (2001). Gabab2 Is Essential For G-Protein Coupling Of The Gabab Receptor Heterodimer. *Journal Of Neuroscience*, 21(20), 8043–8052.
- Robert, S., Maillet, M., Morel, E., Launay, J. M., Fischmeister, R., Mercken, L., & Lezoualc'h, F. (2005). Regulation Of The Amyloid Precursor Protein Ectodomain

- Shedding By The 5-HT₄ Receptor And EPAC. *Febs Letters*, 579(5), 1136–1142.
- Roberts, P. D., Spiros, A., & Geerts, H. (2012). Simulations Of Symptomatic Treatments For Alzheimer's Disease: Computational Analysis Of Pathology And Mechanisms Of Drug Action. *Alzheimer's Research And Therapy*, 4(6).
- Rodefer, J. S., Nguyen, T. N., Karlsson, J. J., & Arnt, J. (2008). Reversal Of Subchronic PCP-Induced Deficits In Attentional Set Shifting In Rats By Sertindole And A 5-HT₆ Receptor Antagonist: Comparison Among Antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*, 33(11), 2657–2666.
- Rogers, D. C., & Hagan, J. J. (2001). 5-HT₆ Receptor Antagonists Enhance Retention Of A Water Maze Task In The Rat. *Psychopharmacology*, 158(2), 114–119.
- Rosel, P., Arranz, B., Urretavizcaya, M., Oros, M., San, L., & Navarro, M. A. (2004). Altered 5-HT_{2a} And 5-HT₄ Postsynaptic Receptors And Their Intracellular Signalling Systems IP₃ And cAMP In Brains From Depressed Violent Suicide Victims. *Neuropsychobiology*, 49(4), 189–195.
- Rosholm, K. R., Leijnse, N., Mantsiou, A., Tkach, V., Pedersen, S. L., Wirth, V. F., ... Stamou, D. (2017). Membrane Curvature Regulates Ligand-Specific Membrane Sorting Of GPCRs In Living Cells. *Nature Chemical Biology*, 13(7), 724–729.
- Roth, B. L. (2016, February 17). Dreads For Neuroscientists. *Neuron*, Vol. 89, Pp. 683–694.
- Rouault, A. A. J., Srinivasan, D. K., Yin, T. C., Lee, A. A., & Sebag, J. A. (2017, October 1). Melanocortin Receptor Accessory Proteins (MRAPs): Functions In The Melanocortin System And Beyond. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis Of Disease*, Vol. 1863, Pp. 2462–2467.
- Rovati, G. E., Capra, V., & Neubig, R. R. (2007, April). The Highly Conserved Dry Motif Of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond The Ground State. *Molecular Pharmacology*, Vol. 71, Pp. 959–964.
- Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J. M., Tardivellacombe, J., Diaz, J., Leurs, R., & Schwartz, J. C. (1993). A Novel Rat Serotonin (5-HT₆) Receptor: Molecular Cloning, Localization And Stimulation Of cAMP Accumulation. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 193(1), 268–276.
- Saerens, D., Kinne, J., Bosmans, E., Wernery, U., Muyldermans, S., & Conrath, K. (2004). Single Domain Antibodies Derived From Dromedary Lymph Node And Peripheral Blood Lymphocytes Sensing Conformational Variants Of Prostate-Specific Antigen. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(50), 51965–51972.

- Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A., & Brown, J. H. (2000). The Role Of Rho In G Protein-Coupled Receptor Signal Transduction. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 40(1), 459–489.
- Samuels, B. A., Mendez-David, I., Faye, C., David, S. A., Pierz, K. A., Gardier, A. M., ... David, D. J. (2016). Serotonin 1A And Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators Of The Neurogenic And Behavioral Actions Of Antidepressants. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology And Psychiatry*, 22(1), 26–45.
- Scholler, P., Nevoltris, D., De Bundel, D., Bossi, S., Moreno-Delgado, D., Rovira, X., ... Pin, J. P. (2017). Allosteric Nanobodies Uncover A Role Of Hippocampal mGlu2 Receptor Homodimers In Contextual Fear Consolidation. *Nature Communications*, 8(1).
- Schorb, W., Conrad, K. M., Singer, H. A., Dostal, D. E., & Baker, K. M. (1995). Angiotensin II Is A Potent Stimulator Of MAP-Kinase Activity In Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 27(5), 1151–1160.
- Setola, V., & Roth, B. L. (2003, December). Why Mice Are Neither Miniature Humans Nor Small Rats: A Cautionary Tale Involving 5-Hydroxytryptamine-6 Serotonin Receptor Species Variants. *Molecular Pharmacology*, Vol. 64, Pp. 1277–1278.
- Sharma, S. K., Klee, W. A., & Nirenberg, M. (1975). Dual Regulation Of Adenylate Cyclase Accounts For Narcotic Dependence And Tolerance. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 72(8), 3092–3096.
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The Postsynaptic Architecture Of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annual Review Of Biochemistry*, 76(1), 823–847.
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2003). Trafficking Patterns Of Beta-Arrestin And G Protein-Coupled Receptors Determined By The Kinetics Of Beta-Arrestin Deubiquitination. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278(16), 14498–14506.
- Shi, G.-X., Rehmann, H., & Andres, D. A. (2006). A Novel Cyclic AMP-Dependent EPAC-RIT Signaling Pathway Contributes To PACAP38-Mediated Neuronal Differentiation. *Molecular And Cellular Biology*, 26(23), 9136–9147.
- Shiraishi, Y., Natsume, M., Kofuku, Y., Imai, S., Nakata, K., Mizukoshi, T., ... Shimada, I. (2018). Phosphorylation-Induced Conformation Of B2-Adrenoceptor Related To

- Arrestin Recruitment Revealed By NMR. *Nature Communications*, 9(1).
- Short Term Effects Of PRX-03140 In Patients With Mild Alzheimer's Disease Being Treated With Aricept - Full Text View - Clinicaltrials.Gov. (N.D.).
- Siehler, S. (2009). Regulation Of RhoGEF Proteins By G12/13-Coupled Receptors. *British Journal Of Pharmacology*, 158(1), 41–49.
- Smolarek, D., Bertrand, O., & Czerwinski, M. (2012). Variable Fragments Of Heavy Chain Antibodies (VHHs): A New Magic Bullet Molecule Of Medicine? *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, Vol. 66, Pp. 348–358.
- Smriga, M., & Torii, K. (2003). L-Lysine Acts Like A Partial Serotonin Receptor 4 Antagonist And Inhibits Serotonin-Mediated Intestinal Pathologies And Anxiety In Rats. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 100(26), 15370–15375.
- Soto, M., Cai, W., Konishi, M., & Kahn, C. R. (2019). Insulin Signaling In The Hippocampus And Amygdala Regulates Metabolism And Neurobehavior. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 116(13), 6379–6384.
- Spiegelberg, B. D., & Hamm, H. E. (2005). Gβγ Binds Histone Deacetylase 5 (HDAC5) And Inhibits Its Transcriptional Co-Repression Activity. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(50), 41769–41776.
- Stanzl, E. G., Trantow, B. M., Vargas, J. R., & Wender, P. A. (2013). Fifteen Years Of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, And Clinical Applications. *Accounts Of Chemical Research*, 46(12), 2944–2954.
- Staus, D. P., Wingler, L. M., Strachan, R. T., Rasmussen, S. G. F., Pardon, E., Ahn, S., ... Lefkowitz, R. J. (2014a). Regulation Of B2-Adrenergic Receptor Function By Conformationally Selective Single-Domain Intrabodies S. *Molecular Pharmacology*, 85(3), 472–481.
- Staus, D. P., Wingler, L. M., Strachan, R. T., Rasmussen, S. G. F., Pardon, E., Ahn, S., ... Lefkowitz, R. J. (2014b). Regulation Of B2-Adrenergic Receptor Function By Conformationally Selective Single-Domain Intrabodies. *Molecular Pharmacology*, 85(3), 472–481.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., ... De La Monte, S. M. (2005). Impaired Insulin And Insulin-Like Growth Factor Expression And Signaling Mechanisms In Alzheimer's Disease - Is This Type 3

- Diabetes? *Journal Of Alzheimer's Disease*, 7(1), 63–80.
- Stewart, G. D., Sexton, P. M., & Christopoulos, A. (2010). Detection Of Novel Functional Selectivity At M3 Muscarinic Acetylcholine Receptors Using A *Saccharomyces Cerevisiae* Platform. *Acs Chemical Biology*, 5(4), 365–375.
- Storez, H., Scott, M. G. H., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., ... Marullo, S. (2005). Homo- And Hetero-Oligomerization Of B-Arrestins In Living Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(48), 40210–40215.
- Strohman, M. J., Maeda, S., Hilger, D., Masureel, M., Du, Y., & Kobilka, B. K. (2019). Local Membrane Charge Regulates B2 Adrenergic Receptor Coupling To Gi3. *Nature Communications*, 10(1), 2234.
- Sugiyama, Y., Fujinoki, M., & Shibahara, H. (2019). Effects Of 5-Hydroxytryptamine On Spermatozoal Hyperactivation And In Vitro Fertilization In Mice. *The Journal Of Reproduction And Development*, 65(6), 541–550.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., & Pei, G. (2002). Beta-Arrestin2 Is Critically Involved In CXCR4-Mediated Chemotaxis, And This Is Mediated By Its Enhancement Of p38 MAPK Activation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277(51), 49212–49219.
- Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El Yacoubi, M., ... Greengard, P. (2006). Alterations In 5-HT1b Receptor Function By P11 In Depression-Like States. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5757), 77–80.
- Svenningsson, P., & Greengard, P. (2007, February). P11 (S100A10) - An Inducible Adaptor Protein That Modulates Neuronal Functions. *Current Opinion In Pharmacology*, Vol. 7, Pp. 27–32.
- Svenningsson, P., Kim, Y., Warner-Schmidt, J., Oh, Y. S., & Greengard, P. (2013, October). P11 And Its Role In Depression And Therapeutic Responses To Antidepressants. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 14, Pp. 673–680.
- Tan, C. M., Brady, A. E., Nickols, H. H., Wang, Q., & Limbird, L. E. (2004). Membrane Trafficking Of G Protein-Coupled Receptors. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 44(1), 559–609.
- Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimerancic, P., Krogan, N. J., & Von Zastrow, M. (2011). SNX27 Mediates Retromer Tubule Entry And Endosome-To-Plasma Membrane Trafficking Of Signalling Receptors. *Nature Cell Biology*, 13(6), 715–723.
- Tesseur, I., Pimenova, A. A., Lo, A. C., Ciesielska, M., Lichtenthaler, S. F., De Maeyer, J. H., ... De Strooper, B. (2013). Chronic 5-HT4 Receptor Activation Decreases

- A β Production And Deposition In hAPP/PS1 Mice. *Neurobiology Of Aging*, 34(7), 1779–1789.
- Thomsen, A. R. B., Plouffe, B., Cahill, T. J., Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., ... Al., Et. (2016). GPCR-G Protein-B-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*, 166(4), 907–919.
- Tonini, M., Galligan, J. J., & North, R. A. (1989). Effects Of Cisapride On Cholinergic Neurotransmission And Propulsive Motility In The Guinea Pig Ileum. *Gastroenterology*, 96(5), 1257–1264.
- Tonini, Marcello, & Pace, F. (2006, May). Drugs Acting On Serotonin Receptors For The Treatment Of Functional Gi Disorders. *Digestive Diseases*, Vol. 24, Pp. 59–69.
- Torres, G. E., Arfken, C. L., & Andrade, R. (1996). 5-Hydroxytryptamine₄ Receptors Reduce Afterhyperpolarization In Hippocampus By Inhibiting Calcium-Induced Calcium Release. *Molecular Pharmacology*, 50(5), 1316–1322.
- Transue, T. R., De Genst, E., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1998). Camel Single-Domain Antibody Inhibits Enzyme By Mimicking Carbohydrate Substrate. *Proteins: Structure, Function And Genetics*, 32(4), 515–522.
- Trudel, M., Yao, Q., & Qian, F. (2016). The Role Of G-Protein-Coupled Receptor Proteolysis Site Cleavage Of Polycystin-1 In Renal Physiology And Polycystic Kidney Disease. *Cells*, 5(1), 3.
- Twarog, B. M., & Page, I. H. (1953). Serotonin Content Of Some Mammalian Tissues And Urine And A Method For Its Determination. *The American Journal Of Physiology*, 175(1), 157–161.
- Ueno, N., & Satoh, Y. (2009, July). Rapid Effect Of Mosapride Citrate, 5-HT₄ Receptor Agonist, On Fasting Blood Glucose In Type 2 Diabetes Patients. *Journal Of Diabetes And Its Complications*, Vol. 23, Pp. 255–256.
- Us20110091446a1 - Single Domain Antibodies Capable Of Modulating Bace Activity - Google Patents. (N.D.).
- Valiquette, M., Parent, S., Loisel, T. P., & Bouvier, M. (1995). Mutation Of Tyrosine-141 Inhibits Insulin-Promoted Tyrosine Phosphorylation And Increased Responsiveness Of The Human Beta 2-Adrenergic Receptor. *The Embo Journal*, 14(22), 5542–5549.
- Van Der Linden, R. H. J., Frenken, L. G. J., De Geus, B., Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Stok, W., ... Verrips, C. T. (1999). Comparison Of Physical Chemical

- Properties Of Llama V(HH) Antibody Fragments And Mouse Monoclonal Antibodies. *Biochimica Et Biophysica Acta - Protein Structure And Molecular Enzymology*, 1431(1), 37–46.
- Van Der Woning, B., De Boeck, G., Blanchetot, C., Bobkov, V., Klarenbeek, A., Saunders, M., ... De Haard, H. (2016). DNA Immunization Combined With SCFV Phage Display Identifies Antagonistic GCGR Specific Antibodies And Reveals New Epitopes On The Small Extracellular Loops. *Mabs*, 8(6), 1126–1135.
- Van Driel, P. B. A. A., Van Der Vorst, J. R., Verbeek, F. P. R., Oliveira, S., Snoeks, T. J. A., Keereweere, S., ... Lowik, C. W. G. M. (2014). Intraoperative Fluorescence Delineation Of Head And Neck Cancer With A Fluorescent Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobody. *International Journal Of Cancer*, 134(11), 2663–2673.
- Venkatakrisnan, A J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular Signatures Of GPCRs. *Nature*, 494(7436), 185–194.
- Vidal, R., Valdizan, E. M., Mostany, R., Pazos, A., & Castro, E. (2009). Long-Term Treatment With Fluoxetine Induces Desensitization Of 5-HT₄ Receptor-Dependent Signalling And Functionality In Rat Brain. *Journal Of Neurochemistry*, 110(3), 1120–1127.
- Vincke, C., Gutierrez, C., Wernery, U., Devoogdt, N., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., & Muyldermans, S. (2012). *Generation Of Single Domain Antibody Fragments Derived From Camelids And Generation Of Manifold Constructs*.
- Wada, K., Hu, L., Mores, N., Navarro, C. E., Fuda, H., Krsmanovic, L. Z., & Catt, K. J. (2006). Serotonin (5-Ht) Receptor Subtypes Mediate Specific Modes Of 5-HT-Induced Signaling And Regulation Of Neurosecretion In Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Molecular Endocrinology*, 20(1), 125–135.
- Waeber, C., Sebben, M., Nieoullon, A., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1994). Regional Distribution And Ontogeny Of 5-HT₄ Binding Sites In Rodent Brain. *Neuropharmacology*, 33(3–4), 527–541.
- Wallace, W. C., Akar, C. A., Lyons, W. E., Kole, H. K., Egan, J. M., & Wolozin, B. (1997). Amyloid Precursor Protein Requires The Insulin Signaling Pathway For Neurotrophic Activity. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 52(2), 213–227.
- Wang, B., Ardura, J. A., Romero, G., Yang, Y., Hall, R. A., & Friedman, P. A. (2010). Na/H Exchanger Regulatory Factors Control Parathyroid Hormone Receptor Signaling By Facilitating Differential Activation Of G(Alpha) Protein Subunits. *The Journal Of Biological Chemistry*, 285(35), 26976–26986.

- Wang, B., Yang, Y., Abou-Samra, A. B., & Friedman, P. A. (2009). NHERF1 Regulates Parathyroid Hormone Receptor Desensitization: Interference With Beta-Arrestin Binding. *Molecular Pharmacology*, 75(5), 1189–1197.
- Wang, H.-Y., Friedman, E., Olmstead, M. C., & Burns, L. H. (2005). Ultra-Low-Dose Naloxone Suppresses Opioid Tolerance, Dependence And Associated Changes In Mu Opioid Receptor-G Protein Coupling And Gbetagamma Signaling. *Neuroscience*, 135(1), 247–261.
- Wang, Qin, & Limbird, L. E. (2002). Regulated Interactions Of The Alpha 2A Adrenergic Receptor With Spinophilin, 14-3-3zeta, And Arrestin 3. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277(52), 50589–50596.
- Wang, Qin, Zhao, J., Brady, A. E., Feng, J., Allen, P. B., Lefkowitz, R. J., ... Limbird, L. E. (2004). Spinophilin Blocks Arrestin Actions In Vitro And In Vivo At G Protein-Coupled Receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5679), 1940–1944.
- Wang, Qingyi, Zhang, H., Xu, H., Guo, D., Shi, H., Li, Y., ... Gu, Y. (2016). 5-HTR3 And 5-HTR4 Located On The Mitochondrial Membrane And Functionally Regulated Mitochondrial Functions. *Scientific Reports*, 6(October), 1–10.
- Wang, Z., Dillon, T. J., Pokala, V., Mishra, S., Labudda, K., Hunter, B., & Stork, P. J. S. (2006). Rap1-Mediated Activation Of Extracellular Signal-Regulated Kinases By Cyclic AMP Is Dependent On The Mode Of Rap1 Activation. *Molecular And Cellular Biology*, 26(6), 2130–2145.
- Warner-Schmidt, J. L., Flajolet, M., Maller, A., Chen, E. Y., Qi, H., Svenningsson, P., & Greengard, P. (2009). Role Of P11 In Cellular And Behavioral Effects Of 5-HT4 Receptor Stimulation. *Journal Of Neuroscience*, 29(6), 1937–1946.
- Watson, G. S., Peskind, E. R., Asthana, S., Purganan, K., Wait, C., Chapman, D., ... Craft, S. (2003). Insulin Increases CSF A β 42 Levels In Normal Older Adults. *Neurology*, 60(12), 1899–1903.
- Watts, V. J., & Neve, K. A. (2005). Sensitization Of Adenylate Cyclase By G α i/o-Coupled Receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(3), 405–421.
- Weinman, E. J., Hall, R. A., Friedman, P. A., Liu-Chen, L.-Y., & Shenolikar, S. (2006). The Association Of Nherf Adaptor Proteins With G Protein-Coupled Receptors And Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Review Of Physiology*, 68(1), 491–505.
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis Of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review Of Biochemistry*, 87(1), 897–919.
- Westfield, G. H., Rasmussen, S. G. F., Su, M., Dutta, S., Devree, B. T., Chung, K. Y.,

- ... Skiniotis, G. (2011). Structural Flexibility Of The Gas A-Helical Domain In The B 2-Adrenoceptor Gs Complex. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 108(38), 16086–16091.
- Wetzker, R., & Böhmer, F.-D. (2003). Transactivation Joins Multiple Tracks To The ERK/MAPK Cascade. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(8), 651–657.
- White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., ... Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization Is Required For The Formation Of A Functional Gaba(B) Receptor. *Nature*, 396(6712), 679–682.
- Whorton, M. R., Bokoch, M. P., Rasmussen, S. G. F., Huang, B., Zare, R. N., Kobilka, B., & Sunahara, R. K. (2007). A Monomeric G Protein-Coupled Receptor Isolated In A High-Density Lipoprotein Particle Efficiently Activates Its G Protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 104(18), 7682–7687.
- Whorton, M. R., Jastrzebska, B., Park, P. S. H., Fotiadis, D., Engel, A., Palczewski, K., & Sunahara, R. K. (2008). Efficient Coupling Of Transducin To Monomeric Rhodopsin In A Phospholipid Bilayer. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(7), 4387–4394.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., ... Nusse, R. (2003). Wnt Proteins Are Lipid-Modified And Can Act As Stem Cell Growth Factors. *Nature*, 423(6938), 448–452.
- Winitz, S., Russell, M., Qian, N. X., Gardner, A., Dwyer, L., & Johnson, G. L. (1993). Involvement Of Ras And Raf In The Gi-Coupled Acetylcholine Muscarinic M2 Receptor Activation Of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Kinase And MAP Kinase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 268(26), 19196–19199.
- Wisler, J. W., Dewire, S. M., Whalen, E. J., Violin, J. D., Drake, M. T., Ahn, S., ... Lefkowitz, R. J. (2007). A Unique Mechanism Of B-Blocker Action: Carvedilol Stimulates B-Arrestin Signaling. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 104(42), 16657–16662.
- Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., & Lefkowitz, R. J. (2004). Beta-Arrestin Inhibits NF-KappaB Activity By Means Of Its Interaction With The NF-KappaB Inhibitor IkappaBalpha. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 101(23), 8603–8607.
- Woolven, B. P., Frenken, L. G., Van Der Logt, P., & Nicholls, P. J. (1999). The Structure Of The Llama Heavy Chain Constant Genes Reveals A Mechanism For Heavy-

- Chain Antibody Formation. *Immunogenetics*, 50(1–2), 98–101.
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y., ... Stevens, R. C. (2014). Structure Of A Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound To An Allosteric Modulator. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6179), 58–64.
- Xavier, C., Blykers, A., Vaneycken, I., D’huyvetter, M., Heemskerk, J., Lahoutte, T., ... Caveliers, V. (2016). 18F-Nanobody For PET Imaging Of HER2 Overexpressing Tumors. *Nuclear Medicine And Biology*, 43(4), 247–252.
- Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W., & Martins, R. (2002). Alzheimer’s Beta-Amyloid Peptides Compete For Insulin Binding To The Insulin Receptor. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 22(10).
- Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R. J., Cirrito, J. R., ... Lee, J.-M. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Degrades Amyloid-Beta Fibrils In Vitro And Compact Plaques In Situ. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281(34), 24566–24574.
- Yoon, E. J., Gerachshenko, T., Spiegelberg, B. D., Alford, S., & Hamm, H. E. (2007). G β Interferes With Ca²⁺-Dependent Binding Of Synaptotagmin To The Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor (Snare) Complex. *Molecular Pharmacology*, 72(5), 1210–1219.
- Yoon, S., & Seger, R. (2006). The Extracellular Signal-Regulated Kinase: Multiple Substrates Regulate Diverse Cellular Functions. *Growth Factors*, 24(1), 21–44.
- 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. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(13), 10016–10029.
- Zemdegs, J., Martin, H., Pintana, H., Bullich, S., Manta, S., Marques, M. A., ... Guiard, B. P. (2019). Metformin Promotes Anxiolytic And Antidepressant-Like Responses In Insulin-Resistant Mice By Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids. *Journal Of Neuroscience*, 39(30), 5935–5948.
- Zhao, Q., & Wu, B. L. (2012, March). Ice Breaking In GPCR Structural Biology. *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 33, Pp. 324–334.
- Zhu, M., Gong, X., Hu, Y., Ou, W., & Wan, Y. (2014). Streptavidin-Biotin-Based Directional Double Nanobody Sandwich Elisa For Clinical Rapid And Sensitive Detection Of Influenza H5n1. *Journal Of Translational Medicine*, 12, 352.
- Zidar, D. A., Violin, J. D., Whalen, E. J., & Lefkowitz, R. J. (2009). Selective Engagement Of G Protein Coupled Receptor Kinases (GRKs) Encodes Distinct

Functions Of Biased Ligands. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 106(24), 9649–9654.

Zürn, A., Zabel, U., Vilardaga, J.-P., Schindelin, H., Lohse, M. J., & Hoffmann, C. (2009). Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis Of Alpha 2A-Adrenergic Receptor Activation Reveals Distinct Agonist-Specific Conformational Changes. *Molecular Pharmacology*, 75(3), 534–541.

Réseaux de protéines associés aux récepteurs de la sérotonine : rôle et options thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer, principale forme de démence dans le monde, est devenue un problème de santé publique majeur. Cette pathologie est caractérisée par la présence de deux lésions principales dans le cerveau : la dégénérescence neurofibrillaire composée de protéine Tau hyperphosphorylée et des plaques amyloïdes, agrégats denses de peptides β -amyloïdes ($A\beta$). Le peptide $A\beta$ provient du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par des β - et γ -sécrétases. Un clivage dit non-amyloïdogène de l'APP existe également, au cours duquel la protéine est clivée par une α -sécrétase (principalement ADAM10) ce qui conduit à la production d'un fragment extracellulaire connu pour être neuroprotecteur et neurotrophique, le sAPP α . Le récepteur sérotoninergique 5-HT $_4$ est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) qui interagit avec l'APP et ADAM10, module leur trafic et leur maturation, et dont l'activation pharmacologique favorise le clivage non-amyloïdogène de l'APP. Le récepteur 5-HT $_6$ est un autre récepteur sérotoninergique dont la modulation pharmacologique induit des effets pro-cognitifs. Les récepteurs 5-HT $_4$ et 5-HT $_6$ apparaissent donc comme des cibles thérapeutiques d'intérêt dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents responsables des effets liés à l'expression et l'activation du récepteur 5-HT $_4$ ne sont pas encore élucidés. Les objectifs de cette thèse ont été d'une part de développer une technique de criblage des nanocorps (fragments d'anticorps à domaine unique provenant des camélidés) contre les récepteurs 5-HT $_4$ et 5-HT $_6$ en utilisant notamment des approches de TR-FRET et de cytométrie de flux. Dans un second temps, l'utilisation d'une approche de protéomique combinant la purification des partenaires du récepteur 5-HT $_4$ par affinité suivie de leur identification systématique par spectrométrie de masse a permis l'identification de partenaires protéiques potentiels associés au récepteur 5-HT $_4$ dans les cellules HEK-293N. Parmi les protéines recrutées par le récepteur 5-HT $_4$, nous avons notamment identifié la protéine IRS4 (*Insulin Receptor Substrate 4*). La protéine IRS4 est un transducteur de la voie de la signalisation de l'insuline. Étant donné qu'une dérégulation de la voie de signalisation de l'insuline est l'un des événements majeurs impliqués dans le développement et la progression de la maladie d'Alzheimer, nous nous sommes focalisés sur ce partenaire. Après avoir validé cette interaction par Western Blot, nous avons montré une co-localisation de IRS4 avec le récepteur 5-HT $_4$ dans les cellules HEK-293. Par ailleurs, des études fonctionnelles ont montré qu'une inhibition de l'expression de IRS4 induit une surexpression du récepteur 5-HT $_4$ dans les cellules HEK-293, associée à une augmentation de la signalisation canonique du récepteur via la voie de la protéine G $_s$.

Ces résultats suggèrent une modulation du trafic du récepteur 5-HT $_4$ et donc du complexe associé incluant l'APP et l'ADAM10 par la protéine IRS4. Ce travail de thèse dévoile pour la première fois un lien fonctionnel entre la signalisation du récepteur sérotoninergique 5-HT $_4$ et la signalisation de la voie de l'insuline via IRS4 qui pourrait être d'intérêt dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Il pose également les bases à une identification rapide de nanocorps dirigés contre les récepteurs 5-HT $_4$ et 5-HT $_6$ dont les outils immunohistologiques manquent pour approfondir la compréhension mécanistique.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, récepteur 5-HT $_4$, nanocorps, interactome, IRS4, insuline

Protein networks associated with serotonin receptors : role and therapeutic options for Alzheimer's Disease.

Alzheimer's Disease is the most common form of dementia worldwide and has become a major public health problem. This pathology is characterized by the presence of two main features in the brain: neurofibrillary tangles (NFTs) composed of hyperphosphorylated Tau and amyloid plaques, dense aggregates of hydrophobic β -amyloid peptide ($A\beta$). $A\beta$ peptide results from the amyloidogenic degradation of the Amyloid Precursor Protein (APP) by β - and γ -secretases. On the other hand, the non-amyloidogenic proteolysis of APP, within the $A\beta$ sequence by an α -secretase (mainly ADAM10), releases the extracellular fragment of APP (sAPP α), which is neurotrophic and neuroprotective. The 5-HT $_4$ receptor (5-HT $_4$ R) is a G protein coupled receptor (GPCR) which interacts with APP and ADAM10, modulates their trafficking and maturation, and which pharmacological activation promotes the non-amyloidogenic cleavage of APP. The 5-HT $_6$ receptor (5-HT $_6$ R) is another serotonergic receptor which pharmacological modulation induces pro-cognitive effects. Thus, 5-HT $_4$ R and 5-HT $_6$ R constitute interesting therapeutic targets in the context of Alzheimer's Disease. Nevertheless, the molecular and cellular mechanisms underlying these effects linked to 5-HT $_4$ R expression and activation remain elusive. This thesis aimed, in a first part, to develop a screening technique to isolate nanobodies (single domain antibody fragment from camelids) directed against 5-HT $_4$ R and 5-HT $_6$ R, by using TR-FRET and flow cytometry approaches. In a second part, the use of a proteomic approach combining affinity purification of 5-HT $_4$ R partner proteins followed by their systematic identification by mass spectrometry (AP-MS) lead to the identification of potential partner proteins associated with 5-HT $_4$ R in HEK-293N cells. Amongst proteins recruited by 5-HT $_4$ Rs, we identified IRS4 (Insulin Receptor Substrate 4) protein. IRS4 protein is a transducer of the insulin signaling pathway. Given that a dysregulation of the insulin signaling pathway is one of the major events involved in Alzheimer's Disease development, we decided to focus on this partner. We validated the interaction by Western blotting and showed a colocalization of endogenous IRS4 with 5-HT $_4$ R in HEK-293 cells. Then, functional studies showed that IRS4 downregulation induced 5-HT $_4$ R overexpression in HEK-293 cells, associated with an increase in the canonical signaling of the receptor through its G $_s$ protein pathway.

These results suggest a modulation of 5-HT $_4$ R trafficking and of its associated complex including APP and ADAM10 by IRS4 protein. This thesis work reveals for the first time a functional link between 5-HT $_4$ R signaling and insulin signaling pathway via IRS4 protein which could be of interest in the context of Alzheimer's disease. It also establishes the preliminary basis for a fast identification of nanobodies targeting 5-HT $_4$ and 5-HT $_6$ receptors for which immunohistological tools are lacking to explore their underlying mechanisms.

Keywords: Alzheimer's disease, 5-HT $_4$ receptor, nanobody, interactome, IRS4, insulin