



HAL
open science

Effets de la fluoxétine, inhibiteur de la recapture de la sérotonine, sur les cellules souches musculaires et la régénération musculaire

Mylène Fefeu

► **To cite this version:**

Mylène Fefeu. Effets de la fluoxétine, inhibiteur de la recapture de la sérotonine, sur les cellules souches musculaires et la régénération musculaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7341 . tel-04117551

HAL Id: tel-04117551

<https://theses.hal.science/tel-04117551v1>

Submitted on 5 Jun 2023

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.

Université de Paris

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité, ED562

*Laboratoire Unité Neuropathologie Expérimentale, Département Santé Globale,
Institut Pasteur, 25-28 rue Docteur Roux, 75015 Paris*

Effets de la fluoxétine, inhibiteur de la recapture de la sérotonine, sur les cellules souches musculaires et la régénération musculaire

Par Mylène Fefeu

Thèse de doctorat de Développement

Dirigée par Pr Fabrice Chrétien

Présentée et soutenue publiquement le 29/11/2021

Devant un jury composé de :

Mr le Pr Denis David, PU, Université Paris Saclay	Rapporteur
Mr le Dr Philippos Mourikis, DR, Université Paris Est Créteil	Rapporteur
Mme la Dr Francine Coté, CR, Université de Paris	Examinatrice
Mme la Dr Barbara Gayraud-Morel, CR, Sorbonne Université	Examinatrice
Mr le Pr Raphaël Gaillard, PU-PH, Université de Paris	Membre invité
Mr le Pr Fabrice Chrétien, PU-PH, Université de Paris	Directeur de thèse

Remerciements

A Monsieur le Professeur **Denis David**, de l'Université de Paris Saclay,
Et à Monsieur le Docteur **Philippos Mourikis**, de l'Université Paris Est Créteil,
Pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse,
Mes remerciements les plus sincères.

A Madame le Docteur **Barbara Gayraud-Morel**, de l'Institut Pasteur
A Madame le Docteur **Francine Cote**, de l'Université de Paris,
Pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse,
Mes hommages les plus respectueux.

A Monsieur le Professeur **Raphaël Gaillard** de l'Université de Paris,
Pour son encadrement et ses conseils lors de ce travail de thèse,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur **Fabrice Chrétien** de l'Université de Paris,
Pour son encadrement et son accueil au sein de son laboratoire lors de ce travail de thèse,
Sincères remerciements.

Ce travail de thèse s'est résolument accompli grâce à de nombreuses personnes, au fil des heures devenues années et du temps s'armant parfois de tempêtes. Et c'est avec un immense plaisir que je peux aujourd'hui leur adresser, enfin, tous mes remerciements.

Je souhaite remercier le **Professeur Raphaël Gaillard** de m'avoir introduit dans l'univers passionnant et parfois déroutant de la recherche fondamentale, d'avoir réussi à créer un challenge intellectuel stimulant bien que parfois au bord du raisonnable et, enfin, je le remercie de m'avoir témoigné son soutien tout au long de mon parcours scientifique comme médical.

Je remercie le **Professeur Fabrice Chrétien**, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie dans son laboratoire me permettant ainsi une formation de qualité au sein de son équipe et de l'Institut Pasteur et pour son encadrement tout au long de ce travail.

Force vive fondatrice de cette thèse, je remercie chaleureusement tous les membres passés et présents de **l'unité Neuropathologie Expérimentale**. Plus particulièrement, je remercie **Pierre Rocheteau** pour son encadrement de la première heure qui a donc eu la patience de me former tant au raisonnement scientifique qu'aux défis impitoyables de la paillasse et sans qui ce travail n'aurait jamais pu être et être surtout une « affaire qui roule ». Je remercie singulièrement **David Briand**, partenaire de manip et de crime de chouffe et de rhum hors pair, qui a fait preuve de la plus grande des patiences à mon égard (en même temps, j'ai suivi au pied de la lettre tes recommandations : « une manip qu'on réussit, c'est une manip qu'on a ratée au moins trois fois »), je te dois beaucoup pour ce travail, merci milles fois. Je remercie **David Hardy**, alias Sansoussan, l'homme aux mille gadgets et également installateur de LED à domicile, merci pour ton aide jusqu'aux derniers instants, ce travail ne pourrait se finir sans toi. Je remercie **Gregory Jouvion**, de m'avoir accueillie dans son bureau, merci pour ta bienveillance, ton écoute et ce désir de transmettre, animé d'une passion rayonnante. Merci mille fois à **Cédric Thépenier**, homme de l'ombre indispensable et insaisissable malgré tout, merci pour tes connaissances infinies délivrées en toute modestie, pour ta gentillesse et disponibilité, ton empathie et tes cadeaux cachés (merci également à **Aurélien Trignol** pour ses conseils et relectures). Merci à **Michael Blatzer** pour son encadrement, sa disponibilité et ses multiples conseils et relectures. Merci à **Anne-Cécile Petit** pour ses conseils. Merci à **Philippe Tixador, Mélanie Juchet, Marie Nguele, Sarah Khalilian, Benjamin Picard, Johan Bedel** pour leurs aides techniques précieuses. Merci à **Jean Marc Cavaillon** pour sa bienveillance et ses qualités pédagogiques et scientifiques. Merci à **Tarek Sharshar** pour sa bienveillance et ses conseils. Merci à l'ensemble des membres du laboratoire qui ont animé mes journées : merci à **Magali Tichit, Sabine Maurin, Sophie Mutricy, Pierre Goossens, Gabriela Ferreira, Franck Verdonk, Adrien Bouglé, Aurélien Mazeraud, Patricia Flamant, Inès Mouyokolo, Nassima Messal, Renaud Florence, Aurélien Séguier, Lucie Duarte, Claire Bastard, Sarah Bengalhem, Marine Ledudal, Antoine Prémont**, en espérant n'oublier personne.

De nombreuses collaborations ont œuvré à l'aboutissement de ce travail. Je remercie particulièrement les **Professeurs Jacques Callebert** et **Jean-Marie Launay** de m'avoir fait découvrir le monde complexe et passionnant de la sérotonine et pour leurs expertises et conseils. Je remercie **Barbara Gayraud-Morel** et **Hiroshi Sakai** de l'Institut Pasteur, pour leurs aides et conseils avisés de myologie. Je remercie les plateformes de cytométrie de flux **CB UtechS** (pour toutes ces heures merveilleuses de FACS) et d'**Imagopole**, et plus

particulièrement, merci à **Nathalie Aulner**. Merci également à **Aude Lafoux** et **Corinne Huchet** de la plateforme Therassay et **François Coudoré** et **Abdulkarim Tutakhail** de l'Université de pharmacie Paris Saclay, pour leurs aides et échanges scientifiques. Merci à **Alice Marques Pinheiro** de l'Institut Curie pour ses précieux conseils. Merci à **Anne Denys** de l'Université de Bobigny pour la découverte du Maldi-tof. Je remercie également **Francine Cote** et **Guillemette Fouquet** de l'Institut Imagine pour ces échanges et temps de collaboration.

Je remercie également **Denis Houzelstein** et **Morgane Besson**, tuteurs de l'Institut Pasteur, pour leur suivi, ainsi qu'**Olivier Cassar**, **Karin Eiglemeier**, **Geneviève Milon** et **François Rougeon** pour leur conseils.

Bien plus qu'une collaboratrice, **Anne Danckaert**, merci mille fois pour ton expertise, ta rigueur, ta disponibilité, ta créativité, mais aussi pour ton amitié, ton soutien et ton écoute. Nos petits lunchs me manquent.

Je souhaite remercier également mes compères bien plus que comparses qui ont partagé toutes ces heures de recherche, les rendant vibrantes et parfois insolites. Merci à mes co-M2 d'avoir plongé avec moi dans cette découverte, merci pour le soutien et les soirées de décompression se soldant en des siestes au soleil avec une glace : merci donc à **Cyril Longé** (à quand notre permis Goupil ?), **Emmanuel Pardo**, **Victoria Lepere**, **Lucile Boccara** (el trio à rio toujours en attente), **Myriam Akbal** (Smahli), **Margot Delabarre**. Merci surtout à ceux, plus fous d'entre tous, qui ont continué la route avec moi sur cet étrange chemin qu'est la thèse de science. Many thanks to **Anthony Yasmann**, who gave me unfailing support despite misunderstandings and disagreements, from Paris to New York to Tokyo, and who taught me the English language that I have unfortunately already lost! I wish you only the best for your life and the success you deserve, See ya Body! Compagnon de la première heure voire de premières cordées, merci mon petit **Duceau Tiste-bap**, d'avoir tenu le coup avec moi !! Je réalise qu'on va finir de gravir cette roche doctoralesque en même temps et je ne suis pas peu fière de le faire à tes côtés. Merci pour ton soutien, et ton entraide, ton intelligence vive et ta soif rieuse ! Et bien sûr, encore bienvenue à la chère petite Romane. Le meilleur du début jusqu'à la fin, **Lorna Guéniot**, c'est bien plus qu'un merci que je t'adresse ici, pour avoir partagé un bout de route et un coin de table avec moi de nombreuses fois (même si tu as fini laaaaagement devant moi, vieille pourrie !), mais surtout je te remercie pour ton amitié et tes qualités humaines qui ont vivifié les couleurs de l'espoir qui s'étaient parfois taries au cours de ce périple. Et merci encore à **Josh** et ses bières savoureuses.

Parce que leur soutien, leur compréhension et leur bienveillance m'ont aidée à aller au bout de ce parcours et parce que je continue d'apprendre encore quotidiennement auprès d'eux et auprès de nos patients, merci aux différentes **équipes soignantes du pôle 15 de l'hôpital Sainte Anne**, un merci plus particulier à l'équipe du CMP S14, l'équipe précieuse de l'HDS, ma chère équipe EMILI et bien sûr mon équipe festival de l'unité protégée. Merci également à mes **collègues du SHU** et mes co-chefs, **Jacob Dhôte** et **Lucie Berkovitch** qui m'ont permis, entre autres, d'avoir le temps de finir d'écrire cette thèse et de découvrir les bars de la rue Coty. Enfin, **Claire Gauthier**, encore et toujours, comme une douce litanie affable, un merci appuyé et infini pour ton amitié, ton écoute, ton soutien et parfois ta révolte.

Au-delà de ces frontières, je remercie sincèrement mes proches qui, chacun à leur manière, de près comme de loin, m'ont soutenue et ont pu éprouver avec moi les concepts de résilience et de persévérance. Un grand merci à **Laura** : co-équipière d'aventures et de fous rires depuis 30 ans, on va continuer à surdater, à **Wafa** : de tmtc à neuf pour longtemps encore, j'ai hâte de rencontrer Franco, à **Tatiana** : aux heures habillées par Hans Zimmer dans cet espace suspendu, à **Alty** : padre avant l'heure pour qui j'aurais à cœur de préserver ton univers vaste pour des générations encore. Merci également au groupe des **Mamies** et **Alicia**, pour avoir animé des jours et mes nuits au-delà d'un réel stationnaire. Merci à ces uniques personnes que l'internat m'a permis de rencontrer et qui continuent d'enrichir mon quotidien : **Manel, Louise, Alice, Jalel, Samuel, Mathilde, Marion**. Merci à **Romain** de l'île intense pour avoir toléré pas un mais deux thésards dans son quotidien. Merci également à **Hugo, Vincent, Jean-Noël, Florian, Laurie-Anne, Alex le Normalo, Romain et Florian** et surtout à très vite. Car à tous et de fait, le monde cinglant d'après nous attend avec impatience.

A **Vous**, que j'attendais quelque part entre mes souvenirs et mes espoirs.

A toi, **Alexandre**, les mots me manquent pour te signifier le soutien crucial pre/per/post que tu m'as apportée. Alors on va tenter des choses simples, je n'aurais absolument pas réussi sans toi, j'admire tant de tes choses que je n'ai qu'une hâte, c'est que le monde les célèbre enfin.

Avec force à la hauteur, je l'espère, de leur dévouement, merci à **mes parents et à ma sœur**, qui ont veillé, écouté, patienté, conseillé, inquiété, soutenu et relu chaque instant. Ce travail est résolument le fruit de nos efforts. Et toujours, cette pensée apaisée aux reposés.

Magritte aurait-il pu dire, ceci n'est pas une pipe ?

l_l_l_l_l_

Résumé

La fluoxétine (FLX), premier inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine développé il y a 50 ans, est le traitement antidépresseur le plus prescrit au monde. Plusieurs mécanismes d'action sous-tendent l'effet antidépresseur de cette classe tels que le renforcement de la neurotransmission de la sérotonine (5-HT) mais également l'augmentation de la neurogenèse hippocampique, de la survie neuronale et de l'angiogenèse cérébrale. En périphérie, la sérotonine, principalement synthétisée par l'intestin et stockée dans les plaquettes, a également montré des effets positifs sur différentes cellules souches et dans plusieurs modèles de régénération tissulaire. Les effets de FLX sur le comportement de cellules souches et la régénération tissulaire au-delà du système nerveux central ont été à ce jour peu étudiés.

Nos objectifs étaient, d'une part de caractériser la modulation des concentrations de 5-HT induite par FLX dans le compartiment central, périphérique et circulant, et d'autre part d'investiguer les propriétés régénératives de FLX en périphérie à l'aide du modèle de régénération *ad integrum* du muscle squelettique.

Nous avons d'abord évalué par HPLC différentes concentrations de 5-HT au cours du temps chez des souris traitées par FLX ou placebo. Dans le cerveau et l'intestin, organes synthétisant la 5-HT, le traitement par FLX entraînait initialement une réduction des concentrations intratissulaires de 5-HT suivie d'une restauration de ces concentrations. A l'inverse, dans le sang total, le traitement par FLX entraînait une déplétion drastique et soutenue des concentrations de 5-HT, associée à une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques de 5-HT suivie d'une diminution durable de ces concentrations. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le signal 5-HT systémique n'est augmenté qu'en cas de traitement subaigu par FLX et que les organes, possédant un métabolisme 5-HT, restaurent une nouvelle homéostasie à l'issue d'un traitement chronique par la fluoxétine.

Dans un second temps, nous avons montré que le traitement prolongé par FLX augmentait le nombre de cellules souches musculaires et l'angiogenèse musculaire chez la souris. FLX améliorait également la régénération du muscle squelettique après une blessure unique et des blessures multiples induites par l'injection intramusculaire de notexine. L'accélération de la régénération musculaire induite par FLX résultait d'une triple action marquée par une augmentation du pool de cellules souches musculaires, une augmentation de la densité des vaisseaux et une réduction des lésions fibrotiques et de l'inflammation. *In vitro*, nous avons montré que les effets prolifératifs de FLX sur des myoblastes immortalisés étaient dépendants de 5-HT et de l'activation du récepteur 5-HT_{1B}. *In vivo*, les souris, dépourvues de 5-HT périphérique traitées par FLX, ne présentaient pas d'effets positifs pendant la régénération musculaire. De plus, l'inactivation pharmacologique et génétique du récepteur 5-HT_{1B} dans les cellules souches musculaires abolissait également l'amélioration induite par FLX sur la régénération musculaire.

En conclusion, nos résultats montrent qu'à travers la modulation du signal 5-HT en périphérie, FLX favorise une régénération musculaire harmonieuse sous-tendue par une action combinée sur la myogenèse, l'angiogenèse et l'inflammation. Ces résultats mettent en lumière l'identité sérotoninergique du muscle squelettique et dégagent une stratégie thérapeutique prometteuse pour les maladies musculaires endogènes. Au-delà du muscle et du cerveau, nos résultats soulignent que les effets des antidépresseurs sur la régénération d'organes doivent être étudiés. Enfin, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives d'investigation tant sur le rôle de la sérotonine et du récepteur 5-HT_{1B} dans d'autres types de cellules souches que sur le potentiel thérapeutique des antidépresseurs en médecine régénérative.

Mots clés : Fluoxetine, sérotonine, 5-HT, récepteur 5-HT_{1B}, cellules souches musculaires, régénération musculaire, angiogenèse, inflammation

Summary

Fluoxetine (FLX), the first selective serotonin reuptake inhibitor developed 50 years ago, is the most prescribed antidepressant treatment worldwide. Several mechanisms of action underlie the antidepressant effect of this class, such as the reinforcement of serotonin (5-HT) neurotransmission but also the increase in hippocampal neurogenesis, neuronal survival, and cerebral angiogenesis. Peripherally, serotonin, mainly synthesized by the gut and stored in platelets, also showed positive effects on different stem cells and in several tissue regeneration models. The effects of FLX on stem cell behavior and tissue regeneration beyond the central nervous system have been little studied to date.

Our objectives were, on the one hand, to characterize the modulation of 5-HT levels induced by FLX in the central, peripheral, and circulating compartments, and on the other hand, to investigate the regenerative properties of FLX in the periphery using the skeletal muscle *ad integrum* regeneration model.

We first assessed by HPLC different levels of 5-HT over time in mice treated with FLX or placebo. In the brain and intestine, organs synthesizing 5-HT, FLX treatment initially led to a reduction in intra-tissue 5-HT levels followed by a restoration of these levels. Conversely, in whole blood, FLX treatment resulted in a drastic and sustained depletion of 5-HT levels, associated with a transient increase in plasma 5-HT levels followed by a sustained decrease in these levels. Taken together, these results suggest that systemic 5-HT signaling is increased only during subacute FLX treatment and that organs, possessing 5-HT metabolism, restore a new homeostasis after chronic FLX treatment.

In a second step, we showed that prolonged FLX treatment increased the number of muscle stem cells and muscle angiogenesis in mice. FLX also improved skeletal muscle regeneration after single and multiple injuries induced by intramuscular notexin injection. The acceleration of muscle regeneration induced by FLX resulted from a triple action marked by an increase in the muscle stem cell pool, an increase in vessel density and a reduction in fibrotic lesions and inflammation. *In vitro*, we showed that the proliferative effects of FLX on immortalized myoblasts were dependent on 5-HT and 5-HT_{1B} receptor activation. *In vivo*, mice lacking peripheral 5-HT treated with FLX did not show positive effects during muscle regeneration. Moreover, pharmacological, and genetic inactivation of the 5-HT_{1B} receptor in muscle stem cells also abolished the FLX-induced improvement in muscle regeneration.

In conclusion, our results show that, through modulation of the 5-HT signal in the periphery, FLX promotes a harmonious muscle regeneration underpinned by a combined action on myogenesis, angiogenesis and inflammation. These results highlight the serotonergic identity of skeletal muscle and point to a promising therapeutic strategy for endogenous muscle diseases. Beyond muscle and brain, our results highlight that the effects of antidepressants on organ regeneration need to be studied. Finally, this work opens new perspectives of investigation both on the role of serotonin and the 5-HT_{1B} receptor in other types of stem cells and on the therapeutic potential of antidepressants in regenerative medicine.

Keywords: Fluoxetine, serotonin, 5-HT, 5-HT_{1B} receptor, muscle stem cells, muscle regeneration, angiogenesis, inflammation

Abréviations

5-HIAA : 5-hydroxyindol-acétique
5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTP : 5-hydroxytryptophane
Ach : Acétylcholine
ADP : Adénoside diphosphate
AGM : Aorto-gonado-mésonephros
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénoside triphosphate
AVC : Accidents vasculaires cérébraux
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BrdU : 5-bromo-2'-désoxyuridine
CE : Cellules endothéliales
CMLV : Cellules musculaires lisses vasculaires
CSMu : Cellules souches musculaires (cellules satellites)
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CSPH : Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques
CSPN : Cellules souches et progéniteurs neuronaux
DAT : Transporteur membranaire de dopamine
E : Jour de vie embryonnaire
EDC : Episode dépressif caractérisé
EDL : *Extensor digitorum longus*
EGF : Facteur de croissance épidermique
EPO : Erythropoïétine
ERC : Essais contrôlés randomisés
FGF : Facteur de croissance fibroblastique
FRM : Facteurs de régulation myogénique
GDNF : Facteur neurotrophique dérivée de cellules gliales
GFP : Protéine fluorescente verte
GIP : Protéines interagissant avec les GPCR
G-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes
GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G
H₂O₂ : Peroxyde d'oxygène
HIF1 α : Facteur 1 α induit par l'hypoxie
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
Htr : Gènes de récepteur 5-HT
IDO : Indoléamine-2-3-dioxygénase
IGF : Facteur de croissance ressemblant à l'insuline
IL : Interleukine
IMAO : Inhibiteur de la MAO
INF α : Interféron α
ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
KI : Knock-in
KO : Knockout

Kyn : kynurénine
M-CSF : Facteur stimulant les colonies de macrophages
MAO : Monoamine oxydase
miR : Micro-ARN
MMP : métalloprotéases matricielles
NO : Monoxyde d'azote
NOS : Synthase d'oxyde nitrique
NRD : Noyaux raphé dorsal
NTX : Notexine
OCT : Transporteur de cations organiques
PA : Potentiel d'action
PGDF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PMAT : Transporteur de monoamines à membrane plasmique
PPP : Plasma pauvre en plaquettes
PRP : Plasma riche en plaquettes
SCF : Facteur de cellules souches
SERT ou 5-HTT : Transporteur membranaire de sérotonine
Shh : Sonic hedgehog
siARN : small interfering ARN
SNC : Système nerveux central
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
TA : *Tibialis Anterior*
TDO : Tryptophane dioxygénase
TFG- β : Facteur de croissance transformant β
TNF α : Facteur de nécrose tumorale α
TPH : Tryptophane hydroxylase
TPO : Thrombopoïétine
Trp : Tryptophane
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR : Récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VMAT : Transporteur vésiculaire de monoamines

Table des matières

Résumé.....	7
Summary	9
Abréviations	11
Introduction.....	15
A. La fluoxétine, un traitement antidépresseur modulant la transmission sérotoninergique .15	
1. La fluoxétine, un traitement antidépresseur efficace.....	15
a) Découverte des antidépresseurs et développement du premier inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, la fluoxétine	15
b) Propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques de la fluoxétine.....	16
c) Efficacité thérapeutique, délai d'action et tolérance des ISRS.....	19
2. La sérotonine, un système complexe hautement régulé.....	21
a) Histoire de la sérotonine.....	21
b) Métabolisme de la sérotonine.....	21
c) Modes d'action de la sérotonine.....	25
d) Distribution de la sérotonine et des acteurs liés à son métabolisme.....	28
e) Fonctions physiologiques de la sérotonine	31
3. Homéostasie de la transmission sérotoninergique et modulation pharmacologique par les ISRS....	34
a) Neurotransmission sérotoninergique.....	34
b) Transmission sérotoninergique périphérique intestinale	41
c) Transmission sérotoninergique dans le compartiment circulant	43
B. La fluoxétine, une molécule aux propriétés régénératives, dépendantes de la sérotonine.48	
1. La fluoxétine, via la sérotonine, une molécule facilitant la régénération du SNC.....	48
a) La sérotonine, un acteur clé dans le développement et le maintien du SNC.....	48
b) La sérotonine, un facteur stimulant l'angiogenèse en situation saine et pathologique	56
c) La fluoxétine, une molécule aux propriétés régénératives du SNC, via la sérotonine	59
2. La fluoxétine, via la sérotonine, favorise la régénération d'autres tissus ?	66
a) Implication de la sérotonine dans l'hématopoïèse embryonnaire chez la souris	66
b) Rôle de la sérotonine dans l'hématopoïèse à l'âge adulte.....	67
c) La fluoxétine, un traitement stimulant les lignées cellulaires de la moelle osseuse	71
C. Le muscle strié squelettique, un tissu au fort potentiel régénératif73	
1. Structure et fonction du muscle squelettique :.....	73
2. Les cellules souches musculaires, actrices centrales du développement et de la régénération du muscle squelettique.....	74
a) Développement pré et post natal du muscle squelettique	75
b) Les cellules souches musculaires résidentes	77
c) Régénération musculaire ad integrum	81
3. Le muscle squelettique, un tissu sensible à la sérotonine ?.....	84
a) Système 5-HT présent dans le muscle squelettique.....	84
b) Rôle de la sérotonine et effets des ISRS dans les fonctions du muscle squelettique	85
c) Effets de la sérotonine ou des ISRS dans le développement et la régénération musculaire	86
Partie 1 : La fluoxétine, un modulateur biphasique des concentrations de sérotonine dans l'organisme.....	89
A. Objectifs : Caractériser les effets de la fluoxétine, prototype des ISRS, sur les concentrations de sérotonine dans le compartiment central, périphérique et circulant.....	89
B. Matériel et méthodes	89
1. Animaux utilisés	89
2. Intervention pharmacologique	90
3. Préparations des échantillons	90
4. Mesures de catabolites du tryptophane	91

5. Analyses statistiques	91
C. Résultats	91
1. Concentrations tissulaires cérébrales de sérotonine au cours d'un traitement par fluoxétine	91
2. Concentrations périphériques de sérotonine au cours d'un traitement par fluoxétine	93
3. Concentrations circulantes de sérotonine, tryptophane et kynurénine au cours d'un traitement par fluoxétine	94
4. Corrélations des concentrations de sérotonine entre les compartiments central, périphérique et circulant	96
D. Discussion et limites	96
<i>Partie 2 : La fluoxétine, un traitement favorisant la régénération musculaire et les fonctions des cellules souches musculaires</i>	<i>101</i>
A. Objectif : caractériser l'impact de la fluoxétine dans la régénération musculaire à l'aide de modèle de blessure musculaire aiguë	101
B. Serotonin reuptake inhibitors improve muscle stem cell function and muscle regeneration (article soumis).....	101
<i>Discussion générale</i>	<i>150</i>
A. Résumé de la thèse	150
B. Implications	151
1. Le muscle squelettique, une identité sérotoninergique limitée	151
2. La fluoxétine, un traitement ciblant les cellules souches.....	152
a) Place du récepteur 5-HT1B dans les cellules souches	153
3. La fluoxétine, un traitement ciblant également les autres acteurs de la régénération tissulaire....	155
C. Limites	156
D. Perspectives.....	157
1. La fluoxétine, un traitement efficace de myopathies ?.....	157
2. Place des ISRS dans la médecine régénérative.....	158
<i>Références</i>	<i>160</i>
<i>Table des figures.....</i>	<i>191</i>
<i>Table des tableaux.....</i>	<i>193</i>
<i>Annexes :</i>	<i>194</i>
A. Communication orale.....	194
B. Collaboration scientifique	195

Introduction

A. La fluoxétine, un traitement antidépresseur modulant la transmission sérotoninergique

1. La fluoxétine, un traitement antidépresseur efficace

a) Découverte des antidépresseurs et développement du premier inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, la fluoxétine

La découverte des premiers antidépresseurs, les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) et les tricycliques, résulta d'un hasard fécond quasi simultané ¹. En effet, en 1952, furent menées par les médecins Selikoff et Robitzek, les premières études cliniques d'efficacité dans la tuberculose de l'iproniazide, dérivé de l'isoniazide. Ils rapportèrent un effet psychostimulant inattendu chez certains patients, considéré alors comme un effet indésirable ². Puis, en 1957, la première étude clinique menée par le psychiatre Kline et son équipe portait sur l'efficacité de l'iproniazide chez les patients déprimés non tuberculeux ³ et retrouvait une amélioration clinique dans 70% des cas. En parallèle en 1957, le pharmacologue Udenfriend démontra que l'administration d'iproniazide chez les animaux était associée à une augmentation rapide des concentrations de sérotonine dans le cerveau ⁴. Ainsi émergea la première catégorie d'antidépresseurs que sont les IMAO avec l'identification d'un mécanisme d'action propre et suggérant l'implication des monoamines dans la physiopathologie de la dépression. A l'issue de ces recherches, plus de 400 000 patients bénéficièrent de ce traitement dans le cadre d'une dépression ¹.

Concomitant à la découverte des IMAO, le psychiatre Kuhn, en 1956, étudia l'effet d'un nouveau composé, nommé ultérieurement imipramine, chez des patients atteints de schizophrénie ^{1,5}. Dans cette première cohorte, les patients présentant le diagnostic de « psychose dépressive » étaient les seuls à montrer une nette amélioration clinique sous imipramine. Faisant alors l'hypothèse d'effet potentiellement antidépresseur, Kuhn a démontré en 1957 l'efficacité de cette molécule dans le traitement des troubles dépressifs ⁶. Puis de nombreuses études à travers le monde ont confirmé ces résultats ¹. En 1968, il a été mis en évidence l'inhibition de la recapture de la sérotonine par les tricycliques, identifiée comme un des mécanismes d'action ⁷. Par la suite, plusieurs molécules appartenant à la catégorie des antidépresseurs tricycliques ont été développées et l'amitriptyline a ainsi été le tricyclique le plus prescrit à cette époque ¹.

A l'issue des découvertes des premiers antidépresseurs, la psychopharmacologie a opéré un tournant d'innovation thérapeutique dans les années 1970 en développant une molécule dans l'objectif de cibler un mécanisme d'action spécifique et une protéine d'intérêt ⁸. Ce sont les laboratoires Lilly qui sont ainsi à l'origine du premier inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS), la fluoxétine, ayant même créé, à cette occasion, une équipe d'étude « dépression et sérotonine », portée par le pharmacologue Fuller, le biochimiste Wong et le chimiste organique Rathbun ^{1,8}. S'appuyant rationnellement sur les avancées scientifiques de l'époque, ils ont sélectionné un mode d'action ciblant la sérotonine devant les théories monoaminergiques décrites dans la dépression et plus précisément, le vif intérêt porté sur la sérotonine à l'issue d'une étude suggérant l'existence d'un sous-groupe de dépression endogène ayant un déficit en sérotonine ⁹. D'autre part, le progrès lié aux outils

technologiques, comme les synaptosomes de cerveaux de rats, ont permis d'étudier la cinétique de recapture de différents neurotransmetteurs, dont la sérotonine ⁸.

Ainsi, en 1974, est publié le premier article sur la fluoxétine, qui est alors présentée comme un outil sélectif pour disséquer le rôle de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) dans le système nerveux central (SNC) en condition physiologique et pathologique ¹⁰. La démonstration de son efficacité clinique dans les troubles dépressifs a eu lieu au début des années 1980 ^{8,11}. Par la suite, la fluoxétine est devenue, à son tour, le traitement antidépresseur le plus prescrit au monde ⁸. On estime qu'il a été prescrit à plus de 40 millions d'individus à travers le monde depuis sa mise sur le marché en 1987 ⁸ et qu'il est à l'origine de plus de 25000 publications scientifiques devenant le psychotrope, avec la chlorpromazine, le plus étudié dans la littérature scientifique ¹.

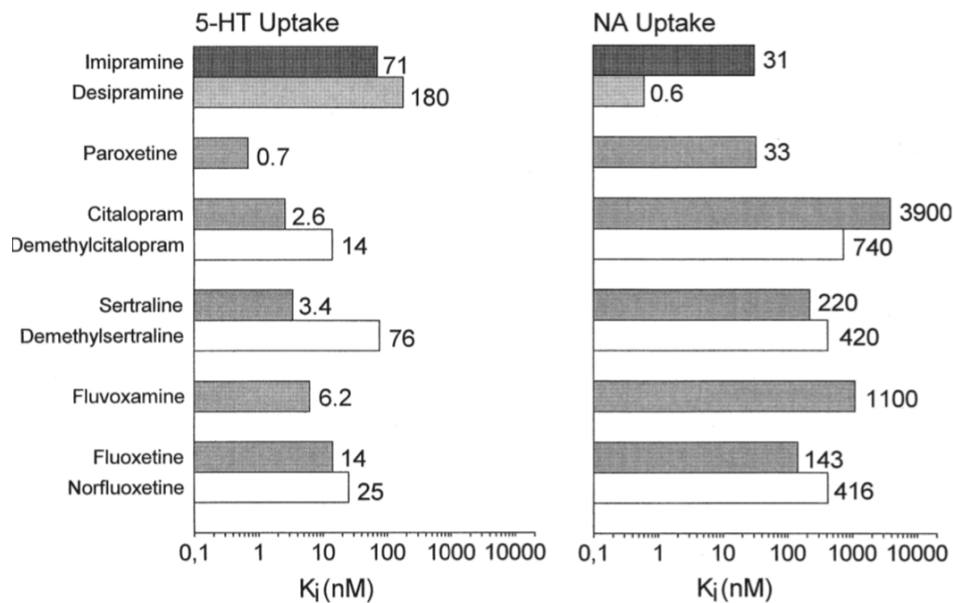
Depuis la fluoxétine, l'arsenal thérapeutique d'antidépresseurs a continué à s'enrichir avec de nombreuses molécules, soit partageant le même mode d'action, soit ciblant d'autres mécanismes essentiellement centrés autour des monoamines ¹². Dans ce présent travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux traitements antidépresseurs par ISRS et, particulièrement la fluoxétine, permettant l'étude de la modulation sélective des concentrations de sérotonine dans l'organisme.

b) Propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques de la fluoxétine

Les ISRS partagent donc un mode d'action spécifique ciblant le transporteur de la sérotonine (SERT ou 5-HTT) ¹²⁻¹⁴. Plus précisément, les ISRS modulent la région allostérique de SERT entraînant un changement conformationnel, ce qui bloque le transport de la sérotonine, permettant *in fine* une augmentation des concentrations de sérotonine dans la fente synaptique ¹²⁻¹⁴. Initialement, les ISRS ont été définis par un profil pharmacologique commun comprenant une haute affinité pour le site de transport de la sérotonine, une faible affinité pour celui de la noradrénaline et une très faible affinité pour les récepteurs de neurotransmetteurs ¹⁴.

Cette définition a été, par la suite, nuancée par la mise en évidence de spécificités propres à chaque molécule tant vis-à-vis de l'affinité aux transporteurs que des récepteurs aux neurotransmetteurs ^{12,13}. Ainsi, la paroxétine est la molécule avec la plus forte affinité pour SERT, alors que la fluoxétine présente, d'une part, la plus faible affinité pour SERT et d'autre part, une affinité pour le transporteur de la noradrénaline (**Figure 1**) ¹⁴. De fait, en augmentant les concentrations de 5-HT dans la fente synaptique, les ISRS peuvent être considérés comme des agonistes indirects des récepteurs 5-HT ¹². Cependant, ils présentent des affinités de liaison aux récepteurs 5-HT propres à chaque molécule. Ainsi, la fluoxétine exerce une activité associée d'antagoniste au récepteur 5-HT_{2C} ¹².

Figure 1 : Constantes d'inhibition (K_i) pour la recapture de monoamines de différents traitements antidépresseurs, dans du tissu de cerveau de rat

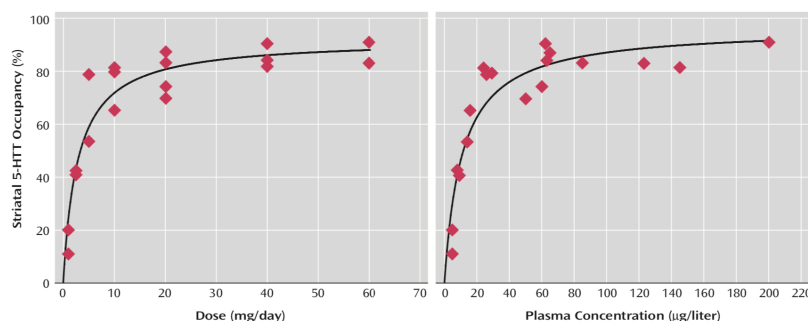


Source : Hiemke et Härtter, 2000 ¹⁴

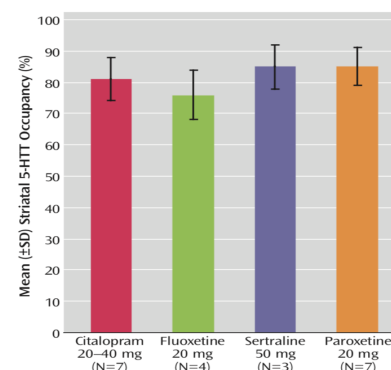
Cependant, malgré ces différences d'affinités, les ISRS présentent la même efficacité d'occupation de SERT, démontrée dans diverses aires cérébrales d'intérêt ¹⁵. En effet, une étude par tomographie par émission de positons (TEP), réalisée chez des patients déprimés traités par ISRS à doses thérapeutiques et chez des sujets sains recevant des doses infrathérapeutiques d'ISRS, a mis en évidence que 75 à 80 % des transporteurs SERT étaient occupés par les ISRS dès la dose minimale efficace (**Figure 2**) ¹⁵. Après majoration de la posologie, les auteurs rapportaient un effet plateau du pourcentage d'occupation autour de 85%, suggérant que 15% des transporteurs SERT n'est pas la cible des ISRS même à posologies maximales. Ainsi la courbe d'occupation du transporteur par les ISRS est une relation hyperbolique typique de liaison récepteur/ligand ¹⁶.

Figure 2 : Pourcentage d'occupation de SERT en fonction de la posologie de ISRS

A. Relation entre % occupation de SERT dans le striatum et de la posologie ou de la concentration plasmatique évaluée après 4 semaines de traitement par Escitalopram



B. % occupation de SERT dans le striatum après 4 semaines de traitement à dose minimale efficace de ISRS



Source : Meyer et al., 2004 ¹⁵

Au niveau pharmacocinétique, les ISRS sont des molécules d'administration strictement *per os* dont les principales caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 1** ^{14,17-23}. Ce sont toutes des molécules lipophiles dont le premier passage métabolique est assuré par le foie ¹⁴. La fluoxétine a la particularité d'avoir un métabolite actif, la norfluoxétine, possédant également une activité inhibitrice de SERT comme sa molécule mère ¹⁴.

Tableau 1 : Propriétés pharmacocinétiques des ISRS

ISRS	T max	Demi-vie	Temps pour état d'équilibre	Volume de distribution (L/kg)	Cinétique Linéaire	Inhibition de CYP
Citalopram	4h	36h	6-10 jr	14-16	Oui	Non
Escitalopram	4 h	30h	7 jr	12-26	Oui	2C19
Fluoxétine	6- 8h	1-4jr	>4 sem	20-45	Non	2D6
Norfluoxétine		7-15 jr				
Fluvoxamine	3-8h	15h	10 jr	5	Non	1A2, 2C19
Paroxétine		20h	7-14 jr	3-12	Non	2D6
Sertraline	4-8h	26h	5-7 jr	20	Oui	Minimal
Vortioxétine	7-11h	66h	14 jr	26	Oui	2D6

Source : Adaptées de Hiemke et Härtter, 2000 ¹⁴ et RCP de l'ANSM ¹⁷⁻²³.

Abréviations : CYP (cytochrome), h (heure), jr (jour), sem (semaine), Tmax (Temps avec concentration maximale)

Sous-tendue par leur caractère lipophile, les ISRS ont une capacité d'accumulation au sein des tissus et peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) ¹³. La fluoxétine ayant le plus large volume de distribution, une accumulation extensive de ce composé a été retrouvée dans l'ensemble de l'organisme et plus particulièrement dans les poumons, en tant qu'organe riche en lysosomes ^{14,24}. A l'inverse, son accumulation dans le tissu cérébral est plus faible en début de traitement comparé aux autres ISRS, comme l'illustre le ratio cerveau/plasma de la fluoxétine estimé à 2,6 :1 comparé à celui de la sertraline estimé à 40 :1 ¹⁴. Par

spectroscopie par résonance magnétique, il a été montré que l'état d'équilibre des concentrations de la fluoxétine dans le SNC était atteint après 6 à 8 mois de traitement permettant un ratio cerveau/ plasma de 20 :1²⁵.

c) Efficacité thérapeutique, délai d'action et tolérance des ISRS

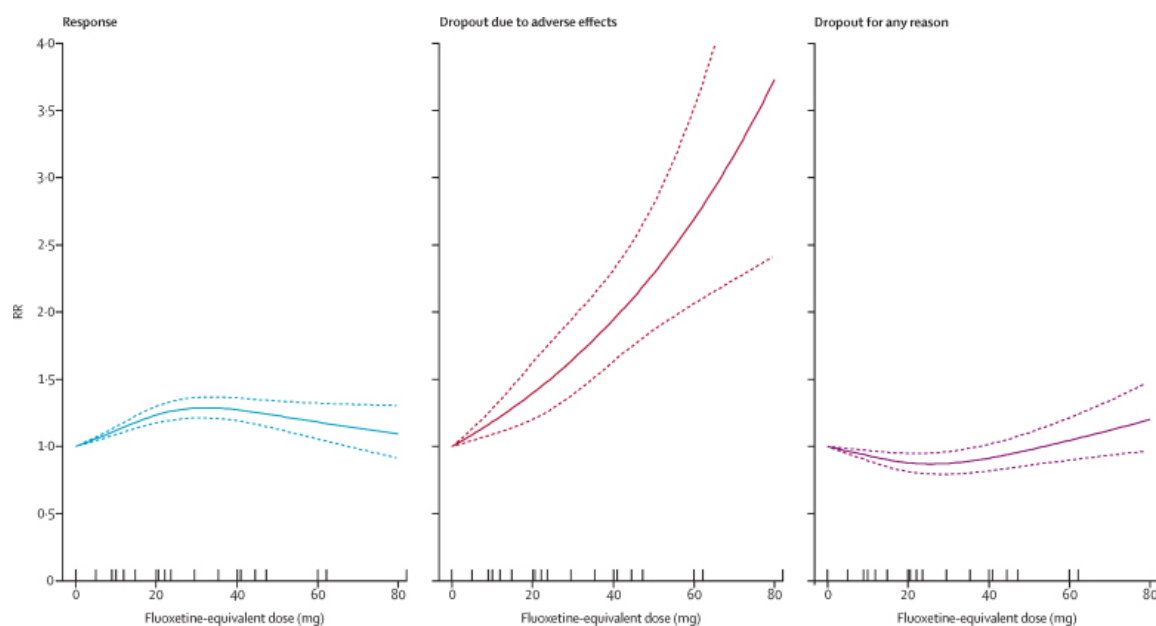
Du fait de leur profil d'efficacité et de tolérance, les ISRS sont actuellement les traitements antidépresseurs recommandés en 1^{ère} intention dans la prise en charge d'un épisode dépressif caractérisé (EDC)^{26,27}. Plus précisément, depuis les premiers essais cliniques sur les ISRS²⁸, plus de 400 essais contrôlés randomisés (ERC) ont évalué leur efficacité dans la dépression²⁹, retrouvant des taux de réponse et de rémission cliniques sous ISRS estimés, respectivement, à 45-60 % et 35%^{30,31}. De récentes méta-analyses, intégrant l'ensemble de ces résultats, ont confirmé leur efficacité thérapeutique dans le traitement aigu de l'EDC^{29,32,33}. L'efficacité thérapeutique des ISRS a également été confirmée dans un contexte naturalistique, mettant en évidence des taux de réponse de 47-48% et de rémission de 28-37% après un traitement par ISRS^{34,35}.

Constaté dès la découverte des premiers antidépresseurs¹, les traitements antidépresseurs, incluant les ISRS, ont la particularité de présenter un délai d'action entre l'introduction du traitement et la survenue des effets thérapeutiques^{26,27}. Ce délai est classiquement évalué à 2-3 semaines et il est nécessaire d'attendre parfois jusqu'à 6-8 semaines avant d'objectiver une non-réponse au traitement^{26,27}, contrastant avec le blocage de SERT quasi immédiat par les ISRS¹⁰. Des études plus récentes ont précisé qu'un début de réponse clinique pourrait être objectivé dès 2 semaines de traitements voire à l'issue de la première semaine de traitement^{36,37}.

Par ailleurs, les molécules ISRS sont typiquement reconnues pour être bien tolérées avec moins d'effets secondaires graves comparés aux précédentes classes d'antidépresseurs³⁸. De manière générale, les ISRS présentent un profil similaire d'effets indésirables³⁸, d'apparition dose-dépendante³⁹ et souvent mis en lien avec un excès de stimulation sérotoninergique^{12,13}. D'après les analyses de tolérance menées lors des ERC, il a été estimé qu'environ 60% des sujets rapportaient au moins un effet indésirable au cours des 6 à 8 premières semaines de traitement par ISRS³⁸.

La courbe dose-réponse des ISRS par rapport à son efficacité a été décrite comme plate³⁹, signifiant une taille d'effet maximale à dose minimale efficace, soit 20mg/jr (**Figure 3**)³⁹. Elle est souvent interprétée en regard de la courbe d'occupation du transporteur de la sérotonine SERT par les ISRS, où 80% d'entre eux sont occupés dès la dose minimale efficace^{13,40}. A contrario, la courbe dose-dépendante des perdus de vue pour effets indésirables était, quant à elle, linéaire puis exponentielle avec un risque ratio augmentant pour des doses équivalant ou supérieurs à 40mg de fluoxétine (**Figure 3**)³⁹. Enfin, la courbe dose-dépendant de perdus de vue, toutes causes confondues, incluant le manque d'efficacité comme les effets indésirables, montrait une fourchette d'acceptabilité pour des doses équivalentes entre 20 et 40mg de fluoxétine (**Figure 3**)³⁹.

Figure 3 : Relation de résultats cliniques (réponse clinique exprimée en risque ratio ; perdus de vue pour effets indésirables ; perdus de vue pour toute cause) en fonction de la posologie de ISRS (en équivalent fluoxétine)



Source : Furukawa et al., 2019 ³⁹

En conclusion, les antidépresseurs ISRS, traitement de 1^{ère} intention dans l'EDC, grâce à leur meilleur profil de tolérance et leur sécurité d'emploi, sont devenus les traitements antidépresseurs les plus fréquemment prescrits dans plusieurs pays ^{41,42}. Ils partagent de nombreuses similitudes ¹³ :

- une inhibition de 60 à 80% de la recapture de la sérotonine dès la dose minimale efficace,
- une efficacité dans le traitement de l'EDC,
- une courbe dose-réponse plate par rapport à l'efficacité clinique, traduisant un faible gain en efficacité clinique observée après majoration de la posologie,
- une courbe dose-réponse linéaire par rapport à la survenue d'effets secondaires, traduisant une augmentation de la survenue d'effets indésirables lors de la majoration des posologies d'ISRS,
- un profil d'effets secondaires principalement en lien avec un excès de stimulation sérotoninergique.

L'ensemble des effets des ISRS est principalement sous-tendu par des mécanismes d'action concernant la stimulation sérotoninergique centrale et périphérique. Cependant, l'action directe quasi immédiate et soutenue d'inhibition de la recapture de la sérotonine par les ISRS contraste avec leur long délai d'action et leur efficacité incomplète dans le traitement de la dépression. Ainsi, il a été proposé que le délai d'action des antidépresseurs pouvait être lié à des changements neurobiologiques adaptatifs se distinguant des effets immédiats sur la recapture de la sérotonine. Des recherches extensives en neurosciences ont permis de préciser ces mécanismes d'action en s'intéressant initialement aux effets induits spécifiquement sur le système sérotoninergique et sa transmission. Du fait de son implication dans de nombreuses situations physiologiques et pathologiques, les neurosciences, mais

également d'autres champs de recherche, se sont intéressés au système sérotoninergique qui est un système conservé chez plusieurs espèces vivantes, complexe et hautement régulé.

2. La sérotonine, un système complexe hautement régulé

a) *Histoire de la sérotonine*

L'histoire de la sérotonine a débuté dans les années 1930 au cœur de l'équipe du Dr Erspamer, pharmacologue italien qui, s'intéressant à la pharmacognosie, cherchait à isoler des agents capables d'induire la contraction de muscles lisses dans différentes espèces vertébrées et invertébrées ⁴³. Ainsi, en 1937, ils ont extrait une substance, issue de cellules entérochromaffines de l'intestin de lapin, capable d'induire la contraction de muscles lisses au niveau de l'utérus de rat. Cette nouvelle molécule est alors baptisée « entéramine » ⁴⁴. De manière indépendante, une équipe américaine composée du médecin Dr Page, du chimiste organique Dr Rapport ainsi que de la biochimiste Dr Green, investiguait le champ de l'étiologie de l'hypertension artérielle et de son traitement ⁴³. En 1948, ils isolèrent dans le sérum humain un agent vasoconstricteur qu'ils dénommèrent sérotonine ⁴⁵ et en 1949, ils en précisèrent la structure chimique comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT) ⁴⁶. En 1952, Erspamer et Asero démontrèrent qu'entéramine et sérotonine n'étaient qu'une seule et même molécule ⁴⁷.

La découverte de la sérotonine a été une révolution scientifique, notamment lorsque son rôle en tant que neurotransmetteur fut démontré, donnant naissance au champ des neurosciences ⁴³. Cette découverte s'est articulée en deux temps grâce aux travaux de la chercheuse américaine, la Dr Twarog. D'une part, en 1952, la sérotonine est identifiée comme neurotransmetteur régulant, avec l'acétylcholine (ACh), la contraction musculaire chez le mollusque ⁴⁸. D'autre part, en 1953, la sérotonine est identifiée dans le cerveau de mammifères ⁴⁹. Enfin, le Dr Woolley, chercheur américain, a été le premier à émettre l'hypothèse d'implication de la sérotonine dans le fonctionnement cérébral ⁴³. En effet, il a montré que le LSD, molécule psychodysléptique découverte en 1943 par Hoffman ⁵⁰, était un « anti-métabolite » de la sérotonine, suggérant l'implication de la sérotonine dans les maladies mentales, dont la psychose ⁵¹. De plus, il supposait un rôle de la sérotonine dans le développement cérébral du fait de la haute similitude entre la sérotonine et l'auxine, une hormone de croissance pour les plantes ⁵¹.

Depuis 80 ans, la sérotonine, en tant que substance largement conservée dans l'ensemble du monde vivant, incluant les bactéries, les champignons, les plantes ou encore les animaux ^{52,53}, a été le sujet de nombreuses recherches. La caractérisation de ce système continue de se poursuivre tant à travers l'identification de ses fonctions, des acteurs impliqués dans son métabolisme comme de ses différents modes d'action.

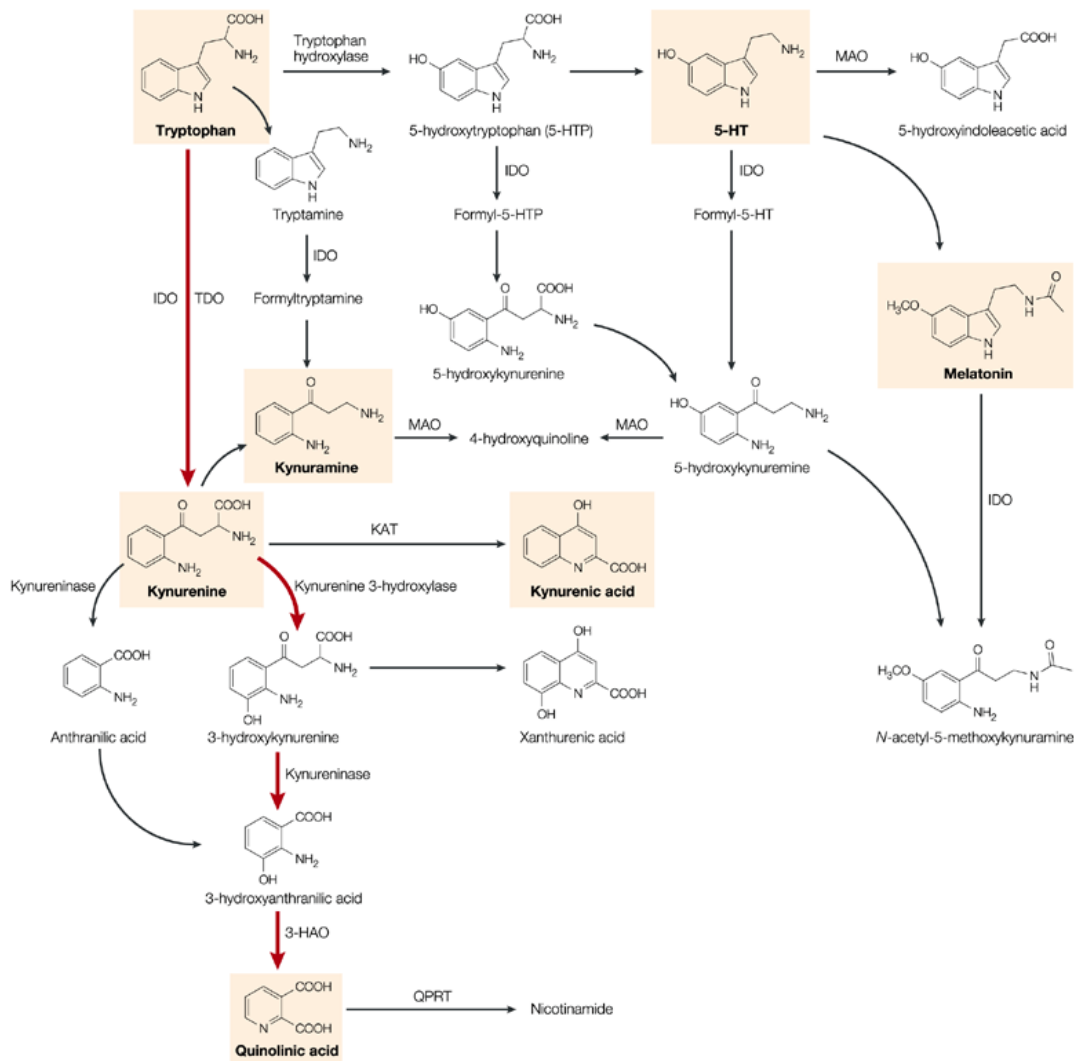
b) *Métabolisme de la sérotonine*

(1) Biosynthèse de la sérotonine

La biosynthèse de la sérotonine résulte de deux réactions enzymatiques effectuées à partir du tryptophane libre (Trp), acide aminé essentiel apporté par l'alimentation ⁵⁴. Ainsi, le rythme de synthèse de sérotonine est lié aux prises alimentaires pouvant être à l'origine d'une variation de plus de 10% des concentrations de 5-HT extracellulaire ⁵⁵. Le tryptophane est

principalement utilisé pour la synthèse protéique ⁵⁶. Il est également à l'origine de deux grandes voies de synthèse : la sérotonine et les kynurénines (**Figure 4**) ⁵⁶. La majeure partie du Trp non utilisée pour la synthèse protéique est convertie en kynurénine (Kyn), dont les produits issus du catabolisme sont une importante source d'énergie ^{56,57}. La production des kynurénines siège essentiellement dans le foie sous l'action enzymatique de la Tryptophane Dioxygénase (TDO) ou dans le système immunitaire et le cerveau, sous l'action de l'Indoléamine Dioxygénase (IDO) ⁵⁷.

Figure 4 : Schéma représentatif de la biosynthèse de la sérotonine et des kynurénines à partir du tryptophane



Nature Reviews | Drug Discovery

Source : Stone et al., 2002 ⁵⁸.

Quant à la conversion du Trp en 5-HT, elle concerne seulement 5% de son métabolisme total ⁵⁶. La première étape enzymatique est réalisée par la Tryptophane Hydroxylase (TPH), présente sous deux isoformes, dont la distribution est limitée, constituant ainsi l'étape

limitante régulant cette synthèse^{56,59}. Avec les enzymes phénylalanine hydroxylase et tyrosine hydroxylase, les TPH appartiennent à la famille des hydroxylases d'acides aminés aromatiques dépendants de la ptérine, ayant la tétrahydrobioptérine et l'oxygène comme co-substrats, ainsi que le fer comme cofacteur. Ainsi, sous l'action de TPH, le tryptophane est transformé en 5-hydroxytryptophane (5-HTP)⁵⁴. Puis sous l'action de la décarboxylase des acides aminés aromatiques, enzyme à expression ubiquitaire également connu sous le nom de Dopa décarboxylase ou tryptophane décarboxylase, la 5-HTP est transformée en 5-HT⁵⁴.

Les deux isoformes de TPH sont codées par deux gènes différents et leur expression est donc spatialement déterminée⁵⁹. TPH1 est principalement exprimée en périphérie notamment par l'intestin et en central, par la glande pinéale⁶⁰. TPH2 est exprimée dans le SNC principalement dans les neurones sérotoninergiques situés dans le noyau du raphé⁵⁹, ainsi que dans le système nerveux périphérique particulièrement dans les neurones du plexus méésentérique⁶¹. En tant qu'étape limitante de la synthèse 5-HT, ces deux enzymes possèdent différents niveaux de régulation. Ainsi, le gène *Tph2* présente un polymorphisme dans sa région promotrice impactant fonctionnellement son activité enzymatique⁶². Chez l'homme, les mutations R441H et P449R sont associées à une activité diminuée respectivement de 81% et 35%⁶³ et chez la souris, le polymorphisme de nucléotides unique (SNP) C1473G est associé à une diminution d'activité de 40% à 70%⁶⁴. De plus, leur transcription peut être influencée dans le SNC par les œstrogènes et glucocorticoïdes, dans la glande mammaire par la prolactine ou encore dans l'intestin par le système immunitaire⁶⁵⁻⁶⁸. Il est à noter que ces deux isoformes présentent des cinétiques enzymatiques différentes puisque TPH1 a une plus grande affinité pour le Trp et une plus grande activité catalytique que TPH2⁶⁹. Enfin, ces deux isoformes présentent toutes deux des modifications post-traductionnelles par phosphorylation, pouvant moduler leur activité⁷⁰.

(2) Stockage de la sérotonine

Au sein de la cellule, la sérotonine est principalement stockée dans des vésicules grâce à un transport actif via le transporteur vésiculaire de monoamines VMAT. Il se présente également sous deux isoformes : VMAT-1 exprimé principalement dans les cellules entérochromaffines de l'intestin et VMAT-2, dans les neurones et dans les plaquettes⁷¹. Il a été estimé que la concentration intravésiculaire était 10^4 fois supérieure à la concentration de 5-HT dans le cytosol⁵⁵. La libération de la sérotonine est un phénomène hautement régulé pouvant se faire par exocytose dépendante du calcium ou par transport inverse via ses transporteurs spécifiques^{72,73}. Cette libération étant une étape clé de la régulation du signal 5-HT, nous détaillerons ce processus ultérieurement.

(3) Transport et recapture de la sérotonine

Après libération dans l'espace extracellulaire, la sérotonine est capturée en intracellulaire grâce à un transport actif principalement assuré par SERT⁷⁴. Dans une moindre mesure du fait d'une plus faible affinité pour la sérotonine, son transport peut également être assuré par le transporteur de la dopamine (DAT) ou encore par les transporteurs de cations organiques 3 (OCT3) et de monoamines à membrane plasmique (PMAT)⁷⁵.

SERT étant une étape clé de la régulation des concentrations de sérotonine biodisponible, il est sujet à de nombreuses régulations tant au niveau de son expression génique, son trafic que de son activité (Revue Baudry et al 2019⁷⁶). Chez l'homme, la région

régulatrice promotrice du gène SERT présente plusieurs mutations, dont un polymorphisme à l'origine d'une variation d'efficacité de transcription de ce gène, se traduisant, *in fine*, en une variation de densité membranaire du transporteur ⁷⁷. Ainsi, les individus homozygotes pour les variants courts (short, « s ») de cette région ont une activité transcriptionnelle réduite comparés aux hétérozygotes ou aux homozygotes pour les variants longs (long, « l »). Dans la population générale, il a été estimé que 19% des individus étaient homozygotes « s/s », rendant compte d'une activité de SERT divisée par deux ^{55,77}. De nombreux autres facteurs participent à la régulation de son expression génique, comme les facteurs de transcription impliqués dans la spécification des neurones sérotoninergiques Pet1 et Lmx1B, des signaux systémiques comme les glucocorticoïdes, les interleukines (IL) IL-1 et IL-6 ou encore des facteurs épigénétiques par acétylation d'histones ou via différents micro-ARN (miR) ⁷⁶. Par ailleurs, le trafic membranaire comme son internalisation sont étroitement régulés par différents acteurs comme la synthase d'oxyde nitrique (NOS), des protéines SNARE, ou encore la phosphorylation par différentes kinases ⁷⁶. Enfin, son activité fonctionnelle peut être influencée par le cholestérol membranaire ou par la phosphorylation par différentes kinases ^{76,78}. Fait intéressant, les récepteurs 5-HT ont aussi la capacité de moduler l'activité de SERT comme les récepteurs 5-HT1B et 5-HT2B ^{79,80}. Plus particulièrement, le récepteur 5-HT2B a un rôle crucial à travers deux voies de phosphorylations distinctes : à l'état basal, l'activité intrinsèque du récepteur couplé à NOS entraîne la phosphorylation de SERT lui conférant une activité totale de transport et, en cas d'excès de 5-HT extracellulaire, l'activation de la voie de l'inositol triphosphate (IP₃)/PKC par le récepteur 5-HT2B entraîne une hyperphosphorylation réduisant son activité et donc le transport de 5-HT ⁷⁹.

(4) Dégradation de la sérotonine

Après son transport en intracellulaire, la sérotonine peut être soit stockée à nouveau dans les vésicules intracellulaires, soit dégradée par la MAO en 5-hydroxyindol-acétique (5-HIAA) ^{71,81}. Présente sur la membrane mitochondriale, la MAO est également une enzyme ubiquitaire ayant deux isoformes MAO-A et MAO-B. Bien que la sérotonine soit le substrat biologique de la MAO-A au regard de sa plus haute affinité, les activités catalytiques *in vivo* des MAO sont essentiellement régulées par la disponibilité de leur substrat ^{81,82}. Cette dégradation s'effectue au sein des neurones dans le compartiment central, au niveau du foie et des poumons pour l'excès de sérotonine circulante ⁸³ ou localement au sein de microsystèmes sérotoninergiques ⁸⁴. Par la suite, le 5-HIAA est excrété dans le sang puis éliminé dans les urines ⁸⁵.

Les gènes *Mao* sont influencés par divers facteurs comme les glucocorticoïdes, l'acide rétinoïque, les œstrogènes ou encore IL-4 ⁸⁶⁻⁸⁹. Au niveau enzymatique, l'activité catalytique peut être modulée par les concentrations locales en oxygène pour la MAO-B et par les niveaux intracellulaires en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour les deux isoformes, puisque les produits générés lors de l'oxydation des amines incluent le H₂O₂ ^{82,90,91}.

Ainsi, le métabolisme de la sérotonine est finement contrôlé, s'appuyant sur plusieurs acteurs enzymatiques, ayant chacun leur propre système de régulation. Ceci permet de maintenir une homéostasie centrale et périphérique spécifique et une stimulation sérotoninergique efficace, via une libération quantitativement et temporellement contrôlée.

c) Modes d'action de la sérotonine

La signalisation sérotoninergique permet d'activer différents modes d'action comprenant principalement l'activation des récepteurs 5-HT, mais également d'autres modes indépendamment d'eux. Les effets induits sont nombreux et peuvent concerner différents processus cellulaires tels que le transport d'ions, la modulation de voies intracellulaires de signalisation, de facteurs de transcription, de facteurs épigénétiques, de synthèse protéique ou encore de respiration mitochondriale ⁹²⁻⁹⁴.

(1) Les récepteurs de la sérotonine

Les principaux effecteurs de la sérotonine sont ses nombreux récepteurs. Leur identification et classification ont débuté en 1957, lorsque les chercheurs Gaddum et Picarelli caractérisèrent deux récepteurs différents, dits neurotrophique « M » ou musculotrophique « D », sous-tendant les effets contractiles de 5-HT sur des extraits d'iléon de cochon d'Inde ⁹⁵. Les avancées scientifiques en matière de pharmacologie fonctionnelle, telle que le développement de radio-ligand spécifique, et de biologie moléculaire, via les techniques de séquençage génomique et de clonage de récepteurs, ont permis l'identification de 15 gènes codant pour les différents récepteurs 5-HT, regroupés conventionnellement en 7 familles (5-HT1 à 5-HT7 ou les gènes *Htr1* à *Htr7*), selon leur structure et leur voie principale de signalisation (Revue de Barnes et al. 2021, Raymond et al. 2001, Hoyer et al. 2002, ⁹⁶⁻⁹⁸). Du fait d'une haute régulation post-transcriptionnelle, telle que l'épissage alternatif d'acide ribonucléique messenger (ARNm) ou d'édition d'ARNm, on peut identifier plus d'une trentaine de récepteurs 5-HT distincts au niveau protéique ⁹⁶. Fait intéressant, le gène *Htr2C*, quasi exclusivement exprimé dans le SNC, est le seul gène pour lequel un processus d'édition d'ARN a été rapporté, donnant lieu à jusqu'à 24 isoformes fonctionnelles, se différenciant par leur distribution ou leur voie de signalisation ⁹⁷.

Exceptés les récepteurs 5-HT3 qui sont des récepteurs ionotropiques assurant le transport de cations ⁹⁷, les autres familles de récepteurs sont des récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G (GPCR). Ces GPCR présentent une structure hautement conservée entre les espèces, avec jusqu'à 80% d'homologie de séquence entre les hommes et les rongeurs ^{97,99}. Ils ont également une haute homologie de séquence entre les sous-type d'une même famille ⁹⁸. Ils sont composés de 7 domaines transmembranaires, dont un domaine extracellulaire permettant la reconnaissance du ligand et un domaine intracellulaire impliqué dans la signalisation d'aval ⁹⁶⁻⁹⁸. Ils présentent des ordres de constantes d'affinité à 5-HT différentes, allant de 2 nM à 1000 nM, et pouvant varier, selon les espèces ^{100,101}. Ainsi, la liaison de 5-HT ou un autre ligand à ces GPCR entraîne l'activation de la protéine G, permettant la séparation de ces 3 sous-unités (α , β , γ) agissant respectivement sur leur cible d'aval ¹⁰². La stimulation d'un même récepteur 5-HT peut ainsi activer plusieurs voies de signalisation au sein d'une même cellule ou en fonction de l'activité intrinsèque de l'agoniste, mais elle peut également générer des effets contraires sur une même signalisation selon le type cellulaire ou tissulaire (**Figure 5**) ⁹⁶⁻⁹⁸. Cette diversité et complexité de signalisation confèrent le caractère pléiotropique à la sérotonine.

Figure 5 : Principales voies de signalisation selon le type de récepteur 5-HT chez l'homme

Receptor	Common signaling linkages	Other signaling linkages	G-protein coupling
5-HT _{1A}	Inhibits AC Activates K ⁺ channels Stimulates ERK Inhibits Ca ²⁺ conductances	Activates PLC Activates NOS Activates NAD(P)H oxidase Activates NHE-1	G _{io3} > G _{io2} ≥ G _{io1} ≥ G _{oo} > G _{zo}
5-HT _{1B}	Inhibits AC Stimulates ERK	Activates PLC Activates NOS Activates AC2 Activates K ⁺ channels Inhibits Ca ²⁺ conductances Activates K ⁺ channels	G _{io3} > G _{io1} ≥ G _{io2} ≥ G _{oo}
5-HT _{1D}	Inhibits AC	Activates K ⁺ channels Inhibits Ca ²⁺ conductances Activates K ⁺ channels	G _{io} & G _{oo}
5-HT _{1E}	Inhibits AC	Activates PLC	G _{io} & G _{oo}
5-HT _{1F}	Inhibits AC	Activates NHE-1	G _{io} & G _{oo}
5-HT _{2A}	Activates PLC Activates PKC Stimulates ERK Activates PLA ₂	Activates AC Inhibits AC Activates Jak2/STAT3 Activates Ca ²⁺ channels	G _{qo} & G _{11o} ≥ G _{io}
5-HT _{2B}	Activates PLC Activates ERK Activates PLA ₂	Activates cell cycle Activates iNOS Activates cNOS	G _{qo} & G _{11o}
5-HT _{2C}	Activates PLC Activates PKC Activates PLA ₂	Activates Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger PDZ motif signals?	G _{qo} & G _{11o}
5-HT ₄	Activates AC Activates PKA	Regulates various channels	G _{so}
5-HT _{5a}	Unknown	Unknown	Unidentified
5-HT _{5b}	Unknown	Unknown	Unidentified
5-HT ₆	Activates AC Activates PKA		G _{so}
5-HT ₇	Activates AC Activates PKA	Activates ERK	G _{so}

Source : Raymond et al. 2001, ⁹⁶

Outre les modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles, divers mécanismes permettent de réguler leur expression, leur trafic et leur activité. Ainsi, ils peuvent interagir directement avec des protéines spécifiques (GIP) qui se différencient des messagers secondaires, et ensemble, ils forment un « réceptosome » (Revue Marin et al 2012 ¹⁰³). Il existe des GIP communs aux GPCR qui participent à la désensibilisation du récepteur, comme les kinases couplées aux GPCR et la β arrestine ¹⁰³. Fait intéressant, la nature du ligand joue un rôle dans le type de protéines recrutées permettant l'internalisation d'un récepteur ¹⁰³. Par exemple, pour le 5-HT_{2A}, il a été montré qu'une stimulation par la sérotonine entraînait une endocytose impliquant la β arrestine, s'opposant à une internalisation indépendante de la β arrestine, lors d'une stimulation par un ligand exogène ¹⁰⁴. De plus, en modifiant la conformation de récepteurs, des modulateurs allostériques impactent, positivement ou négativement, l'affinité d'un ligand ou l'activation de la voie de signalisation d'un récepteur spécifique ⁹⁷.

Faisant partie de leur processus de maturation, les récepteurs 5-HT_{1A}, 1B, 2A, 2C, 4 et 7 forment physiologiquement des homodimères fonctionnels, assurant leur trafic intracellulaire, leur stabilisation et stimulation membranaires ¹⁰⁵. Par ailleurs, certains récepteurs peuvent également former des hétérodimères entre différents sous-types de récepteurs 5-HT ou avec d'autres GPCR, modifiant leurs voies de signalisation respectives ¹⁰⁵.

Enfin, en dehors des phénomènes de dimérisation, la co-expression de récepteurs 5-HT peut également être un mécanisme de régulation bidirectionnelle de leur trafic ou de leur signalisation comme cela a été rapporté entre la famille 5-HT₁ et 5-HT₂ ^{106,107}.

(2) Autres modes d'action de la sérotonine

Un autre mode d'action, commun aux GPCR, repose sur la transactivation de récepteurs tyrosine kinase, via la libération de facteurs de croissance spécifiques (Revue Cattaneo et al. 2014, ¹⁰⁸). Dans les astrocytes, il a été montré que l'activation de 5-HT_{2B} entraînait la libération du facteur de croissance épidermique (EGF) pouvant activer les récepteurs à l'EGF dans différents types cellulaires adjacents ¹⁰⁹. Dans les neurones, l'activation de 5-HT_{1A} majorait, quant à elle, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant la transactivation des récepteurs TrkB et des récepteurs au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) ¹¹⁰. Dans les cellules gliales, la sérotonine, via l'activation de 5-HT₂, peut également induire la transactivation du récepteur au facteur de croissance fibroblastique (FGF) entraînant la transcription du facteur neurotrophique dérivée de cellules gliales (GDNF) ¹¹¹. En dehors du SNC, ce mécanisme de transactivation a également été décrit pour le récepteur EGF, via l'activation de 5-HT_{2A}, dans des adipocytes ou des cellules musculaires ¹¹². Fait intéressant, ce mécanisme de transactivation de récepteur à tyrosine kinase peut également être indépendant de l'activation de GPCR. En effet, dans les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires, le transporteur SERT, stimulé par la sérotonine, peut se lier au récepteur PDGF entraînant sa transactivation ¹¹³.

Indépendamment de l'activation de récepteurs 5-HT, il a été montré que la sérotonine possédait des propriétés chimiques induisant des effets antioxydants. En se liant spécifiquement aux lipides membranaires non saturés, elle agit comme inhibiteur de peroxydation lipidique, pouvant protéger les cellules de la sénescence ^{114,115}.

Par l'intermédiaire du catabolisme lié au MAO, la sérotonine peut également participer à la régulation des signaux apoptotiques. En effet, l'activité de la MAO, stimulée par les concentrations intracellulaires de sérotonine, peut moduler les niveaux de H₂O₂, de ROS, ainsi que l'expression de facteur anti-apoptotique Bcl-2 ^{82,116,117}.

Plus récemment, un autre mécanisme d'action, appelé sérotonylation, a été décrit et correspondant à la liaison covalente de la sérotonine à d'autres protéines, sous l'action enzymatique des transglutaminases (Revue Bader 2019 ¹¹⁸, **Figure 6**).

Figure 6 : Identification des protéines ciblées par la sérotonylation

Protein	Cell type	References
Fibronectin	Platelets	Dale et al., 2002
	Vascular smooth muscle	Penumatsa K. C. et al., 2014
	Glioma	Hummerich and Schloss, 2010
Fibrinogen	Osteoblasts	Cui and Kaartinen, 2015
	Platelets	Dale et al., 2002
rab4, rhoA	Glioma	Hummerich et al., 2015
	Platelets	Walther et al., 2003
rhoA	Vascular smooth muscle	Guilluy et al., 2007; Wang et al., 2012
rab3a, rab27a	Pancreatic β -cells	Paulmann et al., 2009
rab4	Skeletal muscle cells	Al-Zoairy et al., 2017
rac1	Neurones	Dai et al., 2008
ras	Colorectal adenocarcinoma	Lin et al., 2013
Histones	Neurones	Farrelly et al., 2019
Actins, myosins	Vascular smooth muscle	Watts et al., 2009
Akt	Vascular smooth muscle	Penumatsa K. et al., 2014
SERCA2a	Cardiomyocytes	Wang et al., 2016

Source : Bader, 2019 ¹¹⁸

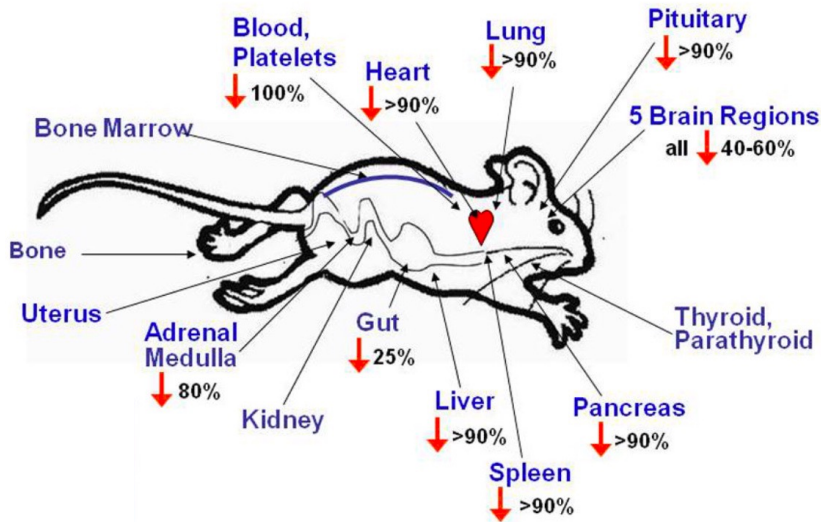
d) *Distribution de la sérotonine et des acteurs liés à son métabolisme*

Ne passant pas la BHE, la sérotonine a une distribution hétérogène et compartimentée dans l'ensemble de l'organisme ⁵¹. Ainsi, 95% de la quantité totale de sérotonine dans l'organisme se situe en périphérie où sa synthèse se déroule essentiellement dans l'intestin via TPH1 ⁵⁹. A l'issue de cette synthèse, 95-98% de la sérotonine est stockée dans les plaquettes grâce au SERT ¹¹⁹.

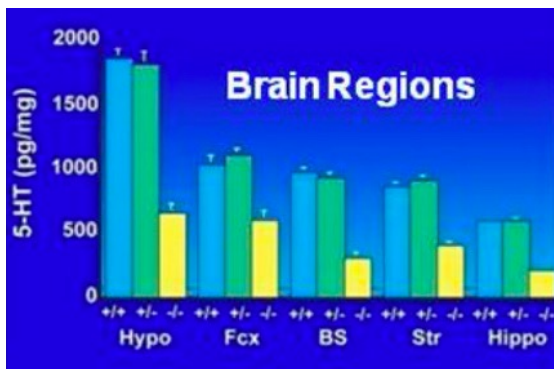
La distribution de 5-HT dans l'ensemble de l'organisme et le caractère pléiotropique de SERT ont pu être mis en lumière grâce au modèle génétique de la souris knockout (KO) *Sert* (Revue Murphy et al 2008) ^{120,121}. En l'absence de SERT, les concentrations extracellulaires de 5-HT étaient augmentées associées à des concentrations intratissulaires de 5-HT diminuées de 40 à 60%, dans différentes régions du SNC (**Figures 7A-B**) ¹²⁰. Dans le compartiment circulant, les concentrations 5-HT intraplaquettaires et plasmatiques étaient toutes deux réduites ^{120,122-124}. Associé à l'augmentation des concentrations urinaires de 5-HIAA, il a été suggéré que les souris KO *Sert* présentaient un métabolisme rapide de 5-HT dans le compartiment circulant ¹²²⁻¹²⁴. En périphérie, les concentrations de 5-HT intratissulaires étaient diminuées de 25% dans l'intestin et effondrées à >90% dans les autres organes ou cellules, tels que les plaquettes, le cœur, les vaisseaux, le poumon, le foie, le pancréas, la rate ou les surrénales (**Figures 7A-C**) ^{120,125}. A l'inverse des organes capables de synthétiser de la sérotonine, ces résultats mettent en évidence le rôle fondamental de SERT dans la régulation de l'homéostasie de la sérotonine avec, pas ou peu, de mécanisme de transport compensatoire efficace, pour les organes en périphérie (**Figures 7A-C**) ^{120,125}.

Figure 7 : Caractérisation des concentrations intratissulaires de 5-HT dans le modèle murin KO *Sert*

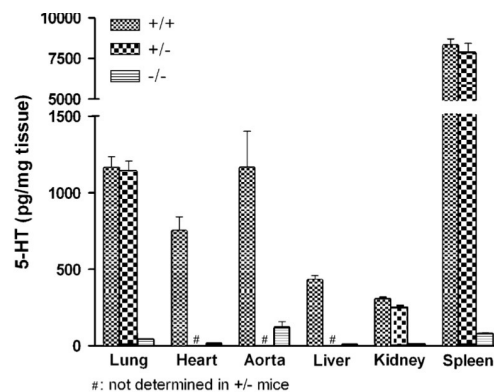
A. Modifications de concentrations de 5-HT chez la souris KO *Sert*



B. Concentrations centrales de 5-HT chez la souris KO *Sert*



C. Concentrations périphériques de 5-HT chez la souris KO *Sert*



Sources : Murphy et al 2008 ¹²⁰, Kim et al 2005 ¹²⁵

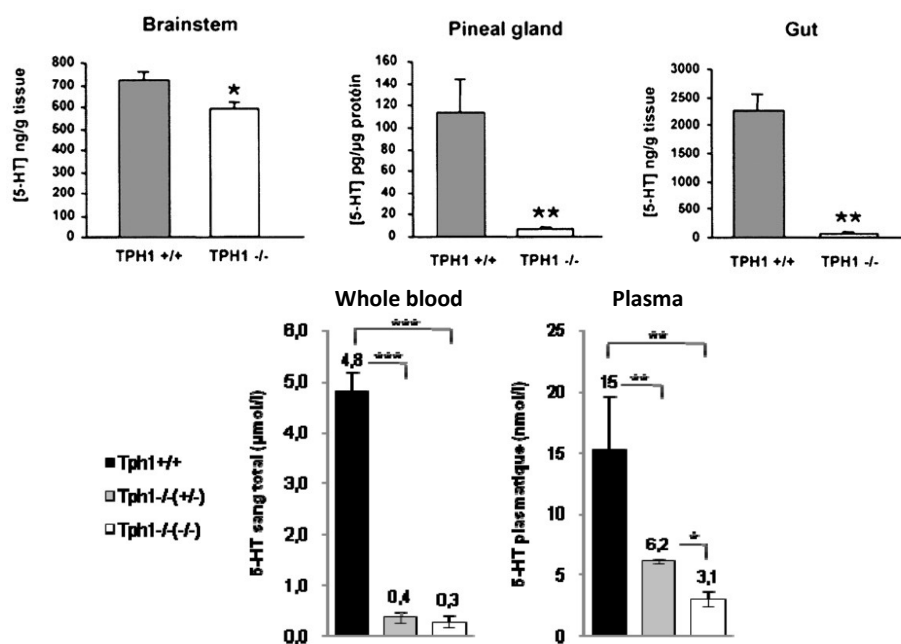
Abréviations : Hypo (hypothalamus), Fcx (cortex frontal), BS (tronc cérébral), Str (striatum), Hippo (hippocampe)

Au niveau du SNC, la sérotonine synthétisée par les neurones sérotoninergiques, via TPH2, ne représente que 2-5% de la sérotonine corporelle ¹²⁶. Les neurones 5-HT, limités en nombre, se situent dans les noyaux du raphé et présentent une arborisation extensive avec des projections descendantes vers la moelle épinière et ascendantes vers les structures limbiques et le cortex ¹²⁶⁻¹²⁸. Après le système glutamatergique, le système sérotoninergique a été décrit comme étant le plus complexe au sein du SNC, puisque ses projections permettent de moduler l'ensemble du cerveau ¹²⁷.

L'utilisation des modèles génétiques de délétion distincte ou cumulée des gènes *Tph* a permis de confirmer la synthèse compartimentée de 5-HT. Les souris *Tph2*^{-/-} présentaient des

concentrations de 5-HT cérébraux effondrées (<1% comparés aux souris sauvages) avec des concentrations inchangées de 5-HT dans la circulation ¹²⁹. Les souris *Tph1*^{-/-} présentaient des concentrations préservées de 5-HT dans le cerveau, associées à des concentrations effondrées dans l'épiphyse et l'intestin, ainsi que des concentrations diminuées dans le sang total (3-15% comparés aux souris sauvages) et dans le plasma (**Figure 8**) ^{59,61,130}. Fait intéressant, les souris présentant la double délétion génétique *Tph1:Tph2* montraient également des concentrations résiduelles de 5-HT dans le compartiment circulant ¹³¹. S'appuyant sur des études *in vitro*, démontrant une activité d'hydroxylation du Trp en 5-HTP par la phénylalanine hydroxylase, il a été suggéré que cette enzyme pouvait être à l'origine des faibles concentrations de 5-HT circulant en l'absence de TPH ¹³².

Figure 8 : Caractérisation des concentrations centrales, périphériques et circulantes de 5-HT dans les modèles murins KO *Tph1*



Sources : Cote et al 2003 ⁶¹, Fligny et al 2007 ¹³³

L'étude du modèle murin *Tph1*^{-/-} a également pu mettre en évidence l'existence de microsystemes sérotoninergiques, comprenant une synthèse 5-HT locale pouvant agir de manière auto/paracrine (Revue Amireault et al 2013, ¹³⁴). En dehors du système intestinal, des expressions fonctionnelles de TPH1 ont pu être caractérisées dans le placenta, les cellules trophoblastiques ¹³⁵, les glandes mammaires ⁶⁷, les cellules β du pancréas ^{136,137}, les ostéoclastes ¹³⁸, les adipocytes ¹³⁹, les cellules musculaires lisses vasculaires ¹⁴⁰, les cellules endothéliales ¹⁴¹, les érythroblastes ¹⁴² ou encore des cellules du système immunitaire (**Figure 9**) ¹⁴³.

Figure 9 : Caractérisation des microsystèmes sérotoninergiques dans le système immunitaire

TABLE 1 | Serotonergic components of immune cells.

Cell type	5-hydroxytryptamine receptors	SERT	Tryptophan hydroxylase 1	MAO
Monocytes and macrophages	1A, 1E, 2A, 3A, 4, 7	+	+	+
Microglia	2B, 5A, 7			
Dendritic cells	1B, 1E, 2A, 2B, 4, 7	+		+
Neutrophils	(1A, 1B, 2)			
Basophils				
Mast cells	1A	+	+	
Eosinophils	1A, 1B, 1E, 2A, 2B, 6			
B cells	1A, 2A, 3, 7	+		
T cells	1A, 1B, 2A, 2C, 3A, 7	+	+	+
NK cells				
Platelets	2A, 3	+		+
Endothelial cells	1B/D β , 2A, 2B, 4	+	+	
Vascular smooth muscle cells	1D, 2A, 2B, 7			

Source : Herr et al, 2017 ¹⁴³

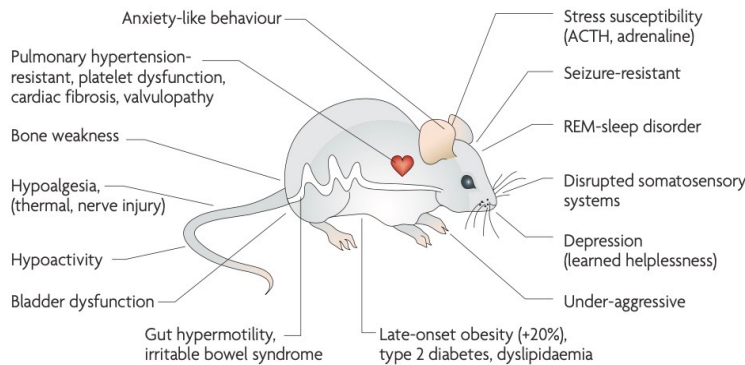
e) Fonctions physiologiques de la sérotonine

Le système sérotoninergique est un système complexe participant à de nombreuses fonctions physiologiques à travers une double fonction hormonale en périphérie et de neurotransmetteur dans le SNC. Illustrant les diverses fonctions physiologiques liées à la sérotonine, la caractérisation phénotypique de la souris KO *Sert* a permis de montrer l'ensemble des altérations associé à une dysrégulation de la transmission 5-HT (**Figure 10**)
120,121 .

Figure 10 : Caractérisation phénotypique de la souris KO *Sert* : exemple de l'impact de la dysrégulation du signal sérotoninergique dans l'organisme

Biochemical features	<i>Slc6a4</i> ^{-/-}	<i>Slc6a4</i> ^{+/-}	Behavioural features	<i>Slc6a4</i> ^{-/-}	<i>Slc6a4</i> ^{+/-}	Physiological features	<i>Slc6a4</i> ^{-/-}	<i>Slc6a4</i> ^{+/-}
SERT binding sites	↓	↓	Anxiety	↑	↑	Stress responses (ACTH, corticosterone, epinephrine, temperature and motor responses)	↑	↑
Serotonin uptake	↓	↓	Learned fear	↑	NS	Gut motility (diarrhoea, constipation)	↑	NT
Serotonin clearance	↓	↓	Learned helplessness (forced-swim and tail-suspension tests)	↑	NS	Body weight	↑	NS
Serotonin content in brain and periphery	↓	NS	Aggression	↓	↓	Glucose tolerance	↓	NT
Extracellular fluid serotonin	↑	↑	Acoustic startle response	↑	↑	Insulin sensitivity	↓	NT
Serotonin synthesis	↑	NS	Exploratory activity	↓	NS	Brain glucose utilization	↓	NT
5-HT _{1A} receptor sites and mRNA	↓	↓	Rotorod agility	↓	NS	Bone mass and strength	↓	NT
5-HT _{1B} receptors	↓	↓	Wire hang	↓	↓	Nociception (nerve injury and thermal)	↓	NT
5-HT _{2A} and 5-HT _{2C} receptors	Δ	NS				Bladder function	↓	NS
5-HT ₃ receptors	↑	Δ	Anatomical features	<i>Slc6a4</i> ^{-/-}	<i>Slc6a4</i> ^{+/-}	Hypoxia-induced pulmonary hypertension	↓	NT
Adenosine receptors	↑	NT	Somatosensory and visual cortex	Δ	Δ	Raphe serotonin neuron firing rate	↓	↓
OCT3 mRNA	↑	NS	Infralimbic cortex (dendrite morphology changes)	Δ	Δ	REM sleep	↑	↑
Glucose	↑	NS	Apoptosis in neonatal brain	↓	NS	EEG power spectra, 'bursting'	Δ	NS
Leptin	↑	NT	Cell density in neonatal cortex	↑	NT			
Cholesterol	↑	NT	Pyramidal neuron spine density in amygdala	↑	NT			
Triglycerides	↑	NT						

***Slc6a4*^{-/-} and *Slc6a4*^{+/-} mice: overview of major phenotypes**



Source : Murphy et al, 2008 ¹²¹

Dans le SNC, la sérotonine est ainsi impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques vitales, comme la régulation des cycles veille/sommeil, la libération des hormones neuroendocriniennes, la prise alimentaire, la thermorégulation, la nociception, l'activité motrice, le contrôle central du rythme cardiaque ou de la pression artérielle ^{97,144,145}. Elle participe également aux processus cognitifs, comme ceux liés à la mémoire et à l'apprentissage, mais également à la régulation de l'humeur et des comportements sexuels ¹⁴⁴.

En périphérie, elle participe également à diverses fonctions physiologiques. Au niveau intestinal, la sérotonine, dérivée de l'intestin via TPH1, participe à la régulation de la motilité, la sécrétion ou encore la nociception intestinale^{146,147} quand la régulation du péristaltisme est principalement assurée par les motoneurons du plexus myentérique¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, synthétisant la sérotonine via TPH2⁶¹. Au niveau cardiovasculaire, la sérotonine exerce des effets cardiaques chronotropes et ionotropes et module le tonus vasculaire notamment en régulant la contraction de muscles lisses vasculaires¹⁴⁵. Dans la continuité de ces effets sur les muscles lisses, la sérotonine est impliquée dans la régulation des contractions des bronches, les uretères, l'utérus¹⁴⁹. Elle est également impliquée dans l'activation et l'agrégation plaquettaire et donc indirectement dans le processus de réponse plaquettaire en cas de blessure^{123,150}. Des fonctions dans la régulation du métabolisme glucidique et de la lipolyse¹⁵¹, de la lactation^{67,152,153}, de la densité osseuse^{154,155} ou encore dans des processus inflammatoires et allergiques^{143,156} ont été identifiées.

Au sein de ces diverses fonctions périphériques, on peut distinguer l'implication de deux types de transmission sérotoninergique : la transmission systémique par les plaquettes et dépendante de la sérotonine dérivée des intestins et la transmission locale au sein des microsystemes sérotoninergiques pouvant secondairement être renforcée par la sérotonine délivrée par les plaquettes. Selon l'organe et la fonction soutenue par la sérotonine, la voie de synthèse pourra être distincte ou cumulée (**Figure 11**).

Figure 11 : Rôle de la sérotonine en fonction de son origine de production

organ/tissue	source of 5-HT		suggested function
	local synthesis	gut-derived	
embryo	Tph2		survival factor ²⁴
placenta	Tph1		hindbrain development ²⁸
mammary gland	Tph1		involution and homeostasis ^{36,37}
bone marrow	Tph1		erythroblast differentiation/proliferation ⁷⁹
gut (enterochromaffin cells)	Tph1		immune modulation ^{46,47}
gut (myenteric neurons)	Tph2		intestinal motility ⁴²
pancreas	Tph1		β -cells proliferation ⁵²⁻⁵⁴
bone	Tph1		osteoclasts differentiation ⁶⁸
		Tph1	osteoblasts differentiation ^{63,64}
liver		Tph1	hepatocytes proliferation ⁷²
heart/blood vessels	Tph1	Tph1	vessels contractility, cardiac myocytes proliferation ¹⁸
adipose tissues	Tph1	Tph1	Lipolysis, thermogenesis modulations
immune cells (mast cells, macrophages, monocytes, T-cells)	Tph1		immune modulation
skin	Tph1		Melanogenesis activation
lung	Tph1		endothelial cells proliferation

Sources : Adaptées d'Amireault et al 2013¹³⁴, Eddahibi et al 2006¹⁴¹, Herr et al 2017¹⁴³, Oh et al 2015¹⁵⁷,

Sumara et al 2012¹⁵⁸, Cai et al 2019¹⁵⁹

Témoignant de l'intrication et de la complexité d'interactions des différentes transmissions sérotoninergiques, les régulations du métabolisme énergétique ou de la densité osseuse nécessitent jusqu'à 3 boucles toniques de signal 5-HT, avec des effets pouvant s'opposer. Par exemple, la sérotonine agit à partir du SNC, de l'intestin, du tissu adipeux et des mastocytes, afin de réguler le métabolisme énergétique de l'organisme ayant des effets opposés sur la prise poids, la sérotonine centrale ayant un effet protecteur vis-à-vis de l'obésité et la sérotonine périphérique la favorisant en réponse à un régime riche en graisse ^{157,158,160-162}.

Au total, la sérotonine, à travers une large distribution compartimentée et des modes d'actions variées, est impliquée dans de nombreux processus physiologiques participant à l'homéostasie de l'organisme. Son action est complexe pouvant nécessiter jusqu'à 3 niveaux de régulation s'articulant entre une signalisation centrale, systémique dérivée de l'intestin et locale et pouvant induire des effets contraires, suggérant une transmission 5-HT tonique. Afin d'assurer une stimulation 5-HT efficace, cette transmission nécessite donc une régulation fine des concentrations de 5-HT, quantitativement et temporellement, dans les différents compartiments de l'organisme. Du fait de leur mode d'action, les ISRS entraînent des modifications de cette transmission sérotoninergique dans l'ensemble de l'organisme.

3. Homéostasie de la transmission sérotoninergique et modulation pharmacologique par les ISRS

a) Neurotransmission sérotoninergique

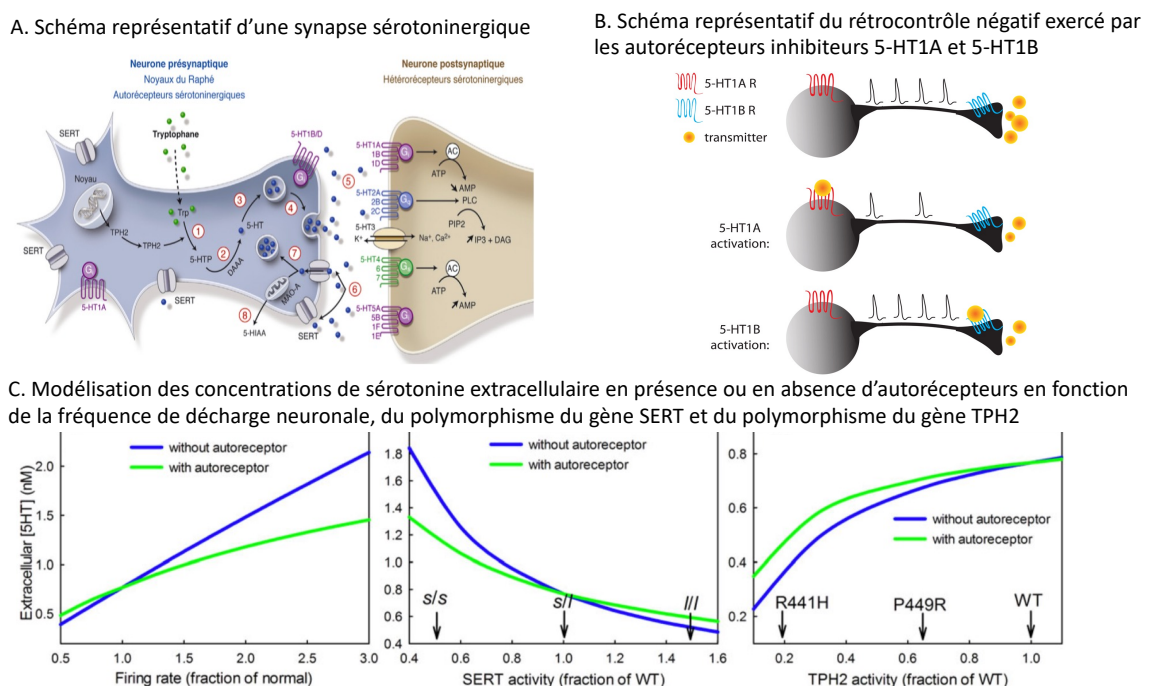
Dès l'identification du rôle de la sérotonine dans le fonctionnement cérébral, la neurotransmission 5-HT et sa régulation ont été extensivement étudiées. Elle concerne les neurones 5-HT, décrits comme des neurones pacemaker avec une décharge lente et régulière, permettant le maintien d'une homéostasie fine ¹²⁷. Ainsi, elle correspond principalement au mécanisme de synapse chimique, commune à l'ensemble des neurotransmetteurs ¹⁶³. Brièvement, après l'arrivée d'un potentiel d'action (PA), la membrane neuronale présynaptique se dépolarise permettant, via les canaux calciques voltage-dépendants, l'entrée de calcium en intracellulaire qui déclenche l'exocytose des vésicules chargées de sérotonine ¹⁶³. Cette libération dépendante du calcium se définit comme une libération quantique, signifiant qu'une même quantité de sérotonine est libérée pour chaque potentiel d'action ⁷². Ainsi, les concentrations de 5-HT dans la fente synaptique peuvent augmenter avec la fréquence des PA ¹⁶³. Par ailleurs, une fois libérée, la sérotonine peut se fixer à ses récepteurs présents sur la membrane post-synaptique, permettant la transmission de son signal ¹⁴⁴ (**Figure 12A**).

La disponibilité de la sérotonine dans la fente synaptique est donc un phénomène hautement régulé, faisant intervenir différents acteurs comme les enzymes liés à son métabolisme, ainsi que ses récepteurs (**Figure 12A**). En immédiat, cette régulation fait intervenir le transporteur SERT capable d'assurer la recapture de 80% de la sérotonine intrasynaptique et permettant de renouveler le stockage des vésicules présynaptiques ¹⁶⁴. Plus précisément, lors de la libération quantique de sérotonine se déroulant en 1/5^{ème} de seconde, la concentration extracellulaire de 5-HT entraîne la saturation du transporteur SERT ⁵⁵. Ce dernier fonctionne alors en continu permettant la recapture de la sérotonine en 2 secondes environ ⁵⁵. A saturation du transporteur, la vitesse de recapture ne peut donc être modulée que par la densité membranaire du transporteur ⁵⁵. Il a été démontré qu'une

élévation de ce niveau était associée à une diminution de la densité de SERT exprimée par les neurones, limitant la biodisponibilité synaptique de la sérotonine ^{76,165}.

Faisant intervenir une boucle de rétrocontrôle, la sérotonine peut également se fixer sur les autorécepteurs 5-HT1A et 5-HT1B présents sur la membrane présynaptique des neurones 5-HT (**Figures 12B-C**). L'activation de ces deux récepteurs entraîne une diminution de la libération de la sérotonine ¹⁶⁶ et, secondairement, une diminution de la synthèse de la sérotonine ^{167,168}. Ils se distinguent par leur distribution cellulaire et leur mécanisme d'inhibition. Les autorécepteurs 5-HT1A se situent au niveau somato-dendritique alors que les autorécepteurs 5-HT1B se localisent au niveau des terminaisons axonales ¹⁶⁹. Plus précisément, en condition physiologique, l'autorécepteur 5-HT1A participe au maintien de l'activité lente de pacemaker des neurones 5-HT en réponse aux signaux entrants excitateurs ¹⁷⁰. Ces récepteurs étant couplés aux canaux potassiques rectificateurs de courant entrant, leur activation entraîne une hyperpolarisation de la membrane neuronale, réduisant alors l'activité de décharge neuronale résultant en une diminution de libération de 5-HT dans les aires de projection ¹⁶⁹. De plus, leur activation est associée à une diminution de la synthèse et du renouvellement de la sérotonine cérébrale dans les aires de projection ^{167,171}. Quant aux autorécepteurs 5-HT1B terminaux, leur activation est associée à une diminution de libération de sérotonine dans les aires de projection ¹⁷², à travers de multiples modes d'action. D'une part, leur activation empêche l'entrée de calcium en inhibant les canaux calciques voltage-dépendants ¹⁷³. D'autre part, il a été démontré que l'activation de cet autorécepteur entraînait une majoration de l'activité de SERT et donc une diminution de 5-HT extracellulaire, alors qu'à l'inverse, l'inhibition de 5-HT1B entraînait une diminution de l'activité de recapture de SERT majorant les concentrations de 5-HT extracellulaire ^{80,174}. Enfin, l'autorécepteur 5-HT1B est également un acteur de régulation de la synthèse de sérotonine, son activation étant associée à une diminution de la synthèse cérébrale de 5-HT ^{168,175}.

Figure 12 : Représentations schématiques de la transmission 5-HT et de sa régulation



Sources : David et Gardier, 2016, ¹⁴⁴ ; Nautiyal et al, 2017 ¹⁷⁶ ; Best et al., 2010 ⁵⁵

D'autres récepteurs 5-HT participent également à la régulation de la libération de 5-HT. Ainsi, l'activation des récepteurs 5-HT_{2B}, également exprimée par les neurones 5-HT, facilitait la libération de sérotonine dans certaines aires de projection^{177,178}. A l'inverse, les autorécepteurs 5-HT_{1D}, également exprimés en présynaptique de neurones sérotoninergiques, participaient au rétrocontrôle négatif en inhibant la libération de sérotonine¹⁷⁹. La stimulation des récepteurs 5-HT₇, quant à elle, entraînait une diminution de l'activité de décharge des neurones 5-HT et participait à la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A}¹⁸⁰. De plus, les récepteurs 5-HT₇, en formant des hétérodimères avec les récepteurs 5-HT_{1A}, favorisaient leur désensibilisation fonctionnelle^{181,182}.

Ce rétrocontrôle négatif assuré par les récepteurs 5-HT permet de maintenir un système sérotoninergique fonctionnel en situation physiologique en limitant, notamment, les conséquences de polymorphismes génétiques identifiés dans la population générale⁵⁵. Des modélisations mathématiques s'appuyant sur les données biochimiques de ces mécanismes moléculaires ont pu mettre en lumière l'importance du rôle des autorécepteurs dans le maintien de cette homéostasie, en limitant l'augmentation des concentrations extracellulaires de sérotonine en cas de génotype « s/s » dans le cadre du polymorphisme du gène *Sert* (**Figure 12C**)⁵⁵. De la même manière, le polymorphisme de la région promotrice du gène *Tph2* peut également être limité par la régulation apportée par les autorécepteurs limitant l'impact du renouvellement diminué de sérotonine en cas de mutations R441H et P449R (**Figure 12C**)⁵⁵.

Enfin, une hétérorégulation de la neurotransmission sérotoninergique se fait par l'intermédiaire d'interneurones GABA, capables d'inhiber l'activité des neurones 5-HT (Revue Beyeler et al 2021,¹⁸³). Il a été identifié deux types d'interneurones impliqués dans ce processus : les interneurones GABA du raphé activés par les récepteurs 5-HT_{2B}, 2C et 7 et les interneurones GABA du cortex préfrontal activés par les récepteurs 5-HT_{2A}, 3 et 4¹⁸³.

Ainsi, l'homéostasie centrale de la sérotonine est finement régulée par une action conjointe de plusieurs acteurs permettant de préserver une stimulation sérotoninergique efficace. Par leur mode d'action ciblant SERT, les ISRS induisent un changement dans cette homéostasie centrale entraînant des processus adaptatifs aigus et chroniques du système 5-HT.

(1) ISRS, modulateur des concentrations de 5HT dans le SNC

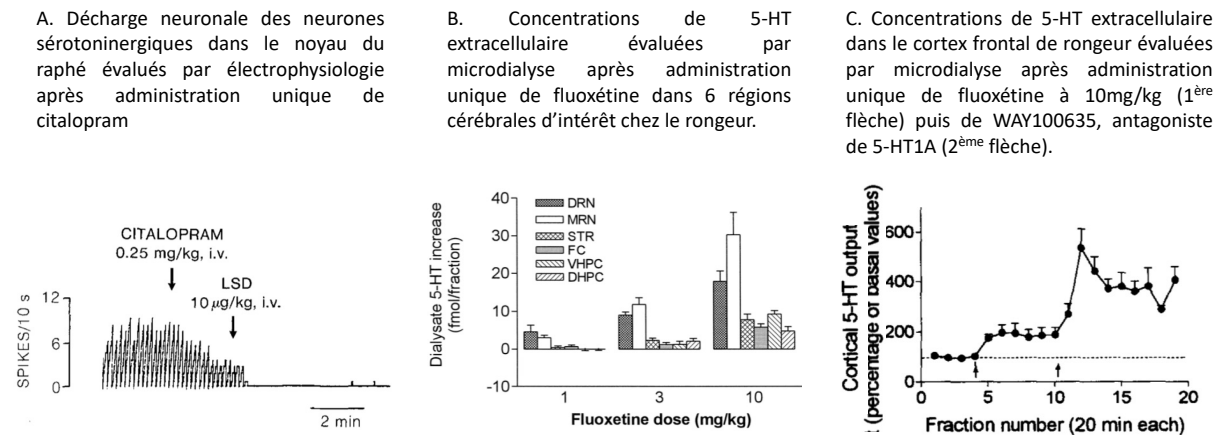
(a) Effets aigus des ISRS sur la neurotransmission

Dès leur découverte en 1974, avec l'utilisation *ex vivo* de synaptosomes issus de cerveaux de rat, il a été démontré qu'un traitement par fluoxétine entraînait une inhibition spécifique de 56% de la recapture de la sérotonine¹⁰ entraînant théoriquement la recapture de la sérotonine extracellulaire en 4 secondes au lieu de 2 secondes⁵⁵. Par la suite, les études caractérisant leurs effets se sont principalement appuyées sur l'analyse de l'activité neuronale par électrophysiologie et l'évaluation *in vivo*, des concentrations de sérotonine dans diverses régions cérébrales grâce au développement des techniques de microdialyse¹⁸⁴.

En administration unique, il a été montré, par électrophysiologie, que l'inhibition aiguë de SERT était associée à une réduction de l'activité des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal (NRD), liée à l'activité inhibitrice de l'autorécepteur 5-HT_{1A} (**Figure 13A**)^{170,185,186}. Par microdialyse, il a été démontré qu'une dose unique d'ISRS était associée à des augmentations rapides et transitoires de concentrations 5-HT extracellulaire de 400% au

niveau du noyau du raphé et de 200% dans les zones de projection, telles que le cortex frontal, préfrontal ou encore l'hippocampe (**Figure 13B**)^{187,188}. Par ailleurs, l'augmentation de sérotonine extracellulaire était dose-dépendante de l'ISRS (**Figure 13B**)¹⁸⁷. De petites doses d'ISRS, comparables aux doses utilisées en pratique clinique, entraînaient des augmentations de 5-HT seulement au niveau du raphé, secondaire à la densité prédominante de SERT dans le noyau du raphé comparé aux aires de projection^{85,187,189}.

Figure 13 : Effets induits par une dose unique d'ISRS sur l'activité des neurones sérotoninergiques et les concentrations de 5-HT extracellulaire



Sources : Chaput et al., 1986¹⁸⁶; Hervas et al. 1998¹⁸⁷; Romero et al., 1996¹⁹⁰

Abréviations : DHPC (hippocampe dorsale), DRN (noyau raphé dorsal), FC (cortex frontal), MRN (noyau raphé médian), STR (striatum), VHPC (hippocampe ventrale)

En augmentant les concentrations extracellulaires de 5-HT dans le raphé, les ISRS ont cet effet paradoxal d'entraîner une diminution de la libération de sérotonine dans les aires de projections, suite à l'activité freinée des neurones 5-HT par l'activation de l'autorécepteur 5-HT1A^{187,191}. Confirmant le rôle inhibiteur de l'autorécepteur 5-HT1A, l'administration unique et conjointe d'ISRS et d'antagonistes 5-HT1A permettait de majorer l'augmentation de 5-HT extracellulaire dans les aires de projection (**Figure 13C**)¹⁹⁰. Des résultats similaires étaient observés chez les souris KO *Htr1A* ayant reçu une administration unique d'ISRS^{192,193}. Suite à la stimulation de 5-HT1A, un phénomène de régulation par désensibilisation rapide et réversible de l'autorécepteur a été démontré par immunomarquage en microscopie électronique¹⁹⁴. Plus précisément, une heure après une dose unique d'ISRS ou d'agoniste 5-HT1A, la densité membranaire des autorécepteurs 5-HT1A dans les neurones du NRD était partiellement diminuée concomitante à une augmentation de leur densité intracellulaire^{195,196}. Cette internalisation partielle suggérait l'existence de deux types d'autorécepteurs de 5-HT1A, un groupe fonctionnel et un non fonctionnel¹⁹⁴. Ce processus était réversible avec une densité membranaire et une sensibilité restaurées 24 heures après stimulation^{195,196}. A l'inverse, l'administration unique d'ISRS n'était pas associée à un changement de densité des hétérorécepteurs dans l'hippocampe^{195,196}.

L'autorécepteur terminal 5-HT1B participe lui aussi à l'atténuation initiale de la libération de sérotonine par les ISRS. En effet, la co-administration d'antagonistes spécifiques 5-HT1B et d'ISRS permettait de majorer les concentrations extracellulaires de 5-HT dans les

aires de projection^{197,198}. Ces résultats ont été confirmés chez les souris KO *Htr1B* traitées par dose unique d'ISRS^{192,193,198}. Cependant, les autorécepteurs présynaptiques 5-HT1B étant terminaux, leur localisation peut se chevaucher avec celle de leurs homologues hétérorécepteurs postsynaptiques, pouvant être un véritable défi technique pour les distinguer¹⁹⁹. Récemment, un modèle murin transgénique a permis la délétion spécifique de l'expression de l'autorécepteur 5-HT1B et a montré l'augmentation attendue de sérotonine extracellulaire dans les aires de projection, après administration aiguë par ISRS²⁰⁰. Confirmant l'implication conjointe des deux récepteurs dans la boucle de rétrocontrôle négatif, des résultats similaires étaient également retrouvés dans des modèles murins avec double KO *Htr1A:Htr1B*²⁰¹. Autre acteur de la régulation du signal 5-HT, il a été montré que l'invalidation génétique ou pharmacologique du récepteur 5-HT2B freinait également l'augmentation de 5-HT extracellulaire induite par dose unique d'ISRS dans l'hippocampe¹⁷⁸.

L'évaluation de l'activité fonctionnelle de TPH par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a mis en évidence qu'après administration aiguë d'ISRS, la synthèse de sérotonine était diminuée dans différentes aires de projection^{202,203}. Cette réduction de synthèse était dose-dépendante et impliquait partiellement et de manière indépendante les récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B^{202,203}.

Ainsi, l'administration aiguë d'ISRS entraîne une diminution du signal sérotoninergique, secondaire au rétrocontrôle négatif exercé par les autorécepteurs 5-HT1A et 5-HT1B, associée à une diminution de la synthèse de 5-HT. Du fait du délai d'action connu des ISRS en pratique clinique, plusieurs études se sont attachées à caractériser les effets d'une administration chronique d'ISRS sur la neurotransmission sérotoninergique.

(b) Effets chroniques des ISRS sur la neurotransmission

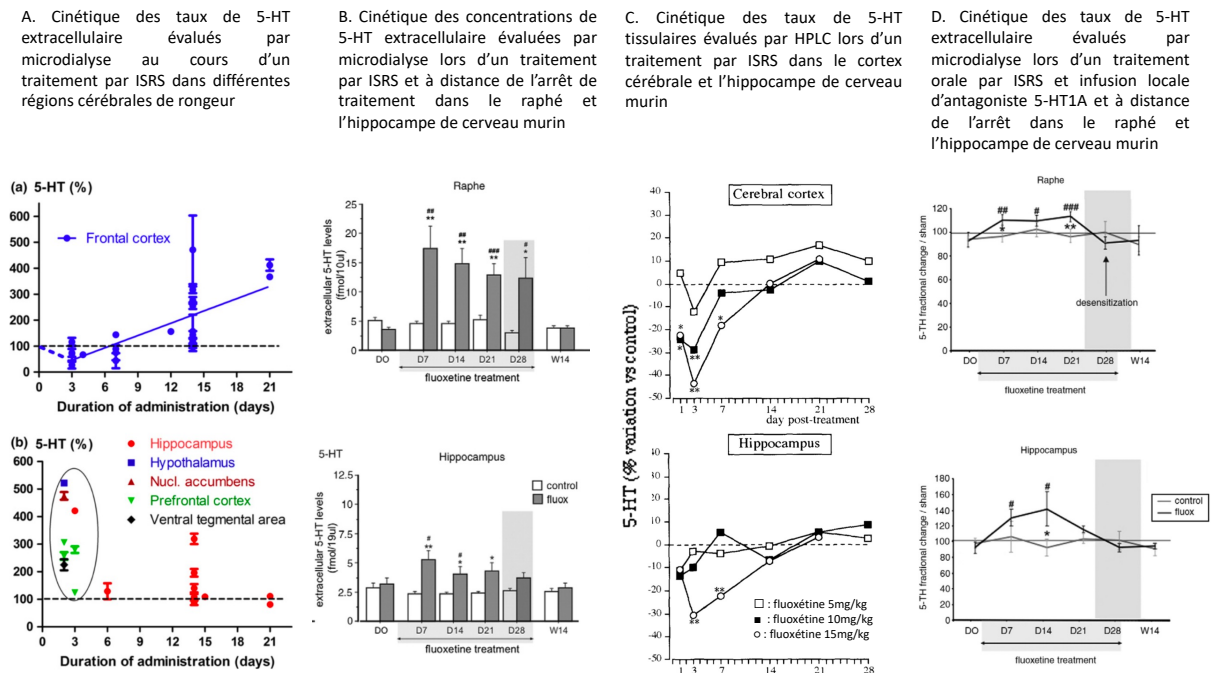
A l'inverse d'une administration unique, un traitement prolongé par ISRS entraîne différents changements adaptatifs du système sérotoninergique et cette caractérisation extensive, à l'aide de modèles animaux, a permis de confirmer le mode d'action des ISRS sur le signal 5-HT et de mettre en lumière la complexité de la régulation de cette transmission.

Ainsi, il a été démontré que les neurones 5-HT du raphé retrouvaient graduellement leur activité de base après 2 à 3 semaines d'administration continue d'ISRS²⁰⁴⁻²⁰⁶. L'activité électrique neuronale de différentes zones d'intérêt était également modifiée par un traitement chronique d'ISRS avec, par exemple, une augmentation d'activité dans l'hippocampe et une diminution dans le cortex moteur préfrontal²⁰⁷.

Par microdialyse, il a été montré qu'une administration répétée d'ISRS était associée à une augmentation soutenue de 3 à 5 fois des concentrations de 5-HT extracellulaire au niveau des noyaux du raphé, ainsi que dans différentes aires de projection, suggérant un renforcement du signal 5-HT par les ISRS²⁰⁸⁻²¹². Une récente méta-analyse regroupant 42 études de microdialyse portant sur les 6 molécules d'ISRS et incluant 798 animaux a pu préciser la cinétique des concentrations extracellulaires de 5-HT au cours d'un traitement par ISRS (**Figure 14A**)²⁰⁹. Ainsi, après 3 jours de traitement par ISRS, les concentrations extracellulaires de 5-HT sont diminuées dans le raphé et le cortex frontal et elles sont augmentées dans les autres aires de projection, associés à des concentrations intratissulaires diminuées en regard, de manière dose-dépendante (**Figures 14A-C**)^{209,210,212-214}. Puis, à partir du 7^{ème} jour de traitement par ISRS, les concentrations extracellulaires de sérotonine sont augmentées dans le raphé, le cortex frontal ou encore l'hippocampe avec une restauration

des concentrations intratissulaires 5-HT associées dans les aires de projection (**Figures 14A-C**)^{209,210,212-214}. Selon les régions, après un traitement prolongé par ISRS, les concentrations extracellulaires de 5-HT pouvaient rester augmentées, comme dans le raphé ou le cortex frontal, ou se normalisaient, comme dans l'hippocampe (Figures 14A-B)^{209,210,212}.

Figure 14 : Cinétique au cours du temps des concentrations extracellulaires et intratissulaires de 5-HT lors d'un traitement par ISRS



Sources : Fritze et al., 2017 ; Popa et al., 2010 ; Trouvin et al., 1992^{209,212,213}.

Témoin de l'adaptation du métabolisme de 5-HT suite à l'augmentation soutenue des concentrations 5-HT extracellulaire induite par les ISRS, l'activité fonctionnelle de TPH et l'expression de *Tph2* étaient diminuées, dès 2 jours de traitement, dans le raphé et les structures cérébrales antérieures et persistaient pendant 28 jours de traitement par ISRS^{215,216}. Par défaut de disponibilité intratissulaire de substrat, l'activité catalytique de MAO était indirectement diminuée après un traitement chronique d'ISRS, démontrée par la diminution des concentrations de 5-HIAA dans les structures cérébrales antérieures, témoignant d'un renouvellement global de la sérotonine diminué^{217,218}.

Associé à cette synthèse 5-HT diminuée par un traitement chronique d'ISRS, la densité du transporteur était majoritairement diminuée dans le raphé et dans différentes aires de projection²¹⁹⁻²²². Dans l'hippocampe, la densité de SERT était régulée d'une part, négativement par un phénomène d'internalisation observé en microscopie électronique dans les terminaisons de neurones 5-HT et d'autre part, positivement observée par immunomarquage dans les neurones glutamatergiques^{194,223}. En regard, le niveau d'expression génique de *Sert* n'était pas modifié par un traitement chronique d'ISRS²¹⁵. A l'inverse, l'expression de *Sert* était diminuée dans le NRD après 7 jours de traitement par ISRS puis se normalisait à l'issue de 3 semaines de traitement^{194,215,224,225}. La régulation de l'expression génique de *Sert* était en partie assurée par la variation des niveaux miR-16 et miR-135 induite par un traitement prolongé par ISRS. En effet, dans les neurones sérotoninergiques, les niveaux miR-16 et miR-135 étaient augmentés par un traitement

chronique d'ISRS entraînant une diminution de Sert et, à l'inverse, dans les neurones glutamatergiques, les niveaux miR-16 étaient diminués entraînant une augmentation de Sert^{222,223,226}.

La restauration des niveaux d'activités neuronales du raphé, associée à l'augmentation soutenue de 5-HT extracellulaire, a été expliquée en partie par l'adaptation fonctionnelle des autorécepteurs 5-HT_{1A}, appelée désensibilisation, correspondant à la levée de l'effet inhibiteur de cet autorécepteur. En effet, à l'issue d'un traitement chronique par ISRS, l'administration d'agoniste 5-HT_{1A} n'entraînait ni réduction d'activité électrique des neurones du raphé ni diminution des concentrations extracellulaires de 5-HT^{185,188,204,211,225}. De plus, l'utilisation d'infusion d'antagoniste 5-HT_{1A}, localisée dans l'hippocampe ou dans le raphé, a montré une potentialisation initiale des effets positifs induits par les ISRS sur les concentrations de 5-HT extracellulaire, suivie d'une perte de l'effet de l'antagoniste 5-HT_{1A}, suggérant la désensibilisation de l'autorécepteur (**Figure 14D**)²¹². Plus précisément, cette désensibilisation induite par un traitement chronique par ISRS a été caractérisée de partielle, fonctionnelle et réversible. En effet, après un traitement par ISRS, les neurones 5-HT présentaient une réponse d'inhibition d'activité neuronale atténuée, mais persistante après stimulation des autorécepteurs 5-HT_{1A}^{204,227,228}. De plus, bien que l'expression de *Htr1A* était diminuée, la densité membranaire de l'autorécepteur 5-HT_{1A} était inchangée, avec une absence d'internalisation observée en microscopie électronique, alors que la transduction du signal d'aval était bien diminuée dans le raphé^{194,212,225,229–231}. Fait intéressant, cette désensibilisation était spécifique aux autorécepteurs, puisque les activités des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} étaient préservées et associées à une augmentation des activités neuronales dans les aires de projection, suggérant le renforcement du signal cérébral sérotoninergique après traitement prolongé par ISRS^{225,229,230,232}.

Une désensibilisation fonctionnelle des autorécepteurs 5-HT_{1B} a également décrit après un traitement chronique par ISRS. De la même manière, la stimulation par un agoniste 5-HT_{1B} n'entraînait plus de freinage sur la libération de 5-HT après un traitement prolongé par ISRS^{233,234}. Fait intéressant, selon les régions cérébrales, cette désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1B} pouvait être sous le contrôle des récepteurs 5-HT_{1A}^{233,234}.

Récemment, un nouveau changement neurobiologique induit par les ISRS a été identifié. Il a été montré qu'un traitement chronique par fluoxétine induisait un changement phénotypique des neurones noradrénergiques localisés dans le locus coeruleus, devenant ainsi une nouvelle source de 5-HT dans le SNC et une nouvelle région ciblée par les ISRS²²². Plus précisément, les neurones sérotoninergiques du raphé exposés chroniquement à la fluoxétine libéraient le facteur neurotrophique S100 β entraînant une réduction de l'expression de miR-16, habituellement élevée dans les neurones noradrénergiques, résultant par l'acquisition de fonctions sérotoninergiques comme l'expression de SERT ou de TPH par les neurones noradrénergiques²²².

Ainsi, un traitement prolongé par ISRS entraîne un renforcement du signal sérotoninergique cérébral à travers plusieurs mécanismes : 1) une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} levant leur rétrocontrôle négatif habituel, 2) une modification du métabolisme 5-HT des neurones sérotoninergiques, via une diminution de sa synthèse et de son transport et 3) un changement phénotypique des neurones noradrénergiques capables de synthétiser et de participer à la neurotransmission 5-HT. L'ensemble de ces résultats suggère que des mécanismes neurobiologiques adaptatifs sont mis en place après un traitement prolongé par ISRS et de manière spécifique, selon les régions

cérébrales concernées. Ces données mettent également en lumière la complexité de la régulation de la neurotransmission 5-HT. La sérotonine étant largement distribuée dans l'organisme, la transmission de son signal en périphérie est également impactée par un traitement par ISRS.

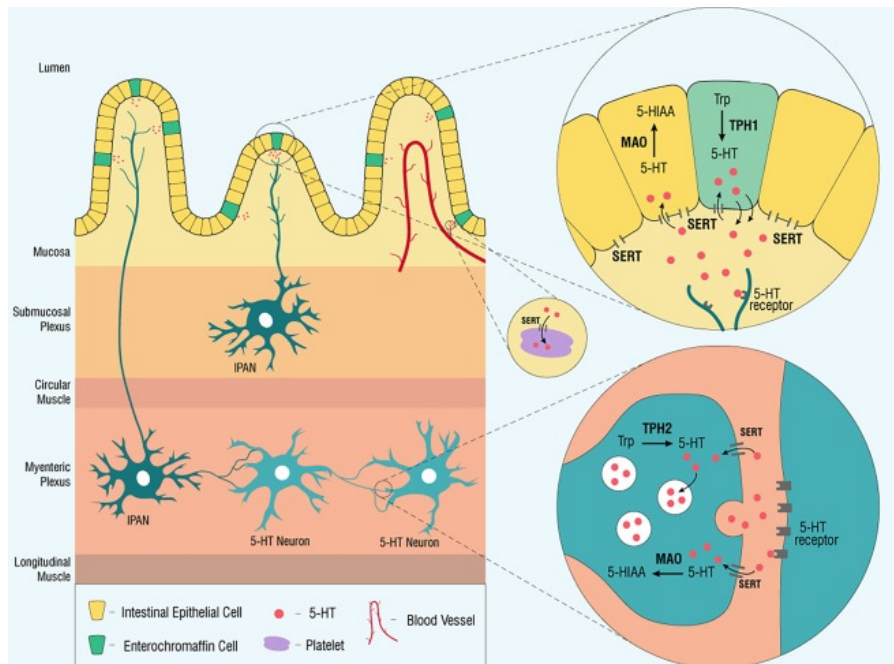
b) Transmission sérotoninergique périphérique intestinale

L'intestin est donc la source principale de sérotonine dans l'organisme. En effet, cette synthèse a lieu majoritairement, via TPH1, dans les cellules entérochromaffines et via TPH2 dans les neurones sérotoninergiques du plexus myentérique (**Figure 15**)⁶¹. Les cellules entérochromaffines sont une sous-population de cellules entéro-endocrines au sein de l'épithélium intestinal constitué majoritairement d'entérocytes²³⁵. De plus, comme l'ensemble des cellules de l'épithélium, les cellules entérochromaffines ont un haut niveau de renouvellement cellulaire qui s'inscrit dans un processus dynamique de mouvement cellulaire au sein de cet épithélium²³⁵. Ces cellules agissent comme des cellules sensorielles, sensibles à des facteurs tels que les compressions mécaniques, le changement de pH, la présence de nutriments ou de toxines (Revue Gershon et Tack, 2007, Bertrand et Bertrand, 2010^{146,147}). A l'issue de cette synthèse dépendante de TPH1, la sérotonine est stockée dans des vésicules intracellulaires via VMAT-1⁷¹ et elle peut être libérée dans deux compartiments extracellulaires distincts (**Figure 15**).

D'une part, elle peut être libérée au niveau basolatéral, soit dans la circulation sanguine où elle sera capturée par les plaquettes^{146,147}, soit au niveau des acteurs locaux, tels que les terminaisons des neurones afférents du système nerveux entérique, les cellules musculaires lisses ou autres cellules adjacentes. Du fait de leur grande mobilité au sein du tissu épithélial, la transmission sérotoninergique entre ces cellules entérochromaffines et les neurones afférents ne correspond pas à une synapse classique¹⁴⁷. En effet, l'activation des récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₄, exprimés au niveau des terminaisons nerveuses, se différencie selon la concentration locale de 5-HT¹⁴⁷. Ainsi, l'activation des récepteurs 5-HT₃ se fait à haute concentration, estimée à 1 μ M, et implique d'être à proximité du site de relargage quand le récepteur 5-HT₄ peut être activé à de plus faibles concentrations dès 5 nM¹⁴⁷. La régulation des concentrations extracellulaires de 5-HT et, donc de ses effets paracrines, est assurée soit par les entérocytes, exprimant SERT, qui capturent la sérotonine et peuvent la cataboliser via MAO, soit par transport dans la circulation sanguine où elle est stockée dans les plaquettes via SERT¹⁴⁶.

D'autre part, elle peut être libérée au niveau apical dans le mucus intestinal en réponse aux contractions péristaltiques du tractus digestif²³⁶, à la stimulation du récepteur 5-HT₄ exprimé, entre autres, par les cellules entérochromaffines²³⁷ ou encore à l'ingestion de nutriments avec une sensibilité particulière au glucose, aux acides gras à courte chaîne ou encore à des métabolites issus du microbiote²³⁸. Plus précisément, il a été démontré dans le microbiote que certaines bactéries, formant des sports, exprimaient SERT et participaient à la stimulation de la biosynthèse de 5-HT par les cellules entérochromaffines²³⁹. Ainsi, il a été estimé que les concentrations de sérotonine au niveau du mucus intestinal à l'état basal étaient comprises entre 2 et 10 μ M, selon les espèces, et pouvaient augmenter jusqu'à 25 μ M en réponse à des stimuli mécaniques¹⁴⁷.

Figure 15 : Transmission sérotoninergique dans l'intestin



Source : Israelyan et Margolis, 2018 ²⁴⁰

A la différence de la neurotransmission sérotoninergique impliquant une signalisation à travers une synapse classique finement régulée, la transmission sérotoninergique intestinale s'effectue à trois niveaux : local avec un mode auto et paracrine, systémique ou circulante via les plaquettes et dans lumière intestinale en interaction notamment avec le microbiote.

(1) ISRS, modulateur des concentrations 5-HT de l'intestin

Initialement, les effets des ISRS sur les concentrations de 5-HT, en dehors du SNC ou du compartiment circulant, ont été peu étudiés. Dans la continuité de l'intérêt croissant sur le rôle de la sérotonine dans l'intestin ainsi que des découvertes de l'implication de l'axe cerveau-intestin et du microbiote dans les troubles psychiatriques ²⁴¹, différentes études ont précisé les effets des ISRS, principalement *ex vivo* ou *in vitro*, sur les concentrations intestinales de 5-HT.

A l'aide d'enregistrement électrochimique appliqué à des préparations iléales de rat, il a été montré que l'exposition de fluoxétine 1 μM entraînait une majoration des concentrations extracellulaires de 5-HT dans le mucus à l'état basal et en réponse à une compression mécanique ²⁴². Confirmant son action directe sur SERT, l'application de 5-HT exogène et de fluoxétine sur le mucus entraînait une augmentation du temps de recapture de 5-HT ²⁴². De plus, en l'absence de SERT comme dans le tissu intestinal néonatal de cochon d'Inde, la fluoxétine n'entraînait pas de hausse des concentrations extracellulaires 5-HT ^{243,244}. Plus précisément, *in vitro*, l'exposition de fluoxétine à de plus faibles concentrations à 200 nM entraînait une diminution de 65% de la recapture de 5-HT exogène au niveau basal de l'iléum,

sans effet au niveau apical ou dans d'autres parties intestinales, telles que le jéjunum ou le colon ²⁴⁵.

In vivo, des rats traités par 10 jours de fluoxétine montraient des concentrations extracellulaires de 5-HT augmentées jusqu'à 180% au niveau basal de l'iléum et une tendance à une augmentation de ces concentrations au niveau apical, traduisant une perméabilité intestinale bidirectionnelle augmentée ²⁴⁵.

Ainsi, de manière similaire aux effets décrits dans le SNC, un traitement prolongé par ISRS entraîne un renforcement du signal sérotoninergique dans l'intestin à travers l'augmentation des concentrations 5-HT extracellulaire. La cinétique des concentrations 5-HT au cours d'un traitement par ISRS ou encore les éventuels effets biologiques adaptatifs liés à ce traitement ne sont, à ce jour, pas connus.

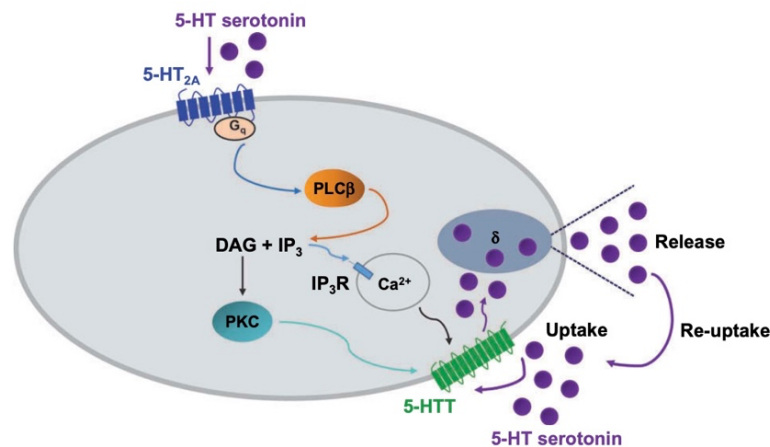
c) Transmission sérotoninergique dans le compartiment circulant

Dans le compartiment circulant, la sérotonine est majoritairement stockée dans les plaquettes ^{119,246}, les plaçant comme acteur principal de régulation du signal sérotoninergique systémique, en assurant la biodisponibilité de la sérotonine circulante (Revue de Mercado et al 2010, Mammadova et al 2018, ^{150,246}). Après recapture par SERT, la sérotonine peut être soit stockée dans les granules denses des plaquettes par VMAT-2 avec une concentration pouvant atteindre 65mM, soit être dégradée par la MAO-B ^{150,246} (**Figure 16**). Il est à noter que la sérotonine est stockée dans les granules denses ou δ -granules contenant également de l'histamine, du calcium, du magnésium ou encore de l'adénoside triphosphate et diphosphate (ATP, ADP), alors que les facteurs de croissance comme le PDGF, l'EGF, le facteur de croissance transformant β (TFG- β), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), ou encore le facteur de croissance ressemblant à l'insuline (IGF) sont, quant à eux, stockés dans les α -granules avec les facteurs de coagulation ²⁴⁷. Lors de l'activation plaquettaire répondant à de multiples stimuli, y compris celui d'une augmentation cytosolique de 5-HT, la libération de sérotonine s'opère par l'exocytose des granules denses, conjointement avec les autres facteurs stockés ¹⁵⁰. La sérotonine peut ainsi activer, de manière autocrine, les récepteurs 5-HT_{2A} exprimés par les plaquettes qui participent en retour à la réactivité plaquettaire ^{150,246,248}. Ainsi, la stimulation 5-HT des plaquettes peut amplifier son propre signal en augmentant ses concentrations extracellulaires par activation et dégranulation plaquettaire de proche en proche ²⁴⁸. Contrebalançant la fonction stimulatrice de la sérotonine sur la réactivité plaquettaire, il a récemment été rapporté que les plaquettes expriment également le récepteur 5-HT₄, dont l'activation pourrait diminuer l'agrégation plaquettaire ²⁴⁹.

Le processus de transport de 5-HT est hautement dynamique et le renouvellement de la sérotonine dans le plasma est rapide, comparé à celui de la sérotonine stockée dans les plaquettes qui, en l'absence d'activation plaquettaire, partage la même durée de vie que celle des plaquettes ²⁵⁰. Plus précisément, la sérotonine exerce un effet biphasique sur la régulation de SERT. Lors de l'élévation de 5-HT dans le plasma, la densité de SERT augmente initialement, associée à un trafic vésiculaire intracellulaire augmenté. Lorsque VMAT est saturé, son inactivation est réalisée par un mécanisme dépendant de protéine G et entraîne l'augmentation des concentrations de 5-HT dans le cytosol. Dès $[5-HT]_{\text{cytosol}} = 12 \mu\text{M}$, la sérotonine entraîne d'une part la sérotonylation d'une petite GTPase, Rab4, dont l'interaction avec SERT empêche son trafic vers la membrane plasmique et, d'autre part, l'exocytose des granules denses et des α -granules. Associée à l'action de Rab4 permettant de réguler les

concentrations cytosoliques de 5-HT, SERT peut être internalisé de manière dépendante de kinases activées par la sérotonine ^{150,246,248,251}. Les cinétiques de transport 5-HT sont également régulées par le niveau de calcium intracellulaire, son augmentation entraînant une diminution du transport de 5-HT en intracellulaire ¹⁵⁰. Par ailleurs, il a été montré que le récepteur 5-HT_{2A}, notamment au niveau des poumons, participait également à la régulation des concentrations plasmatiques de sérotonine ^{252,253}.

Figure 16 : Transmission sérotoninergique par les plaquettes



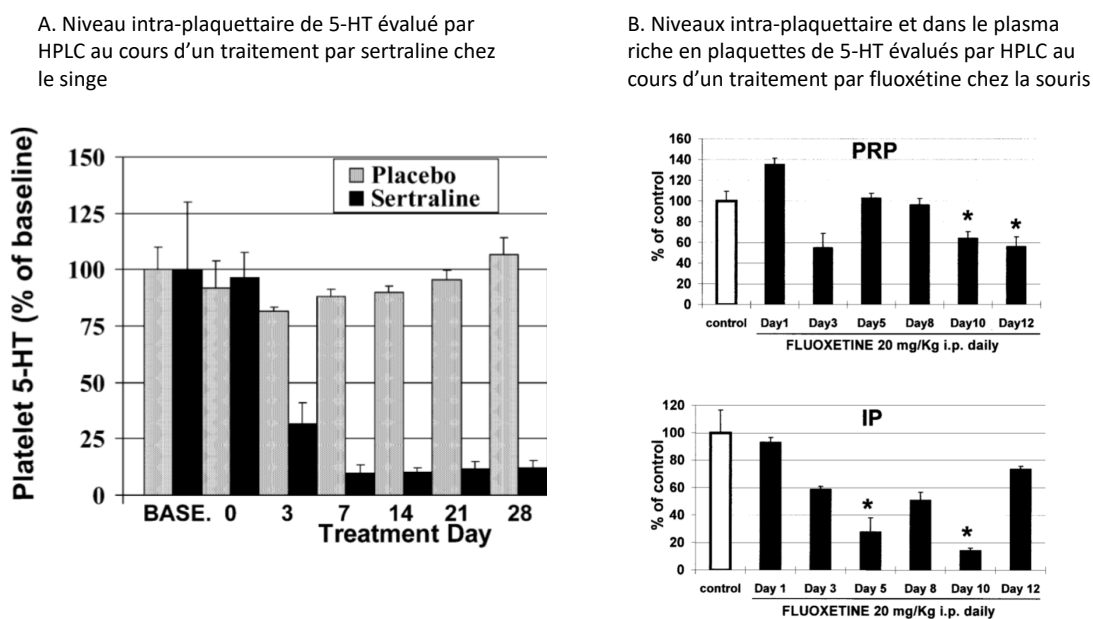
Source : Mammadova et al 2018 ¹⁵⁰

Que ce soit chez l'Homme ou chez le rongeur, les concentrations de sérotonine dans le compartiment circulant sont évaluées à différents niveaux : dans le sang total, dans les plaquettes isolées, dans le plasma riche en plaquettes (PRP) et enfin dans le plasma pauvre en plaquettes (PPP) ²⁵⁴. Les trois premières concentrations sont relativement similaires et hautement corrélées entre elles, permettant de refléter le stockage plaquettaire de la sérotonine ²⁵⁰. Le dosage sérique de sérotonine a peu d'intérêt du fait du manque de fiabilité secondaire au degré variable de libération plaquettaire. Dans le plasma pauvre en plaquettes, il a été montré que les concentrations de sérotonine étaient très variables selon les méthodes d'évaluation et que le dosage était à haut risque d'erreur notamment par contamination plaquettaire ²⁵⁴. Cependant, il a été estimé, chez des sujets sains, que les concentrations moyennes de sérotonine dans le sang total étaient de l'ordre de 100 à 900nM et dans le plasma de 2 à 15 nM ²⁵⁵, associée à un ratio $[5-HT]_{PPP} / [5-HT]_{sang\ total}$ estimé entre 1,1 et 2,3% ²⁵⁵. Par ailleurs, il a été montré que certains facteurs pouvaient influencer le niveau de sérotonine dans le PPP tels que l'âge, le sexe, la tension artérielle ou encore l'apport alimentaire en tryptophane ^{250,251}. Chez le rongeur, les concentrations de 5-HT dans le sang total sont plus élevées avec des concentrations similaires de 5-HT dans le plasma, illustrant la conservation d'une homéostasie fine du signal 5-HT ^{59,256}. De plus, les concentrations 5-HT dans le sang peuvent varier avec la souche de l'animal ^{59,256}. Ainsi, les concentrations de 5-HT sont estimées entre 5000 et 10000 nM dans le sang total et entre 5 et 15 nM dans le plasma, résultant à un ratio $[5-HT]_{PPP} / [5-HT]_{sang\ total}$ autour de 0,15% ^{252,253,257}.

(1) ISRS, modulateur des concentrations de 5HT dans le sang total et dans le plasma

Dans une étude préclinique chez le singe rhésus, les concentrations intraplaquettaires de sérotonine étaient nettement réduites dès 3 jours de traitement par ISRS et cette diminution se maintenait tout au long du traitement ²⁵⁸ (**Figure 17A**). De manière similaire chez la souris ou le rat, les concentrations de sérotonine évaluées dans des plaquettes isolées ou dans le sang total étaient diminuées lors d'un traitement prolongé par ISRS (**Figure 17B**) ^{253,259}. Au niveau plasmatique, l'administration unique d'ISRS à des rats entraînait, dès 30min et de manière dose-dépendante, une franche majoration transitoire des concentrations 5-HT dans le PPP, allant de 226% à 776% d'augmentation selon les molécules ²⁵³. Enfin, les concentrations de 5-HT dans le PRP avaient tendance à augmenter transitoirement au 1^{er} jour de traitement avec une concentration inchangée de sérotonine intraplaquettaire, suggérant également cette augmentation de sérotonine plasmatique transitoire (**Figure 17B**) ²⁵⁹. Après 10 jours de traitement par ISRS, les concentrations de sérotonine dans le PRP étaient également diminuées (**Figure 17B**) ²⁵⁹.

Figure 17 : Cinétique des concentrations de 5-HT dans le compartiment circulant au cours d'un traitement par ISRS



Sources : Anderson et al, 2005, ²⁵⁸ et Bianchi et al., 2002 ²⁵⁹.

Abréviations : IP (plaquettes isolées), PRP (plasma riche en plaquettes).

Chez le sujet sain, une dose unique d'ISRS entraînait un pic de 5-HT plasmatique de 125%, dès 45 minutes ²⁶⁰. A 24h d'une prise d'ISRS, les volontaires sains montraient des concentrations de sérotonine plaquettaire diminuées de 16% associées à un pic de 36% des concentrations de sérotonine plasmatique, ainsi qu'une augmentation de 89% de l'excrétion urinaire de sérotonine ²⁶¹. A l'issue des 2 semaines de traitement par ISRS, les sujets sains montraient une concentration de sérotonine intraplaquettaire nettement diminuée de 83 à 93% ^{261,262}. Plusieurs études cliniques ont également été menées chez des sujets présentant

un EDC, montrant diminution drastique des concentrations de sérotonine intraplaquettaire après un traitement prolongé par ISRS ^{257,263-273}. L'évaluation des concentrations de sérotonine dans le PPP donnait lieu à des résultats contradictoires. En effet, excepté les différents travaux menés par l'équipe de Bardi et al., ayant mis en évidence des concentrations élevées de sérotonine plasmatique, y compris dans le groupe contrôle (soit $[5-HT]_{\text{plasma}} > 200 \text{ nM}$), les autres études ont rapporté une diminution des concentrations de sérotonine dans le plasma lors d'un traitement chronique par ISRS, suggérant l'idée d'une diminution induite par les ISRS du signal sérotoninergique périphérique ^{263,265-270,272,273}. Cet effet s'oppose aux effets de renforcement de signal sérotoninergique par les ISRS, mis en évidence dans le SNC ou dans l'intestin.

Des effets biologiques adaptatifs des ISRS sur les plaquettes ont également été décrits. En effet, la densité de SERT dans les plaquettes était retrouvée diminuée, dès 2 semaines de traitement par ISRS, avec une efficacité d'activité diminuée de 50% environ ^{265 274}. A l'inverse, l'activité plaquettaire de MAO était retrouvée non modifiée après un traitement chronique d'ISRS, avec une absence de modification des concentrations plasmatiques de 5-HIAA ^{266,268,275,276}. La densité membranaire ainsi que l'activité de signalisation des récepteurs 5-HT_{2A} étaient également inchangées, à l'issue d'un traitement prolongé par ISRS ²⁶⁵.

Au total, ces résultats suggèrent que les ISRS modulent les concentrations de sérotonine dans le compartiment circulant, en induisant une déplétion précoce et soutenue du stock de sérotonine intraplaquettaire. Toutefois, l'impact des ISRS sur les concentrations de sérotonine plasmatique, donc du signal 5-HT systémique à l'état d'équilibre, reste incertain devant des résultats contradictoires en lien avec des enjeux techniques et méthodologiques. Ainsi, l'administration aiguë d'ISRS semble entraîner une augmentation des concentrations plasmatiques de 5-HT, alors que l'administration chronique semble induire une diminution du signal sérotoninergique systémique. Ces effets s'opposent donc aux effets décrits dans le SNC ou dans l'intestin, suggérant des mécanismes de régulation d'homéostasie différents entre ces compartiments. Enfin, en dehors des modifications sur la protéine cible SERT, les ISRS ne semblent pas induire d'autres changements biologiques adaptatifs au niveau des plaquettes.

En résumé, la fluoxétine, prototype des traitements de type ISRS, a été un des traitements antidépresseurs les plus prescrits au monde et a été présentée, dès son développement, comme un outil pour étudier le système sérotoninergique. Du fait de leur mode principal d'action rapide ciblant le transporteur SERT contrastant avec leur long délai d'action thérapeutique, les effets des ISRS sur la transmission sérotoninergique ont été largement investigués dans le SNC. A l'issue d'un traitement prolongé par ISRS, le signal sérotoninergique central est *in fine* renforcé. Les changements neurobiologiques adaptatifs, sous-tendant le renforcement de cette transmission, comprennent une désensibilisation des récepteurs participant aux boucles de rétrocontrôle négatif de la libération 5-HT, une modification du métabolisme 5-HT et enfin le recrutement de neurones noradrénergiques comme nouvelle source de sérotonine.

En périphérie, les effets des ISRS sur la transmission sérotoninergique sont moins bien connus. Ainsi, au niveau de l'intestin, quelques études ont montré qu'un traitement prolongé par ISRS renforçait le signal sérotoninergique de manière similaire au SNC. Cependant, les cinétiques précises des concentrations 5-HT, au cours d'un traitement par ISRS, et les éventuelles modifications induites sur le système sérotoninergique local sont, à ce jour, non connus. Au niveau du compartiment circulant, il a été ainsi clairement montré que les ISRS induisaient une déplétion soutenue des concentrations de sérotonine stockées dans les

plaquettes. Les effets des ISRS sur la sérotonine plasmatique, soit la sérotonine biodisponible, sont, quant à eux, incertains, du fait de résultats contradictoires. Toutefois, à l'inverse de l'intestin ou du SNC, organes capables de synthèse 5-HT, les ISRS semblent induire une diminution du signal sérotoninergique dans le compartiment circulant. Dans une perspective d'investiguer les effets des ISRS dépendant de la sérotonine, en dehors du SNC, il est important de mieux comprendre les variations des concentrations de 5-HT induites au cours du temps par ces molécules modulatrices de la transmission 5-HT.

Les effets antidépresseurs induits par les ISRS dépendent du système sérotoninergique central efficient, comme le démontre la perte des effets comportementaux de type antidépresseur chez les souris *Tph2^{-/-}* traités par ISRS ²⁷⁷. Associé aux modulations induites par les ISRS sur le système sérotoninergique, d'autres mécanismes d'action sous-tendant les effets antidépresseurs de ces molécules ont été identifiés, apparaissant également avec un délai d'action.

B. La fluoxétine, une molécule aux propriétés régénératives, dépendantes de la sérotonine

Contemporain de sa découverte dans le SNC, le rôle de la sérotonine dans le développement cérébral fut rapidement suggéré devant sa haute similitude avec le facteur de croissance, l'auxine⁵¹, qui est également issue du métabolisme du tryptophane dans les plantes²⁷⁸. Depuis 50 ans, dans cette perspective, les effets cellulaires de la sérotonine ont été caractérisés, initialement sur la morphologie avec notamment un effet sur la réorganisation du cytosquelette, puis sur divers processus biologiques fondamentaux comprenant la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire (Revue Azmitia, 2001,²⁷⁸) ou encore la biogenèse mitochondriale⁹⁴. De plus, l'étude approfondie des modes d'action et des différentes voies de signalisation, activées par ses récepteurs 5-HT, a permis de mettre en évidence les récepteurs dits « mitogéniques », à savoir les récepteurs 5-HT1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2C, 4, 6, 7^{96,97}.

A l'aide de différents modèles murins d'inactivation génétique ciblée, le rôle de la sérotonine dans le développement et le maintien des tissus a pu être décrypté^{84,134,279}. La présence de la sérotonine et d'un système sérotoninergique fonctionnel a ainsi pu être caractérisée dans l'appareil reproducteur féminin et dès les temps les plus précoces de l'embryogenèse avec, notamment une accumulation de sérotonine proche des mitochondries et l'expression génique de *Htr1D*, *Tph2*, *Sert*^{134,280-283}. Fait intéressant, en plus de la propre synthèse de sérotonine assurée par l'embryon, la sérotonine d'origine maternelle est également cruciale dans la morphogenèse et le développement prénatal normal^{130,284}. Ainsi, la sérotonine participe à de nombreuses étapes de la morphogenèse en amont de la mise en place du SNC, telles que la gastrulation avec une répartition spécifique dans certaines aires de la ligne primitive, la mise en place de l'asymétrie gauche/droite, la spécification des cellules de la crête neurale, impliquant notamment le récepteur 5-HT2B^{285,286}. Puis, au cours de l'organogenèse, la sérotonine est associée à des événements morphogéniques critiques notamment dans le développement craniofacial, la cardiogenèse, l'hématopoïèse embryonnaire et le réseau vasculaire et naturellement la neurogenèse^{278,279,285,287-289}. Comme en témoigne la plus petite taille à la naissance des souris *Tph1*^{-/-} par rapport à leurs homologues sauvages, la sérotonine participe à la croissance globale de la souris¹³⁰.

Le développement et la régénération tissulaire partageant des mécanismes biologiques en commun, comprendre l'implication de la sérotonine dès le développement d'un organe peut permettre de caractériser son éventuel rôle auprès des cellules souches et de la régénération d'un tissu. Dans la continuité de cet axe de recherche et s'appuyant sur le mode d'action de la fluoxétine renforçant la signalisation de la sérotonine, ses effets sur les cellules souches ont également été étudiés.

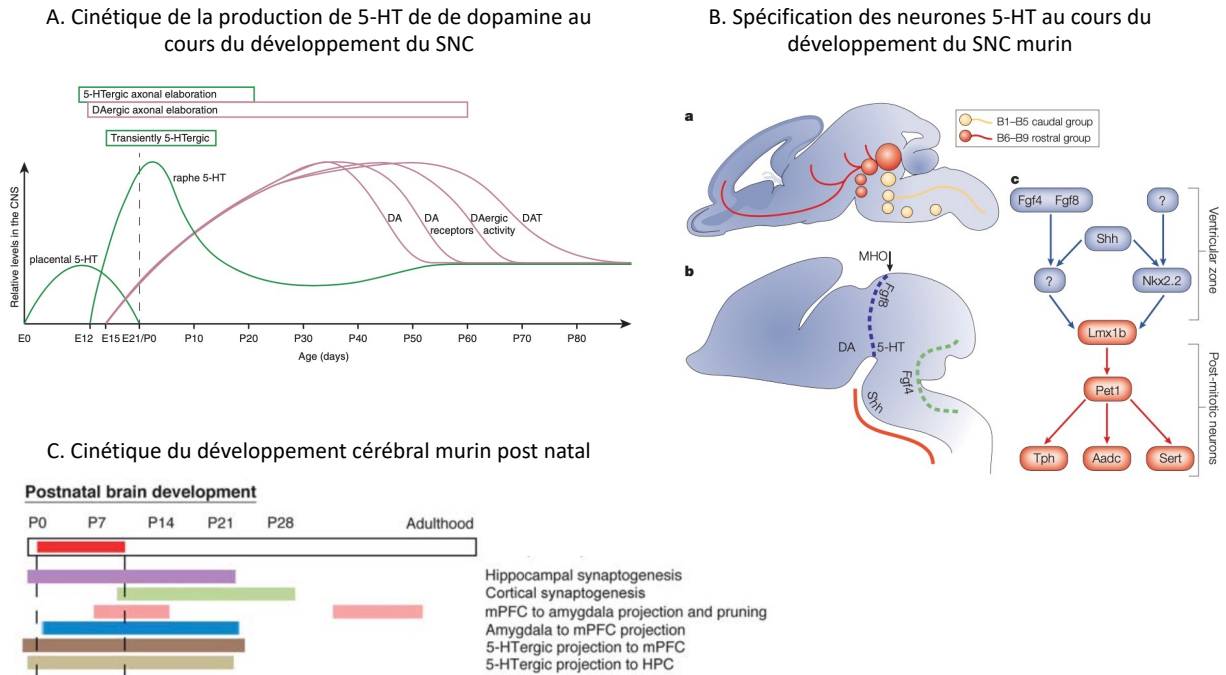
1. La fluoxétine, via la sérotonine, une molécule facilitant la régénération du SNC

a) *La sérotonine, un acteur clé dans le développement et le maintien du SNC*

(1) Rôle crucial de la sérotonine dans la neurogenèse embryonnaire

Au cours du développement murin du SNC, les neurones sérotoninergiques font partie des premiers neurones à se spécifier dès 10,5 jour de vie embryonnaire (E10,5) et arrivent à maturation à E12,5 exprimant ainsi les différents acteurs nécessaires à la synthèse, au stockage et au transport de la sérotonine (**Figures 18A-B**)²⁹⁰⁻²⁹² Plus précisément, la spécification des neurones 5-HT nécessite la signalisation initiale de sonic hedgehog (Shh) et des FGF-4 et 8²⁹³. En réponse, une cascade de facteurs de transcription se met en place avec Nkx2-2, exprimée au niveau de la zone ventriculaire de la partie ventrale du cerveau postérieur, régulant la spécification précoce²⁹⁴, Lmx1b régulant le début de la différenciation des neurones 5-HT²⁹⁵ et enfin Pet1, seulement exprimé dans les neurones post-mitotiques, régulant la différenciation terminale incluant l'expression des acteurs liés au métabolisme 5-HT²⁹¹. La délétion spécifique de ces 3 facteurs de transcription dans des modèles murins a fortement entravé le développement de neurones 5-HT et chez la souris KO *Pet-1*, la déplétion de 80% de neurones sérotoninergique s'associe à des altérations du comportement à l'âge adulte^{291,294,295}. A l'issue du développement précoce des neurones sérotoninergiques, la sérotonine est donc synthétisée, puis libérée, bien avant la mise en place de synapses classiques, la complète maturation des terminaisons axonales s'achevant durant les 3 premières semaines post natal (**Figures 18A-C**)^{279,292}. Associée à la signalisation des neurones 5-HT, une expression phénotypique 5-HT transitoire dans certains neurones non sérotoninergiques a été observée (**Figure 18A**), bien que leur rôle précis ne soit pas encore clairement connu²⁷⁹. En effet, au cours du développement, le thalamus, le cortex limbique, l'hypothalamus ou encore la rétine montraient une expression transitoire de SERT et de VMAT2, temporellement définie, pouvant autant participer à la création d'un gradient morphogénique 5-HT qu'à la régulation des concentrations extracellulaires 5-HT au cours du développement²⁷⁹.

Figure 18 : Développement embryonnaire et post natal du SNC chez la souris



Sources : Gaspar et al 2003 ²⁷⁹, Suri et al 2015 ²⁹²

Abréviations : E (jour de vie embryonnaire), DA (dopamine), MHO (organisateur du milieu du cerveau postérieur), mPFC (cortex préfrontal médian), P (jour de vie post natal)

Ainsi, le rôle de la sérotonine dans le développement du SNC a été mis en évidence au niveau de la division et différenciation de cellules souches et progéniteurs neuronaux (CSPN) et des cellules gliales, la migration neuronale et la synaptogenèse (Revue Azmitia 2001, Gaspar et al 2003, Wirth et al 2017, ^{278,279,296}). Chez les rongeurs, l'augmentation des concentrations de 5-HT favorise la différenciation dendritique dans le cortex cérébral ainsi que la croissance de neurites dans les neurones thalamiques alors que la déplétion de 5-HT inhibe la croissance de neurites et de ramifications au niveau de l'hippocampe, l'arborisation de neurones pyramidaux, la connectivité corticale ou encore la migration d'interneurones ²⁹⁶.

Les modèles murins génétiques, de délétion ou de surexpression géniques, ont permis de préciser les séquences régulées par la sérotonine, notamment dans la mise en place et la maturation de circuits neuronaux, dont les anomalies pouvaient s'associer à des altérations phénotypiques comportementales à l'âge adulte (**Figure 19**) ²⁷⁹. La formation post natale des cortex somato-sensoriel et visuel, chez les rongeurs, est un modèle bien connu pour étudier les effets pro-morphogéniques régulés par la sérotonine au sein du SNC ²⁹⁶. Ainsi, les modèles génétiques murins avec excès de concentrations cérébrales de 5-HT, tels que les souris KO *Mao-a* ou *Sert*, montraient des anomalies morphologiques des axones thalamiques se projetant dans le cortex somato-sensoriel ou des axones rétiniens ²⁹⁷⁻²⁹⁹. De plus, les souris KO *Sert* présentaient une perte de plus de 50% des neurones sérotoninergiques et des anomalies anatomiques post natal du SNC ³⁰⁰.

De manière surprenante, les modèles génétiques murins avec déplétion centrale de 5-HT, tels que les invalidations de gènes constitutionnelle pour *Tph2* ou conditionnelle spécifique aux neurones 5-HT pour *Vmat*, présentaient une croissance embryonnaire normale

avec un nombre de neurones 5-HT préservé^{301,302}. Cependant, ces modèles de déplétion sérotoninergique centrale montraient des anomalies de développement post natal, associant un retard de croissance globale avec des anomalies morphologiques cérébrales comme un retard de maturation dans les couches corticales supérieures^{279,301,302}. De plus, il est à noter que la délétion homozygote constitutionnelle du gène *Vmat2* était associée à une létalité post natal augmentée³⁰³. Les souris *Tph2*^{-/-} présentaient également des anomalies de formation de circuits neuronaux, avec une réduction d'innervation dans les noyaux thalamiques et une augmentation d'innervation dans le noyau accumbens et l'hippocampe, une létalité augmentée de 50 à 60% dans les 4 premières semaines de vie associée à des anomalies du système nerveux autonome, comprenant des anomalies de cycle veille/sommeil, de respiration, de température corporelle, de pression artérielle ou encore de fréquence cardiaque^{301,302,304}.

Ces séquences impliquent également les récepteurs 5-HT dont leur expression est spatialement et temporellement régulée au cours du développement. Ainsi, la cartographie des récepteurs 5-HT1, au cours du développement embryonnaire et post natal, par hybridation *in situ*, a mis en évidence, dès E14,5, une expression dynamique et spécifique des récepteurs selon les régions cérébrales, y compris dans des régions non innervées encore par des axones sérotoninergiques³⁰⁵. Les modèles de délétion génétique ont également permis de préciser leur fonction au cours du développement cérébral et des perturbations comportementales associées à l'âge adulte (**Figure 19**),²⁷⁹. Ainsi, il a été montré que les autorécepteurs 5HT1A et 5-HT1B participaient à la régulation du nombre de neurones sérotoninergiques dans le raphé³⁰⁶. Au cours de la formation des circuits neuronaux, notamment des axones thalamo-corticaux, il a été montré que les récepteurs 5-HT1B/5-HT1D inhibaient l'attraction exercée par le facteur Netrin-1, guidant spatialement la croissance axonale³⁰⁷. De plus, démontrant son rôle primordial au cours de la neurogenèse, les croisements de modèle murin d'invalidation génétique de *Sert* ou de *Mao-a*, avec la délétion de *Htr1B*, permettaient de corriger les malformations du cortex somato-sensoriel malgré la persistance d'une dysrégulation du signal 5-HT²⁹⁸. Lors de la formation du néocortex, la migration neuronale est sous le contrôle du récepteur 5-HT3A³⁰⁸. Lors du développement cérébral tardif, il a été montré que les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2A participaient à la maturation post natal de cellules dendritiques et le récepteur 5-HT2C était impliqué principalement dans la plasticité synaptique²⁷⁹. Enfin, le récepteur 5-HT2B, outre son rôle promorphogénique impliqué dans d'autres organes au cours de l'embryogenèse, participe également au développement des neurones du système nerveux entérique dont la survie post natal est régulée par le récepteur 5-HT4^{309,310}.

Figure 19 : Altérations au cours du développement et à l'âge adulte de différents modèles murins avec KO des acteurs liés à 5-HT

Table 1 | **Mouse mutant phenotypes**

5-HT target molecules	Adult phenotype of knockout mice	Developmental defects and critical period	References
5-HT _{1A} receptor	Increased anxiety, decreased exploration; reduced effects of antidepressants; altered sleep patterns	Adult neurogenesis; dendritic maturation (hippocampus) (first 3 weeks of postnatal life)	8,60,128-130
5-HT _{1B} receptor	Increased aggression; increased exploration; increased response to cocaine; altered sleep patterns	Axon connection defects (retinotectal)	90,110,131
5-HT _{2A} receptor	Decreased response to hallucinogens; enteric nervous system reactivity	Dendritic maturation (phrenic motor neurons)	64,132
5-HT _{2B} receptor	Dilated cardiomyopathy	Cardiovascular and enteric neuron embryogenesis (cell survival)	105,133
5-HT _{2C} receptor	Feeding behaviour; late-onset obesity; audiogenic seizures; altered LTP in hippocampus	Synaptic plasticity	101,134,135
5-HT _{3A} receptor	Reduced pain behaviour	Not known	136
5-HT ₄ receptor	Altered response to stress; hypersensitivity to seizures	Not known	137
5-HT _{5A} receptor	Increased exploration	Not known	138
5-HT ₇ receptor	Abnormal thermoregulation	Not known	139
Sert	Altered 5-HT homeostasis; modified responses to drugs of abuse	Axon connection defects (retinal, thalamic, barrel field); decreased apoptosis	66,68,140,141
Maoa	Increased aggression; increased fear conditioning; reduced exploration; altered beam walking	Axon connection defects (retinal, thalamic, barrel field) (first postnatal week); dendritic exuberance (medulla); neuropeptide expression (hypothalamus)	27,37,61,62,64,65
Maob	Increased reactivity to stress	Not known	142
Vmat2	Lethal; altered feeding/growth	Increased apoptosis in telencephalon; altered migration	28,67,69-71
Pet1	Increased aggression; increased anxiety	Not known	22
Gata3	Altered exploration	Not known	19

Sources : Gaspar et al 2003 ²⁷⁹

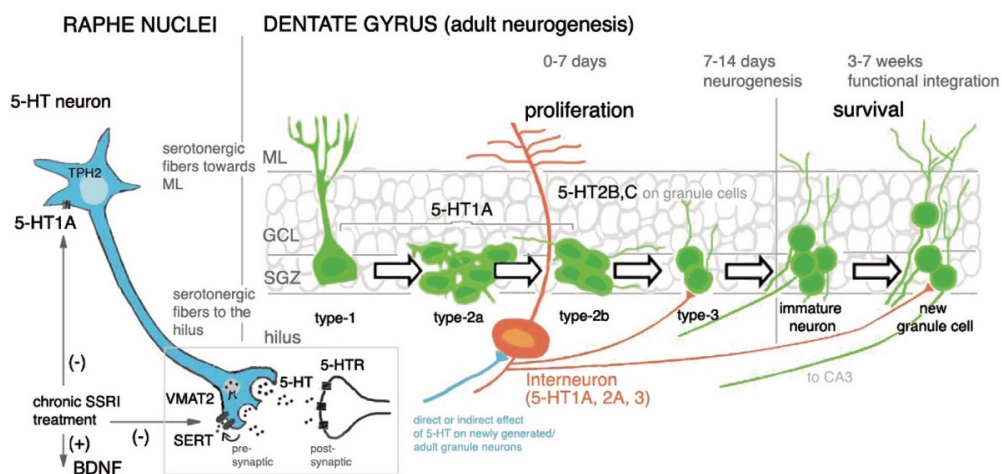
Ces résultats suggèrent que l'excès, la déplétion ou la dysrégulation du signal sérotoninergique s'associe à des anomalies dans le développement et la morphogenèse du SNC, ainsi que lors du développement post natal, suggérant le rôle crucial et complexe de la sérotonine dans la neurogenèse pré et post natal. De plus, les effets de la sérotonine sur la neurogenèse embryonnaire, comprenant la prolifération, différenciation et migration neuronales, impliquent les récepteurs 5-HT_{1A}, 1B, 2A, 2B, 2C, 3A et 4, sous réserve d'études supplémentaires sur les autres récepteurs 5-HT.

(2) Rôle complexe de la sérotonine dans la neurogenèse à l'âge adulte

(a) La neurogenèse à l'âge adulte

Depuis la découverte de la neurogenèse à l'âge adulte, en premier lieu chez les rongeurs, et confirmée secondairement chez les humains, de nombreuses investigations ont permis de préciser les facteurs régulant ce processus complexe (Revue Toda et al 2019, Song et al 2017, Alenina et Klempin 2015, Micheli et al., 2018³¹¹⁻³¹⁴). La neurogenèse adulte repose sur des cellules souches multipotentes, les CSPN, localisées dans des niches et qui, en réponse à des stimuli environnementaux, peuvent générer de nouveaux neurones et dans une moindre mesure des cellules gliales^{311,312}. Elle est présente dans deux régions distinctes : la zone subgranulaire de l'hippocampe, permettant notamment la production de nouveaux neurones glutamatergiques dans le gyrus denté et la zone subventriculaire proche des ventricules latéraux permettant la production de neurones GABAergiques et dopaminergiques destinés au bulbe olfactif^{311,312}. Plus précisément, la cascade de cette neurogenèse hippocampique chez le rongeur repose sur des cellules souches neuronales quiescentes, appelées cellules gliales radiales de type 1 et exprimant, notamment, les facteurs GFAP, Sox2 et nestin (**Figure 20**)^{311,312,314}. A travers différents facteurs de stimulation, ces cellules vont s'activer et se diviser, de manière asymétrique, afin d'assurer un autorenouvellement et générer des progéniteurs neuronaux intermédiaires de type 2a, hautement prolifératifs, puis de type 2b qui vont se différencier en neuroblastes, exprimant la doublecortine, puis en neurones granulaires post-mitotiques immatures, exprimant transitoirement la calrétinine, qui deviendront des neurones matures marqués par l'expression de calbindine (**Figure 20**)^{311,312,314}. A l'issue de cette cascade de neurogenèse qui dure 14 jours, ces nouveaux neurones vont poursuivre, durant 3 à 7 semaines, leur maturation et leur migration afin d'intégrer les circuits cérébraux de manière fonctionnelle et de participer à la synaptogenèse^{311,312}. Chez le jeune rat, il a été estimé qu'environ 9000 nouveaux neurones par jour étaient générés dans le gyrus denté participant au renouvellement, seulement de 10% de la population des neurones granulaires, processus diminuant avec l'âge^{314,315}. Chez l'homme, la neurogenèse hippocampique donne lieu à 700 nouveaux neurones par jour, participant à plus de 35% du renouvellement de cette population neuronale³¹⁴.

Figure 20 : Schéma représentatif du rôle de la sérotonine dans la neurogenèse adulte hippocampique adulte



Sources : Alenina et Klempin 2015³¹³

Abréviations : GCL (couche de cellules granulaires), ML (couche moléculaire), SGZ (zone subgranulaire)

A l'échelle comportementale, il a été mis en évidence que l'exposition des souris à un environnement enrichi par un grand espace de vie, des stimulations nombreuses et variées, des contextes enrichis d'apprentissage ou de stimulation sociale ou encore, d'activités physiques, était associée à une neurogenèse hippocampique augmentée^{316,317}. Des situations pathologiques pouvaient également stimuler la neurogenèse hippocampique telles que les crises convulsives ou des évènements ischémiques ayant mis en lumière le partenariat privilégié d'angiogenèse et neurogenèse^{316,317}. A l'inverse, une exposition répétée au stress entraînait une diminution de la prolifération de CSPN³¹⁶.

Enfin, la caractérisation de la neurogenèse chez plusieurs souches consanguines de souris a permis de mettre en évidence l'influence du patrimoine génétique sur le taux de division cellulaire et de survie neuronale au cours de la neurogenèse^{316,317}. Ainsi, les souris C57Bl/6 présentaient le taux le plus élevé de prolifération cellulaire, tout type cellulaire confondu, les souris CD1 produisaient le plus de nouveaux neurones quand les souris 129/SvJ généraient plus de nouvelles cellules gliales comparées aux autres souches^{316,317}.

(b) Rôle de la sérotonine dans la neurogenèse à l'âge adulte

A l'instar des études portant sur la neurogenèse embryonnaire, l'utilisation de modèles murins génétiques avec KO et l'utilisation de modulation pharmacologique ciblée ont permis de préciser le rôle de la sérotonine dans la neurogenèse dans les zones subgranulaires et subventriculaires^{311,313,318}. La complexité de ce rôle est, par exemple, illustrée par des résultats opposés selon les modèles de déplétion sérotoninergique centrale^{311,313}. Dans les modèles de déplétion centrale de 5-HT à l'âge adulte, les approches par inhibition pharmacologique ou par lésion chimique de neurones 5-HT montraient une diminution de la neurogenèse hippocampique, pouvant être restaurée après une transplantation de raphé entraînant une restauration du contrôle sérotoninergique sur les CSPN, suggérant un rôle crucial, mais non exclusif de la sérotonine dans la neurogenèse^{319,320}. A contrario, d'autres modèles de déplétion 5-HT centrale, inductible seulement à l'âge adulte par un système de Cre recombinase ciblant le gène *Tph2* ou *Pet-1* dans les neurones 5-HT, ont montré une augmentation de la prolifération des CSPN et de la survie des nouveaux neurones³²¹. Quant aux modèles avec déplétion centrale de 5-HT dès l'embryogenèse, tels que les souris *Tph2*^{-/-}, constitutionnelle ou conditionnelle avec une invalidation limitée de *Tph2* aux neurones sérotoninergiques, ils présentaient un maintien de prolifération de CSPN et de neurones immatures à l'état basal. Ces données suggéraient un système redondant de régulation de la neurogenèse par la sérotonine, mis en lumière notamment par la possible expression des deux isoformes TPH1 et TPH2 par les CSPN³²²⁻³²⁴. Cependant, les autres modèles génétiques, induisant une déplétion centrale 5-HT dès l'embryogenèse via l'invalidation conditionnelle limitée aux neurones 5-HT de *Vmat*, *Pet1* ou encore *Lmx1b* montraient également une neurogenèse à l'âge adulte préservée, voire augmentée, alors que la présence de ces facteurs est cruciale lors du développement cérébral^{279,291,302,323,325}. En revanche, lors du vieillissement, processus s'associant naturellement à une réduction de la neurogenèse, la déplétion sérotoninergique centrale chez les deux modèles de souris *Tph2*^{-/-}, constitutionnelle ou limitée aux neurones 5-HT, favorisait la neurogenèse hippocampique et accélérail la maturation de cellules dendritiques dans l'hippocampe^{322,323}. Enfin, le rôle de la sérotonine dans la neurogenèse hippocampique adulte, en réponse à des stimuli environnementaux

spécifiques, a également été démontré avec une abolition de la neurogenèse induite par de l'exercice physique ou un environnement enrichi chez les souris *Tph2*^{-/-} ³¹¹.

Les modèles génétiques murins, avec excès de sérotonine ou dysrégulation de la transmission, tels que les souris KO *Sert* ou *Mao*, présentaient, quant à eux, une prolifération accrue de CSPN ^{326,327}. De la même manière, dans un modèle murin de knock-down de *Sert*, la neurogenèse hippocampique était augmentée, dès le 4^{ème} jour post injection de siARN ciblant *Sert*, associé à de hautes concentrations cérébrales de 5-HT extracellulaire ³²⁸.

Les mécanismes d'action sous-tendant les effets de 5-HT régulant la neurogenèse ont été précisés, *in vivo* et *in vitro*, avec notamment l'identification de récepteurs 5-HT1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 3, 4, 6 et 7 ³¹³. Ainsi, l'expression de l'hétérorécepteur 5-HT1A a été retrouvée dans les CSPN de type 1, 2a et 2b, ainsi que dans les interneurons, l'expression des récepteurs 5-HT2B et 5-HT2C dans les cellules granulaires adultes et les récepteurs 5-HT2A et 5-HT3 au niveau hilare (**Figure 20**) ³¹³. De plus, l'activation de certains récepteurs 5-HT pouvaient avoir des effets contraires, suggérant une boucle dynamique de régulation de la neurogenèse hippocampique induite par la sérotonine ³²⁹. En effet, *in vivo*, l'administration aiguë d'un agoniste 5-HT1A entraînait une augmentation de la prolifération de progéniteurs neuronaux de type 2b et 3, alors qu'une exposition chronique à un antagoniste 5-HT1A entraînait une diminution de la survie neuronale ^{318,329}. A l'inverse, l'administration aiguë et chronique d'agoniste 5-HT2 et d'agoniste 5-HT2C entraînait une diminution de la prolifération et de la survie neuronales, alors qu'une administration aiguë d'antagonistes 5-HT2 et 5-HT2C augmentait la prolifération neuronale et une administration aiguë d'antagoniste 5-HT2A diminuait la prolifération neuronale, sans modification de la survie neuronale et une administration ^{318,329}. Les effets stimulants de l'hétérorécepteur 5-HT1B sur la prolifération de progéniteurs neuronaux dans le gyrus denté n'étaient révélés après déplétion centrale de la sérotonine ³¹⁸. Fait intéressant, l'implication du récepteur 5-HT3, *in vivo*, dans la neurogenèse hippocampique a également été montré, son activation favorisant la prolifération de progéniteurs neuronaux, de manière dépendante de IGF-1 ³³⁰. Participant également à la régulation des effets de la sérotonine, le blocage chronique du récepteur 5-HT7 favorisait la prolifération de la neurogenèse hippocampique ¹⁸⁰. Les modèles d'invalidations génétiques constitutionnelles, tels que les KO *Htr1A*, *Htr1B*, *Htr2B*, *Htr3*, *Htr4*, *Htr7* ne mettaient pas en évidence de modulation de la prolifération de CSPN et seul le double KO *Htr1A:Htr1B* montrait une augmentation de la survie de nouveaux neurones dans le gyrus denté ³¹¹. Cependant, les processus, impliqués dans la stimulation de la neurogenèse hippocampique par l'environnement enrichi ou par l'exercice physique, étaient dépendants de certains récepteurs 5-HT, cette neurogenèse induite étant abolie chez les souris KO *Htr1A:Htr1B* et *Htr4* ^{311,322}. Quant aux effets de la sérotonine sur la maturation neuronale, seule l'activation aiguë du récepteur 5-HT4, *in vivo*, a montré un effet favorisant la maturation de nouveaux neurones dans le gyrus denté ³³¹. Enfin, concernant la neurogenèse de la zone subventriculaire, les effets de la sérotonine impliquent les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2C dont les activations modulent positivement cette neurogenèse ³¹⁸.

In vitro, la modulation pharmacologique de ces récepteurs ont montré que l'activation de 5-HT1A promouvait la division de progéniteurs neuronaux, alors que celle de 5-HT2 favorisait la différenciation neuronale ^{324,329}. De plus, les récepteurs 5-HT1A, 2A, 3, 4, 6, 7 participent à la morphogenèse neuronale, avec une régulation positive et négative de la croissance de neurites ou de dendrites selon le type de récepteur et le type cellulaire l'exprimant ²⁹⁶.

Au total, la sérotonine, principalement dérivée de TPH2, participe activement à la régulation de la neurogenèse à l'âge adulte. L'augmentation des concentrations de 5-HT favorise cette neurogenèse quand la réduction de ces concentrations peut produire des effets opposés, selon le type et l'âge de vie lors de cette déplétion. Ces résultats témoignent de la forte redondance du système de régulation mis en œuvre pour cette neurogenèse, mais également au sein du système sérotoninergique, notamment auprès des acteurs impliqués dans la synthèse 5-HT. Les récepteurs, dont l'activation favorise la neurogenèse hippocampique, à travers la prolifération et la survie neuronale, sont les récepteurs 5-HT1A, 1B, 3, 4 quand les récepteurs 5-HT2A, 2C, 7 l'inhibent. Bien que l'expression du récepteur 5-HT1A ait été identifiée dans les cellules souches neuronales, les effets prolifératifs de la sérotonine ont essentiellement été caractérisés sur les progéniteurs neuronaux. Enfin, les récepteurs 5-HT3, 4 et 6 semblent plus impliqués dans les processus de maturation neuronale.

b) La sérotonine, un facteur stimulant l'angiogenèse en situation saine et pathologique

(1) L'angiogenèse à l'âge adulte

Les vaisseaux sanguins représentent un des plus grands réseaux de l'organisme dès son développement et assurent les fonctions vitales de transmission d'informations et d'échanges de molécules métaboliques et cataboliques³³². Ainsi, le développement et le maintien du tissu vasculaire sont fondamentaux et impliquent des processus hautement régulés que sont la vasculogenèse et l'angiogenèse (Revue Carmeliet 2003 et Ribatti et al 2007,^{332,333}). A l'âge adulte, la vasculogenèse correspond à la formation de vaisseaux à partir de progéniteurs endothéliaux, pouvant être mobilisés dans différentes situations pathologiques comme lors d'ischémie, de néoplasie ou d'inflammation³³². Ces progéniteurs sont dérivés de différents types cellulaires, comme les cellules progéniteurs endothéliales, les mésangioblastes, les cellules souches mésenchymateuses ou des cellules progéniteurs de la moelle osseuse³³². L'angiogenèse se réfère, quant à elle, à l'expansion dite par « sprouting » de capillaires à partir de vaisseaux pré-existants^{332,333}. Plus précisément, l'angiogenèse par sprouting débute par la dégradation de la membrane basale des cellules endothéliales (CE), via des métalloprotéases matricielles (MMP) et activateurs de plasminogène permettant l'émergence de « sprout » dans le stroma périvasculaire. Elle est suivie par la migration de CE guidée par des stimuli angiogéniques le long de l'expansion, de leur prolifération et de la formation d'un tube vasculaire assurant une circulation fonctionnelle. Enfin, ce nouveau réseau vasculaire est stabilisé grâce aux cellules de soutien constituées de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et de péricytes^{332,333}. L'angiogenèse est un processus hautement orchestré grâce à un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques stimulants et anti-angiogéniques inhibiteurs³³³.

A l'état basal en situation saine, les CE sont maintenues en quiescence par la prédominance des facteurs anti-angiogéniques³³³. Plusieurs facteurs angiogéniques ont été identifiés et le facteur pro-angiogénique classique, ayant un rôle crucial dès le développement du tissu vasculaire, est le couple VEGF et ses deux récepteurs VEGFR1 (ou Flt-1) et VEGFR2 (ou Flk-1)³³³. En effet, il promeut l'angiogenèse de manière dose dépendante, en situation saine et pathologique, en favorisant la prolifération et migration des CE, leur différenciation en tube capillaire ainsi que la perméabilité vasculaire^{332,333}. Les autres facteurs classiques impliqués dans ce processus sont, d'une part, les facteurs pro-angiogéniques FGF-2, PDGF, le facteur de

croissant transformant β (TGF- β), ainsi que l'angiopoïétine 1 et son récepteur Tie 2 et, d'autre part, les facteurs anti-angiogéniques comme la thrombospondine-1, l'angiostatine, ou encore l'endostatine³³³. Plus récemment, d'autres facteurs ont été identifiés pour avoir des propriétés angiogéniques ou pour interagir avec les facteurs classiques comme l'érythropoïétine (EPO), l'angiotensine II, l'adrénomédulline, les endothélines, les adipokines, la somatostatine, la ghréline³³³.

(2) La sérotonine, un facteur pro-angiogénique

Du fait de leur fonction de support indispensable à l'organisme, les cellules endothéliales et les processus d'angiogenèse sont des partenaires privilégiés retrouvés dans les niches de cellules souches et dans les phénomènes de régénération tissulaire. Outre les effets de la sérotonine dans la régulation du tonus vasculaire¹⁴⁵, de nombreuses études se sont intéressées aux effets angiogéniques de 5-HT. Ainsi, le tissu vasculaire possède un microsystème sérotoninergique fonctionnel avec une capacité de synthèse via TPH1 exprimée par les CMLV et les CE, de transport via SERT exprimé par les CMLV et les CE et une capacité de dégradation via MAO-A également exprimée par les CMLV^{140,141}. Dans différentes lignées de CE humaines et murines, les types de récepteurs 5-HT exprimés ont pu être caractérisés montrant une prédominance de l'expression de 5-HT1B associée à l'expression d'autres récepteurs tels que 5-HT1A, 5-HT1D, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT4 et 5-HT7³³⁴⁻³³⁷.

Des études *in vitro* menées sur différentes lignées de CE humaines ou animales ont permis de préciser les effets de la sérotonine favorisant la prolifération, la croissance tubulaire ainsi que la migration de CE³³⁸⁻³⁴². Les premières études s'étant intéressées aux effets pro-angiogéniques de la sérotonine ont montré que de hautes doses de sérotonine, allant de 200 à 1000 μ M, favorisaient la prolifération de CE aortiques canines ou bovines à travers un effet mitogénique dose-dépendant et étaient abolies en présence d'antagoniste 5-HT2^{339,340}. Cet effet pro-prolifératif de 5-HT a également été confirmé sur des CE humaines issues de veines ombilicales, à une plus faible concentration de 1 μ M et était inhibé en présence d'antagonistes 5-HT2 et 5-HT3³⁴¹. A l'inverse, l'activation par un agoniste sélectif de 5-HT4 était associée à une réduction de prolifération des CE humaines, de manière dose-dépendante en stoppant la progression dans le cycle cellulaire sans apoptose³⁴³. Cependant, de hautes doses d'agoniste inversé de 5-HT4 impactait la viabilité cellulaire³³⁷. Fait intéressant, les effets prolifératifs de la sérotonine sur les CE humaines étaient similaires à l'effet induit par VEGF, suggérant un rôle de facteur pro-angiogénique de la sérotonine³⁴¹. De plus, cette stimulation sérotoninergique n'était pas abolie en présence d'inhibiteur sélectif du VEGFR2, suggérant l'implication d'un effet pro-angiogénique de 5-HT indépendant du couple VEGF /VEGFR2³⁴¹. D'un point de vue mécanistique, il a pu être précisé *in vitro* que la stimulation sérotoninergique dans différentes lignées de CE humaines (c'est-à-dire issues de veines ombilicales, d'artères pulmonaires, microvasculaires, aortiques) entraînait l'activation, de manière dose-dépendante, de nombreuses voies de signalisation similaires à celles activées par le couple VEGF/VEGFR2³³⁴.

Outre l'effet prolifération, l'exposition de 5-HT *in vitro* favorisait, de manière dose-dépendante, la migration tout comme la croissance tubulaire de CE humaines issues de veines ombilicales humaines ou aortiques^{341 338,342}. Pour les CE issues de veines ombilicales humaines, ces effets étaient également inhibés en présence d'antagonistes 5-HT2 et 5-HT3 et étaient indépendants du couple VEGF/VEGFR2³⁴¹. Pour les CE aortiques, il a été démontré que les médiateurs de l'effet 5-HT étaient espèce-dépendants, la migration cellulaire induite par 5-HT étant inhibée par un antagoniste 5-HT1, sans effet d'un antagoniste 5-HT2, dans les

CE humaines, alors qu'à dose équivalente, les effets positifs de 5-HT sur la migration étaient abolis en présence d'antagoniste 5-HT₂ dans les CE bovines^{342,344}. De plus, il a été montré que l'activation du récepteur 5-HT_{1F} par un agoniste favorisait également la migration de CE humaines d'origine glomérulaires³³⁶. A l'inverse des effets favorisant la migration de 5-HT par l'activation des récepteurs 5-HT₁, 2 et 3, l'activation du récepteur 5-HT₄ entraînait une réduction de migration et de formation de tube capillaire de CE humaines³⁴³. Confirmant le rôle inhibiteur du récepteur 5-HT₄ et compte-tenu de son haut niveau d'activité intrinsèque, l'exposition à un agoniste inversé a montré que la réduction de l'activité de 5-HT₄ entraînait une diminution d'adhésion et de migration, de formation de tube capillaire de CE, de manière dose-dépendante, alors que l'exposition à 5-HT était associée à des résultats variables³³⁷. Ainsi, la modulation positive ou négative de l'activité de ce récepteur pouvait être associée aux mêmes effets d'inhibition de migration de CE humaines³³⁷.

Analogue aux effets d'hyperperméabilité vasculaire induits par le VEGF, la sérotonine exerce également des effets favorisant l'angiogenèse à travers une perméabilité augmentée *in vitro* marquée par une expression réduite de protéines de jonction serrée et d'adhésion³⁴⁵. Ces effets pro-angiogéniques de 5-HT étaient également dépendant du récepteur nucléaire orphelin/facteur de transcription TR3 (protéine humaine) ou Nur77 (protéine souris)^{341,345}. De plus, la stimulation de 5-HT₄ par un agoniste facilitait la perméabilité vasculaire avec la formation de jonction intercellulaire³³⁷.

Un autre mode de régulation de l'angiogenèse par la sérotonine concerne la production de monoxyde d'azote (NO), facteur majeur de régulation du tonus vasculaire, mais également de la prolifération endothéliale^{338,346}. Cette production par les CE est contrôlée par la NOS, dont l'expression est régulée par 5-HT_{2B} et l'activation est régulée par 5-HT_{1B}^{338,346}. Ainsi, de manière dose-dépendante, il a été montré *in vitro* que la stimulation par la sérotonine induisait une augmentation de la production de NO³³⁸, pouvant réguler négativement l'angiogenèse³⁴⁶.

Pour confirmer les effets pro-angiogéniques de 5-HT identifiés *in vitro*, le rôle de la sérotonine dans l'angiogenèse a également été investigué *in vivo* en situation saine. A l'aide d'implantation sous-cutanée de pastilles libérant en continu de la sérotonine chez des souris, les effets pro-angiogéniques de 5-HT ont pu être observés dès le 3^{ème} jour à travers la formation de nouveaux vaisseaux, associée à une perméabilité microvasculaire augmentée. Ces effets 5-HT pro-angiogéniques étaient dépendants des récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃, l'utilisation d'antagoniste respectif les abolissant³⁴¹. Par ailleurs, ces effets n'étaient pas abolis en présence d'inhibiteur de VEGFR2 et contrairement à l'angiogenèse induite par VEGF/VEGFR2, les effets pro-angiogéniques de 5-HT étaient transitoires, marqués par une régression des nouveaux vaisseaux à 21 jours³⁴¹. En situation saine, l'implication du récepteur 5-HT_{1F} dans la vascularisation a également été montrée, grâce aux souris KO *Htr1F*, présentant une densité vasculaire diminuée au sein du tissu rénal par rapport aux souris sauvages³³⁶.

L'effet de la stimulation sérotoninergique sur l'angiogenèse a également été exploré à l'aide de modèles pathologiques. Ainsi, dans des modèles animaux d'ischémie cardiaque ou de membre, l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT_{2A} exprimés, entre autres, par les plaquettes et par les CMLV entraînait indirectement l'activation des récepteurs 5-HT_{1B} des CE stimulant l'angiogenèse, à travers une augmentation de la production de NO^{338,347}. De plus, la stimulation du récepteur 5-HT_{2A} exprimé par les CMLV entraînait une vasodilatation artérielle permettant une meilleure perfusion sanguine³³⁸. Par ailleurs, dans un modèle classique d'ischémie aiguë de membres inférieurs, les souris KO *Htr4* entraînait un défaut de

néovascularisation fonctionnelle post ischémie avec une réduction de densité vasculaire et de restauration de flux sanguin, suggérant un rôle crucial stimulant de l'angiogenèse du récepteur 5-HT₄, à l'inverse des résultats *in vitro*³³⁷. Dans un autre modèle, de type inflammatoire et reposant sur l'injection de Carraghénane dans une poche d'air, il a été montré que les souris traitées par un antagoniste 5-HT₃ présentaient une diminution de la néoangiogenèse au niveau du site inflammatoire³⁴⁸. Enfin, en situation néoplasique, la sérotonine a également montré des effets pro-angiogéniques pouvant impliquer différents acteurs tels que les récepteurs 5-HT₁ et 5-HT_{2B} exprimé par les CE ou encore les macrophages et pouvant indirectement participer à la croissance tumorale^{346,349,350}.

Participant indirectement au processus d'angiogenèse, en tant que cellules de soutien et de stabilité du réseau vasculaire, les CMLV sont également des cibles de la sérotonine³⁵¹. Plus précisément, il a été montré *in vitro* que la sérotonine favorisait la prolifération des CMLV, de manière dose-dépendante dès 10 nM avec un effet maximal à 5 µM^{351,352} et diminuait l'apoptose des CMLV³⁵². Ces phénomènes impliquaient l'activation des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2A}³⁵².

Au total, la sérotonine est un facteur impliqué dans la régulation de l'angiogenèse en situation saine et pathologique. Elle exerce son rôle pro-angiogénique tant en favorisant la prolifération, migration et croissance tubulaire des cellules endothéliales qu'en favorisant la perméabilité ou la perfusion du réseau vasculaire, grâce à l'implication des récepteurs 5-HT₁, 2, 3 et 4. Elle favorise également la stabilité du réseau vasculaire nouvellement créé en promouvant la prolifération de cellules musculaires lisses vasculaires via les récepteurs 5-HT_{1B} et 2A.

c) La fluoxétine, une molécule aux propriétés régénératives du SNC, via la sérotonine

(1) La fluoxétine, une molécule favorisant la neurogenèse à l'âge adulte

Suite à la mise en évidence d'une neurogenèse altérée dans les contextes d'exposition au stress et de dépression^{316,353}, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux effets des antidépresseurs, dont les ISRS sur la neurogenèse. Les premières études ayant investigué cette question se sont appuyées sur différentes approches expérimentales réalisées sur des modèles murins avec, d'une part, le marquage de 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU), marqueur capable de s'incorporer dans l'ADN nouvellement synthétisé, dont le type de pulse permet d'apprécier la prolifération, via un court pulse, ou la survie cellulaire, via un long pulse, d'autre part, la caractérisation phénotypique des progéniteurs neuronaux à l'aide d'immunomarquage ou de lignées murines transgéniques³⁵⁴⁻³⁵⁶.

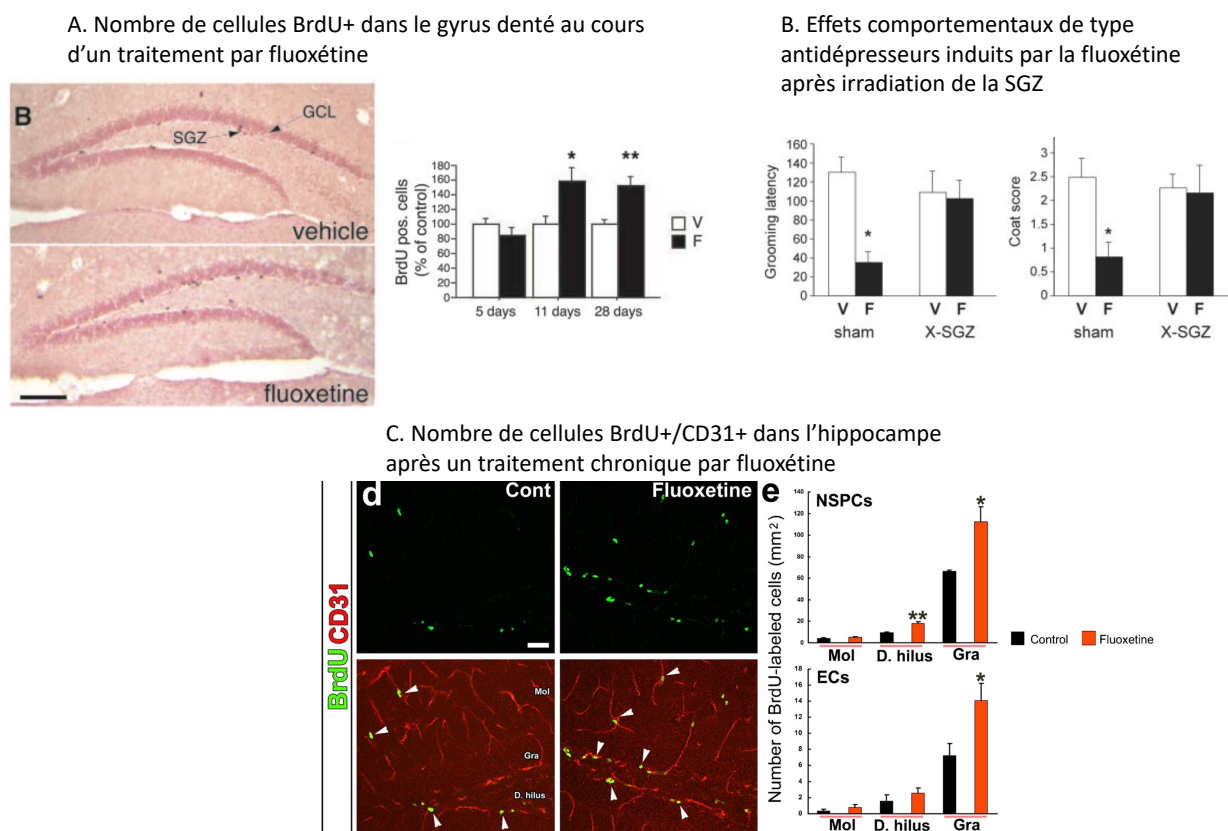
Ainsi, l'équipe de Malberg et al. en 2000 ont été les premiers à montrer qu'un traitement chronique par fluoxétine était associé à une augmentation de la prolifération et de la neurogenèse hippocampique, résultats confirmés ultérieurement par d'autres équipes (**Figure 21A**)^{316,354-360}. Plus précisément, une administration de fluoxétine, de 5 mg/kg à 22 mg/kg, pendant 7 jusqu'à 28 jours de traitements consécutifs de traitement, s'associait un nombre augmenté et stabilisé de cellules BrdU+, co-exprimant des marqueurs spécifiques de progéniteurs neuronaux, dans la zone subgranulaire de l'hippocampe^{316,317,354-359,361}. A contrario, une administration unique ou subaiguë, avec 5 jours consécutifs de fluoxétine,

n'entraînait aucun changement significatif (**Figure 21A**), suggérant que les effets de la fluoxétine, favorisant une prolifération contrôlée lors de la neurogenèse hippocampique, nécessitent une administration prolongée de la molécule,^{328,329,354,356,357,359}. De plus, ces effets pro-prolifératifs de la fluoxétine étaient perdus après un mois d'arrêt de traitement, suggérant un effet transitoire seulement en cas d'exposition soutenue à la molécule³⁵⁵. Toutefois, des études ont mis en évidence que les effets prolifératifs de la fluoxétine sur la neurogenèse hippocampique étaient dépendants de l'âge, ces effets étant absents chez des souris âgées, ou encore de la souche murine^{317,362,363}. Fait intéressant, il a également pu être démontré que la fluoxétine ciblait spécifiquement, parmi les CSPNs, la prolifération des progéniteurs neuronaux, de type 2a et 2b, à l'aide d'une augmentation de leur taux de division symétrique, sans effet sur les cellules souches neuronales de type 1 (**Figure 20**),³⁵⁵. Ces résultats ont été confirmés *in vitro*, la fluoxétine induisant une augmentation de la prolifération uniquement de progéniteurs neuronaux les plus différenciés³⁵⁷.

Associés à l'augmentation de prolifération cellulaire, les effets chroniques de la fluoxétine favorisant la neurogenèse hippocampique impliquaient, également, une survie augmentée de ces nouveaux neurones objectivée par un nombre augmenté de cellules BrdU+ à distance du pulse de BrdU^{317,329,354,355,359,364}. De plus, le traitement prolongé par fluoxétine favorisait la maturation de ces nouveaux neurones, via une accélération des étapes précoces de la maturation, impliquant une diminution plus rapide du marqueur d'immaturité doublecortine au profit de l'expression de marqueur de maturité neuronale, NeuN³⁵⁹. Dans certaines études, la distribution phénotypique entre neurones matures et cellules gliales était retrouvée inchangée avec une morphologie viable de ces nouveaux neurones, suggérant une absence d'effet pro-différenciant de la fluoxétine^{329,354-356,359}. En opposition, d'autres auteurs ont pu mettre en évidence une augmentation modérée du taux de neurones matures et d'une distribution prédominante du phénotype neuronal par rapport au phénotype glial après un traitement chronique par fluoxétine^{364,365}. De plus, dans un modèle rongeur et de primate non humain, il a été montré qu'un processus de « dématuration » était induit par la fluoxétine impliquant un changement de phénotype fonctionnel de neurones matures vers un phénotype moins mature^{366,367}, pouvant être en lien avec les effets de la fluoxétine favorisant la plasticité neuronale et synaptique³⁵⁹.

Fait intéressant, il a été mis en évidence que ces effets pro-neurogenèse de la fluoxétine concernant la prolifération, survie et maturation neuronales, sous-tendent les effets comportementaux de type antidépresseur induits également par un traitement prolongé^{356,359,364,368}. A la suite d'irradiation cérébrale localisée permettant l'ablation sélective des progéniteurs neuronaux dans l'hippocampe, il a été montré que les effets d'un traitement chronique par fluoxétine sur la neurogenèse hippocampique étaient abolis, s'associant à une perte de certains effets comportementaux de type antidépresseur (**Figure 21B**),^{356,359,364}.

Figure 21 : Effets chroniques de la fluoxétine sur la neurogenèse et l'angiogenèse hippocampiques sous-tendant les effets comportementaux de type antidépresseur



Sources : Santarelli et al., 2003³⁵⁶ et Mannari et al., 2014³⁶⁹

Abréviations : Cont (contrôle), ECs (cellules endothéliales), F (fluoxétine), D. hilus (hilus denté), GCL ou Gra (couche de cellules granulaires), Mol (couche moléculaire), NSPCs (CSPNs), SGZ (zone subgranulaire), V (véhicule), X-SGZ (irradiation de la zone subgranulaire)

Par ailleurs, en situation saine, une administration chronique jusqu'à 4 semaines de fluoxétine n'entraînait pas de modification du nombre de cellules BrdU+ dans la zone subventriculaire^{354,356}. Par contre, un traitement de 6 à 9 semaines de fluoxétine était associé à une diminution du nombre de cellules BrdU+ dans cette zone³⁷⁰.

Certains mécanismes d'action, sous-tendant les effets de la fluoxétine favorisant la neurogenèse hippocampique, ont pu être en partie identifiés. Ainsi, il a pu être démontré que les effets prolifératifs de progéniteurs neuronaux et favorisant la survie neuronale induits par la fluoxétine étaient dépendants de la sérotonine. En effet, d'une part, ces effets étaient abolis chez les souris *Tph2*^{-/-}³⁷¹ et sont similaires aux modèles génétiques murins ayant de hautes concentrations extracellulaires de 5-HT présentant également une prolifération accrue de CSPN^{326,327}. Grâce aux modèles murins de KO de récepteurs 5-HT, il a été montré que les effets de la fluoxétine sur la prolifération étaient abolis en l'absence de l'expression génique de *Htr1A*³⁵⁶. A l'inverse, il a été précisé que les effets de la fluoxétine sur la neurogenèse n'impliquaient pas le récepteur 5-HT3A, ces effets prolifératifs étant maintenus chez les souris KO *Htr3A*³³⁰. De plus, le processus de « dématuration » induit par la fluoxétine était, quant à lui, aboli dans un modèle murin KO *Htr4*^{366,372}. Sous-tendant ses effets prolifératifs, il a été

montré que la fluoxétine pouvait réduire l'expression de p21Cip1, inhibiteur du cycle cellulaire, sans modifier pour autant la durée du cycle cellulaire et qu'elle induisait une diminution du signal BMP4, guidant habituellement les progéniteurs neuronaux vers le statut de quiescence^{314,365}. Les effets de la fluoxétine favorisant la survie neuronale pourraient impliquer le gène anti-apoptotique *Bcl-2*, dont l'expression a été retrouvée augmentée par la fluoxétine^{314,373}. De plus, il a été montré, *in vivo*, que le traitement chronique par fluoxétine induisait une augmentation de l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et de son récepteur TrkB, ainsi que le facteur de transcription CREB, dans différentes régions cérébrales³⁷⁴⁻³⁷⁷. Ces résultats ont été confirmés *in vitro*, avec une augmentation de la sécrétion de BDNF induite par la fluoxétine sur des cultures d'astrocytes³⁷⁸. A l'inverse, la diminution du signal lié à BMP4, induite par la fluoxétine, peut impacter négativement les processus de différenciation neuronale³¹⁴.

Au total, la fluoxétine, lors d'une administration nécessairement prolongée, démontre des effets favorisant la neurogenèse hippocampique à travers une action ciblant les progéniteurs neuronaux, sans atteinte des cellules souches neuronales et permettant une augmentation ou accélération de la prolifération, de la survie neuronale, ainsi que de la maturation neuronale. Participant en partie aux effets comportementaux de type antidépresseur, les effets favorisant la neurogenèse de la fluoxétine sont dépendants de la sérotonine, ainsi que des récepteurs 5-HT1A et 5-HT4.

(1) La fluoxétine, une molécule stimulant l'angiogenèse cérébrale

S'appuyant, d'une part, sur le rôle neurotrophique du VEGF ayant une action directe sur les progéniteurs neuronaux et une action indirecte, via les cellules endothéliales, soutenant la neurogenèse et, d'autre part, sur la forte corrélation positive entre la survenue d'une pathologie cardiovasculaire et d'un trouble dépressif, l'implication du VEGF dans les modes d'action des antidépresseurs a été investiguée (Revue Nowacka et al., 2012³⁷⁹).

En 2007, les chercheurs Warner-Schmidt et Duman ont été les premiers à montrer, chez le rat, que la signalisation via VEGF et de son récepteur VEGFR2 était indispensable pour induire, d'une part, les effets pro-neurogenèse de la fluoxétine dans l'hippocampe et, d'autre part, les effets comportementaux de type antidépresseur de la fluoxétine³⁶¹. Plus précisément, plusieurs études ont montré qu'à l'inverse d'un traitement subaigu, un traitement chronique de 14 jours, par fluoxétine de 5mg à 10mg/kg, était associé à une augmentation de l'expression génique et de la densité protéique de VEGF dans l'hippocampe^{360,361,380}. Associé à l'augmentation du signal lié à VEGF, un traitement chronique par fluoxétine entraînait, l'augmentation de cellules BrdU+ dans la zone subgranulaire comprenant donc la prolifération de progéniteurs neuronaux³⁶¹. D'autre part, ce traitement chronique entraînait une augmentation du nombre de cellules BrdU+ exprimant des marqueurs endothéliaux dans le gyrus denté, suggérant un effet favorisant l'angiogenèse cérébrale, via une stimulation de la prolifération de cellules endothéliales^{361,381}. Chez la souris, il a été montré qu'un traitement chronique, par fluoxétine, entraînait une augmentation dynamique de la densité vasculaire dans le gyrus denté en favorisant le sprouting à partir de cellules endothéliales formant les microvaisseaux (**Figure 21C**),³⁶⁹.

En utilisant une approche pharmacologique inhibant localement la signalisation VEGF/VEGFR2, il a été mis en évidence une perte des effets prolifératifs induits par la fluoxétine sur l'ensemble des cellules BrdU+ dans l'hippocampe, incluant les progéniteurs

neuronaux et les cellules endothéliales ³⁶¹. Fait intéressant, en l'absence d'une signalisation fonctionnelle de VEGF, les effets comportementaux de type antidépresseur de la fluoxétine ou de la desipramine étaient abolis en situation saine ou lors dans un modèle de dépression induite ^{361,380}. Ces résultats ont été confirmés, dans un modèle murin, avec un knockdown de VEGF localisé dans le gyrus denté par un petit ARN interférent (siARN), montrant une perte des effets induits par un traitement chronique par fluoxétine sur la neurogenèse hippocampique et des effets comportementaux de type antidépresseur ³⁶⁰.

Les effets de la fluoxétine favorisant l'angiogenèse cérébrale, via l'expression augmentée de VEGF dans l'hippocampe, pouvaient être modulés par les récepteurs 5-HT1A et 5-HT4 ^{380,382}, témoignant de l'implication du système sérotoninergique dans les effets angiogéniques des ISRS.

Donc, un traitement chronique par fluoxétine présente, en situation saine, des propriétés favorisant le couplage d'angiogenèse et de neurogenèse hippocampiques, soutenu par une expression augmentée de facteurs trophiques tels que le BDNF et le VEGF. En prenant également en considération les propriétés anti-inflammatoires de cette molécule ³⁷³, les bénéfices de ce traitement dans des modèles d'atteintes ou de blessures encéphaliques ont été investigués.

(2) La fluoxétine favorise la réparation du SNC

En tant que traitement antidépresseur, dont les effets comportementaux sont dépendants en partie de la neurogenèse et de l'angiogenèse hippocampiques, les effets de la fluoxétine ont été largement investigués dans des modèles murins de dépression induite ou d'exposition chronique au stress. Ainsi, ces modèles induisaient une diminution de la neurogenèse hippocampique qu'un traitement prolongé par fluoxétine restaurait, en favorisant également la gliogenèse ^{363,368,383-385}. Analogue à la neurogenèse hippocampique, un traitement prolongé par fluoxétine restaurait également une neurogenèse dans la zone subventriculaire, initialement diminuée par un modèle d'exposition chronique au stress ³⁸⁶. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme grâce à une analyse en immunomarquage, réalisée en *post mortem* sur des cerveaux de patients ayant eu un EDC traité par ISRS. Ces études montraient un taux augmenté de progéniteurs neuronaux, de cellules en division dans l'hippocampe, ainsi qu'une augmentation de la densité de capillaires chez les patients traités par ISRS ^{387,388}.

Les effets favorisant la neurogenèse dans d'autres conditions pathologiques ont également été démontrés. En effet, de manière similaire, dans des modèles murins de diabète spontané ou induit, il a été mis en évidence qu'un traitement chronique par fluoxétine restaurait également les fonctions de prolifération et différenciation neuronale, impactées dès les stades précoces de diabète ³⁸⁹.

Dans les pathologies neurodégénératives impliquant des altérations dans la neurogenèse, des effets neuro-protecteurs et soutenant la neurogenèse de la fluoxétine ont pu être mis en évidence. Ainsi, dans un modèle transgénique murin de maladie d'Alzheimer, l'administration prolongée de la fluoxétine empêchait la réduction de prolifération cellulaire hippocampique et améliorait les performances mnésiques contextualisées des souris ³⁹⁰. De la même manière, dans un modèle transgénique murin de maladie de Parkinson, un traitement prolongé par fluoxétine rétablissait les proliférations et différenciations neuronales hippocampiques, associées à une augmentation des taux de BDNF ³⁹¹. Enfin, dans un modèle murin de maladie de Huntington, un traitement chronique par fluoxétine était

associé à une amélioration de la prolifération hippocampique, des fonctions mnésiques et des symptômes comportementaux de type dépressif, habituellement aggravés ou induits par la maladie ³⁹².

Outre l'impact positif de la fluoxétine sur la neurogenèse hippocampique, les effets de la fluoxétine sur la réparation cérébrale, notamment vasculaire, ont été étudiés, à l'aide de modèles animaux d'ischémie cérébrale (Revue Siepmann, 2015 ³⁹³). Une méta-analyse, publiée en 2014 et portant sur 44 études précliniques de modèle d'ischémie cérébrale, a mis en évidence qu'un traitement antidépresseur, dont les ISRS, était associé à une réduction du volume d'infarctus de 27%, une récupération fonctionnelle favorisée, objectivée à l'aide de scores neurologiques et par une amélioration de 50% des performances cognitives et sensorimotrices, ainsi qu'à une neurogenèse augmentée ³⁹⁴. De plus, dans un modèle rongeur d'ischémie cérébrale globale, un traitement chronique par fluoxétine était associé à un taux de survie augmenté de 60% durant le premier mois post ischémie ³⁹⁵. Plusieurs mécanismes d'action des ISRS participent aux effets bénéfiques dans la récupération structurelle et fonctionnelle post accident vasculaire cérébrale (AVC), identifiés à l'aide de modèles animaux. Plus précisément, dans des modèles de rongeur avec occlusion d'artère cérébrale moyenne, il a été montré qu'un traitement par fluoxétine, durant la phase précoce post ischémie, atténuait les processus inflammatoires avec, notamment une diminution d'activation microgliale, d'infiltration de neutrophiles et de marqueurs pro-inflammatoires ³⁹⁶. A distance de l'ischémie, les effets anti-inflammatoires de la fluoxétine se maintenaient avec une réduction persistante de l'activation et prolifération microgliales, une diminution de l'infiltration macrophagique, une réduction de l'activité de MMP et de l'expression de cytokines inflammatoires, ainsi qu'une diminution de la perméabilité de la BHE ^{395,397}. De plus, un traitement chronique par fluoxétine participe à la régénération neuronale à travers, d'une part, la stimulation déjà décrite de la neurogenèse hippocampique dont les nouveaux neurones peuvent migrer jusqu'aux zones cérébrales endommagées et, d'autre part, en favorisant la survie neuronale des neurones présents dans la zone d'infarctus ^{393,395-397}. Cette neurogenèse induite par la fluoxétine était associée à une amélioration des fonctions cognitives, notamment de mémoire spatiale, les effets pro-cognitifs étant abolis en cas de blocage de la neurogenèse malgré le maintien du traitement par fluoxétine ³⁹⁸. Associée à ses effets neurotrophiques, l'administration prolongée de cette molécule post ischémie stimulait l'angiogenèse cérébrale via l'augmentation de facteurs pro-angiogéniques, tels que le couple VEGF/VEGFR2, associée à une augmentation de la prolifération de cellules endothéliales et à la diminution de la mort par apoptose de cellules endothéliales ^{397,399}. Enfin, un traitement par fluoxétine post ischémie permettait une amélioration de la régulation de la circulation sanguine cérébrale à travers des effets de vasodilatation et d'augmentation des niveaux du facteur 1α induit par l'hypoxie (HIF 1α) ^{393,399-401}. Fait intéressant, les effets positifs induits par la fluoxétine, en diminuant la neuroinflammation et en favorisant la survie neuronale par inhibition de l'apoptose, étaient également retrouvés dans des modèles rongeurs d'hémorragie cérébrale ^{402,403}.

Sur le plan clinique, dès 2011, porté par des résultats préliminaires montrant une récupération clinique améliorée par un traitement par fluoxétine de patients atteints d'AVC ³⁹³, l'ERC FLAME (fluoxetine for motor recovery after acute ischemic stroke), mené sur 118 patients avec un AVC compliqué d'un déficit moteur modéré à sévère, montrait une nette amélioration de la récupération fonctionnelle motrice après 3 mois dans le groupe traité par fluoxétine ⁴⁰⁴. Cependant, les études ultérieures retrouvaient des résultats contradictoires du

fait d'une grande hétérogénéité d'études incluant les critères d'inclusion, le schéma expérimental de traitement, la durée de suivi ou encore les échelles d'évaluation du déficit neurologique^{393,405,406}. En effet, certaines études rapportaient des bénéfices d'un traitement par ISRS sur la récupération fonctionnelle de déficit neurologique, notamment lorsqu'ils étaient introduits précocement au décours du 1er mois post AVC^{393,405,407-409}. A l'inverse, d'autres études ne retrouvaient pas de différence sur la récupération fonctionnelle post AVC entre les groupes traités par ISRS et les groupes placebos^{406,410-412}. Ainsi, d'après les dernières recommandations américaines de prise en charge d'AVC, les traitements par ISRS sont actuellement préconisés pour la prise en charge de dépression post AVC mais pas dans celle de récupération neurologique⁴¹³.

Les potentiels effets thérapeutiques des antidépresseurs ont également été investigués dans des modèles murins de traumatisme crânien, à l'aide d'un impact cortical contrôlé. Ainsi, après un traumatisme crânien, un traitement chronique par fluoxétine entraînait une augmentation de la neurogenèse hippocampique, sans amélioration de la récupération fonctionnelle motrice ou mnésique⁴¹⁴. A contrario, un traitement chronique par l'antidépresseur imipramine, après un traumatisme crânien, était, quant à lui, associé à une amélioration des fonctions cognitives et à une augmentation de la neurogenèse hippocampique⁴¹⁵.

Les effets de la fluoxétine ont également été investigués dans des modèles de rongeurs de compression de moelle épinière. Il a été mis en évidence qu'un traitement prolongé par fluoxétine post compression était associé à de meilleures récupérations motrices, corrélant positivement avec une plasticité neuronale augmentée⁴¹⁶. De plus, la fluoxétine diminuait la neuroinflammation tant en inhibant l'activation microgliale permettant d'empêcher la mort des cellules de soutien, les oligodendrocytes, qu'en inhibant les MMPs permettant d'empêcher la rupture de la BHE^{417,418}.

Enfin, les effets neuro-protecteurs de la fluoxétine ont été étudiés dans un modèle murin d'arrêt cardiaque, entraînant une ischémie cérébrale globale suivie d'une réanimation cardiopulmonaire. Les auteurs ont montré qu'une administration unique de fluoxétine post arrêt cardiaque était associée à une diminution de perte neuronale dans le putamen avec des déficits sensorimoteurs diminués comparés aux souris traitées par placebo⁴¹⁹.

En résumé, la fluoxétine est un traitement antidépresseur dont le principal mode d'action consiste à renforcer le signal sérotoninergique dans le SNC après une exposition nécessairement prolongée, entraînant de nombreux changements neurobiologiques adaptatifs. Ainsi, un traitement chronique par fluoxétine, à travers l'augmentation du signal 5-HT, démontre des propriétés régénératives en 1) favorisant l'expression de facteurs trophiques agissant en synergie tels que le BDNF et le VEGF, 2) promouvant la neurogenèse hippocampique et plus particulièrement la prolifération de progéniteurs neuronaux, la survie de ces nouveaux neurones, ainsi que leur maturation et 3) stimulant l'angiogenèse cérébrale soutenant activement le processus de neurogenèse. De plus, il a été démontré que les effets pro-angiogenèse et pro-neurogenèse de la fluoxétine sont dépendants de la sérotonine et plus précisément de l'activation des récepteurs 5-HT1A et 5-HT4. L'ensemble de ces effets trophiques et cellulaires sous-tendent en partie les effets comportementaux de type antidépresseur et permettent de restaurer ces fonctions trophiques dans des modèles animaux de dépression induite.

Au-delà du modèle de la dépression, les effets de la fluoxétine favorisant la neurogenèse ont été démontrés dans d'autres modèles de pathologies centrales tels que le

diabète ou les pathologies neurodégénératives entraînant une préservation ou une amélioration de fonctions cognitives notamment mnésiques. Du fait de son action sur la neurogenèse, l'angiogenèse et ses propriétés immunomodulatrices, les effets prometteurs de la fluoxétine ont été investigués dans des modèles de blessure cérébrale de type vasculaire ou traumatique. Bien que la fluoxétine ait induit les effets trophiques cérébraux attendus, ces résultats n'étaient pas systématiquement associés à une amélioration de récupération fonctionnelle ne permettant pas de recommander, par exemple, la fluoxétine dans la prise en charge clinique d'AVC.

Les effets trophiques de la fluoxétine dans le SNC sont donc dans la continuité directe du rôle crucial et complexe de la sérotonine dans la neurogenèse et l'angiogenèse. Ces effets trophiques, induits par 5-HT, sont à l'œuvre dès l'embryogenèse, lors de la mise en place du SNC ou du tissu vasculaire, et se poursuivent lors du maintien de ces tissus, à l'âge adulte. De manière similaire à d'autres facteurs de croissance, la sérotonine participe positivement à la régulation des cascades de cellules souches en favorisant plus spécifiquement la prolifération, la différenciation ou encore la survie cellulaire des progéniteurs cellulaires, sans effet direct sur les cellules souches. Fait intéressant, au cours de l'embryogenèse, la sérotonine est également impliquée dans le développement d'autres organes, pour qui ses effets trophiques se poursuivent en post natal et peuvent donc faire l'objet de modulation positive par les ISRS.

2. La fluoxétine, via la sérotonine, favorise la régénération d'autres tissus ?

a) *Implication de la sérotonine dans l'hématopoïèse embryonnaire chez la souris*

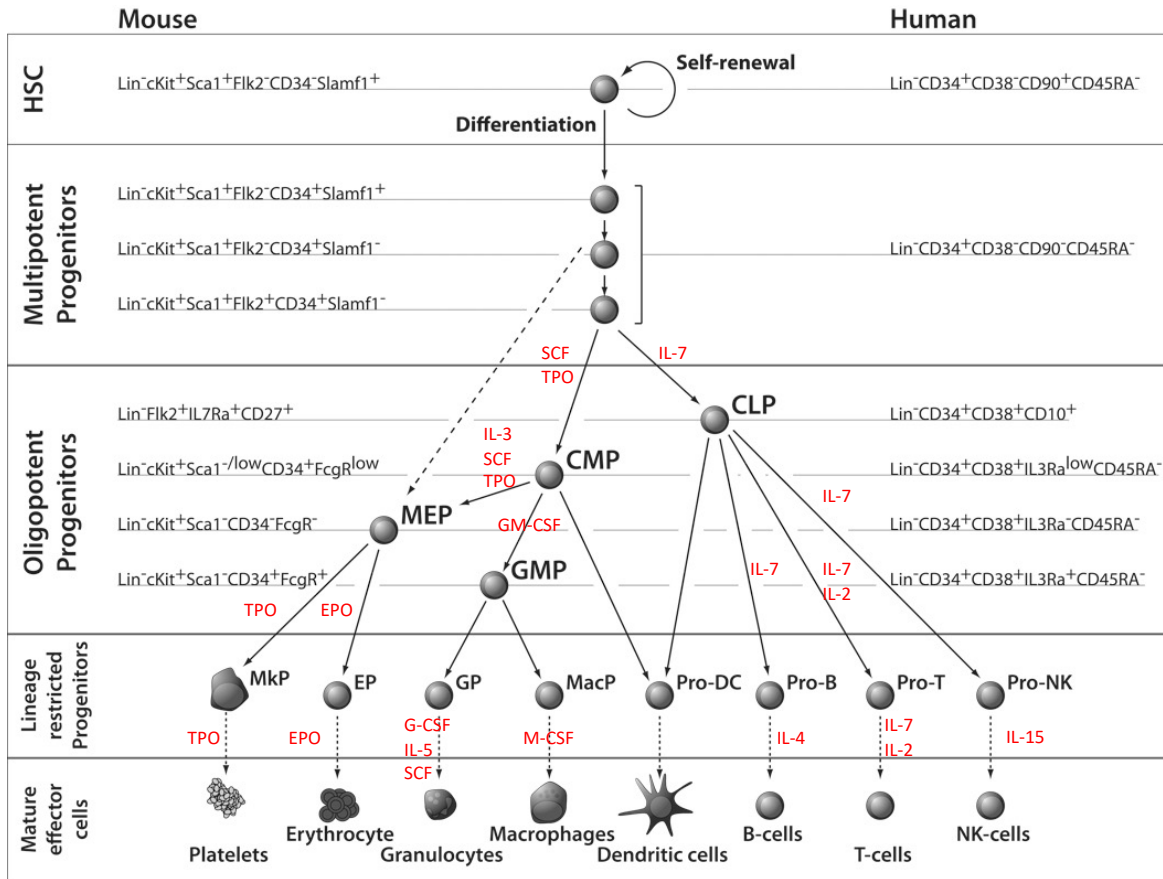
L'hématopoïèse embryonnaire et fœtale, chez les vertébrés, s'effectue en plusieurs étapes, avec différentes localisations anatomiques (Revue de Baron et al 2012, ⁴²⁰). Chez la souris, les premières cellules érythroïdes primitives se forment dans des îlots sanguins, dans le sac vitellin, dès E7,5 ⁴²⁰. Puis, les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) émergent dans la région aorto-gonado-mésonephros (AGM), dès E10,5, avant de migrer au niveau du foie fœtal à E14,5, pour finir par coloniser la moelle osseuse à E18,5 ⁴²⁰.

Dans l'AGM, chez la souris, il a été montré que la sérotonine était synthétisée par les cellules endothéliales adjacentes, exprimant TPH2 ⁴²¹. Sa libération entraînait l'inhibition de la signalisation pro-apoptotique, liée à Akt/FOXO1, favorisant ainsi la survie des CSPH ⁴²¹. Le rôle de la sérotonine, dérivée de TPH2, dans la formation embryonnaire de CSPH, a également été confirmé dans un modèle de poisson-zèbre ^{422,423}. Sous l'effet de facteur de stress hypoxique, seule la sérotonine, dérivée de TPH2, augmentait et favorisait l'expansion et la mobilisation des CSPH dans l'AGM, via l'activation de l'axe de stress hypothalamo-hypophyso-surrénalien, modulant les niveaux de cortisol et du récepteur au glucocorticoïdes ^{422,423}. De plus, le rôle de la sérotonine, cette fois-ci dérivée de TPH1, a également été montré lors de l'hématopoïèse dans le foie fœtal et, plus particulièrement, lors de l'érythropoïèse ⁴²⁴. En effet, il a été montré que les précurseurs érythroïdes immatures, localisés dans le foie fœtal à E13,5, exprimaient fortement TPH1, ainsi que SERT et le récepteur 5-HT2A. De plus, les embryons *Tph1*^{-/-} montraient une altération de l'érythropoïèse, marquée par un nombre augmenté de progéniteurs pro-érythroblastiques immatures au détriment d'un nombre réduit d'érythroïdes matures, suggérant un rôle autocrine de la sérotonine dérivée de TPH1 dans la maturation terminale de l'érythropoïèse ⁴²⁴.

b) Rôle de la sérotonine dans l'hématopoïèse à l'âge adulte

L'hématopoïèse, à l'âge adulte, est un processus complexe, capable de générer l'ensemble des cellules matures du sang et du système immunitaire. Elle se déroule dans la moelle osseuse et repose sur des CSPH, situées dans une niche hautement régulée⁴²⁵. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules souches multipotentes et sont les seules cellules, de cette hiérarchie hématopoïétique, à avoir la capacité de s'autorenouveler (**Figure 22**)⁴²⁵. Elles peuvent également se différencier en progéniteurs multipotents, perdant cette capacité d'autorenouveaulement, et qui, à travers des étapes successives de différenciation et d'engagement dans différentes lignées cellulaires, vont générer l'ensemble des cellules matures (**Figure 22**)⁴²⁵. La complexité de cette cascade, hautement hiérarchisée, a pu être mise en évidence, grâce aux techniques d'analyse, en cytométrie de flux, de leur phénotype spécifique de marqueurs membranaires (**Figure 22**), de leur capacité à former des colonies de lignées cellulaires, *in vitro*, ou encore, de leur capacité à reconstituer une hématopoïèse complète, après transplantation chez des souris préalablement irradiées⁴²⁵. De nombreux facteurs sont impliqués dans la régulation des différentes étapes de l'hématopoïèse, tels que les facteurs de croissance hématopoïétiques comme l'EPO, la thrombopoïétine (TPO), le facteur de cellules souches (SCF), les facteurs stimulant les colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF), de granulocytes (G-CSF), de macrophages (M-CSF) ou encore les interleukines IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7 ou encore IL-15 (**Figure 22**)⁴²⁶.

Figure 22 : Schéma représentatif des différentes étapes de l'hématopoïèse adulte, des phénotypes d'immunomarquage des CSPH ainsi que des facteurs de régulation spécifiques de lignée



Sources : Adaptées de Seita et al 2010 et Kaushansky 2006 ^{425,426}

Abréviations : HSC (cellules souches hématopoïétiques), CLP (progéniteurs lymphoïde commun), CMP (progéniteurs myéloïdes communs), MEP (cellules érythroïdes/mégacaryocytes), GMP (progéniteurs granulocytes/macrophages), MkP (progéniteurs mégacaryocytes), EP (progéniteurs érythrocytes), GP (progéniteurs granulocytes), MacP (progéniteurs macrophages), DC (cellules dendritiques), NK (natural killer), Lin (marqueur de lignée), SCF (facteur cellules souches), TPO (thrombopoïétine), GM-CSF (facteur stimulant les colonies de macrophages et granulocyte), G-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes), M-CSF (facteur stimulant les colonies de macrophages)

Dans la continuité de son implication lors de l'hématopoïèse embryonnaire, le rôle de la sérotonine, dans la régulation de l'hématopoïèse adulte, a été exploré, au niveau des différentes lignées hématopoïétiques. Yang et al ont montré, *ex vivo*, à partir de cellules CD34+, issues du sang de cordon ombilical humain, que l'exposition de sérotonine à 200nM augmentait l'expansion de progéniteurs multipotents CD34+/CD38- et des progéniteurs myéloïdes communs, ainsi que leur capacité à former des colonies formant des lignées myéloïdes, érythroïdes ou mégacaryocytes ⁴²⁷. De plus, la repopulation cellulaire chez des souris diabétiques, irradiées puis transplantées avec des cellules hématopoïétiques humaines CD45+, était augmentée lorsque les cellules CD45+ avaient été préalablement traitées par sérotonine, lors de l'expansion *in vitro* ⁴²⁷. Plus récemment, à partir d'analyse

transcriptomique réalisée sur des CSH *in vitro*, il a été montré que les régulateurs de l'expansion de CSH corrélaient avec les schémas d'expression à l'échelle du génome, permettant d'identifier de nouveaux facteurs ⁴²⁸. Ainsi, de manière similaire aux autres facteurs stimulants comme le VEGF, l'EGF ou le PDGF, il a été mis en évidence que la sérotonine promouvait également l'expansion de progéniteurs multipotents et de CSH, à travers une signalisation liée à l'activation d'un GPCR, et, plus particulièrement, de la famille 5-HT2 ⁴²⁸. Enfin, il a été montré que le récepteur 5-HT2B était exprimé seulement par les progéniteurs hématopoïétiques c-Kit⁺ et non par les cellules c-Kit⁻. *In vivo*, l'inactivation de ce récepteur, chez les souris KO Htr2B, était associée à une altération de la composition de la moelle osseuse, en aval de ces progéniteurs c-Kit⁺ ¹⁷⁸.

Dès les années 1970, le rôle stimulant de la sérotonine a été suggéré, notamment dans l'érythropoïèse. En effet, chez la souris, la sérotonine stimulait l'érythropoïèse à travers l'augmentation des niveaux circulants d'EPO, synthétisée par le rein, avec des effets abolis après inactivation d'EPO ou de néphrectomie ⁴²⁹. Des études plus récentes ont précisé le rôle crucial de la sérotonine dans la régulation d'une érythropoïèse fonctionnelle et dans la survie des hématies. Dans la continuité de la caractérisation de l'expression du récepteur 5-HT2B par les progéniteurs c-kit⁺, il a été montré, *in vitro*, que le blocage pharmacologique de ce récepteur entraînait une diminution de la capacité des cellules progéniteurs c-Kit⁺ murines et CD34⁺ humaines de former des colonies de lignées érythroïdes ¹⁷⁸. Cependant, chez les souris KO 5-HT2B, l'absence de ce récepteur, *in vivo*, n'était pas associée à des anomalies quantitatives ou fonctionnelles des globules rouges matures ¹⁷⁸. Analogue à l'expression caractérisée lors de l'érythropoïèse embryonnaire, il a été montré que les progéniteurs pro-érythroblastiques immatures (CD71⁺/TER119⁻) exprimaient TPH1, SERT et le récepteur 5-HT2A ⁴²⁴. Au sein de ces progéniteurs, il a été mis en évidence une régulation dynamique du signal 5-HT ⁴²⁴. D'une part, le SCF a été identifié comme facteur inhibant l'expression de TPH1, diminuant le signal 5-HT. D'autre part, l'EPO a montré un effet stimulant, en activant la voie JAK/STAT, de l'expression de TPH1 et de l'expression du récepteur 5-HT2A, associé à une diminution de l'expression de SERT, le tout résultant en un renforcement du signal autocrine de 5-HT ⁴²⁴. Plus précisément, l'activation de 5-HT2A par la sérotonine est cruciale, lors de la transition vers l'étape pro-érythroblastique, en régulant le cycle cellulaire et en protégeant de l'apoptose, cette transition étant compromise dans la moelle osseuse de souris *Tph1*^{-/-} ou KO *Htr2A* ⁴²⁴. Par ailleurs, il a également été montré, en aval de cette transition, que les précurseurs érythroïdes (CD71⁻/TER119⁺) exprimaient également les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B sans 5-HT2C ^{142,424}. *In vitro*, la stimulation par de la sérotonine 1 μM ou des agonistes 5-HT2 augmentait les capacités de prolifération des précurseurs érythroïdes ¹⁴². De plus, l'activation des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B était nécessaire pour aboutir à la différenciation terminale de l'érythropoïèse ¹⁴². A l'aide des souris *Tph1*^{-/-}, il a été mis en évidence, *in vivo*, qu'en l'absence de 5-HT périphérique, les hématies avaient une demi-vie plus courte associée à des anomalies morphologiques, les rendant plus sensibles au stress cellulaire et à la phagocytose macrophagique, l'ensemble se traduisant par une anémie macrocytaire modérée ¹⁴². La transplantation de moelle osseuse, issue de souris *Tph1*^{-/-} sur des souris sauvages, entraînait également un phénotype d'anémie chez la souris receveuse ⁴²⁴. Confirmant le rôle fondamental de la sérotonine dans l'efficacité de l'érythropoïèse, les souris *Tph1*^{-/-}, exposées à de la phénylhydrazine, modèle provoquant une anémie aiguë avec normalisation en 21 jours de l'hémoglobine, présentaient une anémie prolongée excessive avec un défaut de réticulocytes ⁴²⁴. Enfin, *in vitro*, la sérotonine favorisait également la survie des globules

rouges en les protégeant de la sénescence à travers un effet antioxydant, sans impliquer les récepteurs 5-HT, puisqu'aucun d'entre eux n'est exprimé par les globules rouges matures¹¹⁵.

Le rôle de la sérotonine a également été exploré au niveau de la mégacaryopoïèse, notamment aux stades terminaux de la cascade. En effet, l'apoptose est un processus essentiel, lors de la différenciation terminale de mégacaryocytes, assurant la formation de pro-plaquettes à travers une activation localisée de caspase 3, ainsi que la sénescence programmée des mégacaryocytes restants, via une activation diffuse de caspase 3⁴³⁰. A l'instar de la machinerie sérotoninergique exprimée par les plaquettes matures, il a pu être mis en évidence que la capture, le catabolisme de la sérotonine et l'expression de récepteurs 5-HT2 étaient présents dans une lignée de cellules mégacaryoblastiques^{431,432}. Ainsi, la sérotonine exerçait un effet anti-apoptotique sur ces mégacaryoblastes, à travers une diminution de la voie liée à la caspase 3, et ces effets étaient abolis en présence d'antagoniste 5-HT2⁴²⁷. De plus, il a été montré, *in vitro*, que la sérotonine stimulait la formation de colonies de mégacaryocytes murins de manière dose-dépendante, avec un pic maximal à 100 nM, via l'activation de récepteur 5-HT2⁴³². Les effets mitogéniques de 5-HT étaient synergiques avec d'autres facteurs comme IL-3, IL-6, EPO et PDGF⁴³². *In vivo*, les souris KO *Htr2B* présentaient une diminution du nombre de plaquettes circulantes¹⁷⁸. Ainsi, il a été suggéré que l'effet de 5-HT, favorisant la prolifération de mégacaryocytes murins, était régulé par le récepteur 5-HT2B quand l'effet sur la différenciation terminale était régulé par le récepteur 5-HT2A par l'intermédiaire de la production de NO⁴³³. Cependant, ces mécanismes d'action n'ont pas été clairement démontrés à ce jour⁴³³. Chez l'homme, de manière similaire aux effets stimulants de TPO, 5-HT favorisait, *in vitro*, la formation de colonies de mégacaryocytes et la prolifération de lignées mégacaryoblastiques, de manière dose-dépendante avec un pic maximal à 200 nM⁴³⁴. L'expression des récepteurs 5HT2A, 2B, 2C a pu être caractérisée dans différentes lignées de mégacaryoblastiques humaines et les effets stimulants de 5-HT étaient abolis en présence d'un antagoniste 5-HT2⁴³⁴. De plus, analogues aux effets connus de TPO, la sérotonine exerçait également un effet anti-apoptotique, via 5-HT2 et la voie Akt, sur les lignées mégacaryoblastiques, en diminuant l'activité de caspase 3 et les altérations mitochondriales⁴³⁴. Enfin, la sérotonine favorisait la maturation de mégacaryocytes humains en pro-plaquettes et, *in fine*, la production de plaquettes matures, à travers une réorganisation de l'actine du cytosquelette induite par l'activation de récepteur 5-HT2 et de la voie d'aval ERK1/2⁴³⁴.

Les effets 5-HT ont été moins explorés sur la lignée issue des progéniteurs granulocytes/macrophages. Cependant, plusieurs résultats suggèrent un effet de la sérotonine, via 5-HT2B, sur cette lignée, notamment sur la différenciation des précurseurs myéloïdes¹⁷⁸. En effet, les souris KO *Htr2B* présentaient une augmentation de la population circulante des granulocytes, associée à une augmentation des progéniteurs de granulocytes dans la moelle osseuse¹⁷⁸. De plus, l'inhibition pharmacologique de 5-HT2B, *in vitro*, sur des cultures de moelle osseuse entière réduisait, d'une part, l'apparition de progéniteurs granulocytes et, d'autre part, la capacité de former des colonies de lignées mixtes myéloïdes, à partir de progéniteurs c-Kit+ murins¹⁷⁸.

Au total, la sérotonine joue un rôle favorisant la prolifération et la différenciation de plusieurs lignées au sein de l'hématopoïèse, en impliquant essentiellement les récepteurs 5-HT2. Similaire à son rôle dans la neurogenèse, les effets de la sérotonine concernent les progéniteurs multipotents et les cellules, en aval dans la cascade hématopoïétique, sans effet direct sur les CSH. La sérotonine, dérivée de TPH1, agit de manière autocrine lors de

l'érythropoïèse et joue un rôle crucial, via les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}, en favorisant la prolifération, la survie cellulaire ainsi que la différenciation terminale assurant une érythropoïèse fonctionnelle. Elle est également impliquée dans la mégacaryopoïèse tant au niveau de la prolifération de mégacaryoblastes que lors de la différenciation terminale, sous la dépendance des récepteurs 5-HT₂. Enfin, des résultats suggèrent l'implication de la sérotonine dans la différenciation de la lignée myéloïde à travers le récepteur 5-HT_{2B}.

c) La fluoxétine, un traitement stimulant les lignées cellulaires de la moelle osseuse

La sérotonine favorisant l'érythropoïèse, les effets de la fluoxétine renforçant son signal ont été investigués dans des modèles murins d'anémie aiguë induite par irradiation sublétales ou encore pharmacologiquement par phénylhydrazine ⁴²⁴. Ainsi, un prétraitement par fluoxétine, pendant 7 jours, était associé à une augmentation rapide de réticulocytes et un taux significativement augmenté d'hémoglobine dès le 3^{ème} jour post anémie induite. De plus, l'anémie était corrigée dès le 11^{ème} jour dans le groupe traité par fluoxétine, avec des taux d'hémoglobine normalisés, alors que la récupération post anémie nécessitait 22 jours dans le groupe contrôle ⁴²⁴. Par ailleurs, dans un modèle animal sans stress hématologique, il a été montré qu'un traitement de 10 jours par fluoxétine était également associé à un nombre augmenté de globules rouges et d'hémoglobine chez le veau avant sevrage ⁴³⁵.

Après irradiation sublétales entraînant une aplasie médullaire, un prétraitement de 7 jours par fluoxétine entraînait une restauration plus rapide des différentes lignées cellulaires, avec une augmentation significative des taux d'hémoglobine, de plaquettes et de leucocytes comparés au groupe contrôle ⁴³⁶. De plus, l'administration de fluoxétine, associée aux facteurs de croissance comme le G-CSF, entraînait une synergie additive d'effets stimulant la moelle osseuse avec une restauration plus rapide des 3 lignées myéloïdes ⁴³⁶. Fait intéressant chez l'homme, il a également été observé une récupération de neutrophiles plus rapide, après une transplantation de cellules souches autologues, lorsque les patients recevaient un traitement par ISRS ⁴³⁶.

Ainsi, la fluoxétine exerce donc des effets stimulants favorables sur la moelle osseuse en cas de stress aigu, permettant une accélération de la restauration des éléments fonctionnels du sang, sous-tendus par les effets favorisant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire déjà connus de la sérotonine sur plusieurs lignées myéloïdes.

En résumé, dans la continuité des effets trophiques de la sérotonine identifiée dès l'embryogenèse jusqu'aux progéniteurs spécifiques de tissus, la fluoxétine, en renforçant le signal 5-HT, démontre donc de potentielles propriétés régénératives, en stimulant la cascade de prolifération et différenciation de progéniteurs spécifiques, dans le SNC et au-delà.

Ainsi, la sérotonine est une monoamine potentiellement précieuse pour la régénération de l'organisme, tant à travers ses effets trophiques ciblant des progéniteurs spécifiques, ses effets pro-angiogéniques stimulant un partenaire privilégié dans le soutien de la régénération tissulaire, que de ses multiples effets immunomodulateurs ⁴³⁷. Outre les effets de la sérotonine locale au sein d'un tissu, la sérotonine délivrée par les plaquettes, activées et recrutées en cas de blessure, est également un acteur favorisant la réparation tissulaire à travers une action autocrine sur l'activation plaquettaire participant à la libération des autres facteurs de croissance stockés dans les plaquettes, de la modulation du tonus vasculaire, de

la stimulation de l'activation et croissance des CE et CMLV, du recrutement et de l'activation des cellules immunes et, enfin, de la libération de cytokines ^{123,150}.

De fait, les effets de la sérotonine favorisant la régénération ont également été décrits dans d'autres organes, tels que la réparation dentaire ou la régénération hépatique ^{438,439}. En effet, dans la continuité de son implication lors du développement craniofacial notamment dentaire ^{285,287}, les cellules souches de pulpe dentaire expriment un microsystème sérotoninergique fonctionnel, dont la stimulation, post blessure, par les hautes concentrations de sérotonine délivrée par les plaquettes, participe activement, *in vivo*, au processus de réparation dentaire ⁴³⁸. Quant au rôle de la sérotonine dans la régénération hépatique post hépatectomie partielle, il est intéressant de noter que le foie est organe unique par son importante capacité de régénération, permettant d'assurer une régénération complète qui, étant dépourvu de cellules souches, repose essentiellement sur les hépatocytes et sur les cholangiocytes ⁴⁴⁰. Bien que le foie exprime un système sérotoninergique, il n'a pas de capacité de synthèse locale de 5-HT, à la différence du tissu dentaire ⁴³⁹. Ainsi, la sérotonine, dérivée des plaquettes, promouvait, *in vivo*, l'initiation de la régénération post hépatectomie, en stimulant la prolifération cellulaire ⁴³⁹. A notre connaissance, les bénéfices d'un traitement par fluoxétine, lors de la régénération de ces organes, n'ont pas été investigués.

Fait intéressant, une des particularités communes à, au moins l'angiogenèse, neurogenèse et hématopoïèse, est d'exprimer un microsystème sérotoninergique fonctionnel, avec une capacité de synthèse locale de la sérotonine. De plus, en cas de blessure, le signal sérotoninergique peut donc être renforcé, par l'intermédiaire des plaquettes recrutées précocement au site de blessure. Afin d'identifier d'éventuels bénéfices ou de prévenir d'éventuels effets délétères, induits par un traitement par ISRS, il est donc fondamental de mieux comprendre, d'une part, comment les concentrations de sérotonine évoluent en périphérie au cours d'un traitement par ISRS et, d'autre part, d'identifier les tissus ayant une sensibilité sérotoninergique et de caractériser le type d'effet du signal sérotoninergique au sein du maintien et de la régénération de ce tissu. De plus, identifier les effets bénéfiques d'un traitement par ISRS, par ailleurs, bien toléré, dans la régénération tissulaire, pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses dans le champ de la médecine régénérative.

La régénération du muscle squelettique est efficiente et facile d'accès, ce qui a permis de profondément caractériser, à l'aide de nombreux modèles expérimentaux, les différents processus biologiques mis en œuvre lors de la cicatrisation d'un tissu ⁴⁴¹. De plus, le muscle squelettique peut être blessé plusieurs fois chez un même individu sans engager le pronostic vital, permettant d'étudier le comportement de cellules souches sur le long terme ⁴⁴¹. Ainsi, l'étude de la régénération musculaire est un paradigme classique d'étude en biologie régénérative ⁴⁴¹.

C. Le muscle strié squelettique, un tissu au fort potentiel régénératif

1. Structure et fonction du muscle squelettique :

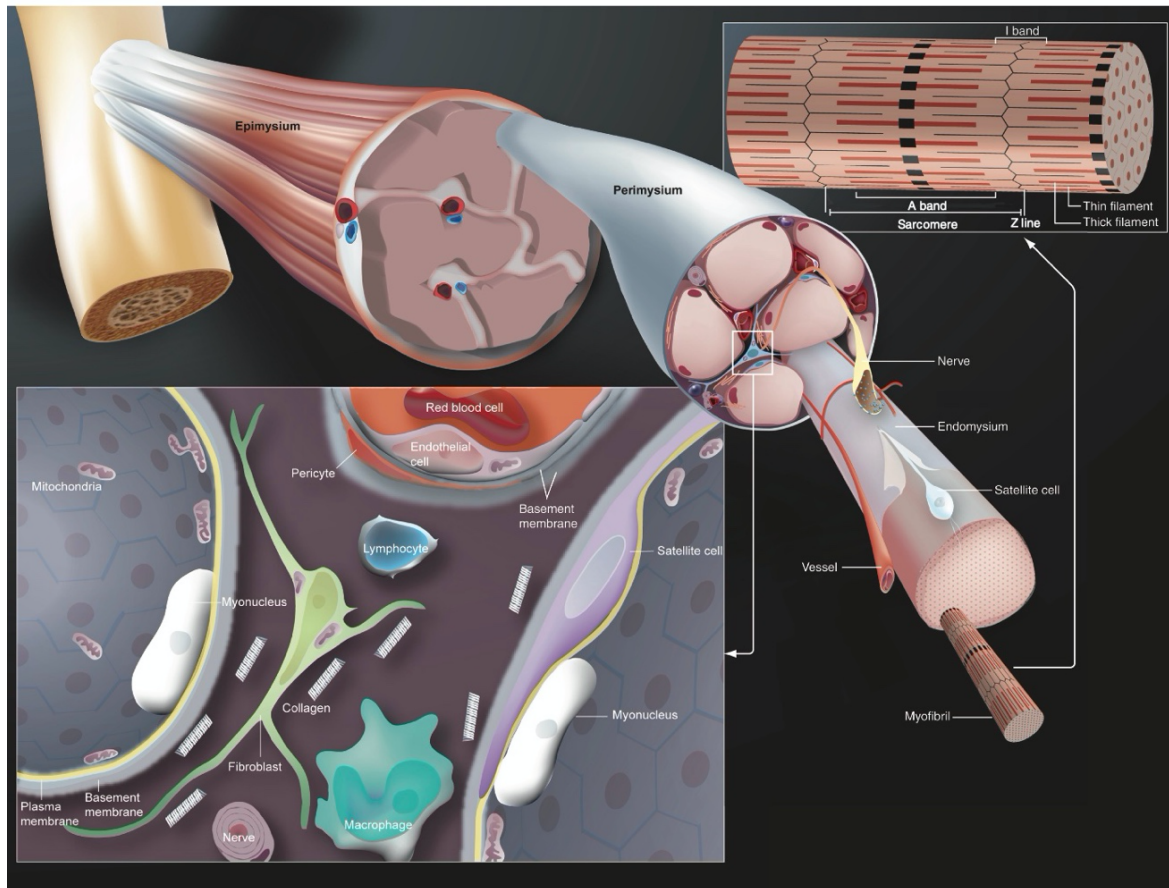
Le muscle strié squelettique constitue l'un des tissus les plus abondants de l'organisme, correspondant à 30-40% du poids corporel total et contenant de 50 à 75% des niveaux en protéines de l'organisme ⁴⁴². D'un point de vue fonctionnel, le muscle squelettique assure les contractions musculaires participant à la production de force musculaire, de maintien de posture et de mouvements volontaires ⁴⁴². De plus, il participe activement à la régulation du métabolisme énergétique, à l'état de base, en tant que tissu de stockage pour les acides aminés et les glucides, à la régulation d'hormones en périphérie, ainsi qu'à l'homéostasie de la température corporelle, étant capable de produire de la chaleur ⁴⁴². C'est un tissu hautement organisé, se définissant par la répétition d'unités motrices comprenant un motoneurone innervant, via les jonctions neuromusculaires, d'1 à 2000 fibres musculaires, également appelées myofibrilles (**Figure 23**) ⁴⁴¹. Ces fibres musculaires se regroupent en fascicules formant, *in fine*, les faisceaux composant le tissu musculaire ⁴⁴¹. Chacun de ces regroupements est entouré par une couche de tissu conjonctif soutenant la haute vascularisation et l'innervation du tissu musculaire et pouvant contenir d'autres acteurs cellulaires (**Figure 23**) ⁴⁴¹. Au sein des compartiments interstitiels du muscle squelettique, il a été identifié 10 groupes de cellules mononuclées, incluant les cellules souches musculaires résidentes, les cellules endothéliales, les progéniteurs fibro-adipogéniques, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes B et T, les cellules gliales, les ténocytes et les cellules mésenchymateuses et de muscles lisses ⁴⁴³

Les fibres musculaires représentent l'unité cellulaire de base du muscle squelettique et sont des cellules musculaires matures multinuclées, dont les noyaux sont localisés en périphérie ⁴⁴¹. Ainsi, elles assurent la contraction musculaire grâce à leur structure, hautement conservée au cours de l'évolution, composée de la succession de sarcomères séparés par les lignes Z, (**Figure 23**) ⁴⁴¹. Plus précisément, le sarcomère est une machinerie protéique complexe, constituée de filaments fins d'actine et de ses protéines associées, dont la troponine, qui s'alternent avec des filaments épais de myosines et de ses protéines associées ⁴⁴¹. Brièvement, la contraction musculaire s'opère à suite de l'arrivée d'un potentiel d'action dans la jonction neuromusculaire, libérant du calcium qui, se liant à la troponine, entraîne un changement de conformation, permettant aux têtes de myosines de se lier et de ramper le long des filaments d'actine ⁴⁴¹.

Corollaires des contractions musculaires, les fibres musculaires assurent également la génération de force, phénomène proportionnel à la taille des fibres et à la composition du type de fibres ⁴⁴⁴. En effet, il a été décrit plusieurs types de fibres musculaires, selon un schéma d'expression des 4 isoformes de chaînes lourdes de myosines I, IIa, IIb et IIx, qui s'associent à un métabolisme énergétique et des paramètres de contraction distincts ⁴⁴⁴. Ainsi, les fibres à contraction lente sont composées de type I, saturées en mitochondries, avec une haute activité oxydative et une faible activité glycolytique, permettant une contraction résistante à la fatigue et générant de peu de force ⁴⁴⁴. Les fibres à contraction rapide peuvent être composées de type IIa et IIx, avec une haute activité oxydative ou de type IIb et IIx, avec une haute activité glycolytique ⁴⁴⁴. Elles génèrent des contractions plus rapides, avec plus de force et pouvant tolérer de courtes périodes d'anaérobie tout en se fatiguant plus rapidement que les fibres de type I ⁴⁴⁴. Pour exemple, le muscle *Soleus* est un muscle dit lent, alors que le

Tibialis Anterior (TA), fréquemment étudié dans les expériences de régénération musculaire du fait de son accessibilité, est un muscle dit rapide ⁴⁴⁴.

Figure 23 : Schéma représentatif du muscle strié squelettique et de ses partenaires



Source : Gayraud-Morel et al., 2009 ⁴⁴¹

Le muscle strié squelettique est un tissu hautement plastique pouvant être l'objet d'études dans différentes situations physiologiques ou pathologiques comme l'hypertrophie musculaire induite par l'exercice physique, la sarcopénie liée à l'âge ou secondaire à une condition pathologique ou encore les myopathies congénitales ou acquises ⁴⁴¹.

Assurant un rôle fondamental dans la régénération et le maintien du tissu squelettique, les cellules souches musculaires résidentes (CSMu), également appelées cellules satellites du fait de leur localisation périphérique, se situent entre la membrane basale et le sarcolemme de la fibre musculaire, au sein d'une niche, permettant une relation étroite avec les composants de la matrice extracellulaire ainsi qu'avec d'autres acteurs cellulaires tels que les vaisseaux, les péricytes, les progéniteurs fibro-adipogéniques ou encore les macrophages (**Figure 23**) ⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁹.

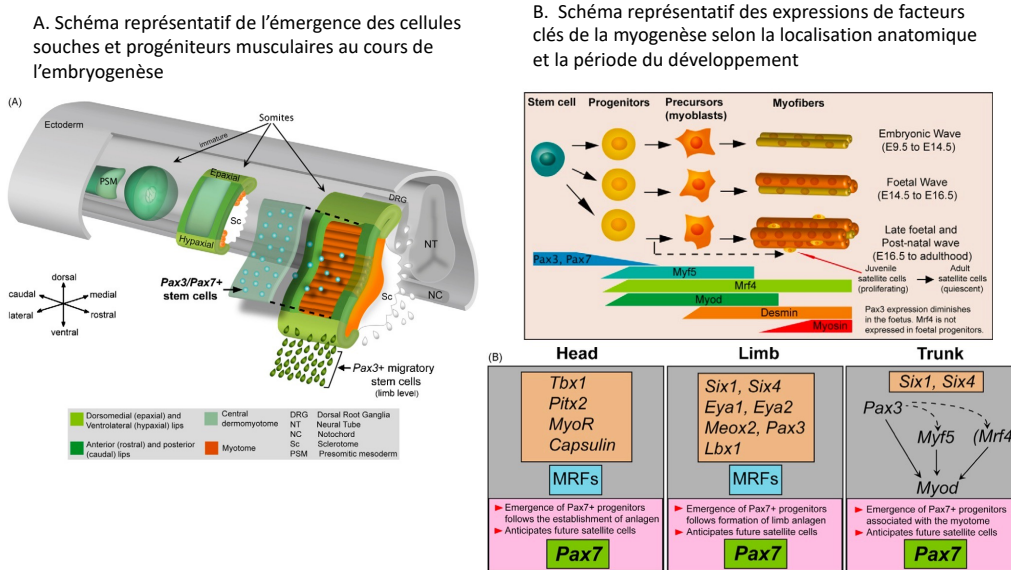
2. Les cellules souches musculaires, actrices centrales du développement et de la régénération du muscle squelettique

a) *Développement pré et post natal du muscle squelettique*

Au cours des phases embryonnaires et fœtales, le développement du muscle squelettique s'effectue en plusieurs vagues, reposant sur la production, migration et différenciation de progéniteurs myogéniques (Revue Tajbakhsh et Buckingham, 1999⁴⁵⁰, Sambasivan et Tajbakhsh, 2007⁴⁵¹, Buckingham et Relaix, 2015⁴⁵², Zammit, 2017⁴⁵³). Ce pool de cellules souches, à l'origine du muscle squelettique, est un processus de développement hautement conservé parmi les espèces vertébrées⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Puis, à l'aide des CSMu apparaissant juste avant la naissance, ce développement se poursuit tout au long de la croissance post natale jusqu'à la taille définitive⁴⁵⁰⁻⁴⁵².

Chez la souris, le développement du muscle squelettique débute, dès E8, à partir des somites épithéliaux, dérivés du mésoderme paraxial, et évoluant selon un axe antéro-postérieur (**Figure 24A**)⁴⁵⁰⁻⁴⁵². La somitogenèse est un processus hautement régulé, reposant sur des cellules souches et progéniteurs, capables de donner naissance à plusieurs tissus tels que le cartilage, les tendons, le derme, le tissu conjonctif, les cellules endothéliales, ainsi que le muscle squelettique⁴⁵⁰⁻⁴⁵². La partie dorsale des somites épithéliaux, appelés dermomyotome, contient les cellules souches et progéniteurs des muscles squelettiques du tronc, des membres et de certains muscles de la tête⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Sous l'effet de différents signaux émanant des structures adjacentes, tels que les facteurs Wnt, Shh ou encore BMP4, le dermomyotome se régionalise et donne lieu à des vagues successives de progéniteurs spécifiques⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Au cours de la première vague de E11 à E14,5 et sous l'effet de facteurs de transcription clés pour l'engagement myogénique, les progéniteurs se spécifient pour le muscle et migrent sous le dermomyotome vers les différents sites de myogenèse⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Puis, ils se différencient en myocytes mononucléés et fusionnent en petites fibres musculaires multinucléées, formant le myotome, première entité de muscle squelettique différenciée⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Au cours de la vague de myogenèse fœtale de E14,5 jusqu'à la naissance, de nouveaux progéniteurs provenant de la partie centrale du dermomyotome migrent, se différencient et fusionnent avec le myotome donnant lieu à des fibres musculaires comprenant des centaines de noyaux⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Enfin, après la naissance et durant les 4 premières semaines de vie, la croissance musculaire est assurée par une haute activité de prolifération de CSMu, suivie de leur fusion en myofibres, assurant l'hypertrophie musculaire post natale⁴⁵⁰⁻⁴⁵².

Figure 24 : Schéma représentatif de la myogenèse embryonnaire et des acteurs de la régulation myogénique



Source : Sambasivan et Tajbakhsh, 2007 ⁴⁵¹

Assurant l'engagement des progéniteurs dans la lignée myogénique et la cascade de myogenèse, il existe un réseau de gènes spécifiques comprenant les facteurs de transcription PAX3 et PAX7 et les facteurs de transcription basiques hélice-boucle-hélice de régulation myogénique (FRM) MYF5, MYOD, MRF4, MYOGENINE (**Figure 24B**) ⁴⁵⁰⁻⁴⁵³. Dans la continuité des rôles fondamentaux des gènes *Pax* lors de la spécification et de l'organogenèse, les gènes *Pax3* et *Pax7* sont exprimés dans plusieurs tissus tels que le SNC, les cellules de la crête neurale et les somites ⁴⁵². Ils jouent donc un rôle crucial dans l'émergence et la survie des cellules souches et progéniteurs musculaires, sous-tendus par leur effet de régulateur en amont de la cascade myogénique et d'effet anti-apoptotique ⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Cependant, leurs implications respectives peuvent différer, selon la temporalité et la localisation anatomique définitive de la musculature (**Figure 24B**) ⁴⁵⁰⁻⁴⁵². En effet, *Pax3* est le régulateur clé, en amont de la myogenèse, et est donc fondamental pour l'émergence des cellules souches musculaires à l'origine des muscles du tronc et des membres au cours du développement embryonnaire, alors que *Pax7* participe à la myogenèse dès la formation du myotome pour les muscles du tronc et n'est crucial pour l'émergence des progéniteurs qu'à l'issue de la première vague de myogenèse, lors de la phase fœtale et périnatale pour les autres types de muscles ⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Ainsi, l'émergence des cellules souches et progéniteurs musculaires des muscles de la tête fait intervenir d'autres facteurs régulateurs (**Figure 24B**) ⁴⁵⁰⁻⁴⁵². De plus, *Pax7* joue un rôle crucial pour la constitution du pool de CSMu en post natal, pour l'ensemble des muscles ⁴⁵². La caractérisation des phénotypes induits, lors d'inactivation génétique sur modèles animaux, a pu mettre en évidence leurs rôles cruciaux lors des différentes étapes de ce développement musculaire ⁴⁵². Ainsi, la perte de fonction du gène *Pax3* entraînait, chez l'embryon de souris, un phénotype non viable marqué par des altérations lors de la somitogenèse, avec une formation anormale du myotome, des anomalies des muscles du tronc et une absence de muscles de membres ⁴⁵². Les embryons de souris, avec l'inactivation du gène *Pax7*, n'entraînait pas de phénotype musculaire pathologique durant l'embryogenèse, la perte de la

fonction *Pax7* étant compensée par *Pax3*⁴⁵². A contrario, durant la phase périnatale, l'absence de l'expression génique de *Pax7* était associée à une perte du pool de CSMu, avec une capacité régénérative compromise⁴⁵². Enfin, le double mutant *Pax3:Pax7*, quant à lui, présentait des anomalies majeures de somites, entraînant une hypoplasie sévère sur défaut de survie de cellules souches et progéniteurs myogéniques et une létalité *in utero*⁴⁵².

Les FRM comprennent 4 gènes : *Myf5*, *Myod*, *Mrf4* et *Myogenine* dont l'expression est régulée, au cours de l'embryogenèse, par les facteurs Shh, BMP et PAX3/7^{450,451,453}. Les facteurs MYF5, MYOD et MRF4 régulent l'engagement des cellules souches en progéniteurs myogéniques de type myoblastes, alors que MYOGENINE joue un rôle crucial dans la différenciation des myoblastes en myocytes durant l'embryogenèse^{450,451,453}. Plus précisément, PAX3 régule directement l'expression de *Myf5* dans le myotome, qui se fait en amont de celle de *Myod*^{450,451,453}. En effet, les souris KO *Myf5* présentaient un retard dans la formation du myotome, avec une létalité périnatale du fait d'anomalies de la cage thoracique^{450,451,453}. Dans un modèle murin knock-in (KI) de *Myf5*, avec l'insertion du gène LacZ au sein du gène *Myf5*, il a pu être mis en évidence que les cellules souches et progéniteurs du dermomyotome, exprimant la β -galactosidase à la place de *Myf5*, avaient des anomalies de migration allant vers le derme ou le sclérotome au lieu du myotome, en s'engageant vers un autre type cellulaire que le muscle^{450,451,453}. Cependant, témoins de la redondance de l'expression des FRM *Myf5* et *Myod*, elles ne présentaient pas d'anomalie ultérieure du développement musculaire, l'absence de *Myf5* étant compensée par *Myod*^{450,451,453}. Inversement, les souris KO *Myod* montraient, en compensation, une surexpression de *Myf5* associée à un développement musculaire préservé^{450,451,453}. En revanche, en l'absence des deux gènes, *Myf5* et *Myod*, cruciaux pour l'engagement dans le programme myogénique, les embryons de souris n'étaient pas viables après la naissance, associée à une absence de progéniteurs myogéniques et de fibres musculaires^{450,451,453}. *Mrf4* est, quant à lui, exprimé, principalement durant la phase embryonnaire dans le myotome, participant à l'engagement des progéniteurs dans la lignée myogénique et également au contrôle de la différenciation en promouvant l'expression de *Myogenine*^{450,451,453}. Enfin, *Myogenine* est indispensable à la différenciation des myoblastes embryonnaires, l'absence d'expression de ce gène durant les différentes vagues de myogenèses embryonnaires est associée à une létalité à la naissance des souriceaux, avec l'absence de fibres musculaires^{450,451,453}. A contrario, l'absence de son expression, seulement en post natal, n'empêche pas la poursuite du développement musculaire post natal reposant sur des CSMu d'allure fonctionnelle, bien que ces souris aient une croissance moindre que les contrôles^{450,451,453}.

b) *Les cellules souches musculaires résidentes*

(1) *Histoire des cellules satellites*

En 1961, le chercheur Mauro identifie, pour la première fois, dans le muscle TA de rat et de xénope, des cellules mononuclées, baptisées initialement cellules satellites, faisant ainsi la découverte des cellules souches musculaires résidentes⁴⁵⁴. En microscopie électronique, ces cellules étaient identifiées morphologiquement des cellules bipolaires, avec un ratio noyau/cytoplasme élevé, contenant une hétérochromatine condensée, peu de mitochondries ou d'autres organelles intracellulaires⁴⁵⁴. Par la suite, il a rapidement été mis en évidence que cette population cellulaire était rare, au sein d'un muscle sain à l'état basal, et leur distribution pouvait varier en fonction de la nature lente ou rapide d'un muscle⁴⁵⁴.

En 1965, les chercheurs Shafiq et Gorycki ont été les premiers à décrire des cellules indifférenciées localisées en périphérie de fibres musculaires, post blessure, chez la souris ⁴⁵⁴. Puis en 1966, Church et Noronha, à l'issue d'expériences sur le développement et la régénération du muscle de chauve-souris, proposent que les CSMu soient les cellules « de réserve » du muscle, capable de se transformer en myoblastes, qui entrant en division, forment de nouvelles fibres ⁴⁵⁴. Grâce aux expériences réalisées avec de la thymidine tritiée, il a pu être montré en 1969 que les CSMu étaient quiescentes, à l'état basal, et contribuaient aux noyaux des fibres musculaires post blessure et en 1975, que les CSMu marquées à la thymidine tritiée de donneur étaient identifiées dans le noyau de fibres musculaires régénérées du receveur ⁴⁵⁴.

En 2000, l'équipe de Seal et al. a mis en évidence l'expression du facteur de transcription Pax7, qui deviendra un des marqueurs spécifiques des CSMu et le développement de la souris transgénique *Tg:Pax7nGFP* par l'équipe de Sambasivan et al., en 2009, facilitera l'isolement et l'investigation spécifique de cette population cellulaire, dont le gène de la protéine fluorescente verte (GFP) a été placé sous le promoteur du gène *Pax7* ⁴⁵⁵. Enfin, en 2011, à l'aide de modèle murin permettant l'ablation sélective et conditionnelle des CSMu, plusieurs équipes ont démontré que ces cellules étaient indispensables pour la régénération du muscle squelettique après une blessure ⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸.

(2) Les cellules satellites, une population cellulaire quiescente et hétérogène à l'état de base

A l'état d'équilibre, la majorité des CSMu sont quiescentes, c'est-à-dire arrêtées au stade G₀, témoignant du faible degré de renouvellement du tissu musculaire en l'absence de signaux de stress ⁴⁴³. Classiquement, l'expression de PAX7 est un marqueur de CSMu quiescente associée, dans certains muscles, à l'expression de PAX3, ces deux gènes empêchant l'engagement myogénique des cellules en réprimant l'expression de *Myod* (**Figure 25**) ⁴⁵⁹. Ce statut se caractérise également par l'absence d'expression de marqueur, spécifique de la lignée myogénique ou non, de prolifération et différenciation, ainsi que la rétention du marquage d'analogue de la thymidine ^{460,461}. Les mécanismes sous-tendant cet état de quiescence ont été investigués et ont mis notamment en évidence le rôle crucial de la voie canonique Notch, ciblant les voies HES et HEY ou en favorisant l'expression de miR-708, l'ensemble réprimant la transcription de gènes clés de la myogenèse ⁴⁶²⁻⁴⁶⁴. Le maintien des CSMu en quiescence est également régulé par la niche des CSMu, notamment par la proximité avec ses capillaires qui participe à la signalisation de Notch ⁴⁶⁵. De nouvelles techniques comme la fixation *in situ* et le séquençage du transcriptome sur cellules uniques, sont venues enrichir la caractérisation de l'état de quiescence des CSMu. Ainsi, le programme génétique, sous-tendant la quiescence de CSMu, outre *Pax7*, comprend également ceux des gènes *Hes1*, cible de la voie Notch dont le rôle de maintien de quiescence a été démontré, *Gas1* codant pour une des protéines spécifiques de blocage de transcription, ou encore *Calcr*, codant pour le récepteur de la calcitonine, ainsi qu'un transcriptome évocateur d'un faible métabolisme reposant sur l'oxydation des acides gras mitochondriaux et de la phosphorylation oxydative ⁴⁶⁶. Ces activités métaboliques ont été suggérées comme étant à l'origine des modifications épigénétiques, empêchant l'expression du programme de la cascade myogénique ⁴⁶⁷.

Un statut intermédiaire entre la quiescence (G₀) et l'activation de CSMu préparant la division cellulaire (G₁), a été rapporté, notamment, en réponse à un stress systémique sans blessure *in situ* du muscle ^{468,469}. Ce statut, G_{alerte}, de CSMu implique, via la signalisation de

mTORC1, un comportement amorcé avec des cinétiques de première division cellulaire plus rapides, une augmentation de l'activité mitochondriale et une capacité régénérative supérieure⁴⁶⁸.

La population des CSMu est une population hétérogène, dans son programme génétique, son origine développementale, ainsi que dans son comportement cellulaire en tant que cellules souches à l'âge adulte (Revue Tierney et Sacco, 2016⁴⁷⁰ et Relaix et al. 2021⁴⁶⁷). En effet, au cours du développement du muscle, les muscles du tronc ou des membres dérivent des somites et l'expression de *Pax3* est indispensable pour leur spécification, alors que les muscles de la tête proviennent du mésoderme paraxial non segmenté et leur engagement myogénique mobilise un tout autre programme génétique⁴⁵¹. A l'âge adulte, il a été montré que l'expression de PAX3 était hétérogène dans la population de CSMu et conférait, aux CSMu l'exprimant, des propriétés de résistance aux stress environnementaux^{459,469}. De plus, plusieurs approches expérimentales ont permis de distinguer les CSMu, avec un potentiel préservé de cellules souches par rapport à des progéniteurs myogéniques au sein de cette population à l'état d'équilibre. Ainsi, à l'aide d'une administration chronique de BrdU à des rats adultes, il a été montré que les cinétiques de division étaient rapides pour 80% des CSMu et que les 20% restants ne s'étaient pas toutes divisées dans l'intervalle de 14 jours⁴⁷¹. Suggérant également une distinction d'engagement cellulaire, l'ablation génétique conditionnelle de *Myf5* a mis en évidence que plus de 10% de la population de CSMu n'exprimait pas ce gène et était capable de division asymétrique participant au maintien du pool de CSMu⁴⁷². A l'aide du modèle transgénique *Tg:Pax7nGFP* de marquage endogène par GFP des CSMu, l'intensité de la GFP a permis de discriminer deux sous-groupes au sein des CSMu, les Pax7^{High} et Pax7^{Low}, dont les signatures génétiques, les activités métaboliques ou les cinétiques de division suggéraient que les Pax7^{High} étaient moins engagés dans la cascade myogénique que les Pax7^{Low}⁴⁶¹. L'efficacité de transplantation des CSMu diffère également en fonction du muscle dont elles proviennent, puisque les CSMu provenant des muscles extraoculaires présentent un meilleur potentiel de greffe⁴⁷³. De la même manière, les prises de greffe de CSMu, avec leur fibre, ont été comparées entre différents muscles, montrant de meilleures capacités pour les muscles *Soleus* ou *Extensor Digitorum Longus* (EDL), comparées à celles provenant du TA⁴⁷⁴. Plus récemment, à l'aide des avancées technologiques, notamment sur le séquençage profond de cellules isolées ou encore la cytométrie de masse basée sur des marqueurs combinés à des isotopes métalliques (le CyTOF), ont permis d'affiner la distinction au sein des CSMu, selon leur signature transcriptomique au niveau des processus d'ubiquitination protéique, de modification post-transcriptionnelle ou encore de voies métaboliques^{466,467}. Ainsi, à la différence du programme transcriptomique lié à la quiescence de CSMu, des CSMu, bien qu'à l'état d'équilibre, exprimaient un transcriptome à l'activation précoce comme *Myod*, *Myf5*, *Rpl24*, *Rpl27*⁴⁶⁶

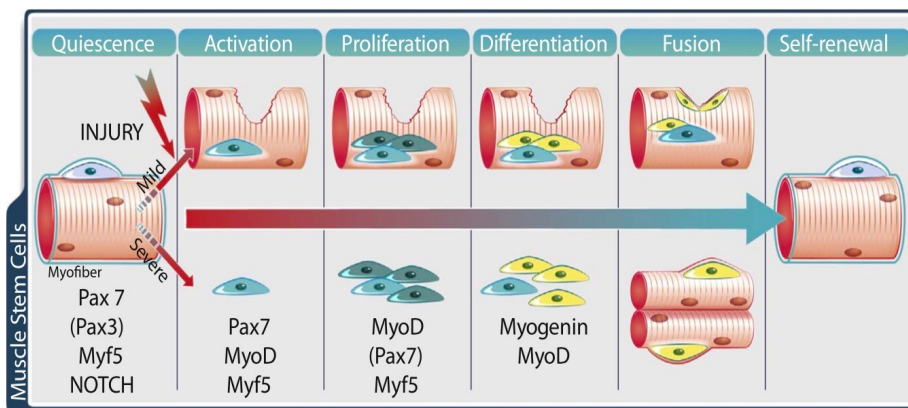
(3) La cascade de la myogenèse à l'âge adulte

Après une blessure musculaire, l'activation de CSMu se caractérise par une expression rapide et élevée de MYOD, en association avec les facteurs *Pax7 +/- Pax3* et *Myf5*, l'ensemble favorisant l'engagement dans la lignée myogénique et la prolifération tout en inhibant les gènes associés à la différenciation myogénique (**Figures 25A-B**)⁴⁷⁵. Ainsi, les CSMu réentrent dans le cycle de division cellulaire dès 20h post blessure^{461,476}. A l'issue de cet engagement myogénique et de première division, ces cellules deviennent des myoblastes, population cellulaire ayant un haut potentiel d'amplification par prolifération (**Figures 25A-B**). MYOD est

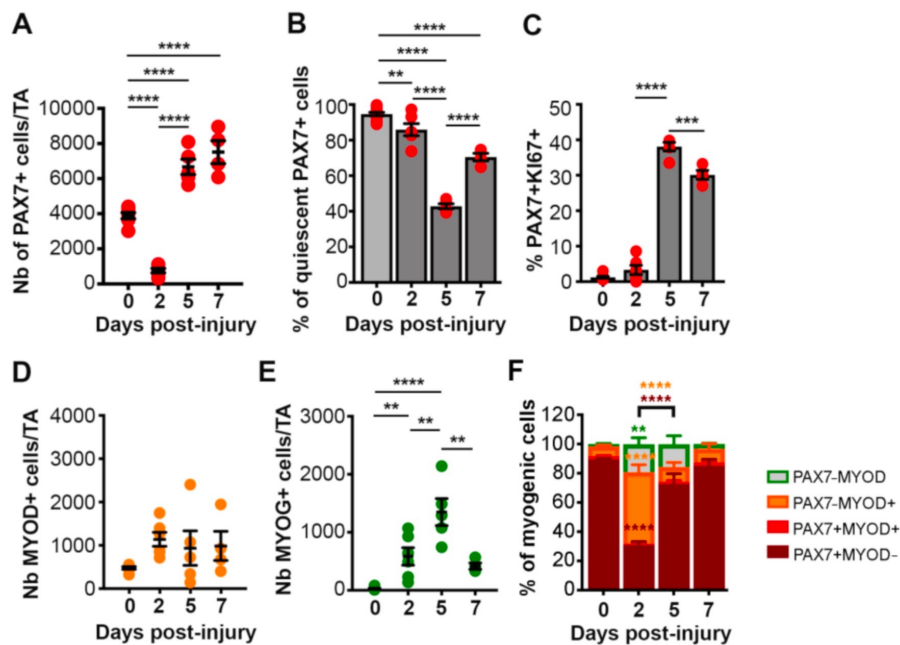
un facteur déterminant pour l'engagement dans le programme myogénique et la différenciation, son absence, chez les souris *Myod*^{-/-}, impacte négativement la myogenèse en stimulant la prolifération au détriment d'une différenciation retardée^{477,478}. Puis, la différenciation terminale est marquée par l'inhibition de l'expression de Pax7 et la surexpression de MYOGENINE et MRF4, guidant l'allongement des myocytes et leur fusion en myotubes (Figure 25A)^{478,479}. *In vitro*, durant l'induction de différenciation de myoblastes, il a pu être montré que les expressions de PAX7 et MYOGENIN sont mutuellement exclusives⁴⁷⁹.

Figure 25 : Marqueurs d'activation, de prolifération, de différenciation des CSMu au cours de la régénération musculaire

A. Schéma représentatif de la myogenèse au cours de la régénération musculaire



B. Cinétique de distribution des différentes populations cellulaires myogéniques isolées par CyTOF, au cours d'une régénération musculaire post blessure par BaCl₂



Source : Bagdhadi et Tajbakhsh, 2018⁴⁸⁰, Borok et al. 2021⁴⁸¹

En tant que cellules souches, une sous-population de CSMu quitte le cycle cellulaire et retourne en quiescence, marquée par la réexpression de Pax7, assurant l'autorenouveaulement du pool de CSMu (**Figure 25A**)⁴⁷⁹. L'autorenouveaulement des CSMu, sous-tendant les capacités régénératives du muscle, a été démontré par plusieurs approches expérimentales. En effet, il a été montré, qu'après plusieurs blessures musculaires en série, la régénération musculaire restait efficiente avec une restitution, *ad integrum*, incluant un pool de CSMu préservé⁴⁸². De plus, la transplantation, unique ou en série, de CSMu, encore associées à leurs fibres isolées ou purifiées, donnait naissance à de nouvelles fibres musculaires au sein du muscle receveur et soutenait la régénération musculaire post blessure^{461,474}. La capacité d'autorenouveaulement des cellules souches est classiquement assurée par le mode division cellulaire asymétrique, permettant de donner naissance à une cellule fille engagée dans la différenciation et à une autre cellule fille retournant à la quiescence⁴⁷⁰. Ainsi, la division asymétrique de CSMu a été montrée, d'une part, par la caractérisation, à partir de CSMU sur fibres isolées, de l'axe de division cellulaire, la polarité de protéines appartenant au complexe PAR/dystrophine ou encore Numb lors de la division cellulaire, la distribution différentielle de marqueurs myogéniques tels que PAX7, MYF5, MYOD, MYOGENINE et, d'autre part, par la ségrégation non aléatoire de l'ADN ou la rétention, ou non, des analogues de thymidine^{460,461,472,483,484}. La régulation de la polarité cellulaire des CSMu, influencée par des signaux temporo-spatiaux, au cours d'une division reste complexe et partiellement connue^{467,470}.

c) *Régénération musculaire ad integrum*

La régénération musculaire, à l'âge adulte, a été décrite, pour la première fois, dans les années 1860, par le pathologiste Weber, rapportant la formation de nouvelles fibres musculaires, initialement dans des conditions de pathologies humaines, puis dans un contexte de blessure musculaire, chez le lapin⁴⁵⁴. Dans la continuité de ces travaux, le chercheur Volkmann a développé le concept de modèles animaux comme moyen d'étude de la régénération musculaire, en élaborant plusieurs modèles de blessures musculaires, dans différentes espèces, allant jusqu'à réaliser plus de 100 expériences et 1700 coupes de coloration de muscles⁴⁵⁴. Puis, le champ d'investigation sur la régénération musculaire s'est enrichi de modèles animaux, de plus en plus fins, et a connu, entre autres, trois grandes révolutions : la découverte des CSMu en 1961 par le chercheur Mauro, l'utilisation de la mitose et du traçage de lignée cellulaire, à l'aide de la thymidine tritiée, puis le développement de modèles transgéniques, notamment murins, avec l'invalidation des gènes clés dans la myogenèse à l'âge adulte⁴⁵⁴.

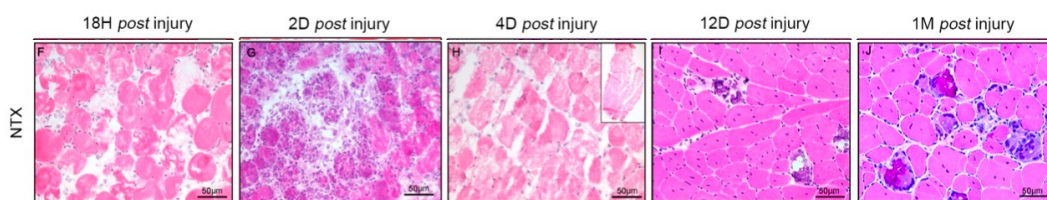
Actuellement, de nombreux modèles animaux de blessures musculaires, aiguës ou chroniques, sont classiquement utilisés dans le champ de recherche sur la régénération musculaire, incluant les injections intramusculaires de myotoxines, de BaCl₂, ou mécaniques par gelure ou encore par compression (Reuves Gayraud-Morel et al., 2009⁴⁴¹, Baghdadi et Tajbakhsh, 2018⁴⁸⁰). La caractérisation extensive de ces modèles a montré que le phénotype de régénération musculaire peut varier, selon le type de blessure^{441,480,482}. Fait intéressant, l'influence de certains paramètres, tels que l'âge des souris ou le type de modèle transgénique, peut se révéler, ou non, selon le type de blessure musculaire^{441,480}.

Lors d'une blessure aiguë musculaire, trois différentes phases vont se succéder et se chevaucher afin de restituer, *ad integrum*, le tissu musculaire endommagé qui s'accompagne, selon l'efficacité de cette régénération, d'un processus variable allant de la cicatrisation à la

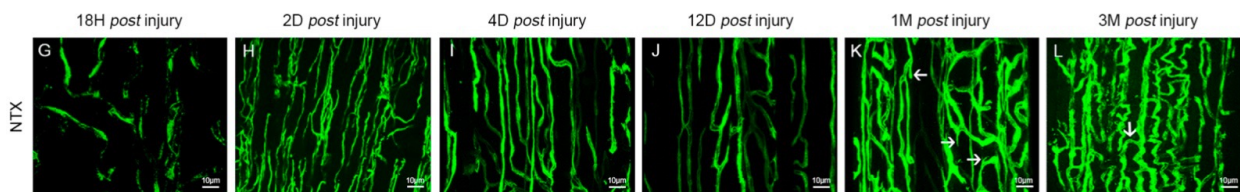
fibrose (**Figure 26A**)⁴⁴¹. Plus précisément, chez la souris, à la suite d'une blessure aiguë musculaire, s'opère une nécrose des fibres musculaires par protéolyse^{441,480}. Une phase inflammatoire précoce se déclenche, pendant les 5 premiers jours post blessure, permettant le recrutement en premier lieu de neutrophiles, suivis de macrophages, permettant la phagocytose des débris cellulaires induits par la nécrose^{441,480}. La reconstruction du tissu repose sur les CSMu, qui, selon leur survie à la blessure musculaire, vont s'activer dans les heures ou les jours post blessure et peuvent migrer, si besoin, au site de la blessure^{441,480,482}. De nombreux facteurs participent à l'activation des CSMu, dont FGF, TGF- β , IGF-1, HGF ou encore IL-6^{441,480}. Après activation, elles vont devenir des myoblastes et proliférer, se différencier, en vue de fusionner (**Figures 25A-B**). D'autres facteurs sont alors impliqués dans cette phase de fusion comme IL-4 ou encore l'intégrine β 1^{441,480}. Cette phase de reconstruction peut durer jusqu'à 14 jours et repose sur la formation de nouvelles fibres musculaires par fusion de myoblastes, entre eux, ou par le renforcement de fibres adjacentes à la zone blessée, par fusion des myoblastes avec des fibres déjà existantes (**Figure 25A**)^{441,480}. Ces nouvelles fibres musculaires vont transitoirement réexprimer des isoformes embryonnaires et fœtales des chaînes lourdes de myosines, jusqu'à 14 jours post blessure, et vont présenter des noyaux centronucléés^{441,480,482}. En l'absence d'innervation, le programme génétique, sous-tendant les fibres rapides, est exprimé par défaut et la réinnervation par des nerfs, dits lents, permet la reconversion de fibres rapides en fibres lentes^{441,480}. Enfin, la régénération musculaire se termine par une phase de remodelage musculaire, comprenant une hyperplasie et une hypertrophie musculaire^{441,480}. Cette phase implique, notamment, une balance de signalisation entre les voies IGF-1/Akt promouvant l'hypertrophie, via la synthèse protéique, et les voies TGF- β /Smad, inhibant la croissance musculaire et pouvant promouvoir la fibrose^{441,480}.

Figure 26 : Cinétique de la régénération musculaire *ad integrum* et du remodelage vasculaire après une blessure musculaire aiguë par notexine

A. Illustrations de la régénération musculaire post notexine sur coupe de TA colorée en HE



B. Illustrations du remodelage vasculaire en 3D post notexine sur coupe de TA avec marquage GFP endogène des vaisseaux



Source : Hardy et al., 2016⁴⁸²

Abréviations : HE (Hématoxyline et Eosine), TA (*Tibialis Anterior*)

Dans ce travail, le modèle de blessure aiguë choisi était celui de l'injection intramusculaire de la notexine (NTX) du fait d'effets myotoxiques bien connus, du peu d'effet systémique lors d'une injection locale et de la bonne reproductibilité de la blessure musculaire, au sein du même lot ⁴⁴¹. C'est une phospholipase A2, isolée à partir de venin de serpent. Une fois injectée, la NTX se lie à la membrane plasmique des fibres musculaires et, en hydrolysant les lipides membranaires, entraîne une augmentation de la perméabilité de cette membrane, résultant en une augmentation de l'entrée de calcium ⁴⁴¹. Ainsi, les fibres musculaires traversent une dépolarisation, suivie d'une hypercontraction, puis d'une dégénérescence par protéolyse, dépendante du calcium intracellulaire ⁴⁴¹. La NTX a également la particularité d'avoir des effets neurotoxiques, incluant le blocage présynaptique de la libération d'Ach de la jonction neuromusculaire et nécessitant la régénération de la terminaison nerveuse et de la fibre musculaire pour restaurer une jonction neuromusculaire ⁴⁴¹. La régénération musculaire, post blessure par NTX, se caractérise par un pool de CSMu préservé entrant en division cellulaire, dès 18 heures post blessure, et dont l'augmentation persiste jusqu'à 3 mois post blessure ⁴⁸². Témoins de myofibres nouvellement formées, plus de 80% des fibres musculaires présentent des noyaux centronucléés à 1 mois post NTX (**Figure 26A**). La néovascularisation est visible, dès le 4^{ème} jour post blessure, et la densité capillaire reste augmentée jusqu'à 3 mois post blessure (**Figure 26B**) ⁴⁸². Enfin, l'infiltration de cellules immunes persiste jusqu'à 3 mois post blessure, associée à des dépôts calciques (**Figure 26A**) ⁴⁸².

Enfin, comme ce fut le cas dans ce travail, le muscle TA est fréquemment étudié dans les expériences de régénération musculaire, étant facilement accessible, et comprenant des cellules souches musculaires résidentes partageant la même signature génétique depuis le développement embryonnaire ⁴⁴¹.

(1) Les autres partenaires de la régénération musculaire

En dehors des CSMu, d'autres cellules avec un potentiel myogénique, notamment de fusion avec des myofibres, ont été décrites bien que leur participation au cours de la régénération musculaire soit de moindre contribution que les cellules satellites elles-mêmes ⁴⁴¹. Ainsi, des cellules dérivées de la moelle osseuse, ou encore de mésoangioblastes, peuvent participer à la régénération musculaire ^{485,486}. Plus récemment, il a pu être mis en évidence une nouvelle population de progéniteurs, à potentiel myogénique, que sont les cellules mésenchymateuses et de muscles lisses ⁴⁴³.

Des partenaires privilégiés des cellules satellites sont également acteurs clés de la régénération musculaire. Les vaisseaux, appartenant à la niche des CSMu à l'état basal, participent activement à la régénération musculaire, à travers une interaction bidirectionnelle entre CSMu et CE ^{445,447,465,487}. En effet, la néovascularisation est mise en œuvre rapidement après une blessure et le couplage d'angiogenèse et de myogenèse est finement orchestré, au cours de la régénération, notamment grâce au VEGF, facteur crucial de co-régulation positive de ces processus ^{447,487,488}. Plus précisément, les CE peuvent stimuler les CSMu à travers la sécrétion différents facteurs trophiques, tels que HGF, IGF-1, PDGF et VEGF, favorisant leur croissance et leur survie, et en retour, les myoblastes participent également à la sécrétion de VEGF stimulant l'angiogenèse ^{445,487}. Associées au tissu vasculaire et à la niche des cellules satellites, les péricytes jouent également un rôle en sécrétant des facteurs tels qu'IGF-1 ou

l'angiopoïétine permettant de réguler la croissance et le retour en quiescence des cellules satellites en fin de régénération musculaire ⁴⁸⁹.

Les macrophages jouent, en effet, un rôle crucial, à plusieurs niveaux au cours de la régénération musculaire. Outre leur rôle précoce dans la phagocytose de débris musculaires, les macrophages sécrètent initialement de nombreuses cytokines, telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), l'interféron (INF α), IL-6, favorisant la prolifération des myoblastes ⁴⁹⁰. Puis, les macrophages vont changer de phénotype et sécréter des cytokines dites anti-inflammatoires, tels qu'IL-4 et IL-10, favorisant ainsi la différenciation et fusion des myoblastes ainsi que la réponse anti-inflammatoire portée par les progéniteurs fibro-adipogéniques et les mésoangioblastes ^{448,491}. De plus, ils participeraient également à la régulation du couplage angio/myogenèse, notamment à travers la production d'oncostatine M ⁴⁴⁷.

Les progéniteurs fibro-adipogéniques, progéniteurs multipotents présents dans l'espace interstitiel du muscle, sont également amplifiés après une blessure musculaire et promeuvent la différenciation des myoblastes tout en participant au soutien cellulaire par remodelage de la matrice extracellulaire ^{449,492}. Les fibroblastes participent également à la régulation de la myogenèse post blessure, leur ablation génétique entraînant une différenciation prématurée des CSMu, associée à une déplétion précoce du pool de CSMu et des fibres musculaires plus petites ⁴⁵⁸.

3. Le muscle squelettique, un tissu sensible à la sérotonine ?

a) *Système 5-HT présent dans le muscle squelettique*

A l'aide de différentes techniques, la présence de sérotonine a été montrée au sein de différents muscles comme le *soleus*, l'EDL, le *plantaris* ou encore le *gastrocnemius* chez de jeunes souris sauvages C57Bl6 ou transgéniques, ainsi que dans des lignées de cellules musculaires matures de rat (L6) ⁴⁹³⁻⁴⁹⁶. Il a même été suggéré que la sérotonine intracellulaire se liait aux microfilaments d'actine, grâce au Fe²⁺, au sein de cellules musculaires matures de lapin ^{497,498}.

Plusieurs études ont, directement ou indirectement, mis en évidence la présence d'acteurs clés du métabolisme de la sérotonine au sein du muscle squelettique. Ainsi, le transporteur SERT est exprimé par des myotubes pleinement différenciés, issus de lignées immortalisées de myoblastes murins (C2C12) ou de rat (L6), permettant la capture de 5-HT de manière dose- et temps- dépendante, *in vitro* ⁴⁹⁹. Les autres transporteurs, moins spécifiques pour la sérotonine, tels que PMAT ou OCT3, sont également exprimés dans le muscle squelettique ^{500,501}. De plus, une expression de *Tph1* a été montrée par le muscle squelettique sans démonstration robuste d'une activité fonctionnelle ⁴⁹⁵. Enfin, les enzymes de dégradation MAO étaient également présentes au sein de myocytes différenciées ou de myotubes, avec une activité de la MAO-A notamment augmentée en cas de stimulation chronique aux glucocorticoïdes stimulant la production de peroxyde d'hydrogène ^{86,502}

Au niveau des modes d'action de la sérotonine déjà décrits dans le muscle, l'expression du récepteur 5-HT_{2A} a été caractérisée dans des cellules musculaires fœtales ou matures de rat et de C2C12, avec un gradient croissant avec la maturation cellulaire ^{112,503-505}, ainsi que l'expression de *Htr7* a été rapportée dans le muscle *soleus* ⁵⁰⁶. De plus, de petites GTPases pouvant être la cible de sérotonylation comme Rab4 ont été identifiées ⁴⁹⁹.

b) Rôle de la sérotonine et effets des ISRS dans les fonctions du muscle squelettique

D'un point de vue fonctionnel, les ISRS dont la fluoxétine, en modulant le système sérotoninergique du SNC, augmentaient l'activité motrice tant chez la souris que chez l'homme (Revue Visco et al. 2018⁵⁰⁷)^{363,364,404,508}. Plus spécifique aux propriétés de force musculaire, il a été montré qu'un traitement chronique par fluoxétine améliorait les performances physiques chez la souris notamment avec une augmentation de la force de pattes avant, la vélocité maximale en aérobie, ainsi que la résistance à la fatigue, lors d'exercice physique⁵⁰⁸. Ces effets étaient synergiques, lorsque la fluoxétine était associée à un entraînement par de l'exercice physique⁵⁰⁸. Confirmant le rôle de la sérotonine dans les performances musculaires, les souris *Tph1*^{-/-} affichaient des performances musculaires réduites comparées aux souris sauvages, incluant une vitesse maximale réduite, avec un ratio d'échange respiratoire diminué malgré un pic de consommation d'oxygène augmenté⁴⁹⁶. Ces performances musculaires, notamment l'adaptation mise en œuvre lors d'exercice d'endurance, étaient dépendantes de la sérotonine périphérique et non de la sérotonine centrale ou d'autres facteurs, issus du métabolisme du tryptophane et des kynurénines⁴⁹⁶. De plus, la majoration de la sérotonine plasmatique sous l'effet d'exercice chez des souris *Tph1*^{-/-} laisse également à penser une interaction entre le système sérotoninergique et le tissu musculaire⁴⁹⁶. Dans un modèle animal invertébré, l'augmentation de la sérotonine biodisponible entraînait une amélioration des propriétés contractiles du muscle strié de sangsue⁵⁰⁹. Chez l'homme, le caractère dopant des ISRS a été suspecté devant la prévalence augmentant au sein de la population d'athlètes, y compris sains, et cette augmentation n'était pas corrélée à celle présente dans la population générale⁵¹⁰.

Associées aux effets fonctionnels musculaires, la sérotonine et sa modulation par les ISRS ont montré des effets sur les propriétés métaboliques des fibres musculaires. En effet, un traitement précoce par fluoxétine pendant les 3 premières semaines de vie de raton entraînait une réduction de fibres musculaires glycolytiques dans l'EDL au profit d'une augmentation de fibres oxydatives et d'activités enzymatiques oxydatives⁵¹¹. Ces paramètres étaient également associés à une amélioration de la respiration mitochondriale comprenant une augmentation de la consommation d'oxygène et une diminution de la production des dérivés réactifs de l'oxygène⁵¹². Le muscle *Soleus*, quant à lui, était peu affecté par un traitement précoce post natal par fluoxétine, alors qu'un traitement à l'âge adulte entraînait une diminution de la production des dérivés réactifs de l'oxygène^{508,511}. Dans un modèle murin d'obésité, l'administration de sérotonine entraînait un changement de la composition de fibres au sein du muscle *Soleus* favorisant les fibres oxydatives, associé à une augmentation de l'expression de PGC1 α , de manière dépendante des récepteurs 5-HT2A et 7⁵⁰⁶.

La sérotonine participe également au métabolisme énergétique et glucidique du muscle, en favorisant la capture du glucose, la glycolyse mais également à long terme la résistance à l'insuline^{112,499,503,513}. Plus précisément, *in vitro*, de hautes doses de sérotonine 10 μ M, en activant 5-HT2A, augmente la translocation à la membrane du transporteur de glucose, GLUT4, grâce à la sérotonylation de Rab4^{499,503}. De plus, via l'activation aiguë du récepteur 5-HT2A, la sérotonine active également les différentes kinases qui vont conjointement participer à la phosphorylation de PFK, enzyme cruciale et limitante de la glycolyse, et favoriser la liaison de la PFK aux microfilaments d'actine-F⁵¹³. Lors de la stimulation continue du récepteur 5-HT2A, il a été montré que la sérotonine entraînait une

transactivation du récepteur à l'EGF, augmentant la production d'EGF lié à l'héparine ce qui favorise la résistance à l'insuline des cellules musculaires par altération de sa signalisation ¹¹².

Enfin, les études, portant sur le syndrome sérotoninergique, ont pu préciser les effets de hautes doses de sérotonine sur le muscle. Chez le rat, une injection intrapéritonéale de 5-HTP entraînait des contractions musculaires anormales, associées à une production d'énergie en anaérobiose augmentée et une surexpression d'UCP-3 participant à l'hyperthermie ⁵¹⁴. Chez la larve de poisson-zèbre, il a pu être précisé que la stimulation excessive du récepteur 5-HT2A était spécifiquement impliquée dans la rhabdomyolyse lors du syndrome sérotoninergique, contrairement à la stimulation des récepteurs 5-HT1A, 1B et 3 ⁵¹⁵.

c) Effets de la sérotonine ou des ISRS dans le développement et la régénération musculaire

Participant à la régulation de la voie liée à l'hormone de croissance au niveau hypothalamo-hypophysaire, la sérotonine peut jouer un rôle indirect dans le processus de croissance post natal notamment musculaire ⁵¹⁶. En modifiant le métabolisme de la sérotonine, plusieurs études ont indirectement investigué son rôle dans le développement musculaire. Toutefois, les approches expérimentales, reposant sur des modifications de la teneur alimentaire en tryptophane ou de supplémentation en 5-HTP, sont limitées pour apprécier les effets propres de la sérotonine ^{517,518}.

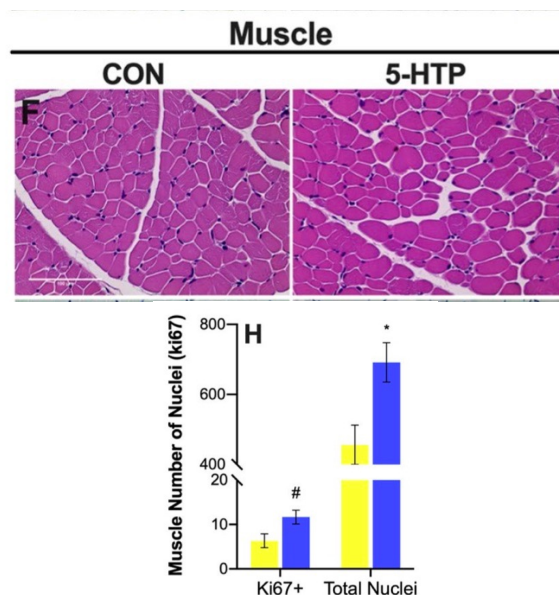
Dans une étude reposant sur l'administration d'un régime riche en tryptophane durant la gestation de rates, le développement post natal des ratons montrait des anomalies morphologiques musculaires marquées par des formes irrégulières de myofibrilles associées à un nombre augmenté de myonuclei ⁵¹⁹. Dans un modèle de veau en pré-sevrage, les effets d'un excès de sérotonine biodisponible sur le développement post natal musculaire a également été évalué avec une supplémentation de 5-HTP (**Figures 27A-B**) ⁵²⁰. Le séquençage ARN réalisé sur le muscle a montré qu'une supplémentation 5-HTP pendant 10 jours était associée à une régulation négative globale des voies, identifiées par Gene Ontology, en lien avec le muscle (**Figure 27A**) ⁵²⁰. Cependant, quelques gènes des voies liées à la prolifération ou à la différenciation musculaires étaient régulés positivement à la suite d'une supplémentation en 5-HTP (**Figure 27A**) ⁵²⁰. Identifiées par Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome, plusieurs voies étaient différenciellement exprimées, post supplémentation 5-HTP, comme les voies de signalisation PI3K/Akt, JAK/STAT, TNF ou encore NFκB (**Figure 27A**) ⁵²⁰. De plus, la supplémentation en 5-HTP entraînait des modifications morphologiques du muscle, en cours de développement post natal, marquées par une augmentation de la population cellulaire en cours de division (**Figure 27B**) ⁵²⁰. A l'inverse, dans une étude, s'intéressant aux conséquences d'un régime pauvre en tryptophane sur le développement musculaire de jeunes rates femelles, il a été mis en évidence des altérations du tissu musculaire, incluant une hypotrophie des fibres, de forme également irrégulière, avec moins de myonuclei et des mitochondries irrégulières ⁵¹⁸.

Figure 27 : Effets d'une augmentation soutenue de sérotonine biodisponible sur la morphologie du muscle et sur l'expression génique évaluée par séquençage d'ARN chez le veau avant sevrage

A. Voies significativement enrichies de GO ou KEGG dans le muscle de veau supplémenté pendant 10 jours en 5-HTP



B. Analyse histologique en HE et marquage de division cellulaire (Ki67) sur une coupe de muscle de veau supplémenté pendant 10 jours par 5-HTP



Source : Field et al, 2021⁵²⁰

Abréviations : GO (Gene Ontology), HE (Hématoxyline et Eosine), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome)

A l'aide d'approches ciblant plus spécifiquement les effets de la sérotonine et bien qu'il n'y ait pas eu d'étude morphologique ciblant le muscle squelettique, les souris *Tph1*^{-/-}, constitutionnellement dépourvues de sérotonine lors du développement post natal musculaire, présentaient une masse musculaire similaire à celles de souris sauvages à l'âge adulte⁴⁹⁶. Par ailleurs, un excès de sérotonine, au cours du développement post natal du muscle, induit par un traitement précoce par fluoxétine, était associé à un retard de croissance chez le rat, avec une taille et un poids inférieur comparés aux souris contrôles⁵¹¹. De plus, le poids, en valeur absolue, des muscles *soleus* ou EDL était diminué en cas d'exposition précoce à la fluoxétine, mais une fois rapportés au poids global du raton, les poids se normalisaient par rapport aux souris contrôles⁵¹¹.

Dans la continuité de l'exploration d'effets de croissance de 5-HT sur le muscle, il a été montré, *in vitro*, que l'exposition de myoblastes de rat L6 à la sérotonine favorisait la différenciation, la fusion en myotubes, ainsi que la croissance longitudinale des myofibres⁴⁹⁵. De plus, l'exposition de sérotonine 5 µM à des myoblastes fœtaux de rats entraînait une augmentation de l'expression génique de *Myogénine*, inhibée en présence de haute dose d'antagoniste 5-HT2A, la kétansérine, suggérant un effet 5-HT favorisant la différenciation musculaire, dépendant du récepteur 5-HT2A⁵⁰⁵. Le rôle du récepteur 5-HT2A a également été montré dans les stades de différenciation terminale, son blocage, par de hautes doses d'antagoniste 5-HT2A, inhibait l'entrée de calcium, nécessaire à la fusion de myotubes⁵²¹. *In vivo*, dans un modèle d'inactivation génétique ou d'inhibition pharmacologique de

Myostatine, facteur de la famille TGF- β connu pour inhiber la masse musculaire, l'expression génique de *Tph1*, dans le muscle, était surexprimée, suggérant que l'hypertrophie musculaire, induite par la sérotonine, pouvait interagir avec les voies liées à la Myostatine⁴⁹⁵.

Au total, le muscle strié squelettique est un muscle remarquable par sa capacité, finement orchestrée, de régénération *ad integrum*. La caractérisation extensive des processus, mis en œuvre dans cette régénération, a démontré le rôle crucial des cellules souches musculaires résidentes, impliqué dans le développement et le maintien du tissu musculaire, ainsi que les interactions indispensables avec d'autres partenaires cellulaires, tels que les vaisseaux, les cellules immunitaires ou encore les progéniteurs fibro-adipogéniques. Parmi les différents signaux identifiés, tant dans la régulation du comportement des cellules souches musculaires que celle des autres partenaires, la sérotonine a été peu investiguée, bien que son rôle comme facteur de croissance dans le muscle, participant notamment à la différenciation de myoblastes, ait été suggéré. A notre connaissance, aucune étude spécifiquement portant sur les effets de la fluoxétine sur la régénération musculaire et de ses acteurs cellulaires n'a été réalisée, à ce jour.

Partie 1 : La fluoxétine, un modulateur biphasique des concentrations de sérotonine dans l'organisme

A. Objectifs : Caractériser les effets de la fluoxétine, prototype des ISRS, sur les concentrations de sérotonine dans le compartiment central, périphérique et circulant

Des recherches extensives dans le champ des neurosciences, mais également au-delà du SNC, ont montré la diversité et la complexité des rôles de la sérotonine, cette monoamine pouvant agir comme neurotransmetteur, mais également comme hormone en périphérie avec une action systémique et locale. De plus, la sérotonine présente des propriétés trophiques notables dans le développement et le maintien de plusieurs tissus, comme le SNC, mais également en périphérie. Fait intéressant, la fluoxétine, traitement antidépresseur prototypique des ISRS ayant été le plus prescrit dans le monde et le plus étudié dans la littérature scientifique, partage les propriétés régénératives de la sérotonine dans le SNC. Dans une perspective d'investiguer, en dehors du SNC, les effets des ISRS dépendant de la sérotonine, notamment ceux favorisant la régénération, il est important de mieux comprendre les variations des concentrations de 5-HT, induits, au cours du temps, par ces molécules modulatrices de la transmission 5-HT.

L'homéostasie du système 5-HT est assurée par une distribution compartimentée de cette monoamine, par la régulation de son métabolisme incluant les enzymes de synthèse TPH, le transporteur SERT et les enzymes de dégradation MAO, et par la régulation de sa libération au niveau extracellulaire, pouvant faire intervenir des boucles de rétrocontrôle négatif via différents récepteurs 5-HT. De nombreuses études de la littérature ont montré que le signal sérotoninergique au niveau cérébral était renforcé sous l'effet d'un traitement prolongé par ISRS, notamment en raison d'une levée du rétrocontrôle négatif et d'une adaptation du métabolisme 5-HT. A contrario, les effets des ISRS en périphérie sur les concentrations de 5-HT sont moins bien connus voire contradictoires comme pour le niveau de 5-HT plasmatique.

Dans notre étude, à l'aide d'un modèle animal en situation physiologique, nous avons caractérisé finement au cours du temps les effets induits par un traitement prolongé par ISRS sur les concentrations de sérotonine dans les différents compartiments central, périphérique et circulant. Ces compartiments ne partageant pas les mêmes acteurs liés au métabolisme de la sérotonine, cette étude permettra de préciser la modulation du signal induite par les ISRS selon les mécanismes de régulation présentés par le tissu ou compartiment cible.

B. Matériel et méthodes

1. Animaux utilisés

Tous les animaux utilisés dans l'étude étaient des souris sauvages C57Bl6/RJ, dont le phénotype avec de hautes concentrations de sérotonine circulante a déjà été caractérisé ²⁵⁶, âgées de 6 semaines au début de l'étude. Les concentrations de sérotonine pouvant être différentes selon les sexes ⁵²², des souris uniquement mâles ont été utilisées dans l'étude. Soixante-quatre souris au total ont été réparties dans 16 groupes (n=5/groupe traité par

fluoxétine et n=3/groupe traité par placebo pour chaque temps de mise à mort, **Figure 28**). Les animaux étaient répartis par groupe de 3 à 5 dans les cages, dans un environnement contrôlé sur la température ($22\pm 1,5^{\circ}\text{C}$) et l'humidité et un cycle jour/nuit de 12h. La nourriture, dont l'apport en tryptophane était standardisé, et l'eau étaient à la disposition *ad libitum*, en accord avec les références internationales.

Pour chaque temps de mise à mort, les animaux ont été euthanasiés par exposition à une concentration croissante de CO_2 permettant d'éviter l'activation plaquettaire post traumatique en cas de dissection cervicale ou de décapitation et permettant également d'éviter les interactions entre anesthésiants et le système sérotoninergique^{523,524}. Les concentrations de sérotonine et son renouvellement pouvant varier au cours de la journée^{525,526} et au cours des saisons⁵²⁷, les mises à mort des animaux se sont déroulées, durant l'été, aux mêmes horaires, entre 9h et 11h du matin, excepté pour le premier temps réalisé à 6 heures post introduction de la fluoxétine, soit 14h.

Toutes les procédures de cette étude ont été approuvées par le comité d'utilisation et de soins des animaux à l'Institut Pasteur (CETEA 2014-0040).

2. Intervention pharmacologique

La fluoxétine (*Prozac* ©, 20mg/5mL), solution buvable, provenait du fabricant Lilly⁵²⁸ et était délivrée à hauteur de 18mg/kg/jr, correspondant aux dosages plasmatiques de fluoxétine utilisés en pratique clinique⁵²⁹.

Le traitement par fluoxétine était administré soit par gavage (uniquement pour le temps précoce de H6), soit *per os* dissous dans un biberon d'eau, protégé de la lumière, et changé deux fois par semaine. Une étude préalable a été réalisée permettant de déterminer la quantité d'eau bue par jour et par animal, ajustée au poids des souris âgées de 6 à 10 semaines.

La solution buvable de fluoxétine contient 4% de sucrose dans ses excipients⁵²⁸. Or il a été préalablement précisé que la teneur élevée en carbohydrates dans les apports journaliers pouvait modifier la concentration cérébrale de sérotonine en favorisant le passage du tryptophane à travers la BHE⁵³⁰. Ainsi, le groupe placebo recevait de l'eau contenant 4% de sucrose, avec des biberons d'eau changés deux fois par semaine.

3. Préparations des échantillons

Après mise à mort, le sang total était délicatement prélevé par ponction intracardiaque, à l'aide d'une seringue préalablement héparinée. Il était recueilli dans un tube, contenant 109 mM de sodium de citrate (Greiner bio-One) avec un ratio sang total/anticoagulant de 9:1, afin d'éviter l'activation plaquettaire. Après homogénéisation par inversement à température ambiante, 40 μL de sang total était prélevé et congelé à -80°C . Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) était recueilli sur 200 μL de surnageant récolté après une centrifugation à 3500G à 25°C , pendant 15min, et était congelé -80°C .

Après perfusion au PBS du corps entier, permettant le lavage du compartiment sanguin, la partie proximale de l'intestin était prélevée, lavée sur glace et pesée. Les échantillons étaient ensuite homogénéisés dans une solution d'HCl à 10^{-3} M et lysés à l'aide d'un instrument FastPrep-24TM (MP BiomedicalsTM, #116004500) et de tubes de Fast-prep Matrice de Z (MP BiomedicalsTM, #116961050-CF). Après clarification par une centrifugation à 12000 G de 10 minutes à 4°C , 400 μL de surnageant était récolté et congelé à -80°C .

Le cerveau était également recueilli et les régions cérébrales d'intérêt sérotoninergiques (raphé dorsal et cortex frontal) étaient disséquées sur glace, regroupées ensemble et congelées à -80°C.

4. Mesures de catabolites du tryptophane

Les concentrations de 5-HT et de 5-HIAA ont été quantifiées par HPLC couplée à une détection fluorimétrique ; ceux de tryptophane (Trp) et kynurénine (Kyn) par ultraHPLC couplée à une détection coulométrique. Les concentrations étaient calculées en fmol par milligramme de tissu ou en nmol/L pour le PPP et le sang total. Le calcul du ratio : $[5\text{-HT}]_{\text{PPP}} * 100 / [5\text{-HT}]_{\text{sang total}}$ permet d'apprécier la répartition de la sérotonine biodisponible dans le compartiment circulant, le calcul du ratio $[5\text{-HIAA}] / [5\text{-HT}]$ permet d'apprécier le turnover de 5-HT dans le tissu et l'activité d'Indoléamine-2-3-dioxygénase (IDO) plasmatique était calculée en % par le rapport : $[Kyn] * 100 / [Trp]$.

5. Analyses statistiques

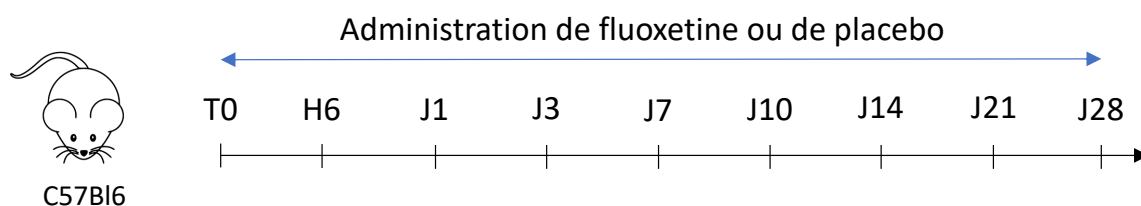
L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad® en utilisant les tests appropriés (tests non paramétriques de Mann-Whitney et corrélation de Spearman) avec un minimum de 95% d'intervalle de confiance pour la signification ; les valeurs de p indiquées sur les figures sont < 0.05 (*). Les figures affichent les valeurs moyennes pour tous les animaux testés associées à leur erreur standard de la moyenne.

C. Résultats

1. Concentrations tissulaires cérébrales de sérotonine au cours d'un traitement par fluoxétine

Afin d'évaluer les effets d'un traitement par ISRS sur les concentrations tissulaires cérébrales de 5-HT et de son métabolite le 5-HIAA, les animaux ont reçu, pendant 28 jours, un traitement par fluoxétine *per os* 18 mg/kg/jr ou un traitement placebo et ont été mis à mort à différents temps (**Figure 28**). Au niveau cérébral, les concentrations de sérotonine ont été évaluées par HPLC dans les zones d'intérêt représentées par, d'une part, le raphé dorsal, en tant que lieu de synthèse, et, d'autre part, le cortex frontal, en tant qu'aire de projection des neurones sérotoninergiques du raphé et donc de libération de sérotonine⁵³¹.

Figure 28 : Schéma représentatif du protocole expérimental d'intervention pharmacologique et de temps de mise à mort



Source : Figure personnelle

Abréviations : T0 (temps 0), H6 (6^{ème} heure post traitement), J1-28 (jours post-traitement).

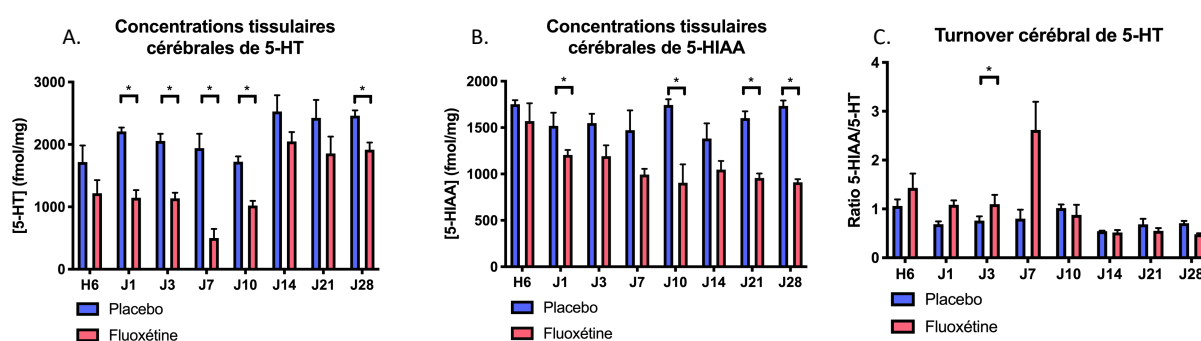
Au sein des groupes placebos, il n'y avait pas de différence significative, au cours du temps, sur les concentrations de 5-HT et de 5-HIAA, ainsi que du ratio 5-HIAA/5-HT (**Figures 29A-C**), ce qui atteste de la stabilité de ces concentrations à l'homéostasie, en lien avec des mécanismes de régulation au niveau central.

Dès le premier jour d'introduction du traitement, les souris traitées par fluoxétine présentaient un niveau intratissulaire de sérotonine significativement diminué de 48% comparé au groupe placebo, dans les zones cérébrales sérotoninergiques ($[5\text{-HT}]_{\text{cérébral}}$ du groupe placebo = $2209 \pm 61,09$ fmol/mg et $[5\text{-HT}]_{\text{cérébral}}$ du groupe fluoxétine = $1147 \pm 90,63$ fmol/mg ; $p= 0,0357$), (**Figure 29A**). Les souris traitées par fluoxétine montraient une diminution significative des concentrations intratissulaires de sérotonine comparés au groupe placebo jusqu'à 10 jours de traitement. A partir de deux semaines de traitement, la différence entre les deux groupes n'était plus significative avec un retour vers l'état d'homéostasie. A noter, à 28 jours de traitement, les concentrations tissulaires cérébrales de sérotonine montraient une légère diminution de 22% dans le groupe fluoxétine comparé au groupe placebo (**Figure 29A**).

L'évaluation des concentrations tissulaires cérébrales de 5-HIAA montrait une diminution significative de 20 % dans le groupe fluoxétine comparé au groupe placebo dès le premier jour de traitement ($[5\text{-HIAA}]_{\text{cérébral}}$ du groupe placebo = $1519 \pm 141,90$ et $[5\text{-HIAA}]_{\text{cérébral}}$ du groupe fluoxétine = $1206 \pm 53,01$; $p= 0,0357$), (**Figure 29B**). Les concentrations de 5-HIAA des souris traitées par fluoxétine avaient une tendance à être inférieurs au niveau des souris traitées par placebo avec des différences significatives à 10, 21 et 28 jours post traitement.

Le ratio 5-HIAA/5-HT tendait vers une augmentation au cours de la première semaine de traitement par fluoxétine, avec une hausse significative le troisième jour, comparée au groupe placebo, suivie d'un retour vers l'homéostasie jusqu'à la fin du traitement (**Figure 29C**).

Figure 29 : Cinétique des concentrations tissulaires de 5-HT et 5-HIAA et du ratio 5-HIAA/5-HT dans les zones sérotoninergiques cérébrales, lors d'un traitement par fluoxétine



Source : Figure personnelle avec données originales de l'étude

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'un traitement prolongé par fluoxétine induit une déplétion intratissulaire cérébrale précoce de sérotonine, suivie d'un retour vers une nouvelle

homéostasie dès 14 jours post-traitement avec des taux réduits par rapport aux groupes placebos. En parallèle, les niveaux de catabolisme, voire de renouvellement, de 5-HT avaient tendance à augmenter la première semaine de traitement suivie d'un retour à l'homéostasie.

2. Concentrations périphériques de sérotonine au cours d'un traitement par fluoxétine

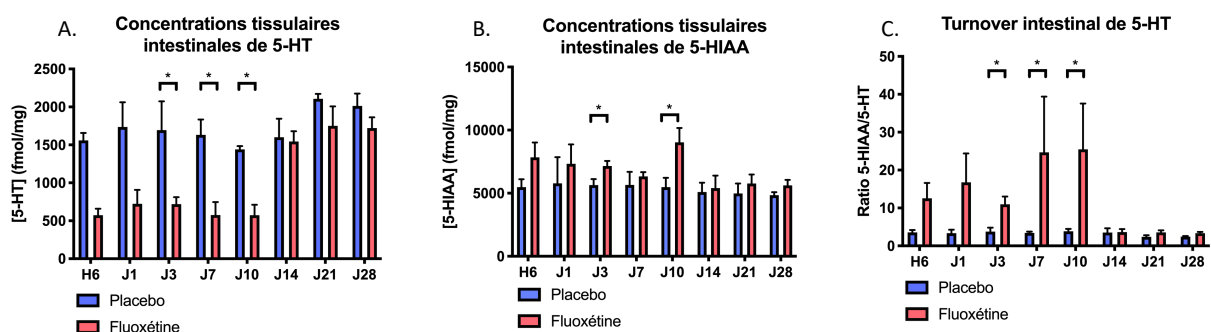
Au niveau périphérique, en regard des concentrations tissulaires de 5-HT dans les aires cérébrales de production et libération de sérotonine, les concentrations tissulaires de sérotonine ont été évaluées par HPLC au niveau de l'intestin, première source de synthèse de sérotonine de l'organisme⁵³¹. Au sein des groupes placebos, il n'y avait pas de différence significative au cours du temps sur les concentrations de 5-HT et 5-HIAA, ainsi que sur le ratio 5-HIAA/5-HT (**Figures 30A-C**).

Dès 3 jours post traitement, les souris traitées par fluoxétine montraient une réduction significative de 57% des concentrations tissulaires de 5-HT comparées aux souris traitées par placebo et cette diminution se maintenait jusqu'à 10 jours de traitement (à J10, $[5\text{-HT}]_{\text{intestin}}$ du groupe placebo = $1440 \pm 44,06$ et $[5\text{-HT}]_{\text{intestin}}$ du groupe fluoxétine = $574,4 \pm 137,10$; $p=0,0357$), (**Figure 30A**). A l'issue de 14 jours de traitement, les concentrations tissulaires de sérotonine dans l'intestin n'étaient pas significativement différentes des concentrations observées dans le groupe placebo.

Les concentrations tissulaires de 5-HIAA évaluées dans l'intestin avaient une tendance globale à être augmentées dans les groupes fluoxétine comparés aux placebos avec une hausse significative à J3 et J10 post traitement (à J10, $[5\text{-HIAA}]_{\text{intestin}}$ du groupe placebo = $5478 \pm 739,20$ et $[5\text{-HIAA}]_{\text{intestin}}$ du groupe fluoxétine = 9029 ± 1142 ; $p=0,0357$), (**Figure 30B**).

Le ratio 5-HIAA/5-HT dans l'intestin était significativement augmenté à J3, J7 et J10 post traitement par fluoxétine, pouvant représenter une multiplication par 7 du niveau de catabolisme de 5-HT par rapport au groupe placebo. Puis, les souris traitées par fluoxétine présentaient un ratio 5-HIAA/5-HT similaire à celui de souris traitées par placebo, signifiant un retour à l'homéostasie dès le 14^{ème} jour de traitement.

Figure 30 : Cinétique des concentrations tissulaires intestinales de 5-HT, de 5-HIAA et du ratio 5-HIAA/5-HT lors d'un traitement par ISRS



Source : Figure personnelle avec données originales de l'étude

Au total, les cinétiques des concentrations de 5-HT dans l'intestin après un traitement répété par fluoxétine sont similaires à celles observées dans les zones cérébrales

sérotoninergiques à savoir une déplétion tissulaire précoce et un retour vers l'homéostasie après 2 semaines. A contrario, le catabolisme de 5-HT dans l'intestin était nettement augmenté durant les 10 premiers jours de traitement, avec une taille d'effet plus marquée que dans les aires sérotoninergiques cérébrales, suivie également d'un retour vers l'homéostasie après 2 semaines.

3. Concentrations circulantes de sérotonine, tryptophane et kynurénine au cours d'un traitement par fluoxétine

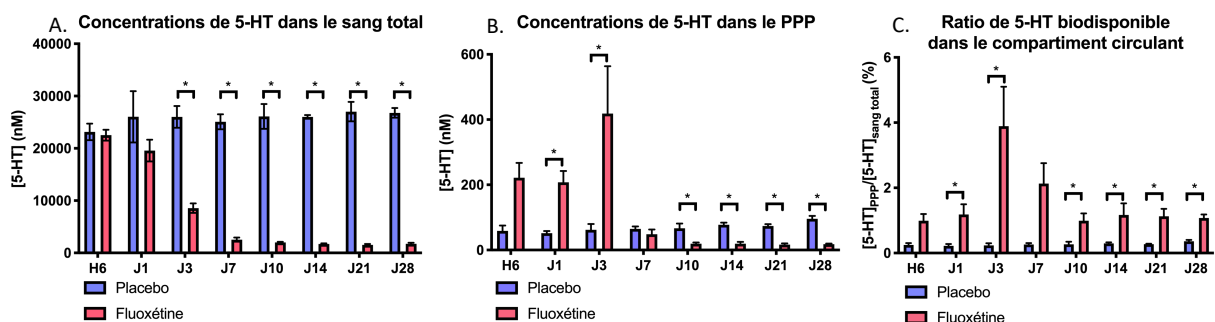
Les concentrations de sérotonine dans le compartiment circulant ont été évaluées par HPLC dans le sang total, représentant majoritairement le stock intraplaquettaire, dans le plasma pauvre en plaquettes, au cours d'un traitement par fluoxétine ou placebo. Au sein des groupes placebos, il n'y avait pas de différence significative au cours du temps sur les concentrations de 5-HT dans le compartiment circulant (**Figures 31A-C**), avec une $[5-HT]_{\text{sang total}}$ moyenne de 25780 nM et $[5-HT]_{\text{PPP}}$ moyenne de 68,9 nM résultant en un rapport $[5-HT]_{\text{sang total}}/[5-HT]_{\text{PPP}} = 374$.

Dans le sang total, dès 3 jours post traitement, une nette diminution significative de 67% des concentrations de sérotonine était observée dans le groupe fluoxétine comparé au groupe placebo. Cette diminution significative des concentrations de sérotonine dans le sang total était soutenue tout au long du traitement par fluoxétine, résultant en une réduction drastique de 93% à J28 post traitement (à J28, $[5-HT]_{\text{sang total}}$ du groupe placebo = $26792 \pm 926,50$ et $[5-HT]_{\text{sang total}}$ du groupe fluoxétine = $1750 \pm 206,50$; $p = 0,0357$), (**Figure 31A**).

Dans le PPP, les concentrations de sérotonine étaient retrouvées augmentées dès H6 avec un changement significatif à J1 et à J3, un pic significatif augmenté de 5% chez les souris traitées par fluoxétine comparées aux souris traitées par placebo (à J3, $[5-HT]_{\text{PPP}}$ du groupe placebo = $61,96 \pm 17,98$ et $[5-HT]_{\text{PPP}}$ du groupe fluoxétine = $418,40 \pm 145,20$; $p = 0,0357$), (**Figure 31B**). Après 10 jours de traitement et jusqu'à 28 jours post traitement, les concentrations de sérotonine dans le PPP étaient significativement inférieures dans le groupe fluoxétine comparé au groupe placebo.

Permettant d'apprécier la répartition de la sérotonine plasmatique donc biodisponible au sein du compartiment circulant, le ratio des concentrations plasmatiques et de sang total de sérotonine a été mesuré au cours d'un traitement prolongé par fluoxétine. Le ratio de $[5-HT]_{\text{PPP}}/[5-HT]_{\text{sang total}}$ a été retrouvé significativement plus élevé chez les souris traitées par fluoxétine comparé aux souris traitées par placebo tout au long du traitement, excepté à J7 post traitement (**Figure 31C**).

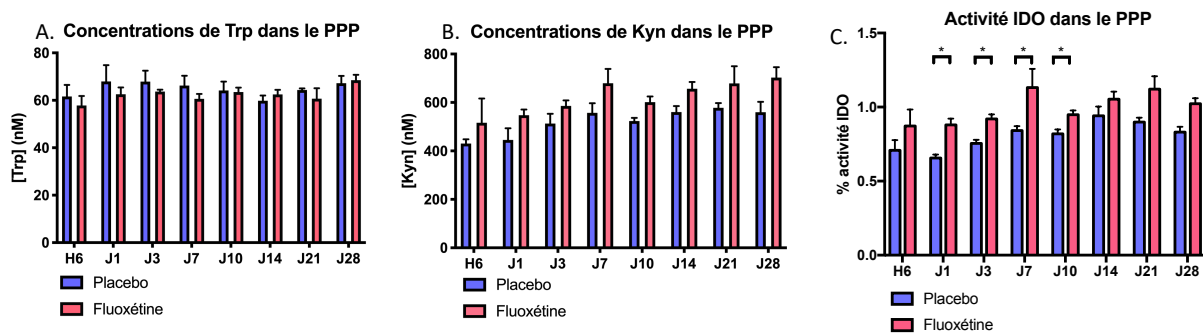
Figure 31 : Cinétique des concentrations de 5-HT dans le compartiment circulant lors d'un traitement par ISRS



Source : Figure personnelle avec données originales de l'étude

Afin d'évaluer indirectement le métabolisme de la sérotonine dans le compartiment circulant, les concentrations extracellulaires de tryptophane et de kynurénine ont été mesurées dans le PPP. Aucune différence significative n'était mise en évidence sur les concentrations plasmatiques de tryptophane entre les groupes fluoxétine et placebo tout au long du traitement (**Figure 32A**). Les souris traitées par fluoxétine présentaient des concentrations augmentées non significatives de kynurénines comparées aux souris traitées par placebo tout au long du traitement (**Figure 32B**). De plus, une augmentation significative de l'activité d'IDO de J1 à J10 post traitement était observée chez les souris traitées par fluoxétine comparées aux souris traitées par placebo (**Figure 32C**).

Figure 32 : Cinétique des concentrations plasmatiques de Trp, Kyn et activité d'IDO lors d'un traitement par ISRS



Source : Figure personnelle avec données originales de l'étude

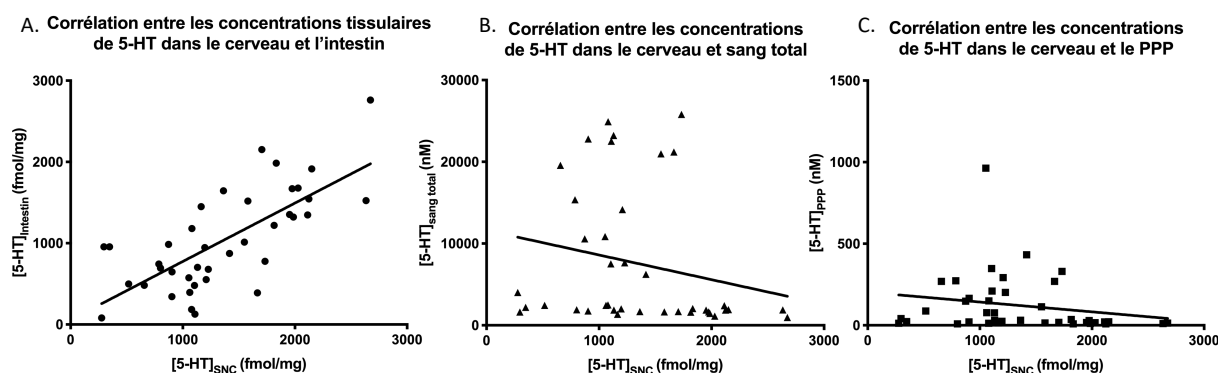
L'ensemble de ces résultats suggère que les effets de la fluoxétine sur le compartiment circulant s'opposent aux effets observés dans le SNC ou l'intestin, avec l'induction de deux types de cinétiques distinctes. D'une part, on observe une nette diminution des concentrations de sérotonine dans le sang total, correspondant principalement aux concentrations intraplaquettaires, induite par un traitement prolongé par fluoxétine, sans mécanisme de régulation mis en œuvre, à la différence des concentrations intratissulaires cérébraux ou intestinaux. D'autre part, les concentrations plasmatiques de sérotonine sont initialement augmentées puis sont durablement diminuées à l'issue de la première semaine de traitement par fluoxétine. Ainsi, à l'issue de la première semaine de traitement par fluoxétine, les concentrations de sérotonine dans diminuées dans l'ensemble du compartiment circulant. Bien que le traitement prolongé par fluoxétine conduise, à terme, à une déplétion de l'ensemble des concentrations du compartiment circulant, le pourcentage de sérotonine biodisponible au sein de ce compartiment est augmenté tout au long du traitement, reflétant indirectement l'activité de SERT bloquée par cet ISRS. Enfin, il peut être suggéré que, par action directe ou indirecte suite à un mécanisme de régulation secondaire à l'excès de sérotonine plasmatique, la fluoxétine est associée à une augmentation de l'activité d'IDO.

4. Corrélations des concentrations de sérotonine entre les compartiments central, périphérique et circulant

Le renforcement du signal sérotoninergique central par un traitement prolongé par fluoxétine a été extensivement démontré. Afin de déterminer si un paramètre en périphérique pouvait corrélérer positivement avec le signal sérotoninergique central renforcé lors d'un traitement prolongé par ISRS, des analyses de corrélations ont été réalisées. Au sein des groupes placebos, les concentrations tissulaires de 5-HT des aires cérébrales sérotoninergiques ne corrélaient pas de manière significative avec les concentrations de 5-HT dans l'intestin, dans le sang total et dans le PPP, respectivement.

Au sein des groupes traités par fluoxétine, les concentrations tissulaires de sérotonine dans le SNC corrélaient positivement, de manière forte et significative, avec les concentrations sérotoninergiques dans l'intestin (Corrélation de Spearman, $r = 0,70$, $p < 0,0001$), (**Figure 33A**). Les concentrations de sérotonine dans le SNC corrélaient négativement et plus faiblement mais de manière significative avec les concentrations de 5-HT dans le sang total et le PPP (Corrélation de Spearman, $r = -0,38$, $p = 0,01$ et $r = -0,33$, $p = 0,03$, respectivement), (**Figures 33B-C**).

Figure 33 : Corrélations des concentrations de sérotonine entre les aires cérébrales sérotoninergiques et de l'intestin, du PPP ou du sang total



Source : Figure personnelle avec données originales de l'étude

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la cinétique des concentrations de sérotonine dans le compartiment périphérique intestinal corrèle positivement au signal sérotoninergique renforcé dans le SNC par un traitement prolongé par ISRS, suggérant que les cinétiques des concentrations de 5-HT au sein de microsystemes sérotoninergiques, capables de synthèse, pourraient être également renforcés par un traitement prolongé par ISRS.

D. Discussion et limites

Cette étude s'est intéressée à caractériser, au cours du temps, les effets des ISRS en administration chronique, simultanément, sur l'homéostasie centrale et périphérique des concentrations de sérotonine. A notre connaissance, c'est la première étude préclinique mettant en évidence si précisément les cinétiques induites par les ISRS sur les concentrations de 5-HT, soulignant leurs effets modulateurs du signal sérotoninergique dans le temps, en central mais également en périphérie.

Attestant de la stabilité du système sérotoninergique, il existe une homéostasie globale des concentrations de sérotonine en situation physiologique stable au cours du temps comme le démontre l'absence de différence significative pour l'ensemble des mesures dans les groupes placebos.

Les cinétiques, induites par les ISRS, des concentrations tissulaires de sérotonine dans le compartiment central, retrouvées dans notre étude, sont cohérentes avec les études antérieures, à savoir une déplétion initiale intratissulaire en sérotonine, puis un retour vers l'état d'homéostasie après deux semaines de traitement^{213,214,532}. Ces résultats sont en lien avec les mécanismes de régulation, mis œuvre lors d'un traitement prolongé par ISRS, incluant une augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT, secondaire à l'inhibition directe de sa recapture de la fente synaptique par ces molécules^{187,212}, une diminution du recyclage de la sérotonine en intratissulaire ou de sa dégradation en 5-HIAA²¹⁷. De plus, outre l'action inhibitrice des autorécepteurs 5-HT1A et 5-HT1B freinant la libération de sérotonine^{176,531}, d'autres mécanismes de régulation participent au rétrocontrôle négatif tels que la diminution neuronale de la synthèse de 5-HT^{215,216}. Cette déplétion initiale de 50% des concentrations tissulaires 5-HT dans les régions cérébrales d'intérêt est similaire au phénotype présenté par les souris KO *Sert* (**Figure 7**)¹²⁰. Fait intéressant, à la différence des souris KO *Sert*, les souris traitées par fluoxétine montraient une restauration des concentrations cérébrales de sérotonine avec un retour vers l'état d'homéostasie, à l'issue de 14 jours de traitement, alors que les phénomènes d'inhibition de recapture et de diminution de synthèse ont été décrits comme persistants dans les neurones 5-HT de rongeurs traités par ISRS jusqu'à 28 jours^{215,216}. A l'instar de la levée du rétrocontrôle négatif secondaire à la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT1A et 5-HT1B^{176,212,531}, d'autres mécanismes neurobiologiques adaptatifs semblent être induits par les ISRS au long cours, permettant la restauration de l'homéostasie sérotoninergique intratissulaire au sein du SNC, comme la capacité de synthèse de 5-HT des neurones noradrénergiques, induite par la fluoxétine²²².

Les effets des ISRS sur les concentrations de sérotonine dans l'intestin, principal organe producteur de sérotonine en périphérie⁵⁹ et exprimant également le transporteur SERT¹⁴⁶, ont été peu décrits. Différentes études ont démontré que l'exposition aiguë, *in vitro*, de fluoxétine tout comme le traitement chronique de 10 jours, *in vivo*, entraînait une augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT, tant au niveau des pôles muqueux que séreux, traduisant une perméabilité intestinale bidirectionnelle augmentée^{242,245}. Comparable à nos observations, une étude a également montré qu'à l'issue de 2 semaines de traitement par ISRS, les concentrations tissulaires de sérotonine dans l'intestin et le côlon étaient inchangés²⁴⁵. Contrastant avec les résultats de notre étude, il a été montré, au niveau du côlon, que l'administration d'ISRS était associée à une diminution des concentrations de 5-HT et de 5-HIAA après 6 semaines de traitement⁵³³. Cependant, il a déjà été précisé, dans des études *ex vivo*, que les concentrations de sérotonine dans l'intestin et le côlon, sous l'effet d'ISRS, impliquaient des mécanismes distincts de libération et de recapture de la sérotonine⁵³⁴.

Fait intéressant, les organes producteurs de 5-HT, en central et en périphérie, ont présenté des cinétiques similaires sous l'effet de traitement ISRS, à savoir une déplétion intratissulaire initiale et une tendance à la restauration des concentrations de 5-HT après deux semaines, suggérant des mécanismes efficaces de régulation du métabolisme de la 5-HT. Dans l'intestin, on observait une nette augmentation, jusqu'à 7 fois, du catabolisme de 5-HT, au cours des 10 premiers jours de traitement par ISRS, comparé aux aires cérébrales sérotoninergiques qui seulement triplaient cette activité, suggérant une mobilisation

différente d'acteurs du métabolisme 5-HT pour réguler les concentrations 5-HT. En effet, à la différence de la synapse dans le SNC qui dispose de mécanismes de régulation de 5-HT enrichis, incluant les boucles de rétrocontrôles négatives régies par les autorécepteurs 5-HT¹⁴⁴, les capacités d'adaptation connues de l'intestin s'articulent autour des acteurs classiques du métabolisme, SERT, TPH1 et MAO¹⁴⁶. De plus, le renforcement du signal sérotoninergique sous l'effet d'un traitement chronique par ISRS a été démontré dans le SNC mais n'a pas été exploré au-delà de 10 jours dans l'intestin, questionnant la nature du signal intestinal 5-HT, à l'issue des 14 jours de traitement où les concentrations 5-HT tissulaires se restaurent^{187,212,242,245}. Par ailleurs, la survenue des effets induits par la fluoxétine était précoce, avec des concentrations de 5-HT diminuant dès 6 heures post introduction. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études ayant mis en évidence une action rapide des ISRS sur les concentrations de sérotonine en central comme en périphérie^{187,245,260}, y compris pour la fluoxétine qui présente, parmi les ISRS, la plus longue demi-vie avec un temps allongé pour atteindre l'état d'équilibre¹⁴. Par ailleurs et de manière attendue, ces modifications n'étaient pas associées à des changements de concentrations plasmatiques de tryptophane comme précédemment montré^{263,268,535}.

En tant que compartiment de stockage sérotoninergique régulant la transmission du signal sérotoninergique systémique notamment pour les organes non capables de synthétiser localement de la sérotonine²⁴⁶, il est intéressant de caractériser les concentrations de 5-HT dans le compartiment circulant. Ainsi, nous avons pu montrer qu'un traitement prolongé par fluoxétine était associé à une réduction drastique des concentrations de sérotonine dans le sang total, signifiant une déplétion majeure du stock de sérotonine porté par les plaquettes. Ces résultats étaient cohérents avec les précédentes études cliniques (**Tableau 2**) et précliniques^{258,259}. Cette déplétion induite par les ISRS et soutenue au cours du temps suggère que ce compartiment ne présente pas de mécanismes de régulation de l'homéostasie sérotoninergique, à l'inverse du cerveau ou de l'intestin. De plus, comparés aux compartiments central et périphérique, les ISRS ont présenté un délai d'action plus long dans le sang total, soit à 3 jours post traitement et de manière similaire aux études précédentes^{258,259}. Ce délai peut être mis en lien avec la durée de vie des plaquettes qui, en l'absence d'activation, vont maintenir leur stock intracellulaire de sérotonine. Cette durée de vie a été estimée à 4,8 jours chez la souris⁵³⁶ et est habituellement de 7 à 10 jours chez l'homme⁵³⁷.

L'évaluation stable des concentrations plasmatiques de sérotonine au cours du temps dans le groupe placebo est en faveur d'une limitation de biais technique permettant une analyse fiable²⁵⁴. Ainsi, nous avons mis en évidence deux cinétiques induites par la fluoxétine sur les concentrations plasmatiques de sérotonine au cours du temps, à savoir une augmentation franche durant la première semaine de traitement suivie d'une diminution des concentrations de sérotonine plasmatique, signifiant que le traitement par fluoxétine initialement renforce le signal 5-HT systémique basal puis le freine durablement. La diminution de la concentration de sérotonine plasmatique après un traitement prolongé par ISRS a été rapportée dans plusieurs études cliniques (**Tableau 2**), tout comme dans le modèle murin KO *Sert*¹²², s'opposant aux effets de la fluoxétine augmentant les concentrations extracellulaires de 5-HT décrits dans le SNC ou dans l'intestin^{187,212,242,245}. Par ailleurs, ces données suggèrent qu'à l'inverse du stock plaquettaire, il existe des mécanismes de régulation permettant de moduler les concentrations plasmatiques de sérotonine, garantissant l'intégrité du signal sérotoninergique systémique. En effet, en dehors des plaquettes, les poumons peuvent participer activement à la régulation de la sérotonine plasmatique²⁵². Par ailleurs, le ratio de la concentration de sérotonine plasmatique rapportée à celle du sang total,

rendant compte de la répartition de la sérotonine entre les compartiments extra et intracellulaire, peut être interprété comme le pourcentage de sérotonine libre circulante et a même été identifié par certains auteurs comme un marqueur d'activation plaquettaire, voire comme facteur prédictif d'évènement cardiovasculaire ^{538,539}. Ce dernier était significativement augmenté lors d'un traitement prolongé par ISRS. De manière similaire, dans une étude clinique récente, il était possible d'évaluer le pourcentage de sérotonine libre circulante qui était également augmenté de 37% à l'issue de 6 semaines de traitement par ISRS ²⁶⁴. Cependant, des études ultérieures sont nécessaires pour préciser, d'une part, la fonction du signal, à l'état de base, porté par la sérotonine plasmatique comparée au signal 5-HT délivré par les plaquettes activées et, d'autre part, les effets de cette modulation biphasique du signal systémique à l'état d'équilibre induite par la fluoxétine, tout comme les conséquences des faibles concentrations de sérotonine délivrées en cas d'activation plaquettaire après un traitement prolongé par la fluoxétine.

L'investigation de la voie des kynurénines est en plein essor du fait des avancées scientifiques en faveur de leur implication dans l'inflammation, notamment la neuroinflammation ^{57,540}. Dans notre étude, les concentrations plasmatiques de Kyn étaient inchangés au cours du traitement prolongé par fluoxétine. Ces données étaient similaires à celles issues d'études cliniques chez des patients présentant un EDC et ayant été traités de 4 à 8 semaines par ISRS ⁵³⁵. A l'inverse du compartiment circulant, il a été montré dans une étude préclinique que les ISRS avaient des effets sur les voies des kynurénines au niveau central notamment avec une diminution des concentrations de l'acide quinolinique, substance neurotoxique, dans différentes régions cérébrales ⁵⁴¹. Par ailleurs, nous avons également évalué l'activité d'IDO qui participe au catabolisme du tryptophane vers les kynurénines et qui est exprimée principalement par les cellules immunes du sang en s'activant classiquement en réponse à un signal inflammatoire ⁵⁷. En parallèle des pics plasmatiques de sérotonine, l'activité d'IDO était retrouvée augmentée en phase précoce sous l'effet des ISRS, suggérant de potentiels effets immunomodulateurs induits par la fluoxétine.

Bien qu'il ait été suggéré que les concentrations de 5-HT intraplaquettaires puissent être le miroir des changements observés dans les neurones sous l'effet des ISRS ²⁵⁹, nos analyses de corrélation ont mis en évidence que seules les concentrations tissulaires de 5-HT dans l'intestin présentaient une corrélation forte et positive avec les concentrations tissulaires de 5-HT dans les aires cérébrales sérotoninergiques. Par ailleurs, l'absence de corrélation forte entre les concentrations de 5-HT cérébrales et dans le sang total, équivalents à des niveaux de stockage intratissulaire, est cohérente avec de précédentes études ^{257,542}, probablement sous-tendus par l'expression d'acteurs liés au métabolisme de 5-HT limitée par les plaquettes, comparés aux neurones sérotoninergiques. Un des mécanismes clés du métabolisme de 5-HT partagé par les neurones 5-HT et l'intestin réside en leur capacité de synthèse de 5-HT qui pourrait être un des mécanismes participant au renforcement du signal 5-HT, induit par un traitement prolongé par ISRS. Fait intéressant, le polymorphisme génétique de *Tph2*, impactant négativement son activité, a été identifié comme facteur de résistance au traitement par ISRS, suggérant l'importance de TPH dans la médiation des effets des ISRS, au même titre que sa cible d'action primaire, SERT ⁵⁴³. Il serait donc intéressant d'évaluer si les autres microsystèmes sérotoninergiques possédant une capacité de synthèse locale de 5-HT répondent de manière similaire à un traitement chronique par ISRS.

Quant à l'appréciation des concentrations extracellulaires de 5-HT, plusieurs études précliniques et cliniques ont recherché des corrélations entre le niveau de sérotonine dans le LCR, considéré comme un reflet des concentrations extracellulaires cérébraux de 5-HT, et le

niveau de sérotonine plasmatique. S'exposant aux mêmes défis techniques et méthodologiques liés aux dosages de la sérotonine, les résultats de ces études sont contradictoires. Plus précisément, en situation saine, les études précliniques ont mis en évidence une forte corrélation entre le niveau de sérotonine plasmatique et le niveau de sérotonine dans le LCR ⁵⁴⁴, alors que les études cliniques n'ont montré qu'une corrélation modérée voire une absence de corrélation ^{545,546}. Ces mêmes résultats contradictoires ont été retrouvés pour la corrélation entre le niveau de sérotonine dans le sang total et le niveau de sérotonine dans le LCR avec une forte corrélation rapportée ^{526,546} *versus* aucune corrélation ⁵⁴⁵.

Une des limites de notre étude repose sur les concentrations tissulaires cérébrales de 5-HT qui ont été évalués sur le regroupement de zones sérotoninergiques d'intérêt qu'étaient le raphé dorsal et le cortex frontal. Ces aires étant différemment impliquées dans le métabolisme sérotoninergique, une caractérisation plus fine des effets chroniques des ISRS aurait pu être établie en distinguant les concentrations de 5-HT quantifiées plus précisément selon les régions cérébrales. Cependant, nous avons pu mettre en évidence des cinétiques de concentrations tissulaires de 5-HT similaires aux études antérieures ^{213,214,532}. A la différence des cinétiques largement caractérisées des concentrations extracellulaires de 5-HT dans le SNC au cours d'un traitement par ISRS, l'absence d'évaluation des concentrations extracellulaires au niveau intestinal nous limite pour conclure sur la cinétique du signal 5-HT dérivé de l'intestin sous fluoxétine. Par ailleurs, nous avons utilisé une souche de souris dont le métabolisme atypique de 5-HT est connu, avec des concentrations de 5-HT notamment plasmatiques augmentées par rapport aux autres souches murines, favorisant la taille d'effet des ISRS sur la modulation des concentrations 5-HT ⁵⁴⁷. Cependant, en situation saine, ces résultats peuvent être comparés aux données biologiques issues d'études cliniques puisque les modèles murins, notamment des souches C57Bl6, ont été comparés aux données humaines et ont montré leur validité dans l'étude du système sérotoninergique ⁵⁴⁸. En effet, la sérotonine est hautement conservée à travers les espèces, ayant été retrouvée chez les plantes comme chez les êtres humains ⁵². Selon les protéines impliquées dans le système sérotoninergique, il peut y avoir jusqu'à 80% d'homologie de séquence entre les espèces humaines et de rongeurs notamment pour les récepteurs 5-HT ⁹⁹. Enfin, l'objectif de cette étude ne portait que sur la caractérisation descriptive des modulations induites par les ISRS sur le signal sérotoninergique et ne permet pas de démontrer les mécanismes de régulation, sous-tendant les effets des ISRS, au cours du temps.

En conclusion, caractériser la modulation positive ou négative du signal 5-HT, dans le temps, par les ISRS peut permettre d'optimiser les effets bénéfiques ou de minimiser les effets délétères liés au signal 5-HT, induits par ces traitements. De plus, la prédiction de la réponse sérotoninergique d'un organe à un traitement par ISRS, selon les mécanismes de régulation du métabolisme 5-HT exprimés ou non par cet organe, peut permettre de dégager de nouvelles cibles des ISRS, tant en termes de durée d'exposition que de l'effet attendu sur le signal 5-HT, à savoir son renforcement ou sa déplétion.

Partie 2 : La fluoxétine, un traitement favorisant la régénération musculaire et les fonctions des cellules souches musculaires

A. Objectif : caractériser l'impact de la fluoxétine dans la régénération musculaire à l'aide de modèle de blessure musculaire aiguë

De manière similaire à d'autres facteurs de croissance, la sérotonine participe positivement à la régulation au développement et au maintien de différents tissus. Ainsi, elle est une monoamine potentiellement précieuse pour la régénération de l'organisme, tant à travers ses effets trophiques ciblant des progéniteurs spécifiques, ses effets pro-angiogéniques stimulant un partenaire privilégié dans le soutien de la régénération tissulaire, que de ses multiples effets immunomodulateurs. De plus, en cas de blessure, le signal sérotoninergique peut être renforcé, par l'intermédiaire des plaquettes recrutées précocement au site de blessure.

Sous-tendus par les effets trophiques de la sérotonine, le traitement antidépresseur ISRS par fluoxétine a démontré des propriétés régénératives dans différents tissus, tels la neurogenèse, l'angiogenèse ou encore l'hématopoïèse, en stimulant la cascade de prolifération et différenciation de progéniteurs spécifiques. Dans cette perspective de confirmer les propriétés régénératives de cette molécule au sein de l'organisme, il est important d'investiguer ses effets, en périphérie, dans un autre modèle de régénération tissulaire, ainsi que d'identifier les mécanismes d'action sous-tendant ces potentiels effets bénéfiques en discriminant les effets communs de ceux spécifiques d'un tissu.

La régénération du muscle squelettique est efficiente et facile d'accès, ce qui a permis de caractériser précisément, à l'aide de nombreux modèles expérimentaux, les différents processus biologiques mis en œuvre lors de la cicatrisation d'un tissu. En ce sens, l'étude de la régénération musculaire est reconnue comme un paradigme classique d'étude en biologie régénérative, ainsi qu'en médecine régénérative. Bien que quelques études aient exploré le rôle trophique de la sérotonine au sein du muscle squelettique, les effets d'un traitement par fluoxétine, lors de la régénération du muscle squelettique, n'ont pas été investigués.

Dans notre étude, à l'aide de modèles classiques de blessure musculaire, aiguë ou répétée, nous avons investigué, chez la souris, les effets d'un traitement prolongé par fluoxétine sur la régénération musculaire, en précisant les effets sur les cellules souches musculaires, la vascularisation et l'inflammation. Puis, à l'aide d'outils génétiques et pharmacologiques, nous avons identifié les mécanismes d'action sous-tendant les effets de la fluoxétine.

B. Serotonin reuptake inhibitors improve muscle stem cell function and muscle regeneration (article soumis)

Serotonin reuptake inhibitors improve muscle stem cell function and muscle regeneration

Authors:

Mylène Fefeu^{1,2,3}, Michael Blatzer⁴, David Briand², Pierre Rocheteau², Alexandre Haroche¹, Mélanie Juchet-Martin², Anne Danckaert⁵, Olivier Mir⁶, Raphaël Gaillard^{1,2,3*}, Fabrice Chrétien^{2,3,7*}.

1: Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo-Universitaire de psychiatrie, Paris, France

2: Institut Pasteur, Experimental Neuropathology Unit, Global Health Department, Paris, France

3: Université de Paris, Paris France

4: EA Dynamyc, Université Paris Est Créteil, Faculté de Santé, Créteil, France

5: Institut Pasteur, UTechS PBI, C2RT, Paris France

6: Sarcoma Group, Gustave Roussy, Villejuif, France

7: Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo-Universitaire de neuropathologie, Paris, France

Corresponding authors: Pr. Fabrice Chrétien & Pr Raphaël Gaillard, Experimental Neuropathology, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

Tel +33-140613144

fabrice.chretien@pasteur.fr

Summary

Serotonin reuptake inhibitor antidepressants such as fluoxetine (FLX) are widely used to treat mood disorders. The mechanisms of action include an increase in extracellular level of serotonin, neurogenesis, and growth of vessels in the brain. We investigated whether FLX could have broader peripheral regenerative properties. Following prolonged administration of FLX, we showed that FLX increases the number of muscle stem cells and the muscle angiogenesis in mice. FLX also improved skeletal muscle regeneration after single and multiple injuries with an increased muscle stem cells pool and vessel density associated with reduced fibrotic lesions and inflammation. Mice devoid of peripheral serotonin treated with FLX did not exhibit beneficial effects during muscle regeneration. Specifically, pharmacological, and genetic inactivation of the 5-HT_{1B} subtype serotonin receptor also abolished the enhanced regenerative process induced by FLX. We highlight here a new regenerative property of serotonin on skeletal muscle.

Keywords

Fluoxetine, serotonin/5-HT, muscle stem cells, muscle regeneration, angiogenesis, 5-HT_{1B} receptor

Introduction

Since its approval four decades ago, fluoxetine (FLX), known as the first selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) ¹, has become the world's most prescribed antidepressant ². Extensive research on neurotransmission, in particular the transmission of serotonin (also termed 5-hydroxytryptamine, 5-HT) in depressive disorders, has provided strong evidence on the mechanisms of action of FLX and other antidepressants, beyond the initial increase in extracellular serotonin levels that they induced ^{3,4}. Indeed, their antidepressant effects involve an increase in hippocampal neurogenesis, neuronal survival ⁵⁻⁸ supported by a concomitant and mandatory increase in cerebral angiogenesis ^{9,10}.

In addition to its well-known neurotransmission activity, serotonin is also described as a peripheral paracrine/autocrine hormone involved in various nonneuronal physiological functions ¹¹. As a potent mitogen, it can modulate tissue remodeling, and is released at the site of tissue injury by platelets ^{12,13}. Using *ad integrum* skeletal muscle regeneration as a paradigm for regenerative medicine ¹⁴, we tested whether FLX could have broader peripheral regenerative properties. We identified novel effects of FLX, accelerating muscle regeneration after single as well as multiple muscle injuries by increasing muscle stem cells (as known as satellite cells, SCs) without exhausting this stem cell pool. In addition, FLX enhanced muscle repair with a coordinated increase in vessel formation as well as a reduction in the inflammatory response. Moreover, we demonstrated that FLX effects were dependent of peripheral serotonin and that the 5-HT_{1B} receptor was a major modulator of downstream FLX action in muscle stem cells.

Results

Fluoxetine increases skeletal muscle stem cells proliferation and coordinates vessel formation

To investigate the impact of FLX on skeletal muscle stem cells, FLX was delivered *per os* at 18 mg/kg daily for six weeks to *Tg:Pax7-nGFP* mice¹⁵, in which the GFP reporter gene marks all SCs (**Figure 1a**). Histological (illustrated in **Figure 1b**) and cytometric analysis revealed that the SCs count in the *Tibialis anterior* (TA) increased by 60% to 80% with FLX treatment, respectively (**Figures 1c and S1a**). Using Pax7 immunolabelling, these results were also confirmed in the wild-type mouse strain C57Bl6 (**Figure S1b**). Extensive histological analyses of the skeletal muscle showed no change neither in the fiber number, their area nor their diameter (**Figures S1c-e**). To quantify proliferation of SCs, BrdU was delivered during prolonged FLX treatment for up to twelve weeks and showed that 90% of the SCs (GFP+/BrdU+) proliferated by the sixth week of FLX treatment and this effect was stable and sustained until twelve weeks of FLX treatment (**Figure 1d**). A short BrdU pulse 12h before death demonstrated that most of the SCs were dividing during the fourth and fifth week of FLX administration (**Figure 1e**).

Vasculature and angiogenesis are crucial to support SC survival and for an efficient and coordinated muscle regeneration (angiogenesis/myogenesis coupling)¹⁴. To investigate the effect of FLX on muscle vessels, we delivered FLX to *Flk1^{GFP/+}* mice¹⁶ allowing the visualization of the entire capillary network due to the GFP expression by endothelial cells. After six weeks of treatment, FLX-treated mice exhibited a 44% increase in their vessels number in TA sections (**Figures 1f-g**). To confirm this enhanced vascularization, we used CD31 as a marker for endothelial cells. C57Bl6 mice that received FLX treatment for 6 weeks also showed an increase in the vessels number in the TA and *Soleus* muscle sections (**Figures S1f-g**). In support of this, we used an *in vivo* angiogenesis assay by subcutaneously grafting Matrigel[®] plugs containing myoblasts in C57Bl6 recipient mice¹⁷. Immunostaining of CD31 confirmed that vascularization increased 2.9-fold in the plugs of the FLX-treated mice compared to untreated controls (**Figures 1h-j**). Neovessels in plugs appeared morphologically normal and functional as assessed by the presence of a basal lamina and a lumen containing red blood cells (**Figure S1h**).

Interestingly, a 6 weeks FLX treatment was associated with changes in intramuscular tissue profiles of cytokines, chemokines, and growth factors (**Table 1**). Indeed, we observed an overall reduction in muscle cytokines levels except for the level of Interleukin 2 (IL-2), which was found to be significantly increased after FLX treatment as well as an overall increase in the muscle levels of growth factors, especially with a significant 143% increase in VEGF level and a trend for a 14% increase in FGF-b level.

Taken together, these results suggest that chronic administration of FLX has a stable and sustained effect promoting proliferation of muscle stem cells and vessels.

Fluoxetine accelerates muscle regeneration after injury *in vivo*

To investigate FLX's regenerative capacity on skeletal muscles, we delivered FLX for six weeks and then performed notexin-induced injuries (phospholipase that induces a severe muscle necrosis) of the TA muscle in *Tg:Pax7-nGFP* and C57BL6 mice¹⁸ (**Figure 2a**). At four days *post* injury, FLX-treated mice showed a 2.5-fold increase in the number of SCs (**Figures 2b-c**), and more cells were differentiating based on the differentiation regulatory factor myogenin immunolabelling (**Figures 2d-e**). As expected, control mice showed four days *post* NTX a clearly altered profile of intramuscular levels of cytokines and chemokines marked by an overall increase in these levels compared to those of uninjured control muscles (**Table 1**). In contrast, FLX-treated mice exhibited an overall reduction in these intramuscular levels of cytokines and chemokines regardless of their pro or anti-inflammatory activities (**Table 1**). Comparing muscles fourteen days *post* injury, we found a faster and more complete regeneration in FLX-treated mice marked by an increase in the fibers number probably newly formed due to their smaller size associated with a massive increase in regenerated fibers (*i.e.*, 55% of centro-nucleated myofibers (CNF) in the FLX group *versus* 39% of centro-nucleated fibers in the control group) (**Figures 2f-h, S2a**). In addition, FLX-treated mice showed milder inflammatory infiltrates, minimal calcium deposits and lower endomysial collagen deposit fourteen days *post* NTX (**Figures S2b-e**). Twenty-eight days *post* injury the muscles were fully

regenerated in both groups and appeared histologically similar to pre-injury (**Figures S2f-h**), except for centro-located nuclei in virtually all myofibers indicating regenerated fibers (**data not shown**). Interestingly, the pool of SCs and the number of muscle capillaries were still significantly increased in FLX-treated animals after the complete regeneration of the muscle (**Figures S2i-k**). To further examine the muscle regenerative capacity and SCs behavior, we next performed three repetitive muscle injuries (**Figure 2j**) and found that the muscle efficiently regenerated without exhaustion of the regenerative capacity over several injuries and especially SCs counts (**Figures 2k-l**). Mice euthanized between two rounds of injuries served as control to ascertain that the muscle did degenerate and regenerate (**data not shown**).

Taken together, these results support that administration of FLX accelerates muscle regeneration upon injury by inducing beneficial effects on the three main components involved in this process via (i) an increase in the stem cells pool and their differentiation capacities without their exhaustion, associated with (ii) an increase in muscle vascularity as well as (iii) an overall decrease in the inflammatory response.

Fluoxetine effects require stimulation of the 5-HT_{1B} receptor specifically expressed on muscle stem cells

To investigate the effects of FLX directly on muscle stem cells, since serum is well documented to contain a relatively high levels of serotonin (5-HT) from platelets lysis¹⁹, we first studied *in vitro* the effects of 5-HT and FLX on immortalized murine myoblasts (C2C12) due to their cell viability in 5-HT-free medium. Two days *post* exposure to 1 μ M 5-HT, the number of C2C12 nuclei increased by 39.8% compared to the 5-HT-free controls (**Figure 3a**). Interestingly, 1 μ M FLX for two days in medium without 5-HT did not induce changes in the number of C2C12 nuclei compared to the control group, whereas the nuclei number increased 1.5-fold after combined exposure to both of FLX and exogenous 5-HT (1 μ M FLX and 0.1 μ M 5-HT) (**Figure 3a**). In addition, the effects of 5-HT on C2C12 cell division rates showed a typical dose-response relationship with a dose-dependent increase in the nuclei number at low

concentrations up to 1 μM and a downshift at higher concentrations (**Figure 3b**, 26.1% increase in nuclei number at 0.01 μM , 47.3% at 1 μM and 37.1% at 10 μM). Of note, exposure to FLX or 5-HT for one day in regular medium with fetal bovine serum (FBS) comprising endogenous 5-HT also increased the number of C2C12 nuclei (**Figure S3a**).

To identify the 5-HT's mode of action on skeletal muscle, we performed western blots and RT-qPCR for 5-HT receptors families 1 and 2 in TA muscle from mice treated for six weeks with FLX or control. As already described in skeletal muscle²⁰, 5-HT_{2A} receptor was the primary receptor expressed in control muscle at steady state (**Figure 3c**). Interestingly, we determined a 108-fold upregulation of 5-HT_{1B} receptor protein expression in muscle after fluoxetine treatment (**Figure 3c**). Moreover, *Htr1b* gene expression was also the most upregulated in TA muscle after six weeks of FLX treatment (**Figure S3b**). Of note, the primary target of FLX is the serotonin transporter SERT¹, we confirmed that TA muscle expressed SERT (**Figure 3c**). Next, we also observed an upregulation of the 5-HT_{1B} receptor protein level in C2C12 cells after short FLX exposure (**Figure 3d**). To confirm the involvement of 5-HT_{1B} receptor in the cellular effects of 5-HT and FLX, we investigated the number of C2C12 nuclei exposed to 5-HT and FLX after pretreatment with specific 5-HT_{1B} antagonists (*i.e.*, SB216641 and GR127935). The increase in the number of C2C12 nuclei following exposure to 5-HT or to FLX was abolished with both 5-HT_{1B} antagonists (**Figures 3e, S3c**) while it was maintained with a specific 5-HT_{2A} antagonist (*i.e.*, MDL100907) as a control (**Figure S3c**). In addition, two days of exposure to 5-HT_{1B} agonists (*i.e.*, CP93129 and RU24969) in 5-HT-free medium were associated with an increase in C2C12 nuclei number (**Figure 3f**) and fusion index as a mark of the late stage of myoblast differentiation (**Figure S3d**).

Finally, we confirmed *in vitro* the FLX proliferative effects on primary murine myoblasts FACS-sorted from *Tg:Pax7nGFP* mice. Indeed, at three days *post* plating, the number of myoblasts labeled with their endogenous GFP was increased 1.3-fold after exposure to FLX compared to the control group seeded in medium containing FBS (**Figure 3g**). In addition, we also confirmed the specific expression of 5-HT_{1B} receptor in primary murine myoblasts at steady state (**Figure 3h**).

Taken together, these results suggest that fluoxetine *in vitro* acts in a serotonin-dependent manner on myoblasts and the proliferative effects of 5-HT is mediated by 5-HT1B receptor.

The beneficial effects of fluoxetine on muscle regeneration *in vivo* are also mediated by 5-HT1B receptor

To demonstrate the 5-HT-dependent effects of FLX on SCs *in vivo*, we delivered FLX to Tryptophan Hydroxylase 1 knockout mice ($TPH1^{-/-}$), which lack serotonin in peripheral organs²¹. FLX-treated $TPH1^{-/-}$ mice did not exhibit an increase in Pax7⁺-SCs number on uninjured TA sections, unlike FLX-treated wild-type C57Bl6 mice (**Figure S4a**). Of note, the untreated $TPH1^{-/-}$ mice didn't show significant change in the SCs number compared to the wild-type mice (**Figure S4a**). At four days *post* injury, FLX-treated $TPH1^{-/-}$ mice showed neither an increase in Pax7⁺ SCs (**Figure 4a**) nor an increase in myogenin⁺ differentiating cells (**Figure 4b**) compared to FLX-treated wild-type mice. In addition, in these FLX-treated $TPH1^{-/-}$ mice, no reduction of collagen deposits areas was observed fourteen days *post* injury (**Figure S4b**).

To investigate whether FLX's effects on muscle stem cells and vessels are mediated by 5-HT1B receptor we co-administered a selective 5-HT1B antagonist (GR127935) throughout the six weeks of FLX treatment. In uninjured muscles, mice treated with FLX + GR127935 did neither show an increase in the number of SCs nor an increase in the number of vessels, unlike the FLX-treated mice (**Figures S4c-d**).

To next determine the involvement of the 5-HT1B receptor in mediating FLX's effects on muscle regeneration, we administered GR127935 after six weeks of FLX treatment and before the notexin-induced muscle injury (**Figure 4c**). At four days *post* injury, both increases in the number of SCs and differentiating cells showed by FLX-treated mice were not observed in mice receiving FLX + GR127935 (**Figures 4d-e**). In addition, fourteen days *post* injury, the mice receiving FLX + GR127935 did not exhibit the decrease in collagen deposits area, the decrease in calcium deposit number and the decrease in immune (Gr1⁺ and F4/80⁺) cells

infiltration that the FLX-treated mice showed (**Figures S4e-h**). As a specificity control, no abrogation of the FLX effects on muscle regeneration was observed when mice were treated with a selective 5-HT_{2A} antagonist (MDL100907) and FLX (**Figures S5a-g**).

Finally, to unequivocally confirm the role of 5-HT_{1B} receptor in FLX effects, we used floxed tetracycline operator–5HT_{1B} (*tetO1B*) mice²² crossed with *Pax7Cre^{ER(T2)}* mice²³ to specifically and conditionally eliminate 5-HT_{1B} receptor from SCs (**Figure S4i**). *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice were treated with FLX and tamoxifen (**Figure 4f**). C57Bl/6 with tamoxifen and *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* without tamoxifen served as controls. In non-injured mice, the *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice treated by tamoxifen and FLX showed a significant decrease in SCs number compared to the wild-type mice treated by tamoxifen + FLX and the *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice treated by FLX (**Figure S4j**). At four days *post injury*, we observed no increase in the number of myogenin⁺ cells in the tamoxifen and FLX-treated *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* (**Figure 4g**). Collagen deposit area were also unchanged fourteen days *post injury* in tamoxifen + FLX-treated *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice (**Figure 4h**).

In summary, these results demonstrate that the positive effects on muscle regeneration induced by FLX treatment are 5HT-dependent and are specifically mediated via the 5-HT_{1B} receptor expressed on the SCs.

Discussion

Regenerative medicine is a broad field of translational research including in particular activator molecules which can favorably influence tissue self-repair processes²⁴. Far from its original antidepressant effects¹, we provide here a first characterization of new beneficial actions of fluoxetine (FLX) on muscle regeneration which implement an impact on both muscle stem cells, vascularization and inflammation leading to a faster healing with limited fibrosis. Remarkably, this study establishes that satellite cells (SCs) are sensitive to the mitogenic potential of peripheral serotonin (5-HT) and that FLX, as a modulator of bioavailable serotonin levels¹, positively influences the behavior of SCs via the 5-HT_{1B} receptor.

We demonstrate by multiple experimental approaches that FLX promotes over time a controlled and sustained proliferation of SCs at steady state. Interestingly, using a classical model of muscle injury, we prove that FLX induces a faster, more efficient, and still harmonious muscle regeneration. At the early regeneration stages, FLX increases the number of Pax7⁺ and myogenin⁺ cells which are myogenic markers of activation/proliferation and differentiation, respectively ²⁵ and, at later stages, FLX leads to a more rapid increase in fiber number and more specifically of centro-nucleated fibers, thus fully regenerated. More importantly, after repetitive muscle injuries, FLX preserves the regenerative capacities of the muscle with a persistently increased SC pool. These results show that all the properties of SCs, namely self-renewal, proliferation, and differentiation, are improved and remained functional during FLX treatment. To our best knowledge, this is the first time that the beneficial effects of the FDA-approved drug FLX on the behavior of muscle stem cells have been demonstrated.

Taking advantage of complementary *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrate that FLX impacts primary or immortalized myoblasts by extracellular or peripheral 5-HT levels. *In vitro* we have characterized this classic biphasic dose-response aspect of the proliferative effects of 5-HT previously described in other cell types ²⁶⁻²⁸. Our results fully support the hypothesis of a serotonergic identity of skeletal muscle in line with previous studies showing the expression of 5-HT system-related actors in myoblasts or muscle such as the synthetic TPH1 enzyme ²⁹, the degradation monoamine oxidase enzyme ³⁰ or the SERT transporter ³¹ associated with a 5-HT signal promoting myoblasts differentiation ^{29,32}. Using the murine genetic model TPH1^{-/-} model constitutionally devoid of peripheral 5-HT, we illustrate that the pool of SCs at steady state as well as their regenerative capacities are preserved in the absence of peripheral 5-HT, whether systemic or within a serotonergic system, suggesting that this 5-HT booster signal is redundant for the development and maintenance of SCs. Furthermore, the abolition of the pro-proliferative and pro-differentiating effects of FLX on SCs *post* injury in TPH1^{-/-} mice confirm the crucial role of 5-HT in FLX's mode of action. In addition, the lack of FLX effects on muscle regeneration in TPH1^{-/-} mice precludes the hypothesis of an involvement of the typical actions of FLX targeting the central nervous system inducing

behavioral changes in mice including locomotor activity ³³. Previously, using similar experimental approaches, the role of serotonin, independent of its central effects, has been demonstrated in the regulation of energy metabolism or the bone density turnover ^{34,35}. Interestingly, the involvement of peripheral 5-HT within serotonergic microsystems in the positive or negative regulation of stem cell behavior ³⁵⁻⁴² and more generally in tissue regeneration ^{12,13,43-45} has been demonstrated in different organs, highlighting the high therapeutic potential of its pharmacological modulation.

Remarkably, pharmacological inactivation or genetic conditional inactivation models have shown that the FLX effects require stimulation of the 5-HT_{1B} receptor specifically expressed in SCs. To our knowledge, the characterization of 5-HT_{1B} regulating the behavior of SCs is a novelty. However, further investigations are needed to decipher the downstream pathways regulated by 5-HT_{1B} in SCs. Previous studies have reported an increasing gradient of 5-HT_{2A} expression in myoblasts undergoing differentiation into myotubes with a metabolic role in glucose transport ²⁰. However, in our study, the *in vivo* use of a 5-HT_{2A} antagonist did not counteract the beneficial effects of FLX during muscle regeneration ruling out its involvement. The mediation of the 5-HT signal through these numerous receptors is complex ⁴⁶. Thus, several 5-HT receptors can be co-expressed within the same cell type in order to regulate distinct functions ⁴⁷ and a sequential expression of different receptors specific to different stages of the stem cell maturation cascade has been reported in the brain or the bone marrow ^{38,48,49}.

In other tissues, FLX similarly promotes the proliferation of other progenitor cells after prolonged administration ^{5-8,38}. In our study, we show an onset of response in the muscle marked by a significant increase in BrdU⁺ SCs from the fourth week, whereas the response of erythropoietic or neuronal progenitors were reported earlier ^{5-8,38}. The cell-type specific response to the proliferative effects of FLX could be explained by the sensitivity of cells to 5-HT signal as well as by the frequency of stem cells turnover. On one hand, SCs display a low turnover rate compared to other progenitor cells ⁵⁰. On the other hand, contrary to the brain ⁵¹ or the bone marrow ³⁷, our results suggest that, the 5-HT signal is redundant in the functioning

of SCs. Furthermore, we show a plateau effect of FLX on the SCs pool saturating at 90% of cumulative BrdU⁺ cells during prolonged treatment, suggesting that 10% SCs seem insensitive to the FLX effects. The population of SCs is known to be heterogenous, in particular with committed myogenic progenitors and around of reserve stem cells ^{25,52}. Interestingly, FLX positively impacts early neuronal progenitors with no effect on neural stem cells ⁵. Further studies are needed to clarify whether the FLX effects differ depending on the type of SCs.

Associated with these specific effects targeting SCs, FLX induces a modification of the microenvironment of SCs with a coordinated increase in vascularization and in local levels of growth factors such as VEGF. The increased angiogenic capacities of FLX were confirmed by an *in situ* angiogenesis assay. Thus, FLX therefore enhances a known bidirectional VEGF-mediated interaction promoting their respective proliferation between endothelial cells and SCs ⁵³. In addition, the beneficial effects of FLX on the vascular niche reinforces the virtuous loop induced by endothelial cells in the maintenance and functioning of SCs ⁵⁴. Similarly in the brain, the FLX effects on neurogenesis also involved mandatory cross-talk with endothelial cells mediated by VEGF independently of 5-HT ^{9,55,56}. However, the abolition of the FLX proangiogenic effects by a 5-HT1B antagonist in muscle suggests that these effects are also mediated by 5-HT and not only result from an independent increase in VEGF levels. The 5-HT involvement in angiogenesis has been extensively studied showing its role in the proliferation and migration of endothelial cells or even neovascularization by sprouting ^{27,57} with participation in particular of 5-HT1B receptor expressed by endothelial cells ^{57,58}.

In support FLX also shows action on major players in muscle regeneration, namely the immune system and connective tissue ⁵⁹. Indeed, FLX initially induces an overall decrease in local cytokine levels associated with preserved levels of immune cell infiltration (data not shown) whose role is crucial in the early phase for phagocytosis of necrotic debris and for SCs activation ⁵⁹. Then, concomitant with coordinated and accelerated regeneration, a decrease in immune cell infiltration and collagen deposits are observed in the muscle of mice treated with FLX, witnessing efficient tissue healing. In addition, the FLX-induced decrease in immune cells infiltration including macrophages was specifically abolished by a systemic 5-HT1B antagonist.

The role of macrophages in particular their balance between pro-inflammatory M1 and pro-regenerative M2 phenotypes, is crucial during muscle regeneration⁵⁹. Interestingly, among the many 5-HT mediated immunomodulatory effects⁶⁰, 5-HT has been reported to modulate the polarization of macrophages promoting maintenance of M2 status⁶¹. However, these effects were mediated by 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors expressed by macrophages and further studies would be needed to clarify the role of 5-HT_{1B} receptor in the FLX effects on macrophages. Finally, in our study, the antifibrotic effects of FLX were counteracted in the absence of peripheral 5-HT or 5-HT_{1B} activation in SCs and *post* injury collagen deposition was similar between control or TPH1^{-/-} groups. These results contrast with previous studies showing the pro-fibrotic role of 5-HT mediated by 5-HT_{2B} and TGFβ expressed by fibroblasts and phenotypic improvement in TPH1^{-/-} in a model of skin fibrosis⁶². Further studies are therefore needed to clarify the interactions between SCs expressing 5-HT_{1B} receptor and fibroblasts expressing 5-HT_{2B} receptor in the regulation of fibrotic processes usually considered as the substratum of symptoms in muscle diseases such as muscular dystrophies.

The combined action of FLX on myogenesis, angiogenesis and inflammation supporting harmonious muscle regeneration in an acute injury model makes it a worthy therapeutic strategy for endogenous muscle diseases. Interestingly, several studies point to the potential effects of FLX in a model of chronic muscle injury such as Duchenne muscular dystrophy⁶³⁻⁶⁵. In addition, at a functional level FLX has already been shown to have a major positive impact on muscle strength, possibly dependent on peripheral serotonin^{66,67}. Beyond muscle our results point out that the effects of antidepressants on the regeneration of other organs than the brain need to be investigated. As such, our work opens new perspectives to further study the role of serotonin and 5-HT_{1B} receptor on other stem cell types and to further understand the role of antidepressants on stem cell behaviour and their therapeutic potential on regenerative medicine.

References

1. Wong, D. T., Horng, J. S., Bymaster, F. P., Hauser, K. L. & Molloy, B. B. A selective

- inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-Trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.* **15**, 471–479 (1974).
2. Wong, D. T., Perry, K. W. & Bymaster, F. P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 764–774 (2005).
 3. Fritze, S., Spanagel, R. & Noori, H. R. Adaptive dynamics of the 5-HT systems following chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *J. Neurochem.* **142**, 747–755 (2017).
 4. Bäckman, J., Alling, C., Alsén, M., Regnéll, G. & Träskman-Bendz, L. Changes of cerebrospinal fluid monoamine metabolites during long-term antidepressant treatment. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **10**, 341–349 (2000).
 5. Encinas, J. M., Vaahtokari, A. & Enikolopov, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8233–8238 (2006).
 6. Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J. & Duman, R. S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **20**, 9104–9110 (2000).
 7. Santarelli, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (80-.)*. **301**, 805–809 (2003).
 8. Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F. & Hen, R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neurosci.* **28**, 1374–1384 (2008).
 9. Warner-Schmidt, J. L. & Duman, R. S. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 4647–4652 (2007).
 10. Lee, J. S. *et al.* Induction of neuronal vascular endothelial growth factor expression by cAMP in the dentate gyrus of the hippocampus is required for antidepressant-like behaviors. *J. Neurosci.* **29**, 8493–8505 (2009).
 11. Amireault, P., Sibon, D. & Coité, F. Life without peripheral serotonin: Insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine

- serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 64–71 (2013).
12. Lesurtel, M. Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. *Science* (80-.). **312**, 104–107 (2006).
 13. Baudry, A. *et al.* Essential Roles of Dopamine and Serotonin in Tooth Repair: Functional Interplay between Odontogenic Stem Cells and Platelets. *Stem Cells* **33**, 2586–2595 (2015).
 14. Gayraud-Morel, B., Chrétien, F. & Tajbakhsh, S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen. Med.* **4**, 293–319 (2009).
 15. Sambasivan, R. *et al.* Distinct Regulatory Cascades Govern Extraocular and Pharyngeal Arch Muscle Progenitor Cell Fates. *Dev. Cell* **16**, 810–821 (2009).
 16. Ema, M., Takahashi, S. & Rossant, J. Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood* **107**, 111–117 (2006).
 17. Malinda, K. M. In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods Mol. Biol.* **467**, 287–294 (2009).
 18. Hardy, D. *et al.* Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One* **11**, e0147198 (2016).
 19. Mödder, U. I. *et al.* Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 415–422 (2010).
 20. Hajdуч, E. *et al.* Serotonin (5-hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **274**, 13563–13568 (1999).
 21. Cote, F. *et al.* Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13525–13530 (2003).
 22. Nautiyal, K. M. *et al.* Distinct Circuits Underlie the Effects of 5-HT1B Receptors on Aggression and Impulsivity. *Neuron* **86**, 813–827 (2015).
 23. Mourikis, P. *et al.* A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* **30**, 243–252 (2012).

24. Mason, C. & Dunnill, P. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine* vol. 3 1–5 (2008).
25. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* **93**, 23–67 (2013).
26. Pakala, R., Willerson, J. T. & Benedict, C. R. Effect of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **96**, 2280–2286 (1997).
27. Pakala, R. & Benedict, C. R. Effect of serotonin and thromboxane A₂ on endothelial cell proliferation: Effect of specific receptor antagonists. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 527–537 (1998).
28. Balasubramanian, S. & Paulose, C. S. Induction of DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes by serotonin: Possible involvement of serotonin S₂ receptor. *Hepatology* **27**, 62–66 (1998).
29. Chandran, S. *et al.* Effects of serotonin on skeletal muscle growth. *BMC Proc.* **6**, O3 (2012).
30. Manoli, I. *et al.* Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. *FASEB J.* **19**, 1359–1361 (2005).
31. Al-Zoairy, R. *et al.* Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 1–9 (2017).
32. Guillet-Deniau, I., Burnol, A. F. & Girard, J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 14825–9 (1997).
33. Popa, D. *et al.* A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur. J. Pharmacol.* **628**, 83–90 (2010).
34. Crane, J. D. *et al.* Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.* **21**, 166–172 (2015).

35. Yadav, V. K. *et al.* Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum: an entero-bone endocrine axis. *Cell* **135**, 825–837 (2009).
36. Yang, M. *et al.* Promoting Effects of Serotonin on Hematopoiesis: Ex Vivo Expansion of Cord Blood CD34⁺ Stem/Progenitor Cells, Proliferation of Bone Marrow Stromal Cells, and Antiapoptosis. *Stem Cells* **25**, 1800–1806 (2007).
37. Amireault, P. *et al.* Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13141–13146 (2011).
38. Sibon, D. *et al.* Enhanced Renewal of Erythroid Progenitors in Myelodysplastic Anemia by Peripheral Serotonin. *Cell Rep.* **26**, 3246-3256.e4 (2019).
39. Yang, M., Srikiatkachorn, A., Anthony, M. & Chong, B. H. Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT₂receptor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **7**, 127–133 (1996).
40. Ye, J. Y. *et al.* Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization. *Stem Cells* **32**, 2973–2982 (2014).
41. Chabbi-Achengli, Y. *et al.* Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2567–2572 (2012).
42. Yadav, V. K. *et al.* A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell* **138**, 976–989 (2009).
43. Sadiq, A. *et al.* The role of serotonin during skin healing in post-thermal injury. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–20 (2018).
44. Furrer, K. *et al.* Serotonin reverts age-related capillarization and failure of regeneration in the liver through a VEGF-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2945–2950 (2011).
45. Coman, T. *et al.* Serotonin Targeting Using Common Antidepressants Induces Rapid Recovery of Cytopenia. *Blood* **134**, 3715–3715 (2019).
46. Raymond, J. R. *et al.* Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 92 179–212 (2001).
47. Azmitia, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell

- proliferation, maturation, and apoptosis. in *Brain Research Bulletin* vol. 56 413–424 (Brain Res Bull, 2001).
48. Launay, J. M. *et al.* Serotonin 5-HT 2B receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension. *Blood* **119**, 1772–1780 (2012).
 49. Kellermann, O., Loric, S., Maroteaux, L. & Launay, J. M. Sequential onset of three 5-HT receptors during the 5-hydroxytryptaminergic differentiation of the murine 1C11 cell line. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1161–1170 (1996).
 50. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (80-.)*. **347**, 78–81 (2015).
 51. Savelieva, K. V. *et al.* Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One* **3**, (2008).
 52. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. & Rudnicki, M. A. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* **129**, 999–1010 (2007).
 53. Abou-Khalil, R., Mounier, R. & Chazaud, B. Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: The ‘ménage à trois’ of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells. *Cell Cycle* vol. 9 892–896 (2010).
 54. Chiristov, C. *et al.* Muscle satellite cells and endothelial cells: Close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1397–1409 (2007).
 55. Greene, J., Banasr, M., Lee, B., Warner-Schmidt, J. & Duman, R. S. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: Pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2459–2468 (2009).
 56. Fournier, N. M., Lee, B., Banasr, M., Elsayed, M. & Duman, R. S. Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/Akt-dependent signaling. *Neuropharmacology* **63**, 642–652 (2012).
 57. Machida, T., Iizuka, K. & Hirafuji, M. 5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1416–1419 (2013).

58. Iwabayashi, M. *et al.* Role of serotonin in angiogenesis: Induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT_{1B}/Akt/eNOS pathway in diabetic mice. *Atherosclerosis* **220**, 337–342 (2012).
59. Tidball, J. G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews Immunology* vol. 17 165–178 (2017).
60. Arreola, R. *et al.* Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J. Immunol. Res.* **2015**, (2015).
61. de las Casas-Engel, M. *et al.* Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR 2B and HTR 7 . *J. Immunol.* **190**, 2301–2310 (2013).
62. Dees, C. *et al.* Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J. Exp. Med.* **208**, 961–972 (2011).
63. Carre-Pierrat, M. *et al.* Pre-clinical study of 21 approved drugs in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 313–327 (2011).
64. Carre-Pierrat, M. *et al.* Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in *C. elegans*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 253–258 (2006).
65. Waugh, T. A. *et al.* Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4651–4662 (2014).
66. Tutakhail, A., Nazari, Q. A., Khabil, S., Gardier, A. & Coudore, F. Muscular and mitochondrial effects of long-term fluoxetine treatment in mice, combined with physical endurance exercise on treadmill. *Life Sci.* **232**, (2019).
67. Falabrègue, M. *et al.* Lack of Skeletal Muscle Serotonin Impairs Physical Performance. *Int. J. Tryptophan Res.* **14**, (2021).
68. Latil, M. *et al.* Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat. Commun.* **3**, 1–12 (2012).
69. Goetsch, K. P., Snyman, C., Myburgh, K. H. & Niesler, C. U. Simultaneous isolation of enriched myoblasts and fibroblasts for migration analysis within a novel co-culture assay. *Biotechniques* **58**, 25–32 (2015).
70. Mayeuf-Louchart, A. *et al.* MuscleJ: A high-content analysis method to study skeletal

muscle with a new Fiji tool. *Skelet. Muscle* **8**, 1–11 (2018).

Acknowledgements

The authors thank Johan Bedel, Marie Nguele, Cédric Thépenier, Aurélie Trignol (Institut Pasteur, France) for their scientific and technical help. The authors also thank Francine Coté and Olivier Hermine (Institut Imagine, Paris, France) who kindly provided the TPH1^{-/-} mice, Katherine Nautiyal (Columbia University, New York, USA) who kindly provided the *tetO1B* mice and Barbara Gayraud-Morel (Institut Pasteur, Paris, France) who kindly provided the *Pax7-Cre^{ER(T2)}* mice. The authors also thank the histology, PFC and PBI platforms of the Institut Pasteur for their technical supports. UTechS PBI/C2RT is part of the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04-01, “Investments for the future”) and is supported by Conseil de la Région Ile-de-France (Domaine d’Intérêt Majeur DIM1HEALTH) and Fondation Française pour la Recherche Médicale (Programme Grands Equipements). This work was financially supported by AFM-Téléthon and by the Fondation des Gueules Cassées.

Author contributions

MF, MB, PR conceived, planned, and carried out the experiments, analyzed the data, wrote the manuscript with input from all authors. DB, MJM, AD, AH participated in conception and carried out the experiments. AD, OM revised the manuscript. RG, FC designed and supervised the research and revised the manuscript.

Competing Interests statement

RG has received compensation as a member of the scientific advisory board of Janssen, Lundbeck, Roche, SOBI, Takeda. He has served as a consultant and/or a speaker for Astra Zeneca, Boehringer-Ingelheim, Pierre Fabre, Lilly, Lundbeck, LVMH, MAPREG, Otsuka, Pileje, SANOFI, Servier and received compensation, and he has received research support from Servier. He is a board member of the Regstem company.

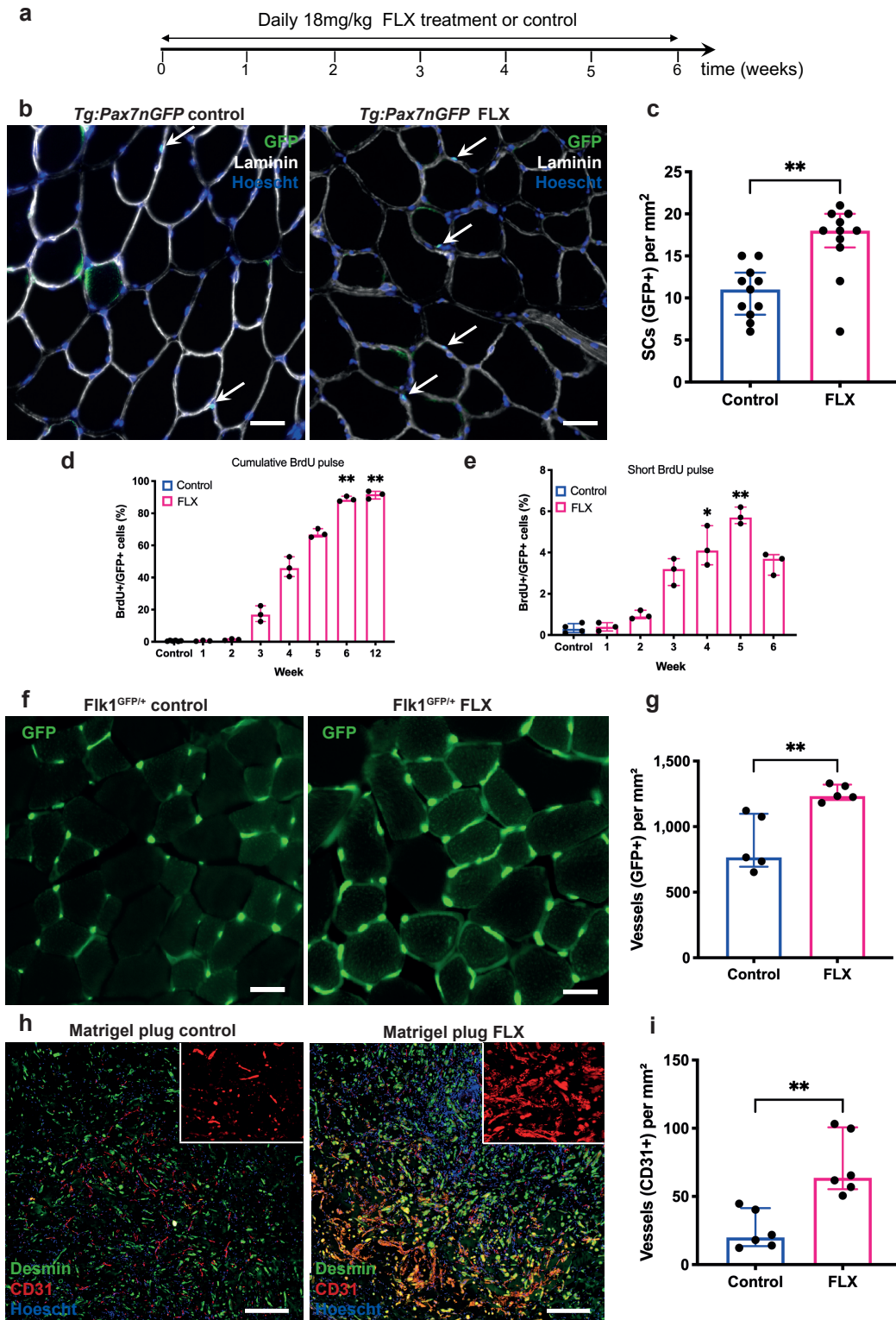
OM has received consultancy fees from AstraZeneca, Blueprint Medicines, Boehringer-Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Ipsen, Lundbeck, Merck Sharpe & Dohme, Pfizer, Roche, Servier, and Vifor Pharma. He is a shareholder of Amplitude Surgical, Ipsen and Transgene.

FC is a board member of the Regstem company.

The remaining authors have nothing to disclose.

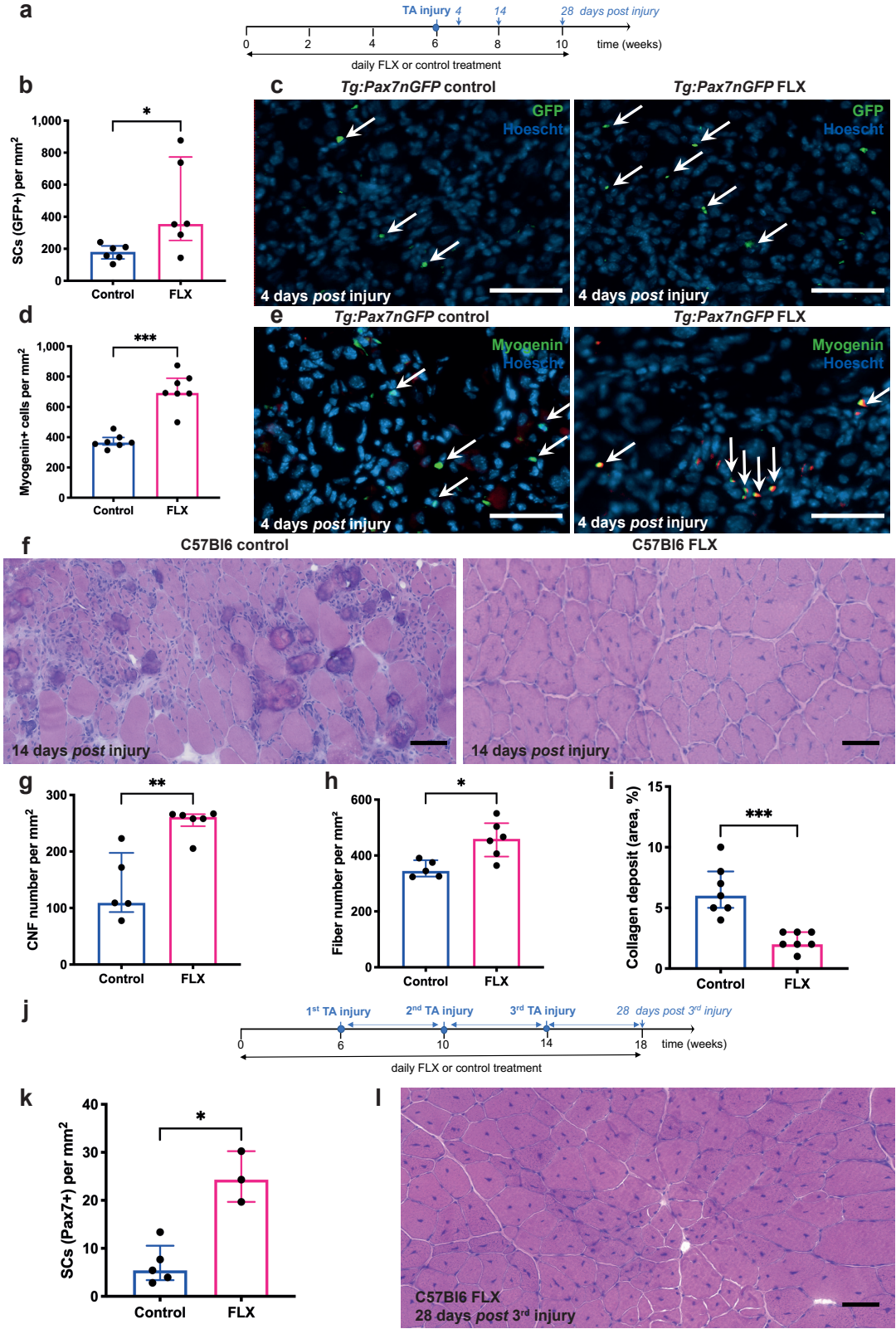
Figures Legends:

Figure 1: Fluoxetine increases the proliferation of skeletal muscle stem cells and the functional vascularization of the skeletal muscle.



(a) Schematic representation of fluoxetine (FLX) delivery. **(b)** Representative histological TA sections of control and FLX-treated mice; sections display GFP (SCs marker, green), Laminin (extracellular matrix, white), Hoechst (nuclei, blue), the arrows indicate SCs. Scale bars indicate 50 μ m. **(c)** Quantification of the SCs number by GFP immunostaining on TA sections from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice (n=11 mice per condition). **(d)** Percentage of cumulative divided SCs counted by BrdU immunostaining after FACS-sorted GFP⁺ cells from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice. Mice received BrdU throughout administration of FLX or control for 12 weeks (n=3 per condition and time point). **(e)** Percentage of dividing SCs counted by BrdU immunostaining after FACS-sorted GFP⁺ cells from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice. Mice received a short pulse of BrdU over chronic FLX administration (n=3 per condition and time point). **(f)** Representative histological TA sections of control and FLX-treated *Flk1^{GFP/+}* mice; sections display GFP (endothelial cells marker, green). Scale bars indicate 50 μ m. **(g)** Quantification of the vessels number by GFP immunostaining on TA sections from control and FLX-treated *Flk1^{GFP/+}* mice (n=5 mice per condition). **(h)** Representative histological Matrigel[®] plugs sections of control and FLX-treated C57Bl6 mice; sections display CD31⁺ cells (endothelial cell marker, red), Desmin (myoblasts marker, green), Hoechst (nuclei, blue). Scale bars indicate 50 μ m. **(i)** Quantification of the vessels number by CD31 immunostaining on cross sections of Matrigel[®] plugs from control and FLX-treated recipient mice (n=6 mice per condition). All values are represented as median with interquartile range. * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01.

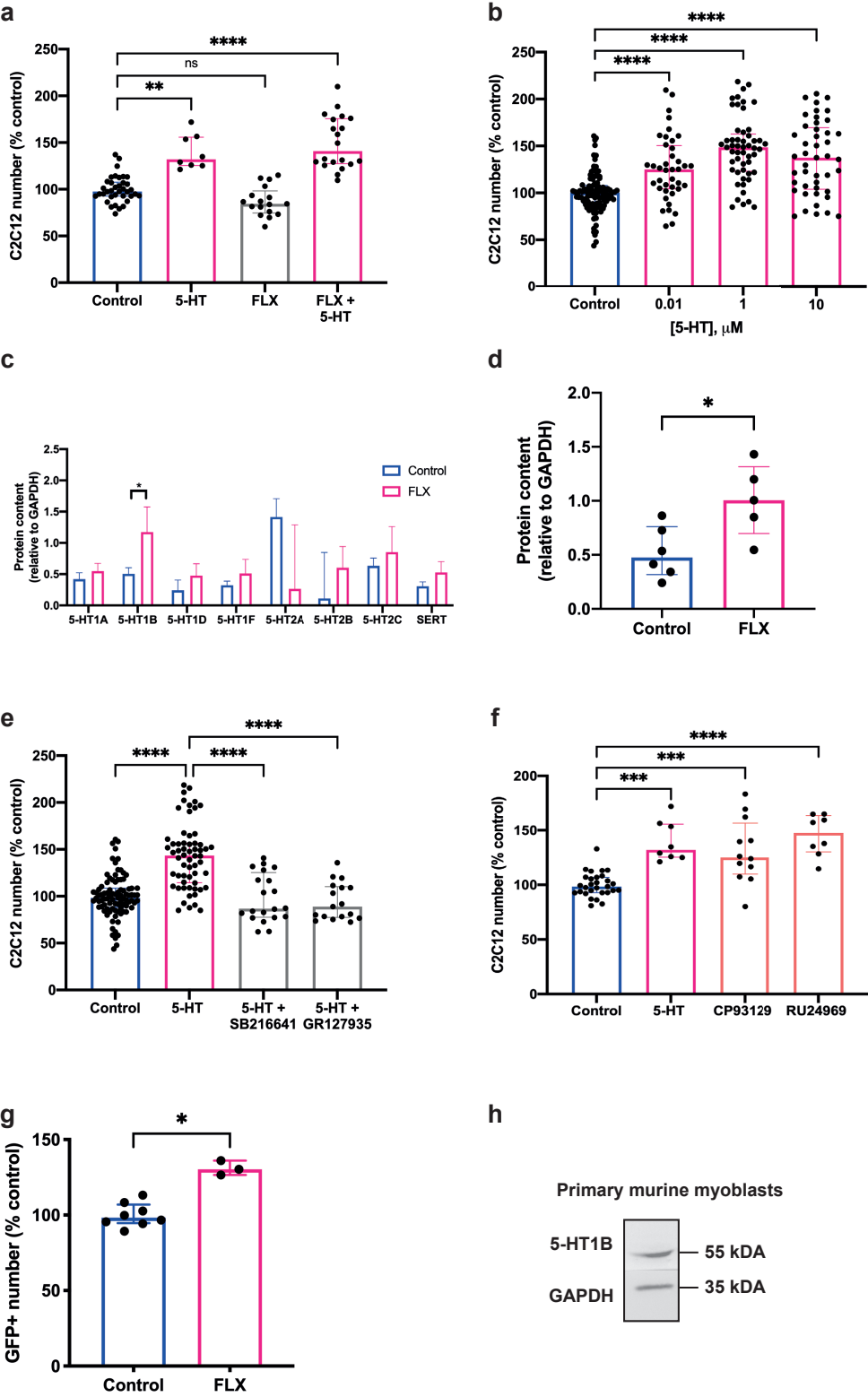
Figure 2: Muscle regeneration after injuries is effectively improved by fluoxetine



(a) Schematic representation of the notexin-induced TA injury model, fluoxetine (FLX) administration and death time points. (b) Quantification of SCs number by GFP

immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice (n=6 mice per condition). **(c)** Representative histological TA sections of control and FLX-treated mice 4 days *post* injury; sections display GFP (green), Laminin (white), Hoechst (nuclei, blue), the arrows indicate SCs. Scale bars indicate 50 μ m. **(d)** Quantification of differentiating cells number by Myogenin immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice (n=7 mice per condition). **(e)** Representative histological TA sections of control and FLX-treated mice 4 days *post* injury; sections display Myogenin (green), Laminin (white), Hoechst (nuclei, blue), the arrows indicate SCs. Scale bars indicate 50 μ m. **(f)** Representative Hematoxylin and Eosin (HE)-stained TA sections of control and FLX-treated mice 14 days *post* injury. Scale bars indicate 50 μ m. **(g)** Automatic quantification of the centro-nucleated fibers number 14 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=5-6 mice per condition). **(h)** Automatic quantification of the fibers number 14 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=5-6 mice per condition). **(i)** Percentage of the collagen deposit area stained with Sirius Red 14 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice and analysed with Fiji software (n=7 mice per condition). **(j)** Schematic representation of the three repetitive notexin-induced TA injury model, FLX administration and death time points. **(k)** Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining 28 days *post* the third notexin injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=3-5 mice per condition). **(l)** Representative HE-stained TA sections of FLX-treated mice 28 days *post* the third notexin injury. Scale bars indicate 50 μ m. All values are represented as median with interquartile range. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

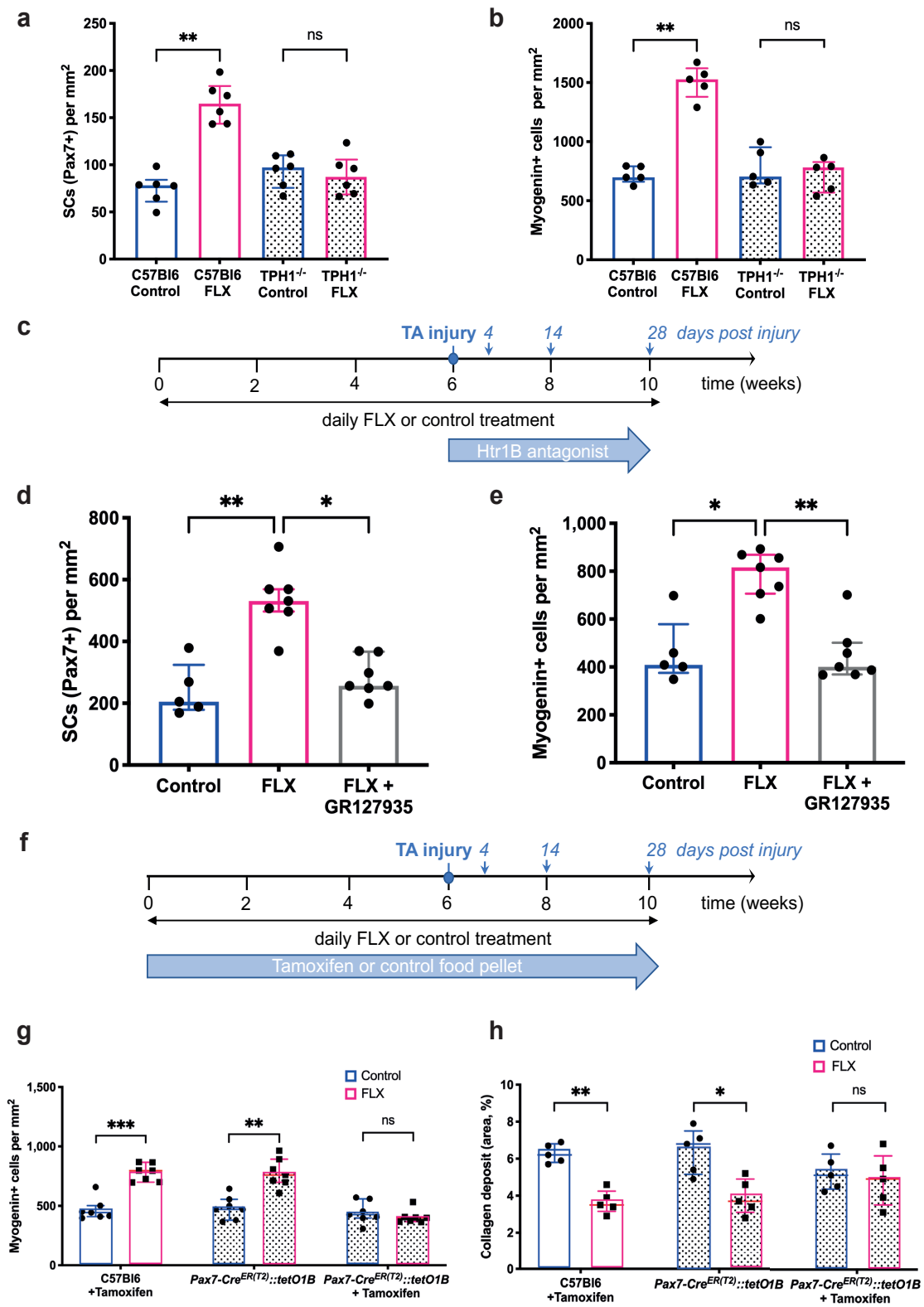
Figure 3: The proliferative effects of fluoxetine on myoblasts are serotonin dependent and act through the 5-HT1B receptor.



(a) Percentage of the nuclei number in C2C12 cells after exposure to 1 μM serotonin (5-HT), 1 μM fluoxetine (FLX) and 1 μM FLX + 0.1 μM 5-HT in 5-HT-free medium for two days.

Quantitative analysis carried out with the Columbus software based on the Hoechst staining (Data are representative of at least 3 independent experiments). **(b)** Percentage of the nuclei number in C2C12 cells after exposure to increasing doses of 5-HT for 24h in 5-HT-free medium (Data are representative of at least 3 independent experiments). **(c)** Level of protein expressions of various 5-HT receptors in TA muscle from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=5 mice per condition). **(d)** Level of protein expression by western blot of the 5-HT1B receptor in C2C12 cells exposed to 1 μ M FLX for 4 hours normalized to GAPDH housekeeper protein level. **(e)** Percentage of the nuclei number in C2C12 cells pretreated with specific antagonists 0.1 μ M (5-HT1B antagonists: SB216641 and GR127935) and exposed to 1 μ M 5-HT for 24h in 5-HT-free medium (Data are representative of at least 3 independent experiments with biological quadruplicates per condition). **(f)** Percentage of the nuclei number in C2C12 cells cultured after exposure to 1 μ M 5-HT and 0.5 μ M 5-HT1B agonists (CP93129, RU24969) for two days in 5-HT-free medium (Data are representative of at least 3 independent experiments with biological quadruplicates per condition). **(g)** Percentage of primary murine alive GFP+ SCs isolated by FACS from *Tg:Pax7nGFP* mice after exposure to 1 μ M FLX for three days in regular medium (n=3-5 mice per condition). Quantitative analysis performed with the Columbus software based on the endogenous GFP fluorescence **(h)** Representative western blot of the expressions of the targeted 5-HT1B receptor protein and the housekeeping GAPDH protein in murine primary myoblasts isolated by pre-plating from control mice (n=3). All values are represented as median with interquartile range. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Figure 4: The beneficial effects of fluoxetine are also mediated *in vivo* by 5-HT1B receptor during muscle regeneration.



(a) Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control and fluoxetine (FLX)-treated C57Bl6 and *TPH1*^{-/-} mice (n=6 mice per condition). **(b)** Quantification of the differentiating cells number by Myogenin immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 and *TPH1*^{-/-} mice (n=5 mice per condition). **(c)** Schematic representation of the notexin-induced TA injury model, FLX and 5-HT1B antagonist (GR127935) administrations and death time points. **(d)** Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ GR127935-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(e)** Quantification of the differentiating cells number by Myogenin immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ GR127935-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(f)** Schematic representation of the notexin-induced TA injury model, FLX and tamoxifen administrations and death time points. **(g)** Quantification of the differentiating cells number by Myogenin immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from C57Bl6 and *Pax7-Cre*^{ER(T2)}::*tetO1B* mice receiving the control, tamoxifen and/or FLX (n=5-7 mice per condition). **(h)** Percentage of the collagen deposit area stained with Sirius Red 14 days *post* injury on TA sections from C57Bl6 and *Pax7-Cre*^{ER(T2)}::*tetO1B* mice receiving the control, tamoxifen and/or FLX (n=5 mice per condition). All values are represented as median with interquartile range. * p≤0.05, ** p≤0.01, ***p≤0.001.

Tables Legends:

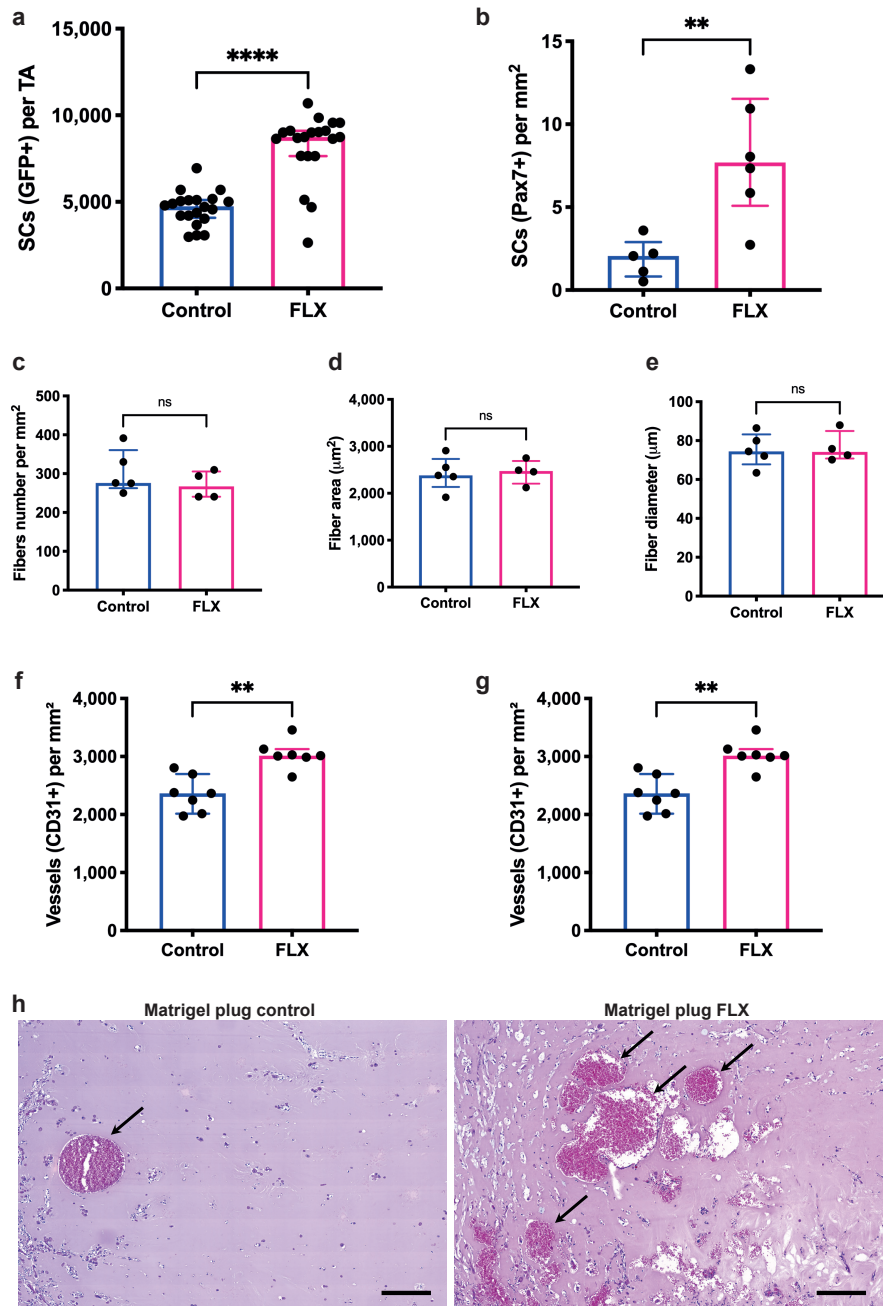
Table 1: Intramuscular Cytokine/Chemokine levels after prolonged fluoxetine treatment at steady state and after muscle injury.

Tissue cytokines levels (pg/g muscle tissue)	Control	Fluoxetine			Muscle injury			Muscle injury + Fluoxetine		
	Mean ±SD	Mean ±SD	% of change ¹	<i>p</i>	Mean ±SD	% of change ¹	<i>p</i>	Mean ±SD	% of change ²	<i>p</i>
IL-1 α	234 ±33	150 ±22	-36%	0.0286, *	308 ±179	32%	>0.9999	91 ±9	-70%	0.0571
IL-1 β	1397 ±379	756 ±205	-46%	0.0286, *	3698 ±2201	165%	0.0571	2039 ±435	-45%	0.0286, *
IL-2	50 ±8	82 ±11	63%	0.0571	212 ±181	321%	0.0571	-	-	-
IL-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-6	426 ±182	33 ±6	-92%	0.0571	3446 ±1517	707%	0.0571	23 ±20	-99%	0.3429
IL-9	-	-	-	-	-	-	-	429 ±147	-	-
IL-10	95 ±59	34 ±14	-63%	0.2667	353 ±206	270%	0.0571	94 ±9	-73%	0.0571
IL-12(p40)	57 ±31	33 ±16	-41%	0.5333	163 ±103	186%	0.0571	97 ±11	-40%	0.2
IL-12(p70)	347 ±244	118 ±40	-66%	0.0571	1057 ±771	204%	0.1143	293 ±53	-72%	0.0286, *
IL-13	875 ±147	626 ±69	-28%	0.0286, *	2101 ±1173	140%	0.0571	938 ±107	-55%	0.0286, *
IL-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eotaxin	-	-	-	-	12110 ±6920	-	-	-	-	-
G-CSF	3746 ±1213	-	-	-	32578 ±15206	80%	0.2	-	-	-
GM-CSF	-	-	-	-	2049 ±1269	-	-	-	-	-
IFN- γ	28 ±9	-	-	-	103 ±77	263%	0.0571	26 ±3	-75%	0.0286, *
KC	840 ±328	-	-	-	-	-	-	717 ±502	-	-
MCP-1	1640 ±1170	312 ±165	-80%	0.1	37824 ±29635	2206%	0.0571	29065 ±13853	-23%	>0.9999
MIP-1a	488 ±352	70 ±33	-85%	0.1143	6135 ±5391	1155%	0.0286, *	617 ±218	-90%	0.0286, *
MIP-1b	442 ±49	469 ±90	6%	0.6857	2866 ±2118	548%	0.0286, *	788 ±167	-72%	0.0286, *
RANTES	120 ±111	-	-	-	1118 ±923	826%	0.0286, *	152 ±143	-86%	0.0286, *
TNF- α	8920 ±1661	8429 ±822	-6%	0.8857	15858 ±5742	78%	0.1143	11495 ±2198	-28%	0.3429
FGF-b	1115 ±117	1275 ±618	14%	>0.9999	790 ±107	-29%	0.0286, *	996 ±319	26%	0.4857
MIG	-	-	-	-	61580 ±46406	-	-	13012 ±11218	-79%	0.0571
PDGF- β	590 ±386	583 ±262	-1%	0.8	-	-	-	-	-	
VEGF	128 ±25	313 ±91	143%	0.0286, *	544 ±426	323%	0.0286, *	653 ±293	20%	0.3429

Multiplex Elisa (Luminex® assay) was performed on the muscle tissue of control and 6 weeks fluoxetine (FLX)-treated uninjured mice as well as 4 days *post* injury (n=4 per condition). The values are represented as the mean \pm standard deviation and the percentage of fold-change relative to control uninjured mice (¹) or control injured mice (²) were also calculated, respectively. In red are represented the percentage of fold-change increases compared to the control group and in blue are represented the percentage of fold-change decreases compared to the control group. Individual *p*-values were determined with the Mann-Whitney test, * $p \leq 0.05$.

Supplemental Figures Legends:

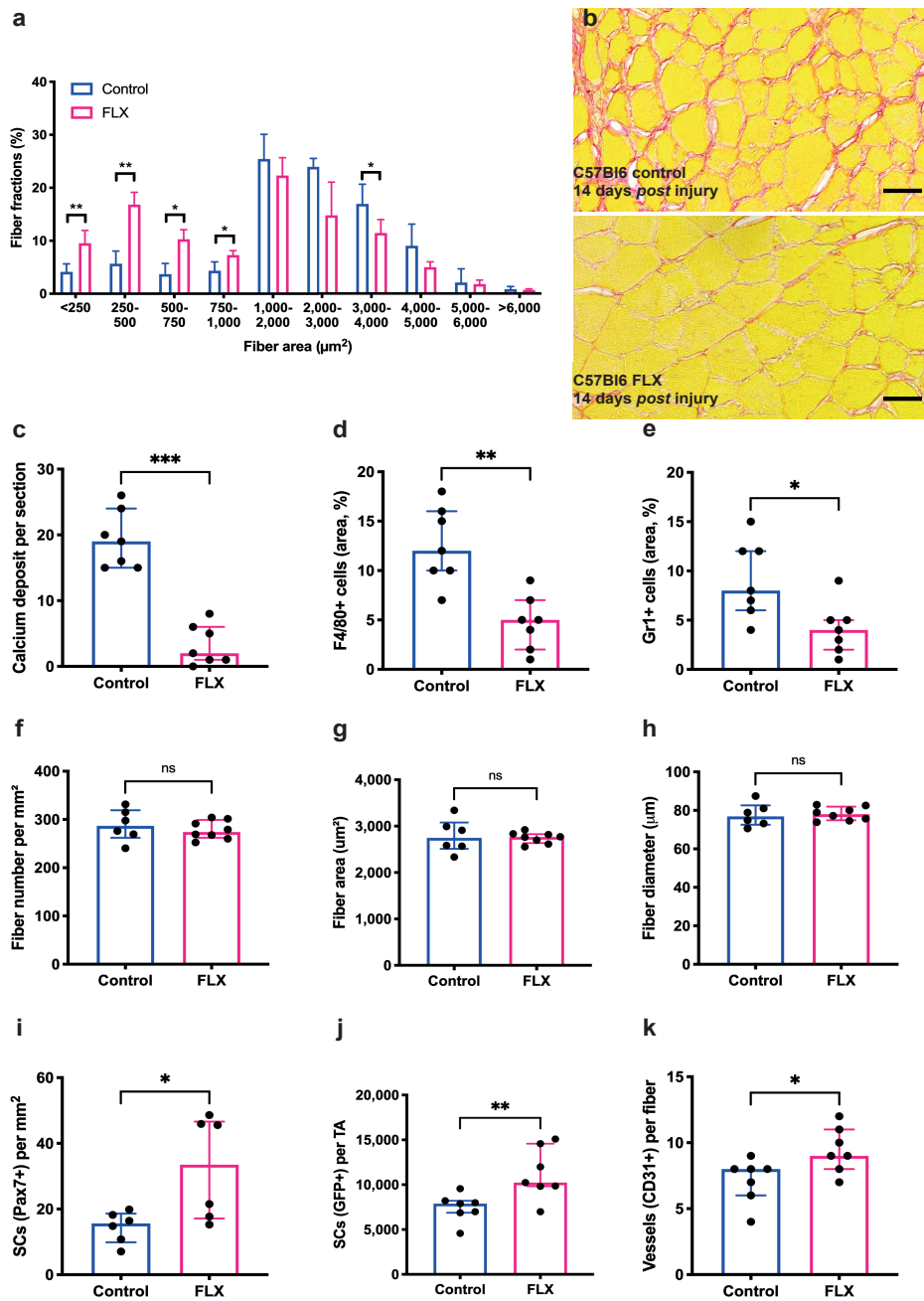
Supplemental Figure 1: Fluoxetine increases satellite cell and vessel numbers with no effect on muscle fibers at steady state.



(a) Quantification of the SCs (GFP+) number per TA with cytometry analysis from *Tg:Pax7nGFP* mice treated with fluoxetine (FLX) or control with FACS analysis (n=20 mice per condition). **(b)** Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=5-6 mice per condition). **(c)** Automatic

quantification of the muscle fibers number on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=4-5 mice per condition). **(d)** Area of muscle fibers in μm^2 on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=4-5 mice per condition). **(e)** Diameter of muscle fibers in μm on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=4-5 mice per condition). **(f)** Quantification of the vessel numbers by CD31 immunostaining on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=5 mice per condition). **(g)** Quantification of the vessel numbers by CD31 immunostaining on Soleus sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=7 mice per condition). **(h)** Representative Hematoxylin and Eosin-stained cross sections of Matrigel[®] plugs from control and FLX-treated recipient mice. Arrows indicated functional vessels containing red blood cells. Scale bars indicate 100 μm . All values are represented as median with interquartile range. ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

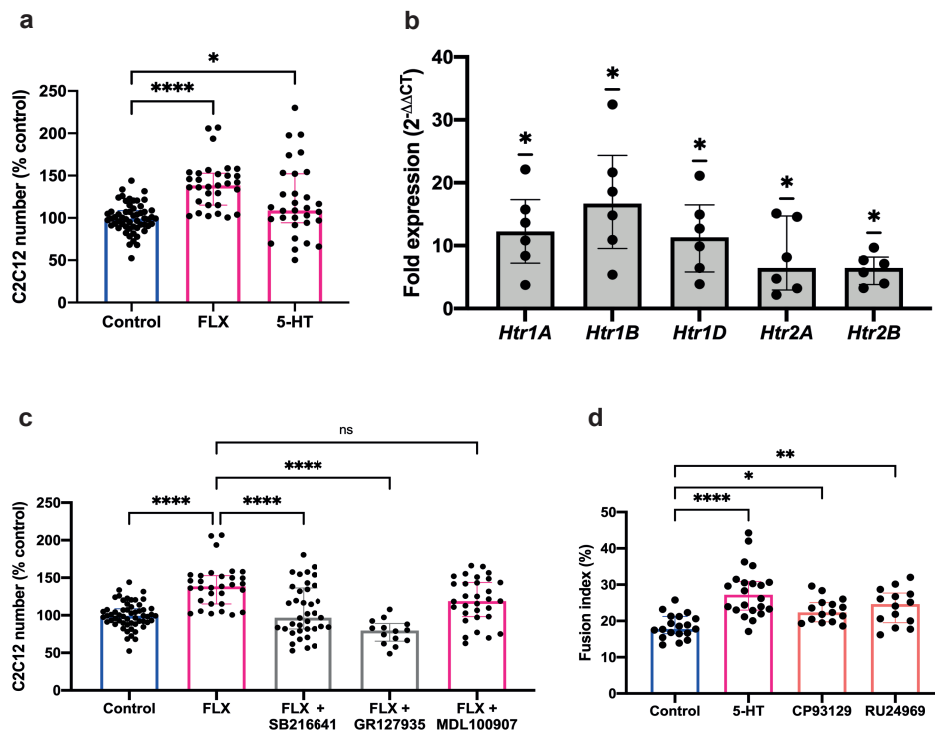
Supplemental Figure 2: Fluoxetine accelerates muscle regeneration *ad integrum* after injury.



(a) Distribution of fiber area in μm^2 14 days *post* injury on TA sections from control and fluoxetine (FLX)-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=6-8 mice per condition). **(b)** Representative Sirius Red-stained TA sections of control and FLX-treated mice 14 days *post* injury. Scale bars indicate 50 μm . **(c)** Quantification of the calcium deposit number by Hematoxylin and Eosin staining 14 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice (n=7 mice per condition). **(d)** Percentage of F4/80+ (macrophages)

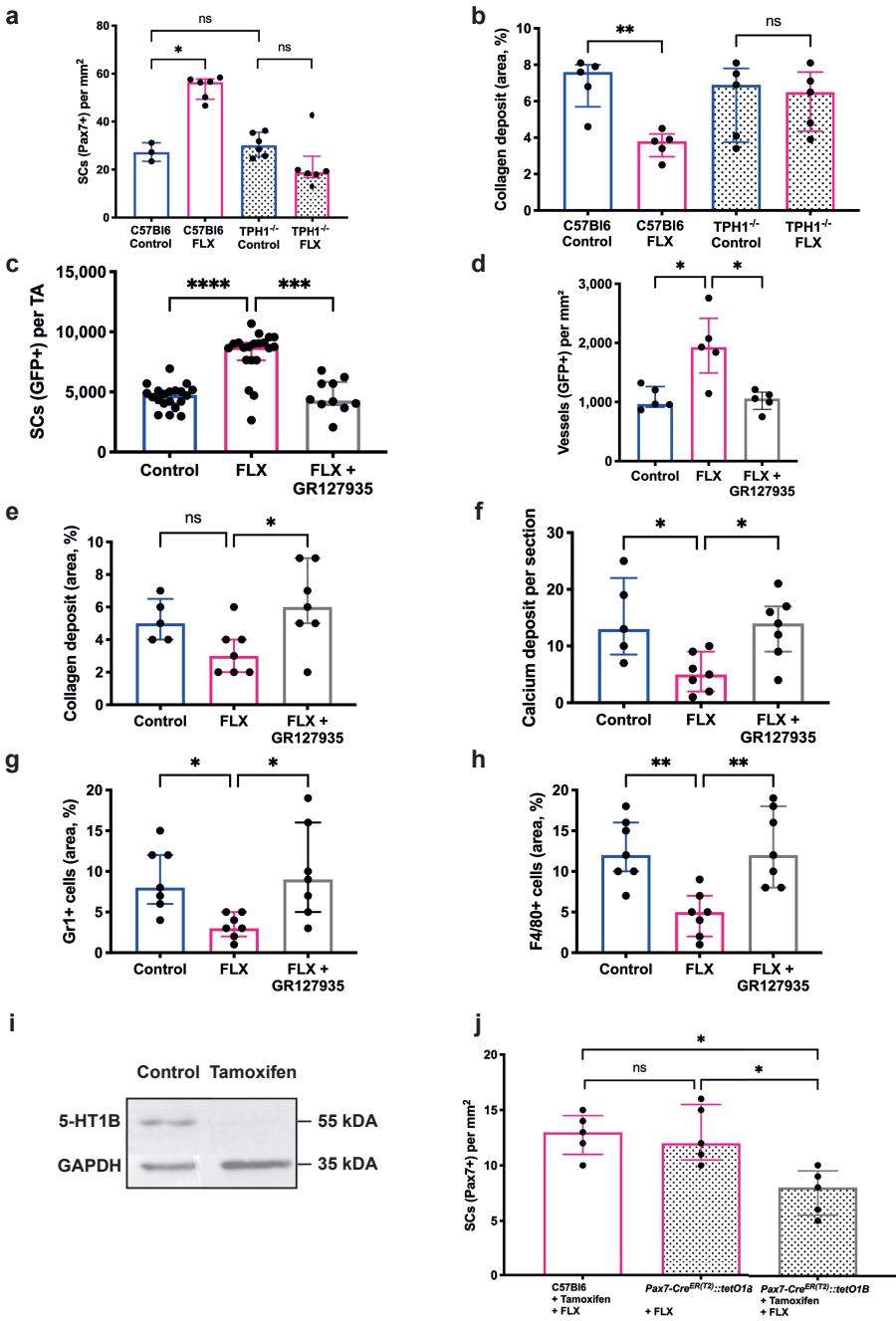
and **(e)** Gr1+ (granulocytes) immune cells infiltration areas 14 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated *Tg:Pax7nGFP* mice analyzed with Fiji software (n=7 mice per condition). **(f)** Automatic quantification of the fibers number 28 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=6-8 mice per condition). **(g)** Area of muscle fibers in μm^2 28 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=6-8 mice per condition). **(h)** Quantification of muscle fiber diameter in μm 28 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice using the MuscleJ analysis (n=6-8 mice per condition). **(i)** Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining 28 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=6 mice per condition). **(j)** Quantification of the SCs (GFP+) number per TA with cytometry analysis 28 days *post* injury from *Tg:Pax7nGFP* mice in FLX and control group (n=7 mice per condition). **(k)** Quantification of the vessel numbers by CD31 immunostaining per muscle fiber on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=7 mice per condition). All values are represented as median with interquartile range. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Supplemental Figure 3: Fluoxetine acts on myoblasts via the 5-HT1B receptor



(a) Percentage of nuclei numbers in C2C12 cells after exposure to 1 μ M fluoxetine (FLX) and 1 μ M serotonin (5-HT) for 24h in regular medium containing endogenous 5-HT. Quantitative analysis performed with the Columbus software based on the Hoechst staining (Data are representative of 3 independent experiments). **(b)** mRNA expression level of various 5-HT receptors (Htr) by RT-qPCR in TA muscle from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=5 mice per condition, values were analysed using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method). **(c)** Percentage of the nuclei number in C2C12 cells pretreated with 0.1 μ M specific antagonists (5-HT1B antagonists: SB216641 and GR127935; 5-HT2A antagonist: MDL100907) and exposed to 1 μ M FLX for 24h in regular medium (Data are representative of 3 independent experiments). **(d)** Quantification of the fusion index (%) for C2C12 cells cultured after exposure to 1 μ M 5-HT and 0.5 μ M 5-HT1B agonists (CP93129, RU24969) for two days in 5-HT-free medium. Quantitative analysis performed with the Columbus software based on the Hoechst and CellMask staining (Data are representing a pool of 3 independent experiments). All values are represented as median with interquartile range. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$

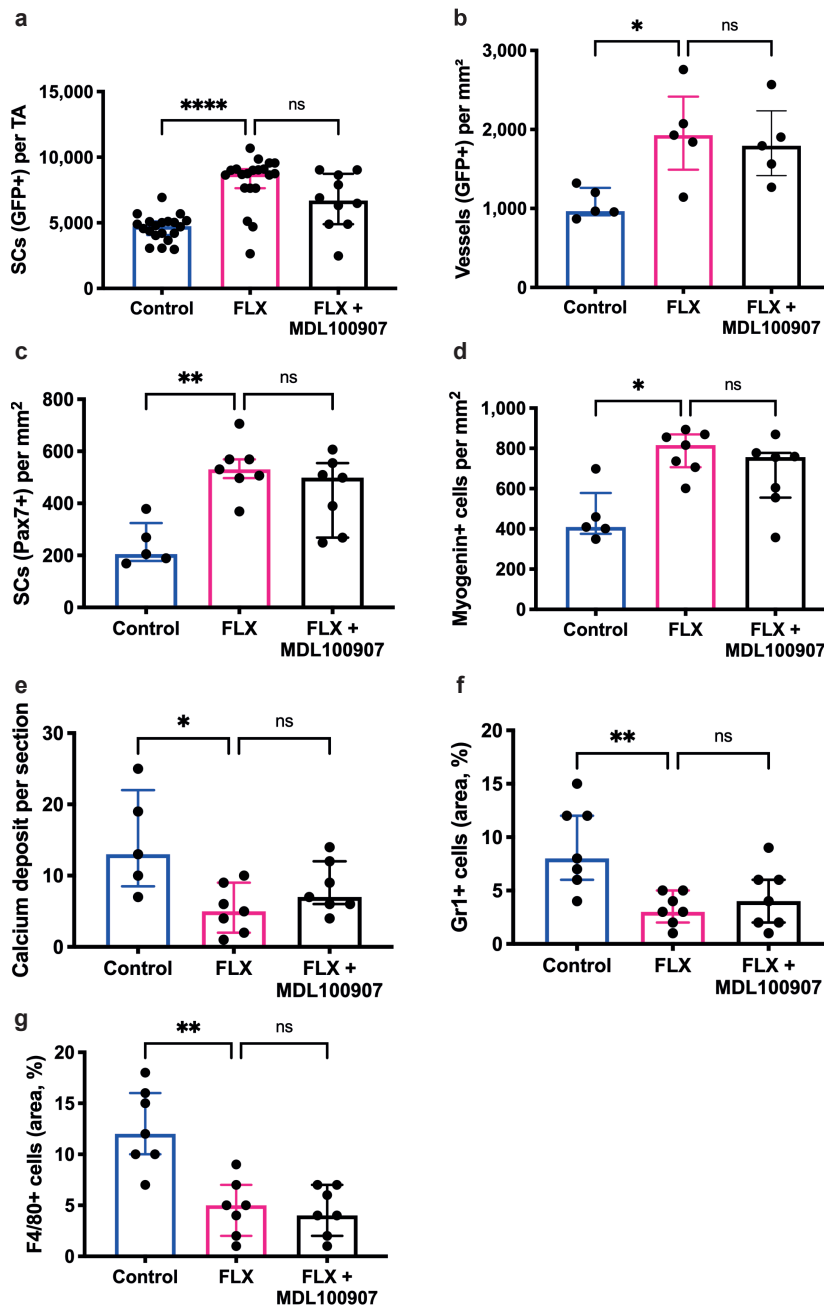
Figure Supplemental 4: Fluoxetine acts on muscle stem cells and muscle regeneration in a 5-HT and 5-HT1B dependent manner.



(a) Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining on TA sections from control and fluoxetine (FLX)-treated C57Bl6 and *TPH1*^{-/-} mice (n=3-6 mice per condition). **(b)** Percentage of the collagen deposit area stained with Sirius Red 14 days *post* injury on TA sections from control and FLX-treated C57Bl6 and *TPH1*^{-/-} mice and analyzed with Fiji software (n=5 mice per condition). **(c)** Quantification of the SCs (GFP+) number per TA with cytometry analysis

from *Tg:Pax7nGFP* mice in FLX, FLX + GR127935 and control group (n=10 mice per condition). **(d)** Quantification of the vessels number by GFP immunostaining on TA sections from *Flk1^{GFP/+}* mice in FLX, FLX + GR127935 and control group (n=5 mice per condition). **(e)** Percentage of collagen deposit area stained with Sirius Red 14 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ GR127935-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(f)** Quantification of the calcium deposit number stained with Hematoxylin and Eosin 14 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ GR127935-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(g)** Percentage of Gr1+ (granulocytes) and **(h)** F4/80+ (macrophages) immune cells infiltration areas 14 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ GR127935-treated C57Bl6 mice and analyzed with Fiji software (n=7 mice per condition). **(i)** Representative western blot of the expressions of the targeted 5-HT1B receptor protein and the housekeeping GAPDH protein in murine primary myoblasts isolated by pre-plating from *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice receiving the tamoxifen or the control (n=3-6 mice per condition). **(j)** Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining on TA sections from C57Bl6 and *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice receiving the control, tamoxifen and/or FLX (n=5 mice per condition). All values are represented as median with interquartile range. * p≤0.05, ** p≤0.01.

Supplemental Figure 5: Fluoxetine acts on muscle stem cells and muscle regeneration independently of the 5-HT2A receptor.



(a) Quantification of the SCs (GFP+) number per TA with cytometry analysis from *Tg:Pax7nGFP* mice in fluoxetine (FLX), FLX + MDL100907 and control group (n=10 mice per condition). **(b)** Quantification of the vessels number by GFP immunostaining on TA sections from *Flk1^{GFP/+}* mice in FLX, FLX+ MDL100907 and control group (n=5 mice per condition). **(c)** Quantification of the SCs number by Pax7 immunostaining 4 days *post injury* on TA sections from control, FLX and FLX+ MDL100907-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(d)**

Quantification of the differentiating cells number by Myogenin immunostaining 4 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ MDL100907-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(e)** Quantification of the calcium deposit number stained with Hematoxylin and Eosin 14 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ MDL100907-treated C57Bl6 mice (n=5-7 mice per condition). **(f)** Percentage of Gr1+ (granulocytes) and **(g)** F4/80+ (macrophages) immune cells infiltration areas 14 days *post* injury on TA sections from control, FLX and FLX+ MDL100907-treated C57Bl6 mice and analyzed with Fiji software (n=7 mice per condition). All values are represented as median with interquartile range. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Materials and Methods:

Mice and animal procedures

All procedures in this study were approved by the Animal Care and Use committee at the Institut Pasteur (CETEA 2014-0040). Unless specified 6 weeks old male mice were used in this study and different strains were used : the wild-type C57Bl/6RJ, *Tg:Pax7nGFP*¹⁵, *Flk1*^{GFP/+}¹⁶, *TPH1*^{-/-}²¹, *Pax7-Cre*^{ER(T2)}²³ and *tetO1B*²². All the genotyping were performed by standard PCR methods. Mice were housed on a 12:12 light/dark cycle in a pathogen free facility with controlled temperature and humidity. Food and drink were given *ad libitum*.

Fluoxetine (Lilly, fluoxetine hydrochloride syrup 20mg/5mL) was dissolved in the drinking water and delivered *per os* at 18mg/Kg. Antagonists GR127935 (Potent and selective 5-HT1B/1D antagonist, Tocris #1477) and MDL100907 (Potent and selective 5-HT2A antagonist, Tocris #4173) were used at 4mg/Kg respectively and delivered in Azlet osmotic sub-cutaneous pump (#2001D).

Thymidine analogue Bromodesoxyuridine (BrdU, Sigma-Aldrich #B5002) was used to assess cell proliferation at a concentration of 50mg/kg dissolved in 0.9% NaCl. For the short

pulse chase labelling, the mice received intraperitoneally BrdU 12h and 4h before death. For the cumulative assay BrdU was delivered *per os* in the drinking water during 12 weeks throughout the course of fluoxetine or control condition.

For muscle injuries, mice were anesthetized with isoflurane, the back limb was shaved and injected with a Hamilton syringe containing 10 μ l of notexin (LATOXAN #L8104) at 0.25mg/ml directly in the *Tibialis anterior* (TA). We have chosen 4 days post-injury as it corresponds to a significant expression of Myogenin; 14 days as it corresponds to half regenerated muscle in normal conditions and 28 days for fully regenerated muscle. In the serial injury experiments, notexin was injected every 28 days and a subgroup of mice was sacrificed to control for efficient regeneration.

To induce the Cre-mediated recombination, the *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice were given Tamoxifen food pellets (TAMOXIFEN DIET TAM400/CreER, Harlan TD.55125) for 21 days or throughout FLX administration.

Histological analysis

All histological analyses were performed in double blind and in the TA unless specified and in double blind. The TA was carefully dissected and snap frozen in liquid-nitrogen-cooled isopentane for a few minutes and stored at -80°C prior to cryo-sectioning (10 μ m sections). Sections were kept at room temperature overnight before staining. Sections were then rehydrated in PBS for 10 minutes and fixed in 10% formalin for 3 minutes. The sections were then routinely stained with hematoxylin and eosin (HE) using an automated stain machine or with Sirius Red to assess the collagen deposit.

Immunostainings

Immunostaining was performed on cryosections fixed with 4% paraformaldehyde (PFA EMS#15710) in cold PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 20 min at room temperature, washed, and blocked with 10% BSA (Sigma-Aldrich, #A1933) for 30 min. Sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C (**Table S1**) and with Alexa-conjugated secondary antibodies 1/250 and Hoechst for 45 minutes. For BrdU immunostaining the cells were treated with 2N HCl after fixation for 20minutes at room temperature and neutralized with 0.1M borate through 2 washes. The procedure was then identical to other immunostainings. Sections were then analyzed using an automated axioscan (Zeiss) or inverted Observer.Z1 Apotome (Zeiss).

Table S1: List of antibodies used for immunostainings.

Antigen	Host	Concentration	Reference
BrdU (Bu20a)	Mouse	1µg/ml	Dako M0744
CD31	Rat	15µg/ml	BD Pharmingen 550274
F4/80 (BM8)	Rat	0.5µg/ml	Thermo scientific MF-48000
GFP	Chicken	1µg/ml	Abcam ab13970
Laminin	Rabbit	0.69µg/ml	Sigma-Aldrich L9393
Ly-6C (Gr1)	Rat	0.5µg/ml	Caltag LabRM3030
Myogenin (F5D)	Mouse	4µg/ml	Thermo scientific MA5-11486
Pax7	Mouse	12µg/ml	DSHB
Secondary antibodies according	Donkey	0.5µg/ml	Jacksonimmuno #711486152 (Rabbit) #200162037 (Mouse)

to the primary Ab host			#703546155 (Chicken)
------------------------	--	--	----------------------

Cell count, sorting, and culture

For satellite cell counting, only the *tibialis anterior* muscle was dissected as previously described in cold DMEM-Glutamax (Gibco #41965-039) ⁶⁸. TA Muscles were then chopped with small scissors and put in a 50 ml Falcon tube with collagenase 0.08% (Sigma-Aldrich, #C51385), trypsin 0.08% (Sigma-Aldrich, #G6452) and DNase 1UI/mL (Roche, #04716728001) at 37°C with gentle agitation. After 20 minutes, the supernatant was collected in 20% serum placed on ice, and the collagenase/trypsin solution was added to continue the digestion. Once muscle is completely digested, the solution was filtrated using 40µm cell strainers and analyzed by FACS. Cells were labelled with propidium Iodide 10 µg/ml (Sigma-Aldrich#P4170) to exclude dead cells and displayed using the PE (Phycoerythrin, Red) channel on the FACS profile. FACS analysis was done using a FACSaria (Beckman). All analyses and quantitation were performed using Summit v4.3 software from DakoCytomation and FloJo software. The quantification of GFP+ cells by cytometry was performed on the entire TA muscle.

For the number of BrdU+ cells, GFP+ cells were FACS-sorted and plated in a cytospin machine (Cytospin4; ThermoFisher), spun at 500 g with low acceleration for 5 min. The slide was dried off and cells were fixed with 4%PFA. After immunostaining against BrdU, proliferating cells were expressed as the percentage of BrdU+-GFP+ among the SCs.

For satellite cell FACS-sorting, all the muscles of the hind limbs from *Tg:Pax7nGFP* mice were dissected and digested as previously described. Cells were labelled with propidium Iodide 10 µg/ml to exclude dead cells and displayed using the PE channel on the FACS profile. Cell sorting was done with Aria III (BD Biosciences) and BD FACSDIVA software (BD Biosciences). SCs were directly plated onto 96-well plate (PerkinElmer, #6005550) coated with

Matrigel (150ng/ml, BD Biosciences#354234) at an initial density of 6,000 cells per well. SCs were cultured in 1:1 DMEM-Glutamax (Gibco, #41965-039):Ham's F-12-Glutamax (Gibco, #31765035) containing 20% serum FBS (Biowest S1860) and kept in an incubator (37°C, 5% CO₂). The drug used was Fluoxetine (Sigma-Aldrich, #F132) at 1 μM. Alive cells were imaged using the 10x air immersion objective on an Opera Phenix High-Content Imaging System (Perkin Elmer).

For the isolation of SCs from the *Pax7-Cre^{ER(T2)}::tetO1B* mice, we used the five-step pre-plating as previously described⁶⁹. Briefly, all muscles of the hind limbs of mice were dissected. After enzymatic digestion as previously described, the solution was seeded onto gelatin-coated 6-well plates. After incubation, the supernatant containing non-adherent cells was transferred to a new gelatin-coated well. The incubation times for each of the 5 stages respectively were 1h, 2h, 18h, 24h and 24h. In the 4th and 5th pre-plating steps, adherent cells were transferred to new gelatin-coated wells for 1h. Next the supernatant containing non-adherent SCs was transferred to flasks coated with Matrigel[®]. They were cultured for 3 days in 1:1 DMEM-Glutamax:Ham's F-12-Glutamax containing 20% serum FBS and kept in an incubator (37°C, 5% CO₂). The cells were then collected in RIPA buffer to protein extraction.

C2C12 cells between the 2nd and the 10th passage were maintained in a monolayer in DMEM-Glutamax (Gibco #41965-039) supplemented with 10% FBS (Biowest S1860) and kept in an incubator (37°C, 5% CO₂). For the proliferation assay, the cells were plated in 96-well plates (PerkinElmer, #6005550) at an initial density of 2,000 cells per well and cultured in the regular medium with 10% FBS for 24h. Then serotonin starvation was induced for 24h by washing cells with PBS and replacing medium with 90% DMEM-Glutamax and 10% charcoal stripped FBS (Thermo, #A3382101). At 48h *post* plating, C2C12 cells were exposed to different drugs for 24 and 48h with medium changed every day. The drugs used were Fluoxetine (Sigma-Aldrich, #F132) at 1 μM, Serotonin (Sigma-Aldrich, #H9523) at 1 μM except for the increasing doses, SB216641 (selective 5-HT_{1B} antagonist, Tocris #1242) at 0.1 μM, GR127935 (potent and selective 5-HT_{1B/1D} antagonist, Tocris #1477/) at 0.1 μM, MDL100907

(potent and selective 5-HT_{2A} antagonist, Tocris #4173) at 0.1 μ M, CP93129 (potent and highly selective 5-HT_{1B} agonist, Tocris #1032) at 0.5 μ M and RU24969 (potent 5-HT_{1A/1B} agonist, Tocris #0912) 0.5 μ M. All the drugs used were dissolved in the water. For antagonist drugs, cells were pre-treated with specific antagonists for 30min and then exposed to 5-HT or FLX combined with the antagonists for 24h. Plasma membrane staining was performed with CellMask Green Stain (ThermoFisher, #C37608) diluted 1:1,000 in DMEM for 15min and then cells were washed with PBS and fixed with 4% PFA for 10min. Next, cells were stained with Hoescht for 30min, and cells were imaged using the 10x air objective on an Opera Phenix High-Content Imaging System (Perkin Elmer). The experimental procedures were repeated independently three times.

Image Analysis

For diameter, area and number of fibers, as well as number of centro-nucleated fibers, sections were immunostained with Laminin and Hoescht and all fiber parameters were performed automatically using the high-content analysis, MuscleJ⁷⁰, in ImageJ software independently of the centro or peripheral location of the nucleus. For calcium deposits, their number was quantified on HE-stained TA sections and expressed as a number per section. For collagen deposit quantification, ImageJ 1.46r software was using between 10 different photos randomly taken per section and 3 sections minimum per experimental group. We converted the pictures in a binary image and then collected the pixel values. The collagen deposit area was quantified on TA section stained by Sirius Red among the total section area.

The quantification of SCs and differentiating cells by immunofluorescence was expressed as number of cells per mm², when done *in vivo*. The total number of cells was counted and divided by the size (in mm²) of the tissue. SCs were quantified on section either after GFP or Pax7 immunostaining (specified in figure legends) on the entire section. At least 7 sections per muscle were quantified at different levels of the muscle. The quantification of

vessels by immunofluorescence was expressed as number of cells per mm² or per fiber, when done *in vivo*. Vessels were quantified on section either after GFP or CD31 immunostaining (specified in figure legends) on the entire section. The quantification of immune cells was expressed as a percentage of infiltration area relative to the entire tissue section.

Morphological analysis of cultured cells (*i.e.* SCs or C2C12s) was performed using Columbus Conductor™ software (Perkin Elmer Technologies) to assess the nuclear count (detected by endogenous GFP for SCs and Hoescht stain for C2C12s), nuclear area and roundness. The plasma membrane was detected for C2C12s with CellMask Green Stain to assess the nuclei number per cell using the integrated Image analysis building blocks appropriated. Cells touching image borders were excluded. The nuclei number was divided by the mean of the nuclei number in the control wells (n=8 per plate) and the normalized data were analysed as a percentage of nuclei. The fusion index was calculated as the ratio of the nuclei number in multinucleated cells (≥ 2 nuclei per cell) to the total number of nuclei per well.

Western Blot

Tissue samples were lysed with cold Ripa buffer (Sigma-Aldrich, #R0278) in Lysing Matrix Z tubes (MP Biomedicals, #116979010) and processed at 4.0m/sec for 30s with the FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, #116004500). Cell lysates were prepared by washing with cold PBS followed by incubation on ice for 1h RIPA buffer with 1X complete protease inhibitor cocktail (Roche, #11873580001). To remove particulates, tissue and cell lysates were centrifuged at 14,000g for 15 min at 4°C and the supernatant was collected. The protein suspensions were quantified using a Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo, #23227) and the 96-well plates were read on GloMax® Discover (Promega) at 570nm. 25 ug of proteins per sample were separated by electrophoresis on 10% SDS (Sigma-Aldrich, #L3771)-12% Acrylamide (Sigma-Aldrich, #A9099) gel and then transferred to a nitrocellulose membrane (PerkinElmer, #NBA083G001EA). The membranes were blocked with 5% BSA (Sigma-

Aldrich, #A1933) in TBS (PBS with 0.1% Tween 20X (Sigma-Aldrich, #P9416)) for 1h and then incubated with primary antibodies (**Table S2**) overnight at 4 °C. After washed with TBS, the membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibodies (**Table S2**) for 45 min. Bound antibody complexes were visualized by SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific, #34095). The exposed membranes were imaged using Gbox imaging system from Syngene (Cambridge, UK). The levels of GAPDH housekeeping protein expression were used for the normalisation of each target protein level.

Table S2: List of antibodies used for western blots.

Antigen	Host	Concentration	Reference
5-HT1A	Rabbit	0.3µg/ml	Thermo scientific PA5-28090
5-HT1B	Rabbit	1µg/ml	Sigma SAB4501470
5-HT1D	Rabbit	1µg/ml	Invitrogen PA1-29462
5-HT1F	Rabbit	0.5µg/ml	Invitrogen PA5-51066
5-HT2A	Mouse	1µg/ml	Novus Biological NBP2-26091
5-HT2B	Rabbit	3µg/ml	Novus Biological NLS1187
5-HT2C	Rabbit	0.25µg/ml	Novus Biological NBP2-67100
SERT	Rabbit	4µg/ml	Alomone Labs AMT-004
GAPDH	Rabbit	1µg/ml	Cell Signaling 2118
HRP-linked secondary antibodies according to the primary Ab host	Goat Horse	0.2µg/ml	Cell Signaling #7074 (Rabbit) #7076 (Mouse)

RT-qPCR

Total RNA was extracted using TRI Reagent® (Invitrogen, #15596026) as per the manufacturer's instructions. The total RNA was reverse transcribed using the iScript™ Reverse Transcriptase Supermix for RT-qPCR (Bio-rad, #1708840). Real-time quantitative PCR was performed using Power SYBR Green (Bio-rad, #1725274) and the rate of dye incorporation was monitored using the StepOne™ Plus RealTime PCR system (Applied Biosystems). At least three biological replicates were used for each condition. Data were analysed by StepOne Plus RT PCR software v2.1 and Microsoft excel. *β2microglobuline* transcript levels were used for the normalisation of each target (=ΔCT). RT-qPCR CT values were analysed using the 2^{-ΔΔCt} method to calculate the fold expression. The primers used were listed **Table S3**.

Table S3: List of primers used for RT-qPCR.

Gene	Sequences
<i>Htr1a</i>	Fwd : AACTATCTCATCGGCTCCTT Rev : GATTGCCAGTACCTGTCTA
<i>Htr1b</i>	Fwd : CTCCATCTCTATTTTCGTTGC Rev : GTCTTGTGGGTGTCTGTTT
<i>Htr1d</i>	Fwd: CCATCCATCTTGCTCATTAT Rev : CACCTGGTTGAAAAAGAGAG
<i>Htr2a</i>	Fwd : TGTGATGCTTTTAACATTGC Rev : CCAACTTACTCCCATGCTAC
<i>Htr2b</i>	Fwd : GAACATCCTTGTGATTCTGG Rev : AGGCAGTTGAAAAGAGAACA
<i>β2microglobuline</i>	Fwd: GACCGGCCTGTATGCTATCC Rev: TCAGTCTCAGTGGGGGTGAA

Luminex® (Multiplex Immunoassay).

As previously described, the muscle samples were snap frozen and lysed. After clarification, the supernatant was processed for analysis of Luminex® multiple cytokine and chemokine (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Standard 23-Plex, Group I and Standard 9-Plex, Group II). TA muscle was collected from control and FLX-treated C57Bl6 mice (n=4 per condition). For the injury model, TA muscle was collected 4 days *post* NTX from control and FLX-treated mice (n=4 per condition).

Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software using appropriate tests after being assessed for non-normal distribution: the non-parametric Mann-Whitney test for comparing two groups, the non-parametric Kruskal-Wallis test for comparing more than two groups, or the non-parametric Wilcoxon test for comparing to a theoretical value such as statistical analysis of fold change, and a minimum of 95% confidence interval for significance; p values indicated on figures are < 0.05 (*), < 0.01(**), < 0.001 (***), < 0.0001 (****), ns: not significant. Unless specified, quantitative data were represented by median and interquartile range.

Discussion générale

A. Résumé de la thèse

Les mécanismes d'action des ISRS ayant été largement mis en évidence dans le SNC tant sur la modulation positive du signal 5-HT que sur le couplage neurogenèse/angiogenèse, le but de ce travail était de caractériser, à l'aide de modèles animaux expérimentaux, les effets de la fluoxétine sur le signal 5-HT en périphérie et d'investiguer les potentiels effets favorisant la régénération du muscle squelettique, connu pour sa capacité régénérative remarquable.

Dans une première partie, nous avons montré que la fluoxétine, en bloquant l'activité du transporteur SERT, induit une modulation du signal 5-HT au niveau de l'intestin, premier lieu de synthèse 5-HT de l'organisme, ainsi qu'au niveau sanguin, premier lieu de stockage de 5-HT, portant le signal 5-HT systémique. De manière similaire aux effets décrits dans le SNC, le traitement prolongé par fluoxétine entraîne une adaptation du métabolisme de 5-HT de l'intestin, suggérant des mécanismes de régulation tendant vers l'homéostasie au sein de tissus avec une capacité de synthèse locale de 5-HT. A l'inverse, le traitement chronique par fluoxétine entraîne une déplétion du stockage de sérotonine dans les plaquettes, un signal sérotoninergique systémique initialement renforcé puis durablement freiné. Ces résultats suggèrent que la modulation positive d'un signal 5-HT systémique nécessite un traitement subaigu en fluoxétine et que les organes possédant un métabolisme 5-HT restaurent une nouvelle homéostasie 5-HT à l'issue d'un traitement chronique par la fluoxétine.

Dans une deuxième partie, nous avons mis évidence des actions bénéfiques de la fluoxétine sur la régénération musculaire qui s'articulent à la fois sur les cellules souches musculaires (CSMu), la vascularisation et l'inflammation conduisant à une cicatrisation plus rapide avec moins de fibrose. Cette étude établit que les CSMu sont sensibles au potentiel mitogène de la sérotonine périphérique et que la fluoxétine, en tant que modulateur des concentrations extracellulaires de 5-HT, influence positivement et directement le comportement des cellules souches musculaires, via le récepteur 5-HT_{1B}. Ces résultats appuient pleinement l'hypothèse d'une identité sérotoninergique du muscle squelettique, actuellement peu caractérisée.

Plus précisément, nous avons démontré, par de multiples approches expérimentales, que la fluoxétine favorise au fil du temps une prolifération contrôlée et soutenue des CSMu, à l'état d'équilibre. A l'aide d'un modèle classique de lésion musculaire, nous avons montré que la fluoxétine promeut une régénération musculaire plus rapide, plus efficace et toujours harmonieuse. Plus important encore, après des blessures musculaires répétitives, la fluoxétine préserve les capacités de régénération du muscle avec un pool de CSMu constamment augmenté. Profitant d'approches complémentaires *in vitro* et *in vivo*, nous démontrons que la fluoxétine module positivement le comportement de CSMu et de myoblastes. S'appuyant sur des modèles d'inactivation pharmacologique ou d'inactivation génétique conditionnelle, nous avons montré que les effets de la fluoxétine nécessitent une stimulation du récepteur 5-HT_{1B} spécifiquement exprimé par les CSMu.

Associé à ces effets spécifiques ciblant les CSMu, la fluoxétine induit une modification du microenvironnement des CSMu, à l'état de base, avec une augmentation coordonnée de la vascularisation et des concentrations locales de facteurs de croissance comme le VEGF. Puis au cours de la régénération, tout en stimulant le couplage myogenèse/angiogenèse, la fluoxétine induit une diminution globale des concentrations locales de cytokines associée à

une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires et des dépôts de collagène, témoignant d'une cicatrisation tissulaire efficace.

B. Implications

1. Le muscle squelettique, une identité sérotoninergique limitée

Nos résultats soutiennent l'hypothèse d'une identité sérotoninergique du muscle strié squelettique. En effet, nous avons mis en évidence, d'une part, l'expression par le muscle squelettique de SERT, ainsi que de différents récepteurs 5-HT puis nous avons confirmé l'expression du récepteur 5-HT_{1B} par des myoblastes primaires, à l'état d'équilibre. Témoignant de l'effet direct de la sérotonine sur le muscle, la stimulation du récepteur 5-HT_{1B}, spécifiquement exprimé par les CSMu, était le principal médiateur des effets positifs de la fluoxétine, au cours de la régénération musculaire. Ces résultats rejoignent les précédentes études montrant l'expression d'acteurs liés au système 5-HT dans le muscle ou par des myoblastes comme SERT, MAO, *Tph1*, 5-HT_{2A} et *Htr7*, ainsi que les effets de 5-HT favorisant la différenciation et la croissance musculaires, *in vitro* ^{495,499,502,503,505,506}.

Toutefois, les capacités de synthèse locale de 5-HT au sein du muscle nécessite la confirmation d'une activité fonctionnelle de TPH. En effet, comparés aux autres tissus sensibles à la sérotonine tant au cours de leur développement qu'au cours de leur réparation à l'âge adulte, l'absence d'anomalies majeures chez les souris *Tph1*^{-/-} au cours du développement ou de la régénération musculaire, suggère un rôle non crucial de la sérotonine dans l'homéostasie du tissu musculaire ^{134,496}. Par ailleurs, bien que l'expression de TPH2 ayant déjà été rapportée en périphérie ⁵⁴⁹ et que les muscles de souris *Tph1*^{-/-} contiennent de la sérotonine ⁴⁹⁶, l'hypothèse d'une synthèse locale de 5-HT via TPH2 semble peu probable ou limitée dans sa fonction physiologique, étant peu capable de compenser l'absence de sérotonine dans les souris *Tph1*^{-/-}. Le caractère redondant de l'action de 5-HT dans le muscle à l'âge adulte explique en partie la longue durée de traitement par fluoxétine nécessaire *in vivo* pour stimuler les CSMu. Bien que les éléments ci-dessus soient en faveur d'une sensibilité limitée du muscle à la 5-HT, il ne peut être exclu qu'à l'instar du SNC, le muscle dispose d'un système de régulation du métabolisme 5-HT plus complexe que dans d'autres tissus, nécessitant une levée de rétrocontrôle afin de renforcer localement le signal 5-HT.

Cependant, l'hypothèse d'une double boucle d'action de la sérotonine ne peut être exclue, à savoir une boucle centrale, dérivée de TPH2, pouvant participer à l'homéostasie du tissu musculaire et une boucle périphérique, dérivée de TPH1, non cruciale pouvant stimuler la régénération musculaire, sous-tendant les effets de la fluoxétine. L'intrication de différentes boucles d'action de la sérotonine a déjà été décrite dans le métabolisme osseux ou énergétique ^{157,158,160-162}. En effet, notamment au cours du développement musculaire, la sérotonine pourrait participer à la stimulation de la croissance musculaire, à travers une action centrale sur la voie somatostatine/GH/IGF-1 ⁵¹⁶. Les anomalies du développement musculaire rapportées en cas de régime riche ou pauvre en tryptophane peuvent soutenir cette hypothèse ^{517,518}.

Ainsi, des études ultérieures sont nécessaires pour confirmer l'identité sérotoninergique du muscle à travers ses capacités de synthèse locale de 5-HT et de préciser plus finement le rôle physiologique de la sérotonine au cours du développement musculaire ou dans le comportement de CSMu.

2. La fluoxétine, un traitement ciblant les cellules souches

Dans notre étude, nous avons montré que le traitement chronique par fluoxétine favorisait une prolifération contrôlée et soutenue des CSMu, dans un muscle sain non lésé, et qu'elle influençait positivement le comportement de CSMu jusqu'à 3 blessures musculaires répétées, lorsque le pool de CSMu avait été préalablement exposé au traitement. Nos résultats ont montré que toutes les propriétés des CSMu, à savoir l'autorenouveaulement, la prolifération et la différenciation, étaient améliorées et restaient fonctionnelles au cours d'un traitement prolongé par fluoxétine. De plus, à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons confirmé que la fluoxétine, de manière dépendante de la sérotonine, exerçait un effet direct sur les CSMu et myoblastes.

Dans le SNC à l'état d'équilibre, il a été clairement démontré que la fluoxétine, lors d'une administration nécessairement prolongée, exerçait des effets stimulant la neurogenèse hippocampique à travers une action ciblant spécifiquement les progéniteurs neuronaux, sans atteinte des cellules souches neuronales et permettant une augmentation ou accélération de la prolifération, de la survie neuronale, ainsi que de la maturation neuronale^{354,356,359}. Les similitudes des effets de la fluoxétine sur le comportement des cellules souches et progéniteurs issus de ces deux tissus suggèrent une proximité de fonctionnement des cellules souches, ontogénétiquement intéressantes. De plus, ces éléments sont dans la continuité des interactions bidirectionnelles, via le système 5-HT, existant entre ces deux organes^{496,550,551}.

En dehors du SNC, la fluoxétine a également démontré des effets stimulant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire d'autres lignées de cellules souches. Ces effets positifs ont notamment été rapportés sur les lignées myéloïdes, après un stress aigu de moelle osseuse^{424,436}. Ils s'inscrivaient dans la continuité des effets 5-HT connus, s'exerçant de manière auto et paracrine au sein de microsystemes sérotoninergiques, et ciblant différents progéniteurs hématopoïétiques, à savoir les progéniteurs multipotents hématopoïétiques, les progéniteurs érythropoïétiques ou encore les mégacaryoblastes^{115,142,424,427,434}.

A la différence du SNC qui nécessitait 14 jours de traitement ou de la moelle osseuse stressée qui nécessitait 7 jours, les effets de la fluoxétine impactaient significativement le pool de CSMu, dès la 4^{ème} semaine. Plusieurs hypothèses peuvent étayer cette durée plus longue de traitement dans le muscle, comparée aux autres tissus. D'une part, comme citée ci-dessus, les effets 5-HT semblent redondants, signifiant une faible sensibilité à ce signal. D'autre part, la fréquence de renouvellement de cellules souches au sein d'un tissu peut impacter la rapidité de réponse à un signal mitogénique. En effet, les CSMu présentent un faible taux de renouvellement par rapport aux autres progéniteurs⁵⁵². Enfin, le traitement par fluoxétine entraîne, *in vivo*, une augmentation significative de la vascularisation du muscle squelettique, dès la 3^{ème} semaine (données non montrées). Les vaisseaux constituent un partenaire privilégié des CSMu, illustré par leur proximité au sein de la niche de CSMu et de leur relation linéaire entre la densité vasculaire et le nombre de CSMu⁴⁴⁵. De plus les CEs participent activement à la régulation des comportements de quiescence et d'activation des CSMu^{447,465,487}. Ainsi, bien que l'effet prolifératif direct et rapide de la sérotonine et de la fluoxétine ait été démontré *in vitro* sur des myoblastes, l'augmentation de la densité vasculaire induite par la fluoxétine pourrait participer à un remodelage de la niche de CSMu favorisant l'accessibilité des CSMu, ainsi que leur sortie de quiescence des CSMu. Ainsi, les CSMu, activées par les CEs, pourraient alors être plus sensibles à la sérotonine, augmentée dans le microenvironnement sous l'effet de la fluoxétine. Ces résultats sont cohérents avec les effets

de la fluoxétine dans le SNC, comprenant une augmentation de vascularisation cérébrale dès 12 jours de traitement, soutenu par une augmentation du facteur angiogénique VEGF, indispensable dans la médiation des effets de la fluoxétine sur la neurogenèse^{361,369,380}. De manière similaire dans le muscle, VEGF est un médiateur important dans les interactions bidirectionnelles entre les CE et les CSMu⁴⁸⁷ et pourrait également être impliqué dans les effets induits par la fluoxétine. En ce sens, nous avons montré une augmentation musculaire locale de VEGF, à l'issue du traitement chronique par fluoxétine. Par ailleurs, d'autres acteurs cellulaires participent à la niche de CSMu tels que les péricytes, les progéniteurs fibroadipogéniques ou encore les cellules mésenchymateuses muscles lisses et il ne peut pas être exclu que la fluoxétine exerce également une action sur eux influençant le comportement des CSMu.

De plus, nous avons montré un effet plateau de la fluoxétine sur le pool de CSMu saturant à 90% des cellules BrdU+ cumulées pendant un traitement prolongé, suggérant que 10% des CSMu semblaient insensibles aux effets de fluoxétine, à l'état de base. De nombreuses études ont permis de montrer que la population de CSMu était hétérogène, notamment dans leur capacité d'engagement myogénique et d'autorenouveaulement, suggérant une distinction, au sein des CSMu exprimant PAX7, entre des cellules souches de réserve et des progéniteurs myogéniques^{460,461,476}. Fait intéressant, dans le tissu nerveux et hématopoïétique, les effets de la fluoxétine ou de la sérotonine ne concernaient que les progéniteurs et ne semblaient pas impacter les cellules souches, pouvant suggérer un effet similaire de la fluoxétine ciblant seulement les progéniteurs myogéniques au sein du muscle^{142,355,427}. Plus précisément, il a été montré, dans le SNC, que la fluoxétine favorisait le mode de division symétrique des progéniteurs neuronaux³⁵⁵, soutenant les processus d'amplification d'une population cellulaire, à la différence des divisions asymétriques pouvant assurer l'autorenouveaulement d'une population de cellules souches⁴⁷⁰. Des études ultérieures sont nécessaires afin d'identifier la cible cellulaire précise de la fluoxétine ou de la sérotonine, au sein des CSMu, ainsi que de préciser les modulations induites par ces molécules sur le comportement des CSMu, telles que le mode de division cellulaire favorisé, la maturation ou encore la survie cellulaire.

Ainsi, la fluoxétine influence positivement et directement différentes populations de cellules souches et progéniteurs, favorisée activement par son rôle angiogénique. Des études ultérieures sont nécessaires afin d'identifier précisément les stades cellulaires sensibles à la sérotonine, au cours des cascades de cellules souches, et de préciser le type d'effet induit par la sérotonine sur le comportement des cellules souches. Au-delà du muscle, la sensibilité d'un tissu aux effets trophiques de la sérotonine et la fréquence de renouvellement des cellules souches semblent guider l'investigation des effets de la fluoxétine sur les cellules souches, ainsi que l'optimisation de leur administration.

a) *Place du récepteur 5-HT1B dans les cellules souches*

Dans notre étude, à l'aide d'approche *in vitro* et *in vivo*, incluant des modèles animaux d'inactivation pharmacologique ou génétique, nous avons mis en évidence que les effets de la fluoxétine spécifiquement sur les CSMu nécessitent, d'une part, la sérotonine dérivée de TPH1 et, d'autre part, la stimulation du récepteur 5-HT1B, exprimé par les CSMu. À notre connaissance, la caractérisation de la régulation du comportement de CSMu par le 5-HT1B est une nouveauté.

Comme précédemment cités, des études ont rapporté l'expression d'un gradient croissant d'expression du récepteur 5-HT_{2A} dans les myoblastes en cours de différenciation en myotubes, avec un rôle métabolique prédominant dans le transport du glucose⁵⁰³⁻⁵⁰⁵. De plus, une étude antérieure a montré, à partir de cultures de myoblastes fœtaux de rats, que l'exposition de 5-HT entraînait une augmentation rapide de l'expression génique de *Myogénine*, inhibée en présence de haute dose d'antagoniste 5-HT_{2A}, la kétansérine, suggérant un effet 5-HT favorisant la différenciation musculaire, dépendant du récepteur 5-HT_{2A}⁵⁰⁵. Il est à noter qu'outre son antagonisme 5-HT_{2A}, la kétansérine exerce de nombreuses autres activités biologiques, telles qu'un antagonisme de récepteurs 5-HT_{1A}, 1B, 7 mais également un antagonisme des récepteurs adrénergiques α 1 ou encore des récepteurs dopaminergiques¹⁰¹. De plus, les affinités réceptorielles peuvent varier avec les espèces comme c'est le cas pour le récepteur 5-HT_{1B}¹⁰¹. Enfin, comparés à leur constante d'affinité de l'ordre du nM, des hautes doses de kétansérine, de l'ordre du μ M, peuvent diminuer la spécificité de liaison réceptorielle de la molécule¹⁰¹. Fait intéressant, il a été montré que le récepteur 5-HT_{2A} pouvait être activé par un autre ligand que la sérotonine, tel que des glycosaminoglycanes présents dans la matrice extracellulaire, et favorisait alors la différenciation terminale de myotubes⁵²¹. Toutefois, dans notre étude, l'utilisation *in vivo* et *in vitro* d'un antagoniste de la 5-HT_{2A}, le MDL100907, exerçant une activité antagoniste spécifique aux récepteurs 5-HT₂ prédominant sur 5-HT_{2A}, n'abolissait pas les effets pro-prolifératifs et pro-différenciants, induits par la fluoxétine, sur des CSMu et myoblastes. La modulation du signal 5-HT est hautement régulé et complexe. Ainsi, plusieurs récepteurs 5-HT peuvent être co-exprimés au sein d'un même type de cellule afin de réguler des fonctions distinctes ou de co-réguler leur expression^{107,338,346}. De plus, une expression séquentielle de différents récepteurs spécifiques à différentes étapes de la cascade de maturation des cellules souches a été rapportée dans le cerveau ou la moelle osseuse^{142,313}. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la stimulation du récepteur 5-HT_{1B} pourrait moduler les étapes précoces de la myogenèse quand l'activation du récepteur 5-HT_{2A}, de manière non exclusivement dépendante de la sérotonine, participerait à la différenciation terminale. En plus de confirmer ces résultats préliminaires, des études ultérieures sont nécessaires afin d'explorer si d'autres récepteurs 5-HT sont présents au sein de CSMu et des progéniteurs myogéniques, ainsi que leur fonction au cours de la cascade de myogenèse.

Quant au récepteur 5-HT_{1B}, son expression est diffuse dans l'organisme, tant dans le SNC, le tissu vasculaire ou d'autres organes périphériques comme le cœur, la prostate ou encore le tissu osseux^{96,97}. Fait intéressant, plusieurs études ont suggéré qu'il pouvait avoir une présentation « silencieuse », pouvant s'activer en réponse à des facteurs dits de « priming »⁹⁷. D'un point de vue transductionnel, outre sa voie principale de signalisation par inhibition de l'adénylate cyclase, le récepteur 5-HT_{1B} peut également activer les voies ERK, Akt, PLC ou encore la NOS⁹⁶.

Outre son rôle dans la régulation du signal central 5-HT, le récepteur 5-HT_{1B} joue un rôle dans le tonus vasculaire, notamment en favorisant la vasoconstriction, limitant sa stimulation au long cours^{96,97}. Son activité peut également transmettre les effets mitogéniques induits par la sérotonine. Ainsi, son activation favorise la prolifération de progéniteurs neuronaux intermédiaires, de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses vasculaires ou encore de progéniteurs ostéoclastiques^{138,313,338,346,553}. De plus, son expression a également été caractérisée dans différents tissus néoplasiques⁵⁵⁴.

Ainsi, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déchiffrer les voies en aval régulées par le 5-HT_{1B} dans les CSMu. De plus, d'autres modes d'action de la sérotonine

touchant à la biogenèse mitochondriale ou aux effets antioxydants, ou de la fluoxétine à travers des modifications épigénétiques, restant également à explorer.

3. La fluoxétine, un traitement ciblant également les autres acteurs de la régénération tissulaire

Dans cette étude, nous avons montré dans cette étude qu'un traitement chronique par fluoxétine exerçait une triple action favorable au cours de la régénération musculaire en ciblant des effets pro-myogéniques, des effets pro-angiogéniques associant une densité vasculaire augmentée avec des niveaux locaux augmentés de VEGF, ainsi que des effets immunomodulateurs comprenant une diminution globale de cytokines et d'infiltration de cellules immunes, l'ensemble résultant en une cicatrisation efficace avec une fibrose limitée.

Outre les effets positifs de la fluoxétine sur le couplage angiogenèse/neurogenèse^{361,380}, similaires aux effets présents dans notre étude sur le couplage angiogenèse/myogenèse, la triple action de la fluoxétine a également été rapportée dans des modèles de blessures vasculaires cérébrales. En effet, il a été montré, post ischémie cérébrale transitoire que la fluoxétine atténuait les processus inflammatoires précoces et tardifs, incluant une diminution d'activation microgliale, d'infiltration de neutrophiles et de macrophages, ainsi que de marqueurs pro-inflammatoires comme les MMP et les cytokines³⁹⁵⁻³⁹⁷. Elle stimulait également la neurogenèse en promouvant la survie neuronale et la migration de nouveaux neurones^{393,395-397}. Enfin, elle favorisait l'angiogenèse cérébrale, à travers l'augmentation de facteurs pro-angiogéniques, tels que le couple VEGF/VEGFR2 et des niveaux HIF1 α , associée à une amélioration fonctionnelle de la circulation sanguine grâce à des effets vasodilatateurs, dépendants de NOS^{393,397,399-401}. Fait intéressant, en périphérie, les effets combinés pro-angiogéniques, anti-inflammatoires et antioxydants de la fluoxétine ont également été mis en évidence dans des modèles d'ischémie transitoire sur le muscle cardiaque, le rein ou encore sur la patte arrière, associés à un effet vasodilatateur sur le muscle améliorant le débit sanguin^{507,555-559}.

Plus spécifiquement, nous avons montré que les effets de la fluoxétine ciblant les vaisseaux dépendaient également de l'activation du récepteur 5-HT1B et non du récepteur 5-HT2A, ces derniers étant abolis *in vivo* en présence d'un antagoniste 5-HT1B systémique, sans modification en présence d'un antagoniste systémique 5-HT2A. Ces résultats sont cohérents avec les actions mitogéniques connues de la sérotonine via le récepteur 5-HT1B, dont l'expression prédomine celles des autres récepteurs au sein des cellules endothéliales^{334,335}. Bien que nous n'ayons pas observé d'effet synergique lorsque les souris étaient traitées par fluoxétine et antagoniste 5-HT2A, il a été montré que l'inhibition du récepteur 5-HT2A pouvait entraîner indirectement l'activation des récepteurs 5-HT1B des CE stimulant ainsi l'angiogenèse^{338,347}.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence qu'au cours de la régénération, les infiltrats de neutrophiles et de macrophages étaient diminués par la fluoxétine, de manière dépendante de 5-HT1B. Au cours d'une blessure, le rôle connu de la sérotonine plaquettaire et des cellules endothéliales, qui expriment 5-HT1B, dans le recrutement de cellules immunes pourraient sous-tendre les effets d'infiltration de cellules immunes atténués de la fluoxétine^{123,150,334,555}. Par ailleurs, la sérotonine est un médiateur connu de diverses fonctions immunorégulatrices, allant du recrutement de cellules immunes, de leur activation et différenciation, à la sécrétion de cytokines¹⁴³. Différentes lignées cellulaires sont, d'ailleurs, capables de synthétiser de la sérotonine agissant de manière auto ou paracrine et expriment

différents récepteurs 5-HT dont le récepteur 5-HT1B (**Figure 9**)¹⁴³. Fait intéressant, il a été montré *in vitro* que la sérotonine modulait la polarisation des macrophages en favorisant le maintien du statut M2, via l'activation des récepteurs 5-HT2B et 5-HT7⁵⁶⁰. Or, parmi les processus immuno-inflammatoires apparaissant au cours de la régénération musculaire, les macrophages tiennent une place centrale, avec des fonctions dépendantes du phénotype exprimé (M1 ou M2), qui incluent la phagocytose, la sécrétion de cytokines ou encore la régulation du couplage angiogénèse/myogénèse^{447,448,490,491}. Ainsi, des investigations ultérieures sont nécessaires pour préciser, d'une part, les effets précis de la fluoxétine sur les cellules immunitaires, notamment les macrophages, et, d'autre part, la régulation probablement indirecte du récepteur 5-HT1B dans les infiltrats immunitaires.

Enfin, dans notre étude, les niveaux de dépôts de collagène, au cours de la régénération musculaire, étaient similaires chez les souris sauvages et les souris TPH1^{-/-}, contrastant avec des études précédentes montrant le rôle pro-fibrotique de la 5-HT dérivée de TPH1, dans différents tissus comme la peau, le poumon, le foie ou encore le cœur⁵⁶¹. Selon le tissu ciblé, l'implication des récepteurs 5-HT2A, 2B et 7 a été démontré à travers la modulation de la voie liée à TGFβ ou encore la croissance ou la transdifférenciation de myofibroblastes^{561,562}. Des études ultérieures sont donc nécessaires pour préciser le rôle de la sérotonine dans la fibrose musculaire et les mécanismes d'action sous-tendant les effets anti-fibrotiques de la fluoxétine.

C. Limites

Bien que chaque travail ait été déjà discuté dans chaque partie respective, nous pouvons également pointer les limites générales de nos approches expérimentales.

Le caractère pléiotropique de la sérotonine et la complexité et diversité des acteurs liés à son système font de l'étude du système 5-HT, un enjeu scientifique tant au niveau méthodologique que technologique. Illustrant ces défis d'investigation, on peut évoquer le dosage de sérotonine difficile du fait de l'instabilité de cette molécule⁵⁶³ et le risque de contamination par activation plaquettaire²⁵⁴. Commun à d'autres cibles protéiques, la caractérisation des acteurs 5-HT peut également être limitée, d'une part, par la faible sensibilité des outils technologiques, notamment par immunomarquage ou radio-ligand, du fait d'une haute homologie de séquence protéique entre ces récepteurs⁹⁷ et, d'autre part, par la complexité de régulation de leurs expressions, pouvant donner lieu à des dissociations de niveaux entre l'expression génique, protéique et d'activité fonctionnelle d'un acteur, largement étayé dans le SNC^{79,194,215,219-222,224,225}. L'approche expérimentale *in vitro* peut également être difficile devant la stabilité de la molécule variant avec les niveaux d'oxygène, de lumière, du pH ou encore sur la durée d'expérimentation^{339,563}. De plus, la présence de hautes concentrations de sérotonine dans les différents sérums utilisés couramment en culture cellulaire a limité nos investigations sur les effets 5-HT sur le comportement de cellules souches⁵⁶⁴. Enfin, l'utilisation des outils pharmacologiques peut être également limitée en termes de sélectivité des activités biologiques, variant entre les espèces et parfois entre les types cellulaires^{97,101}. Par exemple, le récepteur 5-HT1B présente un profil pharmacologique selon les espèces, puisque la molécule CP93129 est un agoniste sélectif 5-HT1B ou le (-)propranolol est un antagoniste sélectif, uniquement chez les rongeurs⁹⁷.

Par ailleurs, l'étude des effets de la fluoxétine au cours de la régénération musculaire comprend également plusieurs limites. D'une part, cette étude ne comprend qu'un modèle de blessure aigue par notexine. Il aurait pu être pertinent d'explorer les effets de la fluoxétine

dans un modèle de blessure aiguë avec destruction du pool de cellules satellites et des vaisseaux comme dans le cas de la blessure par engelure, dans un modèle de blessure chronique comme dans les myopathies notamment génétiques ou encore dans le modèle de transplantation de cellules souches ⁴⁴¹. D'autre part, les effets positifs de la fluoxétine sur la régénération musculaire n'ont été montrés qu'en cas de longue période de traitement précédant la blessure, suggérant que les modifications préalables du tissu musculaire induites par la fluoxétine facilitent la régénération musculaire. Il aurait pu être intéressant d'évaluer si les effets de la fluoxétine seraient similaires, distincts ou absents, en cas d'administration uniquement après blessure musculaire. Par ailleurs, l'ensemble de nos expériences a porté sur les effets de la fluoxétine, en tant que molécule prototypique des ISRS. Néanmoins, cette molécule possède un profil pharmacologique propre comprenant notamment des propriétés anti-inflammatoires ou influençant les autres monoamines, non partagés par les autres antidépresseurs de type ISRS ou même aux autres molécules appartenant à la grande classe des ISRS ³⁷³. La confirmation des effets positifs sur la régénération musculaire à l'aide d'un autre ISRS permettrait de généraliser les effets de la fluoxétine à l'ensemble de cette classe. Une autre limite majeure de notre étude est l'absence d'investigation de bénéfices fonctionnels d'un traitement par fluoxétine sur le plan de la force musculaire, de la physiologie ou du métabolisme musculaire. De plus, la quasi-totalité de nos expériences a été réalisée sur le muscle dit rapide *Tibialis Anterior*, questionnant les effets de la fluoxétine sur les muscles squelettiques lents comme le Soleus et leurs CSMu. Enfin, l'étude *in vitro* sur des myoblastes immortalisés limite la généralisation des effets directs de la sérotonine ou de la fluoxétine sur les cellules souches musculaires, pour qui la culture sans sérum est, à ce jour, compromise.

D. Perspectives

1. La fluoxétine, un traitement efficace de myopathies ?

L'action combinée de la fluoxétine sur la myogenèse, l'angiogenèse et l'inflammation, favorisant une régénération musculaire harmonieuse dans un modèle de blessure aiguë, en fait une stratégie thérapeutique valable pour les maladies musculaires endogènes comme les myopathies génétiques, inflammatoires ou encore dans les conditions de sarcopénie liée à l'âge. Cliniquement, la blessure musculaire, toutes causes confondues, est une des premières causes de douleurs chroniques et d'incapacité physique, faisant de cette condition médicale un enjeu socio-économique et de santé publique ⁵⁶⁵.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique liée au chromosome X, affectant 1 garçon sur 3500 dans le monde et qui se caractérise par une dégénérescence neuromusculaire progressive ⁵⁶⁶. Cette maladie incurable est causée par des mutations du gène DMD entraînant l'absence d'expression correcte de la dystrophine, protéine au rôle clé dans la liaison entre le cytosquelette des fibres musculaires et la matrice extracellulaire ⁵⁶⁷. Son absence conduit à des myofibres instables et endommagées entraînant des cycles de régénération inefficace et de nécrose associés à une inflammation, les tissus musculaires étant progressivement remplacés par de la fibrose et du tissu adipeux, conduisant à une incapacité fonctionnelle majeure ⁵⁶⁸. A l'aide de différents modèles animaux, il a pu être précisé que l'absence de dystrophine impactait, d'une part, le comportement des CSMu, marqué par une capacité proliférative diminuée et un mode de division cellulaire altérée, et d'autre part, des anomalies vasculaires avec une perte de capacité angiogénique des cellules endothéliales ^{484,569}. De ce fait, la DMD peut aussi être considérée comme une maladie

affectant les cellules souches musculaires et les vaisseaux. Fait intéressant, plusieurs études ont déjà mis en évidence des effets positifs d'antidépresseurs dans différents modèles animaux de DMD, comprenant une diminution des niveaux de dégénérescence musculaire, d'infiltrats de cellules immunes, de niveaux de cytokines pro-inflammatoires, associées à une amélioration fonctionnelle de la force musculaire⁵⁷⁰⁻⁵⁷³.

Par ailleurs, de récents résultats suggérant une modification du système 5-HT dans le muscle de souris avec sarcopénie liée à l'âge ouvrent également des perspectives d'exploration de traitement par ISRS dans cette condition⁴⁹⁴. Cependant, à l'instar des effets de la fluoxétine diminués avec l'âge sur la neurogenèse hippocampique³¹⁴, ses effets sur le muscle pourraient également être atténués ou inexistantes.

Ainsi, la fluoxétine est une piste thérapeutique prometteuse nécessitant des investigations précliniques et cliniques extensives dans les pathologies musculaires. Bien qu'elle ne puisse pas avoir pour vertu d'être un traitement curatif de DMD, la fluoxétine pourrait être une vraie stratégie d'amélioration fonctionnelle et du phénotype musculaire, permettant un ralentissement de l'évolution de la maladie en préservant la fonctionnalité des muscles respiratoires ou cardiaques et une meilleure qualité de vie, résultant en une survie augmentée.

2. Place des ISRS dans la médecine régénérative

La médecine régénérative est un vaste domaine de recherche translationnelle, incluant en particulier des molécules activatrices qui peuvent influencer favorablement les processus d'autoréparation tissulaire. Loin de ses effets comportementaux antidépresseurs, nous avons montré de nouvelles actions bénéfiques de la fluoxétine sur la régénération musculaire. Il est intéressant de noter que le traitement par plasma riche en plaquettes, et donc riche en sérotonine, a également montré des effets favorisant la réparation de blessures musculaires aiguës et chroniques^{565,574}. A la différence des difficultés de standardisation et de reproductibilité de la thérapie par plasma riche en plaquettes ou comparé aux risques liés aux approches traditionnelles de transplantation d'organe ou thérapie cellulaire, la stratégie thérapeutique par fluoxétine peut s'appuyer sur nombreux avantages en termes de sécurité d'emploi et de tolérance, offrant de nouvelles perspectives dans la régénération ou réparation tissulaire.

Une approche complémentaire des bénéfices de la fluoxétine à explorer dans le champ de la médecine régénérative concerne la transplantation d'organes ou de cellules souches tant sur le renforcement potentiel de l'amplification *in vitro* de cellules souches collectées que dans le traitement du receveur afin de favoriser la prise de greffe. Cette stratégie a déjà été évoquée en hématologie après la mise en évidence d'une diminution de la réponse de rejet lié à la greffe dans des modèles animaux de transplantations de moelle osseuse⁵⁷⁵.

Outre le SNC, la moelle osseuse et dorénavant le muscle squelettique, de nombreux tissus ont d'ores et déjà montré une sensibilité à la sérotonine au cours de leur réparation, justifiant l'exploration d'éventuels bénéfices d'un traitement par fluoxétine^{356,424,436,438,439}. De plus, afin d'identifier de nouvelles cibles tissulaires pouvant bénéficier des effets d'ISRS au cours de leur réparation, plusieurs paramètres sont à prendre en considération tels que la sensibilité aux effets trophiques de 5-HT du tissu ciblé, ainsi que les mécanismes de régulation du métabolisme de 5-HT et notamment de synthèse qu'il possède, le type d'acteur cellulaire à cibler, avec une attention particulière sur l'accessibilité et le degré de renouvellement en cas de cellules souches.

Dans cette perspective, il existe un réel enjeu d'optimisation de l'utilisation de ce traitement tant sur la question d'association à d'autres facteurs de croissance qui a déjà montré une efficacité synergique en sortie d'aplasie médullaire ⁴³⁶, qu'à la stimulation simultanée avec d'autres monoamines comme le nécessite la réparation dentaire avec la sérotonine et la dopamine ⁴³⁸. De plus, l'optimisation de la modulation positive ou négative du signal 5-HT, dans le temps, par les ISRS, peut permettre de cibler les effets bénéfiques de ces molécules et d'en minimiser les effets délétères et également d'adapter le type de signal 5-HT requis par l'organe. Ainsi, à la différence du SNC ou du muscle, nous pouvons faire l'hypothèse qu'une régénération tissulaire comme celle du foie, dépendante de la sérotonine périphérique et sans capacité de synthèse locale ⁴³⁹, pourrait bénéficier d'un traitement subaigu par fluoxétine visant une majoration du signal 5-HT systémique plutôt qu'une stimulation chronique par ISRS s'associant à une déplétion de ce signal. Enfin, à l'instar du développement de la vortioxétine qui s'est basé sur les avancées neuroscientifiques ayant identifié le rôle de chaque récepteur 5-HT dans la modulation des effets antidépresseurs ⁵⁷⁶, le développement d'une molécule combinant l'ensemble des mécanismes d'action lié au système 5-HT favorable à la régénération tissulaire ouvre des perspectives thérapeutiques prometteuses.

Références

1. Lopez-Munoz, F. & Alamo, C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1563–1586 (2009).
2. Selikoff, I. J., Robitzek, E. H. & Ornstein, G. G. Treatment of pulmonary tuberculosis with hydrazide derivatives of isonicotinic acid. *J. Am. Med. Assoc.* **150**, 973–980 (1952).
3. Loomer, H. P., Saunders, J. C. & Kline, N. S. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatr. Res. Rep. Am. Psychiatr. Assoc.* **8**, 129–141 (1957).
4. Udenfriend, S., Weissbach, H. & Bogdanski, D. F. Effect of iproniazid on serotonin metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **120**, 255–260 (1957).
5. Cahn, C. Roland Kuhn, 1912–2005. *Neuropsychopharmacology* **31**, 1096–1096 (2006).
6. Kuhn, R. Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355). *Schweiz. Med. Wochenschr.* **87**, 1135–1140 (1957).
7. Carlsson, A., Fuxe, K. & Ungerstedt, U. The effect of imipramine of central 5-hydroxytryptamine neurons. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* vol. 20 150–151 (1968).
8. Wong, D. T., Perry, K. W. & Bymaster, F. P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 764–774 (2005).
9. Åsberg, M., Bertilsson, L., Tuck, D., Cronholm, B. & Siöqvist, F. Indoleamine metabolites in the cerebrospinal fluid of depressed patients before and during treatment with nortriptyline. *Clin. Pharmacol. Ther.* **14**, 277–286 (1973).
10. Wong, D. T., Horng, J. S., Bymaster, F. P., Hauser, K. L. & Molloy, B. B. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-Trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.* **15**, 471–479 (1974).
11. Montgomery, S. A. The efficacy of fluoxetine as an antidepressant in the short and long term. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **4 Suppl 1**, 113–119 (1989).
12. Stahl. Stahl Online: essential Psychopharmacology, 4th edition. https://sthalonline.cambridge.org/prescribers_guide.jsf.
13. Preskorn, M. S. *Handbook of Experimental Pharmacology 250 Antidepressants From Biogenic Amines to New Mechanisms of Action*.
14. Hiemke, C. & Härtter, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 85 11–28 (2000).
15. Meyer, J. H. *et al.* Serotonin Transporter Occupancy of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors at Different Doses: An [¹¹C]DASB Positron Emission Tomography Study. *Am. J. Psychiatry* **161**, 826–835 (2004).
16. Horowitz, M. A. & Taylor, D. Tapering of SSRI treatment to mitigate withdrawal symptoms. *The Lancet Psychiatry* vol. 6 538–546 (2019).
17. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Paroxetine. 10/03/2014 <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0237104.htm>.
18. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Escitalopram. 21/07/2015 <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0261965.htm>.
19. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Citalopram. 07/06/2012 <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0214745.htm>.
20. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Fluoxetine. 27/03/2014 <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0240456.htm>.

21. CHMP. RESUME DES CARACTERISTIQUES DU PRODUIT Vortioxetine.
22. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Fluvoxamine. 18/09/2013 <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0228404.htm>.
23. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Sertraline. 21/07/2015 27/03/2014 <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0261965.htm>.
24. Daniel, W. A. & Wójcikowski, J. Interactions between promazine and antidepressants at the level of cellular distribution. *Pharmacol. Toxicol.* **81**, 259–264 (1997).
25. Karson, C. N. *et al.* Human brain fluoxetine concentrations. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **5**, 322–329 (1993).
26. Bauer, M. *et al.* World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 1: Update 2013 on the acute and continuation treatment of unipolar depressive disorders. *World J. Biol. Psychiatry* **14**, 334–385 (2013).
27. Kennedy, S. H. *et al.* Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 clinical guidelines for the management of adults with major depressive disorder: Section 3. Pharmacological Treatments. *Canadian Journal of Psychiatry* vol. 61 540–560 (2016).
28. Georgotas, A., Mann, J., Bush, D. & Gershon, S. A clinical trial of zimelidine in depression. *Commun. Psychopharmacol.* **4**, 71–77 (1980).
29. Cipriani, A. *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* **391**, 1357–1366 (2018).
30. Thase, M. E., Entsuah, A. R. & Rudolph, R. L. Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. *Br. J. Psychiatry* **178**, 234–241 (2001).
31. Stahl, S. M. *Placebo-Controlled Comparison of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Citalopram and Sertraline**. (2000).
32. Cipriani, A. *et al.* 12 Antidepressiva der neuen Generation im Vergleich bei Major Depression - Eine neue Meta-Analyse. *Lancet* **373**, 746–758 (2009).
33. Jakobsen, J. C. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors versus placebo in patients with major depressive disorder. A systematic review with meta-analysis and Trial Sequential Analysis. *BMC Psychiatry* **17**, (2017).
34. Trivedi, M. H. *et al.* Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: Implications for clinical practice. *Am. J. Psychiatry* **163**, 28–40 (2006).
35. Rush, A. J. *et al.* Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR*D report. *Am. J. Psychiatry* **163**, 1905–1917 (2006).
36. Nierenberg, A. A. *et al.* Timing of onset of antidepressant response with fluoxetine treatment. *Am. J. Psychiatry* **157**, 1423–1428 (2000).
37. Taylor, M. J., Freemantle, N., Geddes, J. R. & Bhagwagar, Z. Early onset of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant action: Systematic review and meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* **63**, 1217–1223 (2006).
38. Brambilla, P., Cipriani, A., Hotopf, M. & Barbui, C. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: A meta-analysis of clinical trial data. *Pharmacopsychiatry* **38**, 69–77 (2005).
39. Furukawa, T. A. *et al.* Optimal dose of selective serotonin reuptake inhibitors,

- venlafaxine, and mirtazapine in major depression: a systematic review and dose-response meta-analysis. *The Lancet Psychiatry* **6**, 601–609 (2019).
40. Preskorn, S. H. The use of biomarkers in psychiatric research: How serotonin transporter occupancy explains the dose-response curves of SSRIs. *J. Psychiatr. Pract.* **18**, 38–45 (2012).
 41. Olekhovitch, R. *et al.* Using filled prescription sequences to rank antidepressants according to their acceptability in the general population: The Constances cohort. *J. Psychiatr. Res.* **123**, 72–80 (2020).
 42. Luo, Y., Kataoka, Y., Ostinelli, E. G., Cipriani, A. & Furukawa, T. A. National Prescription Patterns of Antidepressants in the Treatment of Adults With Major Depression in the US Between 1996 and 2015: A Population Representative Survey Based Analysis. *Front. Psychiatry* **11**, (2020).
 43. Whitaker-Azmitia, P. M. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* **21**, 2S-8S (1999).
 44. Vialli, M. & Erspamer, V. Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini - Nota VII Osservazioni critiche su alcuni problemi inerenti alla istochimica delle enterocromaffini. *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* **27**, 81–99 (1937).
 45. Rapport, M. M., Green, A. A. & Page, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **176**, 1243–1251 (1948).
 46. Rapport, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.* **180**, 961–969 (1949).
 47. Erspamer, V. & Asero, B. Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. *Nature* **169**, 800–801 (1952).
 48. Twarog, B. M. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J. Cell. Comp. Physiol.* **44**, 141–163 (1954).
 49. Twarog, B. M. & Page, I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* **175**, 157–161 (1953).
 50. Ban, T. A. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin. Neurosci.* **8**, 335–344 (2006).
 51. Woolley, D. W. & Shaw, E. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **40**, 228–231 (1954).
 52. Ichikawa, M. *et al.* Expression analysis of genes responsible for serotonin signaling in the brain. *Neurobiol. Dis.* **19**, 378–385 (2005).
 53. Hardeland, R. *Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. Reproduction Nutrition Development. EDP Sciences* vol. 39 (1999).
 54. Clark, C. T., Weissbach, H. & Udenfriend, S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *J. Biol. Chem.* **210**, 139–148 (1954).
 55. Best, J., Nijhout, H. F. & Reed, M. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: A mathematical model. *Theor. Biol. Med. Model.* **7**, 34 (2010).
 56. Tyce, G. M. Origin and metabolism of serotonin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16 Suppl 3**, S1-7 (1990).
 57. Savitz, J. The kynurenine pathway: a finger in every pie. *Molecular Psychiatry* vol. 25 131–147 (2020).
 58. Stone, T. W. & Darlington, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 1 609–620 (2002).
 59. Walther, D. J. *et al.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science (80-.)*. **299**, 76 (2003).

60. Patel, P. D., Pontrello, C. & Burke, S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry* **55**, 428–433 (2004).
61. Cote, F. *et al.* Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13525–13530 (2003).
62. Scheuch, K. *et al.* Characterization of a Functional Promoter Polymorphism of the Human Tryptophan Hydroxylase 2 Gene in Serotonergic Raphe Neurons. *Biol. Psychiatry* **62**, 1288–1294 (2007).
63. Winge, I., McKinney, J. A., Knappskog, P. M. & Haavik, J. Characterization of wild-type and mutant forms of human tryptophan hydroxylase 2. *J. Neurochem.* **100**, 1648–1657 (2007).
64. Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain synthesis. *Science (80-.)*. **305**, 217 (2004).
65. Azmitia, E. C., Liao, B. & Chen, Y. S. Increase of tryptophan hydroxylase enzyme protein by dexamethasone in adrenalectomized rat midbrain. *J. Neurosci.* **13**, 5041–5055 (1993).
66. Pecins-Thompson, M., Brown, N. A., Kohama, S. G. & Bethea, C. L. Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques. *J. Neurosci.* **16**, 7021–7029 (1996).
67. Matsuda, M. *et al.* Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell* **6**, 193–203 (2004).
68. Wang, H. *et al.* CD4+ T cell-mediated immunological control of enterochromaffin cell hyperplasia and 5-hydroxytryptamine production in enteric infection. *Gut* **56**, 949–957 (2007).
69. McKinney, J., Knappskog, P. M. & Haavik, J. Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.* **92**, 311–320 (2005).
70. Ehret, M., Pevet, P. & Maitre, M. Tryptophan Hydroxylase Synthesis Is Induced by 3', 5'-Cyclic Adenosine Monophosphate During Circadian Rhythm in the Rat Pineal Gland. *J. Neurochem.* **57**, 1516–1521 (1991).
71. Yaffe, D., Forrest, L. R. & Schuldiner, S. The ins and outs of vesicular monoamine transporters. *J. Gen. Physiol.* **150**, 671–682 (2018).
72. Sharp, T., Bramwell, S. R. & Grahame-Smith, D. G. Release of endogenous 5-hydroxytryptamine in rat ventral hippocampus evoked by electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus as detected by microdialysis: Sensitivity to tetrodotoxin, calcium and calcium antagonists. *Neuroscience* **39**, 629–637 (1990).
73. Rudnick, G. & Wall, S. C. p-Chloroamphetamine Induces Serotonin Release through Serotonin Transporters. *Biochemistry* **31**, 6710–6718 (1992).
74. Homberg, J. R. *et al.* Characterization of the serotonin transporter knockout rat: A selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience* **146**, 1662–1676 (2007).
75. Daws, L. C. Unfaithful neurotransmitter transporters: Focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 121 89–99 (2009).
76. Baudry, A. *et al.* Multifaceted regulations of the serotonin transporter: Impact on antidepressant response. *Frontiers in Neuroscience* vol. 13 (Frontiers Media S.A., 2019).
77. Lesch, K. P. *et al.* Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science (80-.)*. **274**, 1527–1531 (1996).

78. Ragu Varman, D., Jayanthi, L. D. & Ramamoorthy, S. Glycogen synthase kinase-3 β supports serotonin transporter function and trafficking in a phosphorylation-dependent manner. *J. Neurochem.* **156**, 445–464 (2021).
79. Launay, J., Schneider, B., Loric, S., Prada, M. Da & Kellermann, O. Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT 2B receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J.* **20**, 1843–1854 (2006).
80. Montañez, S., Munn, J. L., Owens, W. A., Horton, R. E. & Daws, L. C. 5-HT1B receptor modulation of the serotonin transporter in vivo: Studies using KO mice. *Neurochem. Int.* **73**, 127–131 (2014).
81. Sandler, M., Reveley, M. A. & Glover, V. Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review. *Journal of Clinical Pathology* vol. 34 292–302 (1981).
82. Wang, C. C., Billett, E., Borchert, A., Kuhn, H. & Ufer, C. Monoamine oxidases in development. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 70 599–630 (2013).
83. Jonnakuty, C. & Gragnoli, C. What do we know about serotonin? *J. Cell. Physiol.* **217**, 301–306 (2008).
84. Fouquet, G., Coman, T., Hermine, O. & Côté, F. Serotonin, hematopoiesis and stem cells. *Pharmacol. Res.* (2018) doi:10.1016/j.phrs.2018.08.005.
85. Saura, J., Kettler, R., Da Prada, M. & Richards, J. G. Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19- 6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *J. Neurosci.* **12**, 1977 LP – 1999 (1992).
86. Manoli, I. *et al.* Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. *FASEB J.* **19**, 1359–1361 (2005).
87. Wu, J. B., Chen, K., Ou, X. M. & Shih, J. C. Retinoic acid activates monoamine oxidase B promoter in human neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 16723–16735 (2009).
88. Shih, C. J., Wu, J. B. & Chen, K. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes. in *Journal of Neural Transmission* vol. 118 979–986 (2011).
89. Chaitidis, P. *et al.* Th2 Response of Human Peripheral Monocytes Involves Isoform-Specific Induction of Monoamine Oxidase-A. *J. Immunol.* **173**, 4821–4827 (2004).
90. Chaitidis, P., Billett, E., Kuban, R. J., Ungethuen, U. & Kuhn, H. Expression regulation of MAO isoforms in monocytic cells in response to Th2 cytokines. *Med. Sci. Monit.* **11**, BR259-65 (2005).
91. Kwon, S. H., Pimentel, D. R., Remondino, A., Sawyer, D. B. & Colucci, W. S. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 615–21 (2003).
92. Kandel, E. R. *The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* vol. 92 <http://science.sciencemag.org/> (1995).
93. Millan, M. J. MicroRNA in the regulation and expression of serotonergic transmission in the brain and other tissues. *Curr. Opin. Pharmacol.* **11**, 11–22 (2011).
94. Rasbach, K. A. *et al.* 5-Hydroxytryptamine Receptor Stimulation of Mitochondrial Biogenesis. **332**, 632–639 (2010).
95. GADDUM, J. H. & PICARELLI, Z. P. Two kinds of tryptamine receptor. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **12**, 323–328 (1957).
96. Raymond, J. R. *et al.* Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 92 179–212 (2001).
97. Barnes, N. M. *et al.* International union of basic and clinical pharmacology. Cx. Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine; pharmacology and function.

- Pharmacol. Rev.* **73**, 310–520 (2021).
98. Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533–554 (2002).
 99. Manivet, P. *et al.* The serotonin binding site of human and murine 5-HT 2B receptors. Molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 17170–17178 (2002).
 100. Watts, S. W. & Davis, R. P. 5-Hydroxytryptamine Receptors in Systemic Hypertension: An Arterial Focus. *Cardiovascular Therapeutics* vol. 29 54–67 (2011).
 101. Armstrong, J. F. *et al.* The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2020: Extending immunopharmacology content and introducing the IUPHAR/MMV Guide to MALARIA PHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res.* **48**, D1006–D1021 (2020).
 102. Drake, M. T., Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation Research* vol. 99 570–582 (2006).
 103. Marin, P., Becamel, C., Dumuis, A. & Bockaert, J. 5-HT Receptor-Associated Protein Networks: New Targets for Drug Discovery in Psychiatric Disorders? *Curr. Drug Targets* **13**, 28–52 (2012).
 104. Schmid, C. L., Raehal, K. M. & Bohn, L. M. Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on β -arrestin-2 interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1079–1084 (2008).
 105. Maroteaux, L., Béchade, C. & Roumier, A. Dimers of serotonin receptors: Impact on ligand affinity and signaling. *Biochimie* vol. 161 23–33 (2019).
 106. Tournois, C., Mutel, V., Manivet, P., Launay, J. M. & Kellermann, O. Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **273**, 17498–17503 (1998).
 107. Janoshazi, A. *et al.* Modified Receptor Internalization upon Coexpression of 5-HT1B Receptor and 5-HT2B Receptors. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1463–1474 (2007).
 108. Cattaneo, F. *et al.* Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 15 19700–19728 (2014).
 109. Peng, L. *et al.* Astrocytic transactivation by α 2A-adrenergic and 5-HT2B serotonergic signaling. *Neurochem. Int.* **57**, 421–431 (2010).
 110. Kruk, J. S., Vasefi, M. S., Heikkila, J. J. & Beazely, M. A. Reactive Oxygen Species Are Required for 5-HT-Induced Transactivation of Neuronal Platelet-Derived Growth Factor and TrkB Receptors, but Not for ERK1/2 Activation. *PLoS One* **8**, (2013).
 111. Tsuchioka, M., Takebayashi, M., Hisaoka, K., Maeda, N. & Nakata, Y. Serotonin (5-HT) induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells. *J. Neurochem.* **106**, 244–257 (2008).
 112. Li, Q. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mediates 5-HT-induced insulin resistance through activation of EGF receptor-ERK1/2-mTOR pathway. *Endocrinology* **153**, 56–68 (2012).
 113. Liu, Y., Li, M., Warburton, R. R., Hill, N. S. & Fanburg, B. L. The 5-HT transporter transactivates the PDGF β receptor in pulmonary artery smooth muscle cells. *FASEB J.* **21**, 2725–2734 (2007).
 114. Azouzi, S. *et al.* Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. *Biophys. J.* **112**, 1863–1873 (2017).
 115. Amireault, P. *et al.* Serotonin is a key factor for mouse red blood cell survival. *PLoS One* **8**, 8–13 (2013).

116. Fitzgerald, J. C., Ufer, C., De Girolamo, L. A., Kuhn, H. & Billett, E. E. Monoamine oxidase-A modulates apoptotic cell death induced by staurosporine in human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **103**, 2189–2199 (2007).
117. Trouche, E. *et al.* Characterization of monoamine oxidases in mesenchymal stem cells: Role in hydrogen peroxide generation and serotonin-dependent apoptosis. *Stem Cells Dev.* **19**, 1571–1578 (2010).
118. Bader, M. Serotonylation: Serotonin Signaling and Epigenetics. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 288 (2019).
119. Da Prada, M., Pletscher, A., Tranzer, J. P. & Knuchel, H. Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine and histamine in blood platelets [15]. *Nature* vol. 216 1315–1317 (1967).
120. Murphy, D. L. *et al.* How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* **55**, 932–960 (2008).
121. Murphy, D. L. & Lesch, K. P. Targeting the murine serotonin transporter: Insights into human neurobiology. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9 85–96 (2008).
122. Wolf, K. *et al.* Partially defective store operated calcium entry and hem(ITAM) signaling in platelets of serotonin transporter deficient mice. *PLoS One* **11**, e0147664 (2016).
123. Mammadova-Bach, E., Mauler, M., Braun, A. & Duerschmied, D. Immuno-Thrombotic Effects of Platelet Serotonin. *Serotonin - A Chem. Messenger Between All Types Living Cells* (2017) doi:10.5772/intechopen.69349.
124. Matondo, R. B. *et al.* Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **296**, G963–G968 (2009).
125. Kim, D. K. *et al.* Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology* **49**, 798–810 (2005).
126. Dahlström, A. & Fuxe, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398–399 (1964).
127. Artigas, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 137 119–131 (2013).
128. Rosenzweig, M., Breedlove, S., Inc., N. W.-, MA, S. & 2005, undefined. Biological psychology: an introduction to behavioral and cognitive neuroscience, Sinauer associate.
129. Gutknecht, L. *et al.* Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J. Neural Transm.* **115**, 1127–1132 (2008).
130. Cote, F. *et al.* Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 329–334 (2007).
131. Savelieva, K. V. *et al.* Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One* **3**, (2008).
132. Renson, J., Weissbach, H. & Udenfriend, S. Hydroxylation of tryptophan by phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **237**, 2261–2264 (1962).
133. Cécile Fligny. Invalidation du gène TPH1 chez la souris : rôle de la sérotonine circulante et implication de la sérotonine maternelle dans la fonction cardiaque. *Physiol. [q-bio.TO]. Univ. Pierre Marie Curie - Paris VI, 2007. Fr. <tel-00184157>* (2007).

134. Amireault, P., Sibon, D. & Coïté, F. Life without peripheral serotonin: Insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 64–71 (2013).
135. Bonnin, A. *et al.* A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* **472**, 347–350 (2011).
136. Paulmann, N. *et al.* Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic β -Cells by Protein Serotonylation. *PLoS Biol.* **7**, e1000229 (2009).
137. Kim, H. *et al.* Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* **16**, 804–808 (2010).
138. Chabbi-Achengli, Y. *et al.* Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2567–2572 (2012).
139. Stunes, A. K. *et al.* Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes, Obes. Metab.* **13**, 551–558 (2011).
140. Ni, W. *et al.* The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 663–674 (2008).
141. Eddahibi, S. *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: Critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* **113**, 1857–1864 (2006).
142. Amireault, P. *et al.* Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13141–13146 (2011).
143. Herr, N., Bode, C. & Duerschmied, D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* vol. 4 48 (2017).
144. David, D. J. & Gardier, A. M. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique : application à la réponse antidépressive. *Encephale.* **42**, 255–263 (2016).
145. Watts, S. W., Morrison, S. F., Davis, R. P. & Barman, S. M. Serotonin and Blood Pressure Regulation. *Pharmacol. Rev.* **64**, 359–388 (2012).
146. Gershon, M. D. & Tack, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology* **132**, 397–414 (2007).
147. Bertrand, P. P. & Bertrand, R. L. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **153**, 47–57 (2010).
148. Li, Z. *et al.* Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **31**, 8998–9009 (2011).
149. Berger, M., Gray, J. A. & Roth, B. L. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* vol. 60 355–366 (2009).
150. Mammadova-Bach, E., Mauler, M., Braun, A. & Duerschmied, D. Autocrine and paracrine regulatory functions of platelet serotonin. *Platelets* vol. 29 541–548 (2018).
151. Martin, A. M. *et al.* The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinology* vol. 158 1049–1063 (2017).
152. Pai, V. P. & Horseman, N. D. Biphasic regulation of mammary epithelial resistance by serotonin through activation of multiple pathways. *J. Biol. Chem.* **283**, 30901–30910 (2008).
153. Marshall, A. M. *et al.* Serotonin transport and metabolism in the mammary gland modulates secretory activation and involution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 837–846 (2010).
154. Yadav, V. K. *et al.* Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the

- duodenum: an entero-bone endocrine axis. *Cell* **135**, 825–837 (2009).
155. Yadav, V. K. *et al.* A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell* **138**, 976–989 (2009).
 156. Dürk, T. *et al.* Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 476–485 (2013).
 157. Oh, C. M. *et al.* Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat. Commun.* **6**, 1–12 (2015).
 158. Sumara, G., Sumara, O., Kim, J. K. & Karsenty, G. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metab.* **16**, 588–600 (2012).
 159. Cai, M. *et al.* IFN- γ inhibits 5-HT-induced melanin biosynthesis via downregulation of 5-HT receptors in vivo/in vitro. *J. Pharmacol. Sci.* **141**, 1–8 (2019).
 160. Berglund, E. D. *et al.* Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **123**, 5061–5070 (2013).
 161. Yabut, J. M. *et al.* Genetic deletion of mast cell serotonin synthesis prevents the development of obesity and insulin resistance. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
 162. Crane, J. D. *et al.* Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.* **21**, 166–172 (2015).
 163. Kaeser, P. S. & Regehr, W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annual Review of Physiology* vol. 76 333–363 (2014).
 164. Torres, G. E., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. Plasma membrane monoamine transporters: Structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 13–25 (2003).
 165. Ramamoorthy, S. & Blakely, R. D. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science (80-.)*. **285**, 763–766 (1999).
 166. Knobelmann, D. A., Kung, H. F. & Lucki, I. Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 1111–1117 (2000).
 167. Larsson, L. G., Stenfors, C. & Ross, S. B. Differential regional antagonism of 8-OH-DPAT-induced decrease in serotonin synthesis by two 5-HT(1A) receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **346**, 209–215 (1998).
 168. Hjorth, S., Suchowski, C. S. & Galloway, M. P. Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. *Synapse* **19**, 170–176 (1995).
 169. Montalbano, A., Corradetti, R. & Mlinar, B. Pharmacological Characterization of 5-HT1A Autoreceptor-Coupled GIRK Channels in Rat Dorsal Raphe 5-HT Neurons. *PLoS One* **10**, e0140369 (2015).
 170. Celada, P., Puig, M. V., Casanovas, J. M., Guillazo, G. & Artigas, F. Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABA A, and Glutamate Receptors. *Soc Neuroscience* <https://www.jneurosci.org/content/21/24/9917.short> (2001).
 171. Hjorth, S. & Magnusson, T. The 5-HT1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **338**, 463–471 (1988).
 172. Trillat, A. C. *et al.* Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral

- hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT(1B) receptors: In vivo microdialysis studies. *J. Neurochem.* **69**, 2019–2025 (1997).
173. Riad, M. *et al.* Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* **417**, 181–194 (2000).
 174. Hagan, C. E., Mcdevitt, R. A., Liu, Y., Furay, A. R. & Neumaier, J. F. 5-HT1B autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. *Synapse* **66**, 1024–1034 (2012).
 175. Skelin, I., Kovačević, T., Sato, H. & Diksic, M. The opposite effect of a 5-HT1B receptor agonist on 5-HT synthesis, as well as its resistant counterpart, in an animal model of depression. *Brain Res. Bull.* **88**, 477–486 (2012).
 176. Hen, R. & Nautiyal, K. M. Serotonin receptors in depression: From A to B. *F1000Research* vol. 6 123 (2017).
 177. Doly, S. *et al.* Serotonin 5-HT2B Receptors Are Required for 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Hyperlocomotion and 5-HT Release In Vivo and In Vitro. *J. Neurosci.* **28**, 2933–2940 (2008).
 178. Launay, J. M. *et al.* Serotonin 5-HT 2B receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension. *Blood* **119**, 1772–1780 (2012).
 179. Pullar, I. A. *et al.* The role of the 5-HT1D receptor as a presynaptic autoreceptor in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* **493**, 85–93 (2004).
 180. Mnie-Filali, O. *et al.* Pharmacological blockade of 5-HT 7 receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1275–1288 (2011).
 181. Naumenko, V. S., Popova, N. K., Lacivita, E., Leopoldo, M. & Ponimaskin, E. G. Interplay between serotonin 5-HT1A and 5-HT7 receptors in depressive disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics* vol. 20 582–590 (2014).
 182. Renner, U. *et al.* Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J. Cell Sci.* **125**, 2486–2499 (2012).
 183. Beyeler, A. *et al.* Multiple facets of serotonergic modulation. in *Progress in Brain Research* vol. 261 (Elsevier B.V., 2021).
 184. Artigas, F., Bortolozzi, A. & Celada, P. Can we increase speed and efficacy of antidepressant treatments? Part I: General aspects and monoamine-based strategies. *European Neuropsychopharmacology* vol. 28 445–456 (2018).
 185. Blier, P., Montigny, C. De & de Montigny, C. *Current advances and trends in the treatment of depression. Trends in Pharmacological Sciences* vol. 15 220–226 (Elsevier Current Trends, 1994).
 186. Chaput, Y., de Montigny, C. & Blier, P. Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **333**, 342–348 (1986).
 187. Hervás, I. & Artigas, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **358**, 9–18 (1998).
 188. Invernizzi, R., Bramante, M. & Samanin, R. Role of 5-HT1A receptors in the effects of acute and chronic fluoxetine on extracellular serotonin in the frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**, 143–147 (1996).
 189. Spies, M., Knudsen, G. M., Lanzenberger, R. & Kasper, S. The serotonin transporter in psychiatric disorders: Insights from PET imaging. *The Lancet Psychiatry* vol. 2 743–755 (2015).

190. Romero, L., Hervás, I. & Artigas, F. The 5-HT_{1A} antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in rat brain. *Neurosci. Lett.* **219**, 123–126 (1996).
191. Rutter, J. J., Gundlach, C. & Auerbach, S. B. Systemic uptake inhibition decreases serotonin release via somatodendritic autoreceptor activation. *Synapse* **20**, 225–233 (1995).
192. Knobelmann, D. A., Hen, R. & Lucki, I. Genetic regulation of extracellular serotonin by 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} autoreceptors in different brain regions of the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 1083–1091 (2001).
193. Bortolozzi, A., Amargós-Bosch, M., Toth, M., Artigas, F. & Adell, A. In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* **88**, 1373–1379 (2004).
194. Descarries, L. & Riad, M. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**, 2416–2425 (2012).
195. Riad, M. *et al.* Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J. Neurosci.* **24**, 5420–5426 (2004).
196. Riad, M., Watkins, K. C., Doucet, E., Hamon, M. & Descarries, L. Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J. Neurosci.* **21**, 8378–8386 (2001).
197. Gobert, A., Rivet, J. M., Cistarelli, L. & Millan, M. J. Potentiation of the fluoxetine-induced increase in dialysate levels of serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely moving rats by combined blockade of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors with WAY 100,635 and GR 127,935. *J. Neurochem.* **68**, 1159–1163 (1997).
198. Gardier, A. M. *et al.* 5-HT_{1B} receptors mediate the antidepressant effects of selective-serotonin reuptake inhibitors. *Comptes Rendus l'Academie des Sci. - Ser. III* **324**, 433–441 (2001).
199. Sari, Y. Serotonin 1B receptors: From protein to physiological function and behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 28 565–582 (2004).
200. Nautiyal, K. M. *et al.* A lack of serotonin 1B autoreceptors results in decreased anxiety and depression-related behaviors. *Neuropsychopharmacology* **41**, 2941–2950 (2016).
201. Guilloux, J. P. *et al.* Characterization of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice: An animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology* **61**, 478–488 (2011).
202. Stenfors, C., Yu, H. & Ross, S. B. Pharmacological characterisation of the decrease in 5-HT synthesis in the mouse brain evoked by the selective serotonin re-uptake inhibitor citalopram. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **363**, 222–232 (2001).
203. Barton, C. L. & Hutson, P. H. Inhibition of hippocampal 5-HT synthesis by fluoxetine and paroxetine: Evidence for the involvement of both 5-HT(1A) and 5-HT(1B/D) autoreceptors. *Synapse* **31**, 13–19 (1999).
204. Czachura, J. F. & Rasmussen, K. Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **362**, 266–275 (2000).
205. El Mansari, M., Sánchez, C., Chouvet, G., Renaud, B. & Haddjeri, N. Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: An in vivo electrophysiological study in rat brain.

- Neuropsychopharmacology* **30**, 1269–1277 (2005).
206. Blier, P., Chaput, Y., De Montigny, C., -Schmiedeberg', N. & Pharmacology, A. Long-term 5-HT reuptake blockade, but not monoamine oxidase inhibition, decreases the function of terminal 5-HT autoreceptors: an electrophysiological study in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* vol. 337 (1988).
 207. Fitzgerald, P. J. & Watson, B. O. In vivo electrophysiological recordings of the effects of antidepressant drugs. *Experimental Brain Research* vol. 237 1593–1614 (2019).
 208. Fuller, R. W. Microdialysis studies with 5-HT reuptake inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 14 397 (1993).
 209. Fritze, S., Spanagel, R. & Noori, H. R. Adaptive dynamics of the 5-HT systems following chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *J. Neurochem.* **142**, 747–755 (2017).
 210. Bel, N. & Artigas, F. Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* **15**, 243–245 (1993).
 211. Kreiss, D. S. & Lucki, I. Chronic administration of the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT differentially desensitizes 5-HT(1A) autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* **25**, 107–116 (1997).
 212. Popa, D. *et al.* A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur. J. Pharmacol.* **628**, 83–90 (2010).
 213. Trouvin, J. H., Gardier, A. M., Chanut, E., Pages, N. & Jacquot, C. Time course of brain serotonin metabolism after cessation of long-term fluoxetine treatment in the rat. *Life Sci.* **52**, PL187–PL192 (1993).
 214. Caccia, S., Fracasso, C., Garattini, S., Guiso, G. & Sarati, S. Effects of short- and long-term administration of fluoxetine on the monoamine content of rat brain. *Neuropharmacology* **31**, 343–347 (1992).
 215. Kumar, S. *et al.* Transcriptomic changes following chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors: A review of animal studies. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* vol. 21 26–35 (2019).
 216. MacGillivray, L., Lagrou, L. M., Reynolds, K. B., Rosebush, P. I. & Mazurek, M. F. Role of serotonin transporter inhibition in the regulation of tryptophan hydroxylase in brainstem raphe nuclei: Time course and regional specificity. *Neuroscience* **171**, 407–420 (2010).
 217. Honig, G., Jongsma, M. E., van der Hart, M. C. G. & Tecott, L. H. Chronic citalopram administration causes a sustained suppression of serotonin synthesis in the mouse forebrain. *PLoS One* **4**, (2009).
 218. Holt, A. & Baker, G. Inhibition of rat brain monoamine oxidase enzymes by fluoxetine and norfluoxetine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **354**, (1996).
 219. Piñeyro, G., Blier, P., Dennis, T. & De Montigny, C. Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade. *J. Neurosci.* **14**, 3036–3047 (1994).
 220. Benmansour, S., Owens, W. A., Cecchi, M., Morilak, D. A. & Frazer, A. Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter. *J. Neurosci.* **22**, 6766–6772 (2002).
 221. Hirano, K. *et al.* Effects of continuous administration of paroxetine on ligand binding site and expression of serotonin transporter protein in mouse brain. *Brain Res.* **1053**, 154–161 (2005).

222. Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J. M. & Kellermann, O. MiR-16 targets the serotonin transporter: A new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science (80-.)*. **329**, 1537–1541 (2010).
223. Launay, J. M., Mouillet-Richard, S., Baudry, A., Pietri, M. & Kellermann, O. Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl. Psychiatry* **1**, (2011).
224. Neumaier, J. F., Root, D. C. & Hamblin, M. W. Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT(1B) mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* **15**, 515–522 (1996).
225. Le Poul, E. *et al.* Differential adaptation of brain 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* **39**, 110–122 (2000).
226. Issler, O. *et al.* MicroRNA 135 is essential for chronic stress resiliency, antidepressant efficacy, and intact serotonergic activity. *Neuron* **83**, 344–360 (2014).
227. Babb, J. A., Linnros, S. E. & Commons, K. G. Evidence for intact 5-HT1A receptor-mediated feedback inhibition following sustained antidepressant treatment in a rat model of depression. *Neuropharmacology* **141**, 139–147 (2018).
228. Arborelius, L. *et al.* 5-HT1A receptor antagonists increase the activity of serotonergic cells in the dorsal raphe nucleus in rats treated acutely or chronically with citalopram. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **352**, 157–165 (1995).
229. Hensler, J. G. Differential regulation of 5-HT1A receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant Administration. *Neuropsychopharmacology* **26**, 565–573 (2002).
230. Castro, M. E., Diaz, A., Del Olmo, E. & Pazos, A. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT1A receptors in rat brain. *Neuropharmacology* **44**, 93–101 (2003).
231. Riad, M. *et al.* Unchanged density of 5-HT1A autoreceptors on the plasma membrane of nucleus raphe dorsalis neurons in rats chronically treated with fluoxetine. *Neuroscience* **151**, 692–700 (2008).
232. Richardson-Jones, J. W. *et al.* 5-HT1A Autoreceptor Levels Determine Vulnerability to Stress and Response to Antidepressants. *Neuron* **65**, 40–52 (2010).
233. Davidson, C. & Stamford, J. A. Effect of chronic paroxetine treatment on 5-HT(1B) and 5-HT(1D) autoreceptors in rat dorsal raphe nucleus. *Neurochem. Int.* **36**, 91–96 (2000).
234. Newman, M. E., Shalom, G., Ran, A., Gur, E. & Van De Kar, L. D. Chronic fluoxetine-induced desensitization of 5-HT1A and 5-HT1B autoreceptors: Regional differences and effects of WAY-100635. *Eur. J. Pharmacol.* **486**, 25–30 (2004).
235. Stappenbeck, T. S., Wong, M. H., Saam, J. R., Mysorekar, I. U. & Gordon, J. I. Notes from some crypt watchers: Regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 702–709 (1998).
236. Keating, D. J. & Spencer, N. J. Release of 5-Hydroxytryptamine From the Mucosa Is Not Required for the Generation or Propagation of Colonic Migrating Motor Complexes. *Gastroenterology* **138**, 659-670.e2 (2010).
237. Hoffman, J. M. *et al.* Activation of colonic mucosal 5-HT4 receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology* **142**, 844-854.e4 (2012).
238. Martin, A. M. *et al.* Regional differences in nutrient-induced secretion of gut serotonin. *Physiol. Rep.* **5**, e13199 (2017).

239. Yano, J. M. *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **161**, 264–276 (2015).
240. Israelyan, N. & Margolis, K. G. Serotonin as a link between the gut-brain-microbiome axis in autism spectrum disorders. *Pharmacological Research* vol. 132 1–6 (2018).
241. Kim, Y.-K. & Shin, C. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiological Mechanisms and Novel Treatments. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 559 (2018).
242. Bertrand, P. P., Hu, X., Mach, J. & Bertrand, R. L. Serotonin (5-HT) release and uptake measured by real-time electrochemical techniques in the rat ileum. **295**, G1228–G1236 (2008).
243. Bian, X., Patel, B., Dai, X., Galligan, J. J. & Swain, G. High Mucosal Serotonin Availability in Neonatal Guinea Pig Ileum Is Associated With Low Serotonin Transporter Expression. *Gastroenterology* **132**, 2438–2447 (2007).
244. Patel, B. A., Bian, X., Quaiserová-Mocko, V., Galligan, J. J. & Swain, G. M. In vitro continuous amperometric monitoring of 5-hydroxytryptamine release from enterochromaffin cells of the guinea pig ileum. *Analyst* **132**, 41–47 (2007).
245. Martel, F., Monteiro, R., Lemos, C. & Vieira-Coelho, M. A. In vitro and in vivo effect of fluoxetine on the permeability of 3H-serotonin across rat intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**, 940–950 (2004).
246. Mercado, C. P. & Kilic, F. Molecular mechanisms of sert in platelets: Regulation of plasma serotonin levels. *Molecular Interventions* vol. 10 231–241 (2010).
247. Rendu, F. & Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* vol. 12 261–273 (2001).
248. Walther, D. J. *et al.* Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet α -Granule Release. *Cell* **115**, 851–862 (2003).
249. Serebruany, V. *et al.* Investigations on 5-HT₄ receptor expression and effects of tegaserod on human platelet aggregation in vitro. *Am. J. Ther.* **17**, 543–552 (2010).
250. Ortiz, J., Artigas, F. & Gelpí, E. Serotonergic status in human blood. *Life Sci.* **43**, 983–990 (1988).
251. Brenner, B. *et al.* Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J. Neurochem.* **102**, 206–215 (2007).
252. Callebert, S. J. *et al.* Evidence for a Control of Plasma Serotonin Levels by 5-Hydroxytryptamine 2B Receptors in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 724–731 (2006).
253. Ortiz, J. & Artigas, F. Effects of monoamine uptake inhibitors on extracellular and platelet 5-hydroxytryptamine in rat blood: different effects of clomipramine and fluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 941–6 (1992).
254. Brand, T. & Anderson, G. M. The Measurement of Platelet-Poor Plasma Serotonin:A Systematic Review of Prior Reports and Recommendations for Improved Analysis. *Clin. Chem.* **57**, 1376–1386 (2011).
255. Drouet, L. *et al.* Plasma Serotonin is Elevated in Adult Patients with Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Thromb. Haemost.* (2020) doi:10.1055/s-0040-1713924.
256. Eleftheriou, B. E. & Bailey, D. W. A gene controlling plasma serotonin levels in mice. *J. Endocrinol.* **55**, 225–226 (1972).
257. Li, X. *et al.* Decreased platelet 5-hydroxytryptamin (5-HT) levels: A response to antidepressants. *J. Affect. Disord.* **187**, 84–90 (2015).
258. Anderson, G. M. *et al.* Time course of the effects of the serotonin-selective reuptake inhibitor sertraline on central and peripheral serotonin neurochemistry in the rhesus

- monkey. *Psychopharmacology (Berl)*. **178**, 339–346 (2005).
259. Bianchi, M., Moser, C., Lazzarini, C., Vecchiato, E. & Crespi, F. Forced swimming test and fluoxetine treatment: In vivo evidence that peripheral 5-HT in rat platelet-rich plasma mirrors cerebral extracellular 5-HT levels, whilst 5-HT in isolated platelets mirrors neuronal 5-HT changes. *Exp. Brain Res.* **143**, 191–197 (2002).
260. Kilkens, T. O. C., Honig, A., Fekkes, D. & Brummer, R. J. M. The effects of an acute serotonergic challenge on brain-gut responses in irritable bowel syndrome patients and controls. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**, 865–874 (2005).
261. Kotzailias, N., Marker, M. & Jilma, B. Early effects of paroxetine on serotonin storage, plasma levels, and urinary excretion: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Psychopharmacol.* **24**, 536–539 (2004).
262. Hergovich, N. *et al.* Paroxetine decreases platelet serotonin storage and platelet function in human beings. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 435–442 (2000).
263. Celada, P., Dolera, M., Alvarez, E. & Artigas, F. Effects of acute and chronic treatment with fluvoxamine on extracellular and platelet serotonin in the blood of major depressive patients. Relationship to clinical improvement. *J. Affect. Disord.* **25**, 243–249 (1992).
264. Peters, M. A. M. *et al.* Use of selective serotonin reuptake inhibitors is associated with very low plasma-free serotonin concentrations in humans. *Ann. Clin. Biochem.* **57**, 59–63 (2020).
265. Alvarez, J. *et al.* Decreased platelet serotonin transporter sites and increased platelet inositol triphosphate levels in patients with unipolar depression: Effects of clomipramine and fluoxetine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**, 617–624 (1999).
266. Lestra, C. *et al.* Biological parameters in major depression: effects of paroxetine, viloxazine, moclobemide, and electroconvulsive therapy. Relation to early clinical outcome. *Biol. Psychiatry* **44**, 274–80 (1998).
267. Alvarez, J. C. *et al.* Plasma serotonin level after 1 day of fluoxetine treatment: A biological predictor for antidepressant response? *Psychopharmacology (Berl)*. **143**, 97–101 (1999).
268. Figueras, G., Pérez, V., San Martino, O., Alvarez, E. & Artigas, F. Pretreatment platelet 5-HT concentration predicts the short-term response to paroxetine in major depression. *Biol. Psychiatry* **46**, 518–524 (1999).
269. Blardi, P. *et al.* Serotonin and fluoxetine levels in plasma and platelets after fluoxetine treatment in depressive patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* **22**, 131–136 (2002).
270. Castrogiovanni, P., Blardi, P., De Lalla, A., Dell’Erba, A. & Auteri, A. Can serotonin and fluoxetine levels in plasma and platelets predict clinical response in depression? *Psychopharmacol. Bull.* **37**, 102–108 (2003).
271. Blardi, P. & Lalla, A. De. Activity of Citalopram on Adenosine and Serotonin Circulating Levels in Depressed Patients. **25**, 262–266 (2005).
272. Gupta, M. *et al.* TSPAN5, ERICH3 and selective serotonin reuptake inhibitors in major depressive disorder: Pharmacometabolomics-informed pharmacogenomics. *Mol. Psychiatry* **21**, 1717–1725 (2016).
273. Holck, A. *et al.* Plasma serotonin levels are associated with antidepressant response to SSRIs. *J. Affect. Disord.* **250**, 65–70 (2019).
274. Fišar, Z., Kališová, L., Paclt, I., Anders, M. & Vevera, J. Platelet serotonin uptake in drug-naïve depressive patients before and after treatment with citalopram. *Psychiatry Res.* **161**, 185–194 (2008).

275. Pivac, N. *et al.* Long-term sertraline treatment and peripheral biochemical markers in female depressed patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **27**, 759–765 (2003).
276. Mück-Šeler, D., Pivac, N., Šagud, M., Jakovljevi, M. & Mihaljevi-Peleš, A. The effects of paroxetine and tianeptine on peripheral biochemical markers in major depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **26**, 1235–1243 (2002).
277. Angoa-Pérez, M. *et al.* Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 908–919 (2014).
278. Azmitia, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. in *Brain Research Bulletin* vol. 56 413–424 (Brain Res Bull, 2001).
279. Gaspar, P., Cases, O. & Maroteaux, L. The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 4 1002–1012 (2003).
280. Amireault, P. & Dubé, F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol. Reprod.* **73**, 358–365 (2005).
281. Il'ková, G. *et al.* Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* **12**, 205–213 (2004).
282. Veselá, J. *et al.* Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol. Res.* **52**, 223–228 (2003).
283. Basu, B. *et al.* Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction* **135**, 657–669 (2008).
284. Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Sadler, T. W. & Lauder, J. M. Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta* **14**, 149–161 (1993).
285. Levin, M., Buznikov, G. A. & Lauder, J. M. Of Minds and Embryos: Left-Right Asymmetry and the Serotonergic Controls of Pre-Neural Morphogenesis. *Dev. Neurosci.* **28**, 171–185 (2006).
286. Moiseiwitsch, J. R. D. The role of serotonin and during craniofacial development. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* vol. 11 230–239 (2000).
287. Buznikov, G. A., Lambert, W. H. & Lauder, J. M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell and Tissue Research* vol. 305 177–186 (2001).
288. Nebigil, C. G. *et al.* Serotonin 2B receptor is required for heart development. *PNAS August* **15**, 9508–9513 (2000).
289. Lv, J. & Liu, F. The Role of Serotonin beyond the Central Nervous System during Embryogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–7 (2017).
290. Goriadis, C. & Rohrer, H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 3 531–541 (2002).
291. Hendricks, T. J. *et al.* Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* **37**, 233–247 (2003).
292. Suri, D., tia Teixeira, C. M., Caffrey Cagliostro, M. K., Mahadevia, D. & Ansorge, M. S. Monoamine-Sensitive Developmental Periods Impacting Adult Emotional and Cognitive Behaviors. *Neuropsychopharmacol. Rev.* **40**, 88–112 (2015).
293. Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L. R., Hynes, M. A. & Rosenthal, A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* **93**, 755–766 (1998).

294. Briscoe, J. *et al.* Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622–627 (1999).
295. Ding, Y. Q. *et al.* Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat. Neurosci.* **6**, 933–938 (2003).
296. Wirth, A., Holst, K. & Ponimaskin, E. How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Progress in Neurobiology* vol. 151 35–56 (2017).
297. Cases, O. *et al.* Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* **16**, 297–307 (1996).
298. Salichon, N. *et al.* Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knock-out mice. *J. Neurosci.* **21**, 884–896 (2001).
299. Upton, A. L. *et al.* Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase a knockout mice: Possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J. Neurosci.* **19**, 7007–7024 (1999).
300. Lira, A. *et al.* Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol. Psychiatry* **54**, 960–971 (2003).
301. Alenina, N. *et al.* Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10332–10337 (2009).
302. Narboux-Neïme, N. *et al.* Postnatal growth defects in mice with constitutive depletion of central serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 171–181 (2013).
303. Wang, Y. M. *et al.* Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* **19**, 1285–1296 (1997).
304. Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Lunardi, G. & Pasqualetti, M. Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. *Mol. Psychiatry* **18**, 1106–1118 (2013).
305. Bonnin, A., Peng, W., Hewlett, W. & Levitt, P. Expression mapping of 5-HT₁ serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience* **141**, 781–794 (2006).
306. Rumajogee, P. *et al.* Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT autoreceptors or the 5-HT transporter: Involvement of BDNF and cAMP. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 937–944 (2004).
307. Bonnin, A., Torii, M., Wang, L., Rakic, P. & Levitt, P. Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat. Neurosci.* **10**, 588–597 (2007).
308. Murthy, S. *et al.* Serotonin receptor 3A controls interneuron migration into the neocortex. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
309. Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L. & Gershon, M. D. Serotonin and the 5-HT_{2B} receptor in the development of enteric neurons. *J. Neurosci.* **20**, 294–305 (2000).
310. Mawe, G. M. & Hoffman, J. M. Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 10 473–486 (2013).
311. Song, N.-N. *et al.* Divergent Roles of Central Serotonin in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–7 (2017).
312. Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B. & Gage, F. H. The role of adult hippocampal

- neurogenesis in brain health and disease. *Molecular Psychiatry* vol. 24 67–87 (2019).
313. Alenina, N. & Klempin, F. *The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. Behavioural Brain Research* vol. 277 49–57 (2015).
 314. Micheli, L., Ceccarelli, M., D'Andrea, G. & Tirone, F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res. Bull.* **143**, 181–193 (2018).
 315. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**, 2027–2033 (1996).
 316. Jacobs, B. L., van Praag, H. & Gage, F. H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* **5**, 262–269 (2000).
 317. David, D. J. *et al.* Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist* vol. 16 578–591 (2010).
 318. Banasr, M., Hery, M., Printemps, R. & Daszuta, A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* **29**, 450–460 (2004).
 319. Brezun, J. M. & Daszuta, A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* **89**, 999–1002 (1999).
 320. Brezun, J. M. & Daszuta, A. Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. *Hippocampus* **10**, 37–46 (2000).
 321. Song, N. N. *et al.* Reducing central serotonin in adulthood promotes hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
 322. Klempin, F. *et al.* Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* **33**, 8270–8275 (2013).
 323. Song, N. N. *et al.* Enhanced dendritic morphogenesis of adult hippocampal newborn neurons in central 5-HT-deficient mice. *Stem Cell Res.* **19**, 6–11 (2017).
 324. Benninghoff, J. *et al.* Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells. *Neuropsychopharmacology* **35**, 893–903 (2010).
 325. Diaz, S. L. *et al.* Paradoxical increase in survival of newborn neurons in the dentate gyrus of mice with constitutive depletion of serotonin. *Eur. J. Neurosci.* **38**, 2650–2658 (2013).
 326. Karabeg, M. M. *et al.* 5-HTT Deficiency Affects Neuroplasticity and Increases Stress Sensitivity Resulting in Altered Spatial Learning Performance in the Morris Water Maze but Not in the Barnes Maze. *PLoS One* **8**, 78238 (2013).
 327. Singh, C. *et al.* Cognitive abnormalities and hippocampal alterations in monoamine oxidase A and B knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12816–12821 (2013).
 328. Ferrés-Coy, A. *et al.* RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Transl. Psychiatry* **3**, (2013).
 329. Klempin, F. *et al.* Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT_{1a}, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* **3**, 14 (2010).
 330. Kondo, M., Koyama, Y., Nakamura, Y. & Shimada, S. A novel 5HT₃ receptor-IGF1 mechanism distinct from SSRI-induced antidepressant effects. *Mol. Psychiatry* **23**, 833–842 (2018).

331. Mendez-David, I. *et al.* Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology* **39**, 1366–1378 (2014).
332. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* vol. 9 653–660 (2003).
333. Ribatti, D., Conconi, M. T. & Nussdorfer, G. G. Nonclassic endogenous regulators of angiogenesis. *Pharmacological Reviews* vol. 59 185–205 (2007).
334. Zamani, A. & Qu, Z. Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells. *FEBS Lett.* **586**, 2360–2365 (2012).
335. Machida, T., Iizuka, K. & Hirafuji, M. 5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1416–1419 (2013).
336. Dupre, T. V., Jenkins, D. P., Muise-Helmericks, R. C. & Schnellmann, R. G. The 5-hydroxytryptamine receptor 1F stimulates mitochondrial biogenesis and angiogenesis in endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **169**, (2019).
337. Profirovic, J. *et al.* A novel regulator of angiogenesis in endothelial cells: 5-hydroxytryptamine 4 receptor. *Angiogenesis* **16**, 15–28 (2013).
338. Iwabayashi, M. *et al.* Role of serotonin in angiogenesis: Induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT_{1B}/Akt/eNOS pathway in diabetic mice. *Atherosclerosis* **220**, 337–342 (2012).
339. Pakala, R., Willerson, J. T. & Benedict, C. R. Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* **90**, 1919–1926 (1994).
340. Pakala, R. & Benedict, C. R. Effect of serotonin and thromboxane A₂ on endothelial cell proliferation: Effect of specific receptor antagonists. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 527–537 (1998).
341. Qin, L. *et al.* The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR₃/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1. *Blood* **121**, 2154–2164 (2013).
342. Matsusaka, S. & Wakabayashi, I. 5-Hydroxytryptamine as a potent migration enhancer of human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* **579**, 6721–6725 (2005).
343. Nishikawa, T. *et al.* Antiangiogenic Effect of a Selective 5-HT₄ Receptor Agonist. *J. Surg. Res.* **159**, 696–704 (2010).
344. Bottaro, D., Shepro, D., Peterson, S. & Hechtman, H. B. Serotonin, histamine, and norepinephrine mediation of endothelial and vascular smooth muscle cell movement. *Am. J. Physiol. Physiol.* **248**, C252–C257 (1985).
345. Zhao, D. *et al.* Orphan nuclear transcription factor TR₃/Nur77 regulates microvessel permeability by targeting endothelial nitric oxide synthase and destabilizing endothelial junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12066–12071 (2011).
346. Asada, M. *et al.* Depletion of Serotonin and Selective Inhibition of 2B Receptor Suppressed Tumor Angiogenesis by Inhibiting Endothelial Nitric Oxide Synthase and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Phosphorylation. *Neoplasia* **11**, 408–IN10 (2009).
347. Fujita, M. *et al.* Selective blockade of serotonin 5-HT_{2A} receptor increases coronary blood flow via augmented cardiac nitric oxide release through 5-HT_{1B} receptor in hypoperfused canine hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 1219–1223 (2004).
348. Maleki-Dizaji, N., Eteraf-Oskouei, T., Fakhrjou, A., Maljaie, S. H. & Garjani, A. The effects of 5HT₃ receptor antagonist granisetron on inflammatory parameters and angiogenesis in the air-pouch model of inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 1010–1016 (2010).

349. Nocito, A. *et al.* Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res.* **68**, 5152–5158 (2008).
350. Banskota, S. *et al.* BJ-1108, a 6-amino-2,4,5-trimethylpyridin-3-ol analog, inhibits serotonin-induced angiogenesis and tumor growth through PI3K/NOX pathway. *PLoS One* **11**, (2016).
351. Pakala, R. & Benedict, C. Synergy between thrombin and serotonin in inducing vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Lab. Clin. Med.* **134**, 659–667 (1999).
352. Liu, Y. *et al.* Serotonin inhibits apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell by pERK1/2 and PDK through 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporters. *Cardiovasc. Pathol.* **22**, 451–457 (2013).
353. Mahar, I. *et al.* Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **38**, 173–192 (2014).
354. Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J. & Duman, R. S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **20**, 9104–9110 (2000).
355. Encinas, J. M., Vaahtokari, A. & Enikolopov, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8233–8238 (2006).
356. Santarelli, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (80-.)*. **301**, 805–809 (2003).
357. Manev, H., Uz, T., Smalheiser, N. R. & Manev, R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **411**, 67–70 (2001).
358. Marlatt, M. W., Lucassen, P. J. & Praag, H. van. Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice. *Brain Res.* **1341**, 93 (2010).
359. Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F. & Hen, R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neurosci.* **28**, 1374–1384 (2008).
360. Lee, J. S. *et al.* Induction of neuronal vascular endothelial growth factor expression by cAMP in the dentate gyrus of the hippocampus is required for antidepressant-like behaviors. *J. Neurosci.* **29**, 8493–8505 (2009).
361. Warner-Schmidt, J. L. & Duman, R. S. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 4647–4652 (2007).
362. Klomp, A., Václavů, L., Meerhoff, G. F., Reneman, L. & Lucassen, P. J. Effects of chronic fluoxetine treatment on neurogenesis and tryptophan hydroxylase expression in adolescent and adult rats. *PLoS One* **9**, (2014).
363. David, D. J. *et al.* Article Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety / Depression. *Neuron* **62**, 479–493 (2009).
364. Airan, R. D. *et al.* High-Speed Imaging Reveals Neurophysiological Links to Behavior in an Animal Model of Depression. *Science (80-.)*. **317**, 819–823 (2007).
365. Micheli, L. *et al.* Terminal differentiation of adult hippocampal progenitor cells is a step functionally dissociable from proliferation and is controlled by Tis21, Id3 and NeuroD2. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, (2017).
366. Kobayashi, K. *et al.* Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 8434–8439 (2010).
367. Ohira, K., Hagihara, H., Miwa, M., Nakamura, K. & Miyakawa, T. Fluoxetine-induced dematuration of hippocampal neurons and adult cortical neurogenesis in the common marmoset. *Mol. Brain* **12**, (2019).
368. Mateus-Pinheiro, A. *et al.* Sustained remission from depressive-like behavior depends

- on hippocampal neurogenesis. *Transl. Psychiatry* **3**, e210 (2013).
369. Mannari, T. *et al.* Antidepressant-induced vascular dynamics in the hippocampus of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* **358**, 43–55 (2014).
 370. Ohira, K. & Miyakawa, T. Chronic treatment with fluoxetine for more than 6 weeks decreases neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. 1–12 (2011).
 371. Sachs, B. D. *et al.* The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. *Transl. Psychiatry* **2013 38 3**, e291–e291 (2013).
 372. Imoto, Y. *et al.* Role of the 5-HT₄ receptor in chronic fluoxetine treatment-induced neurogenic activity and granule cell dematuration in the dentate gyrus. *Mol. Brain* **8**, (2015).
 373. Caiaffo, V., Oliveira, B. D. R., Sá, F. B. de & Neto, J. E. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. *Pharmacol. Res. Perspect.* **4**, 1–9 (2016).
 374. Balu, D. T. *et al.* Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain Res.* **1211**, 37–43 (2008).
 375. Molteni, R. *et al.* Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **9**, 307–317 (2006).
 376. Nibuya, M., Nestler, E. J. & Duman, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J. Neurosci.* **16**, 2365–2372 (1996).
 377. Nibuya, M., Morinobu, S. & Duman, R. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.* **15**, 7539–7547 (1995).
 378. Allaman, I., Fiumelli, H., Magistretti, P. J. & Martin, J. L. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. *Psychopharmacology (Berl)*. **216**, 75–84 (2011).
 379. Nowacka, M. M. & Obuchowicz, E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: A new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. *Neuropeptides* **46**, 1–10 (2012).
 380. Greene, J., Banasr, M., Lee, B., Warner-Schmidt, J. & Duman, R. S. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: Pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2459–2468 (2009).
 381. Kodama, M., Fujioka, T. & Duman, R. S. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol. Psychiatry* **56**, 570–580 (2004).
 382. Tamburella, A., Micale, V., Navarria, A. & Drago, F. Antidepressant properties of the 5-HT₄ receptor partial agonist, SL65.0155: Behavioral and neurochemical studies in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **33**, 1205–1210 (2009).
 383. Malberg, J. E. & Duman, R. S. Cell Proliferation in Adult Hippocampus is Decreased by Inescapable Stress: Reversal by Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacol.* **2003 289 28**, 1562–1571 (2003).
 384. Surget, A. *et al.* Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol. Psychiatry* **16**, 1177–1188 (2011).
 385. Surget, A. *et al.* Drug-Dependent Requirement of Hippocampal Neurogenesis in a Model of Depression and of Antidepressant Reversal. *Biol. Psychiatry* **64**, 293–301 (2008).

386. Hitoshi, S. *et al.* Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3574–3585 (2007).
387. Boldrini, M. *et al.* Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2376–2389 (2009).
388. Boldrini, M. *et al.* Hippocampal Angiogenesis and Progenitor Cell Proliferation Are Increased With Antidepressant Use in Major Depression. *Biol. Psychiatry* **72**, 562–571 (2012).
389. Beauquis, J., Roig, P., Nicola, A. F. De & Saravia, F. Neuronal Plasticity and Antidepressants in the Diabetic Brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1153**, 203–208 (2009).
390. Dong, H. *et al.* Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* **127**, 601–609 (2004).
391. Kohl, Z. *et al.* Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. *Eur. J. Neurosci.* **35**, 10–19 (2012).
392. Grote, H. E. *et al.* Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington’s disease mice are rescued by fluoxetine. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 2081–2088 (2005).
393. Siepmann, T. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors to improve outcome in acute ischemic stroke: possible mechanisms and clinical evidence. *Brain Behav.* **5**, (2015).
394. McCann, S. *et al.* Efficacy of antidepressants in animal models of ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* **45**, 3055–3063 (2014).
395. Khodanovich, M. *et al.* Effects of Fluoxetine on Hippocampal Neurogenesis and Neuroprotection in the Model of Global Cerebral Ischemia in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, Vol. 19, Page 162 **19**, 162 (2018).
396. Lim, C.-M. M. *et al.* Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. *J. Neurosci. Res.* **87**, 1037–1045 (2009).
397. Lee, J. *et al.* Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption. *Neuropharmacology* **79**, 161–171 (2014).
398. Li, W. L. *et al.* Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. *J. Neurosci. Res.* **87**, 112–122 (2009).
399. Hu, Q. *et al.* Effect of fluoxetine on HIF-1 α - Netrin/VEGF cascade, angiogenesis and neuroprotection in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. **329**, (2020).
400. Ofek, K. *et al.* Fluoxetine induces vasodilatation of cerebral arterioles by co-modulating NO/muscarinic signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2736–2744 (2012).
401. Shin, T. *et al.* Fluoxetine and sertraline attenuate postischemic brain injury in mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **13**, 257–263 (2009).
402. Liu, F. Y. *et al.* Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: A possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. *J. Neuroinflammation* **15**, (2018).
403. Hu, H. M. *et al.* Fluoxetine is Neuroprotective in Early Brain Injury via its Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Effects in a Rat Experimental Subarachnoid Hemorrhage Model. *Neurosci. Bull.* **34**, 951–962 (2018).
404. Chollet, F. *et al.* Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **10**, 123–130 (2011).
405. Liu, G. *et al.* Is Fluoxetine Good for Subacute Stroke? A Meta-Analysis Evidenced From

- Randomized Controlled Trials. *Front. Neurol.* **12**, 633781 (2021).
406. Legg, L. A. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for stroke recovery. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2019 (2019).
 407. Gu, S. C. & Wang, C. De. Early Selective Serotonin Reuptake Inhibitors for Recovery after Stroke: A Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **27**, 1178–1189 (2018).
 408. Mead, G. E. *et al.* *Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for stroke recovery.* vol. 2012 (2012).
 409. Marquez-Romero, J. *et al.* Fluoxetine for motor recovery after acute intracerebral hemorrhage, the FMRICH trial. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **190**, (2020).
 410. Effects of fluoxetine on functional outcomes after acute stroke (FOCUS): a pragmatic, double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)* **393**, 265–274 (2019).
 411. Safety and efficacy of fluoxetine on functional recovery after acute stroke (EFFECTS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet. Neurol.* **19**, 661–669 (2020).
 412. Safety and efficacy of fluoxetine on functional outcome after acute stroke (AFFINITY): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet. Neurol.* **19**, 651–660 (2020).
 413. Winstein, C. J. *et al.* Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery. *Stroke* **47**, e98–e169 (2016).
 414. Wang, Y. *et al.* Fluoxetine increases hippocampal neurogenesis and induces epigenetic factors but does not improve functional recovery after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **28**, 259–268 (2011).
 415. Han, X. *et al.* Imipramine treatment improves cognitive outcome associated with enhanced hippocampal neurogenesis after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* **28**, 995–1007 (2011).
 416. Scali, M. *et al.* Fluoxetine treatment promotes functional recovery in a rat model of cervical spinal cord injury. *Sci. Rep.* **3**, (2013).
 417. Lee, J. Y., Kang, S. R. & Yune, T. Y. Fluoxetine Prevents Oligodendrocyte Cell Death by Inhibiting Microglia Activation after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **32**, 633–644 (2015).
 418. Lee, J. Y., Kim, H. S., Choi, H. Y., Oh, T. H. & Yune, T. Y. Fluoxetine inhibits matrix metalloprotease activation and prevents disruption of blood-spinal cord barrier after spinal cord injury. *Brain* **135**, 2375–2389 (2012).
 419. Taguchi, N., Nakayama, S. & Tanaka, M. Fluoxetine has neuroprotective effects after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mouse. *Resuscitation* **83**, 652–656 (2012).
 420. Baron, M. H., Isern, J. & Fraser, S. T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* vol. 119 4828–4837 (2012).
 421. Lv, J., Wang, L., Gao, Y., Ding, Y.-Q. & Liu, F. 5-Hydroxytryptamine Synthesized in the Aorta-Gonad-Mesonephros Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Survival. *J. Exp. Med.* **214**, 529–545 (2017).
 422. Kwan, W., Cortes, M., Goessling, W. & North, T. Serotonergic regulation of hematopoietic stem cell production in the AGM. *Exp. Hematol.* **42**, S44 (2014).
 423. Kwan, W. *et al.* The Central Nervous System Regulates Embryonic HSPC Production via Stress-Responsive Glucocorticoid Receptor Signaling. *Cell Stem Cell* **19**, 370–382 (2016).
 424. Sibon, D. *et al.* Enhanced Renewal of Erythroid Progenitors in Myelodysplastic Anemia

- by Peripheral Serotonin. *Cell Rep.* **26**, 3246-3256.e4 (2019).
425. Seita, J. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* vol. 2 640–653 (2010).
 426. Kaushansky, K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2034–2045 (2006).
 427. Yang, M. *et al.* Promoting Effects of Serotonin on Hematopoiesis: Ex Vivo Expansion of Cord Blood CD34⁺ Stem/Progenitor Cells, Proliferation of Bone Marrow Stromal Cells, and Antiapoptosis. *Stem Cells* **25**, 1800–1806 (2007).
 428. Kirouac, D. C. *et al.* Dynamic interaction networks in a hierarchically organized tissue. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 417 (2010).
 429. Lowy, P. H., Keighley, G. & Cohen, N. S. Stimulation by Serotonin of Erythropoietin-dependent Erythropoiesis in Mice. *Br. J. Haematol.* **19**, 711–718 (1970).
 430. Gordge, M. P. Megakaryocyte apoptosis: Sorting out the signals. *British Journal of Pharmacology* vol. 145 271–273 (2005).
 431. Yang, M., Srikiatkachorn, A., Anthony, M., Chesterman, C. N. & Chong, B. H. Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaryoblasts. *Int. J. Hematol.* **63**, 137–142 (1996).
 432. Yang, M., Srikiatkachorn, A., Anthony, M. & Chong, B. H. Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT₂receptor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **7**, 127–133 (1996).
 433. Liu, Y. S. & Yang, M. The effect of 5-hydroxytryptamine on the regulation of megakaryocytopoiesis. *Hematology* **11**, 53–56 (2006).
 434. Ye, J. Y. *et al.* Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization. *Stem Cells* **32**, 2973–2982 (2014).
 435. Marrero, M. G. *et al.* Increasing serotonin bioavailability in preweaned dairy calves impacts hematology, growth, and behavior. *Domest. Anim. Endocrinol.* **69**, 42–50 (2019).
 436. Coman, T. *et al.* Serotonin Targeting Using Common Antidepressants Induces Rapid Recovery of Cytopenia. *Blood* **134**, 3715–3715 (2019).
 437. Wan, M., Ding, L., Wang, D., Han, J. & Gao, P. Serotonin: A Potent Immune Cell Modulator in Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **11**, 1–12 (2020).
 438. Baudry, A. *et al.* Essential Roles of Dopamine and Serotonin in Tooth Repair: Functional Interplay between Odontogenic Stem Cells and Platelets. *Stem Cells* **33**, 2586–2595 (2015).
 439. Lesurtel, M. Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. *Science (80-)*. **312**, 104–107 (2006).
 440. Michalopoulos, G. K. & Bhushan, B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. doi:10.1038/s41575-020-0342-4.
 441. Gayraud-Morel, B., Chrétien, F. & Tajbakhsh, S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen. Med.* **4**, 293–319 (2009).
 442. Frontera, W. & Ochala, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* **96**, 183–195 (2015).
 443. Giordani, L. *et al.* High-Dimensional Single-Cell Cartography Reveals Novel Skeletal Muscle-Resident Cell Populations. *Mol. Cell* **74**, 609-621.e6 (2019).
 444. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **91**, 1447–1531 (2011).
 445. Chiristov, C. *et al.* Muscle satellite cells and endothelial cells: Close neighbors and

- privileged partners. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1397–1409 (2007).
446. Abou-Khalil, R. *et al.* Autocrine and Paracrine Angiopoietin 1/Tie-2 Signaling Promotes Muscle Satellite Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 298–309 (2009).
 447. Latroche, C. *et al.* Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Reports* **9**, 2018–2033 (2017).
 448. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
 449. Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
 450. Tajbakhsh, S. & Buckingham, M. 6 The Birth of Muscle Progenitor Cells in the Mouse: Spatiotemporal Considerations. *Curr. Top. Dev. Biol.* **48**, 225–268 (1999).
 451. Sambasivan, R. & Tajbakhsh, S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 870–882 (2007).
 452. Buckingham, M. & Relaix, F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **44**, 115–125 (2015).
 453. Zammit, P. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **72**, 19–32 (2017).
 454. Scharner, J. & Zammit, P. S. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet. Muscle 2011 11* **1**, 1–13 (2011).
 455. Sambasivan, R. *et al.* Distinct Regulatory Cascades Govern Extraocular and Pharyngeal Arch Muscle Progenitor Cell Fates. *Dev. Cell* **16**, 810–821 (2009).
 456. Lepper, C., Partridge, T. A. & Fan, C. M. An absolute requirement for pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* **138**, 3639–3646 (2011).
 457. Sambasivan, R. *et al.* Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* **138**, 3647–3656 (2011).
 458. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
 459. Relaix, F. *et al.* Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* **172**, 91–102 (2006).
 460. Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D. & Tajbakhsh, S. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 677–682 (2006).
 461. Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M. A. & Tajbakhsh, S. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* **148**, 112–125 (2012).
 462. Mourikis, P. *et al.* A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* **30**, 243–252 (2012).
 463. Mourikis, P. & Tajbakhsh, S. Distinct contextual roles for Notch signalling in skeletal muscle stem cells. *BMC Dev. Biol.* **14**, 1–8 (2014).
 464. MB, B. *et al.* Notch-Induced miR-708 Antagonizes Satellite Cell Migration and Maintains Quiescence. *Cell Stem Cell* **23**, 859-868.e5 (2018).
 465. Verma, M. *et al.* Muscle Satellite Cell Cross-Talk with a Vascular Niche Maintains

- Quiescence via VEGF and Notch Signaling. *Cell Stem Cell* **23**, 530-543.e9 (2018).
466. Dell'Orso, S. *et al.* Single cell analysis of adult mouse skeletal muscle stem cells in homeostatic and regenerative conditions. *Dev.* **146**, (2019).
 467. Relaix, F. *et al.* Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nature Communications* vol. 12 (2021).
 468. Rodgers, J. T. *et al.* mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert. *Nature* **510**, 393–396 (2014).
 469. Der Vartanian, A. *et al.* PAX3 Confers Functional Heterogeneity in Skeletal Muscle Stem Cell Responses to Environmental Stress. *Cell Stem Cell* **24**, 958-973.e9 (2019).
 470. Tierney, M. T. & Sacco, A. Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. *Trends in Cell Biology* vol. 26 434–444 (2016).
 471. Schultz, E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev. Biol.* **175**, 84–94 (1996).
 472. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. & Rudnicki, M. A. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* **129**, 999–1010 (2007).
 473. Stuelsatz, P. *et al.* Extraocular muscle satellite cells are high performance myo-engines retaining efficient regenerative capacity in dystrophin deficiency. *Dev. Biol.* **397**, 31–44 (2015).
 474. Collins, C. A. *et al.* Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122**, 289–301 (2005).
 475. Soleimani, V. D. *et al.* Transcriptional Dominance of Pax7 in Adult Myogenesis Is Due to High-Affinity Recognition of Homeodomain Motifs. *Dev. Cell* **22**, 1208–1220 (2012).
 476. Gayraud-Morel, B. *et al.* Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells. *J. Cell Sci.* **125**, 1738–1749 (2012).
 477. Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Scale, P., Asakura, A. & Rudnicki, M. A. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **144**, 631–643 (1999).
 478. Cornelison, D. D. W., Olwin, B. B., Rudnicki, M. A. & Wold, B. J. MyoD^(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev. Biol.* **224**, 122–137 (2000).
 479. Olguin, H. C. & Olwin, B. B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Dev. Biol.* **275**, 375–388 (2004).
 480. Baghdadi, M. & Tajbakhsh, S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev. Biol.* **433**, 200–209 (2018).
 481. Borok, M. *et al.* Progressive and Coordinated Mobilization of the Skeletal Muscle Niche throughout Tissue Repair Revealed by Single-Cell Proteomic Analysis. *Cells* **10**, (2021).
 482. Hardy, D. *et al.* Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One* **11**, e0147198 (2016).
 483. Yennek, S., Burute, M., Théry, M. & Tajbakhsh, S. Cell adhesion geometry regulates non-random DNA segregation and asymmetric cell fates in mouse skeletal muscle stem cells. *Cell Rep.* **7**, 961–970 (2014).
 484. Dumont, N. A. *et al.* Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.* **21**, 1455–1463 (2015).
 485. Tamaki, T. *et al.* Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **157**, 571–577 (2002).
 486. Sampaolesi, M. *et al.* Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in

- dystrophic dogs. *Nature* **444**, 574–579 (2006).
487. Abou-Khalil, R., Mounier, R. & Chazaud, B. Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: The 'ménage à trois' of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells. *Cell Cycle* vol. 9 892–896 (2010).
 488. Luque, E., Peña, J., Martin, P., Jimena, I. & Vaamonde, R. Capillary Supply During Development of Individual Regenerating Muscle Fibers. *Anat. Histol. Embryol.* **24**, 87–89 (1995).
 489. Kostallari, E. *et al.* Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence. *Development* **142**, 1242–1253 (2015).
 490. Lu, H., Huang, D., Ransohoff, R. M. & Zhou, L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* **25**, 3344–3355 (2011).
 491. Saclier, M. *et al.* Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells* **31**, 384–396 (2013).
 492. Fiore, D. *et al.* Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Res.* **17**, 161–169 (2016).
 493. Nagler, J., Schriever, S. C., De Angelis, M., Pfluger, P. T. & Schramm, K.-W. Comprehensive analysis of nine monoamines and metabolites in small amounts of peripheral murine (C57Bl/6 J) tissues. *Biomed. Chromatogr.* **32**, e4151 (2018).
 494. Uchitomi, R. *et al.* Metabolomic Analysis of Skeletal Muscle in Aged Mice. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
 495. Chandran, S. *et al.* Effects of serotonin on skeletal muscle growth. *BMC Proc.* **6**, O3 (2012).
 496. Falabrègue, M. *et al.* Lack of Skeletal Muscle Serotonin Impairs Physical Performance. *Int. J. Tryptophan Res.* **14**, (2021).
 497. Pardo, C. V. *et al.* Fe²⁺-mediated binding of serotonin and dopamine to skeletal muscle actin: resemblance to serotonin binding proteins. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* **288**, 209–218 (1995).
 498. Small, D. H. & Wurtman, R. J. Binding of [3H]Serotonin to Skeletal Muscle Actin. *J. Neurochem.* **45**, 819–824 (1985).
 499. Al-Zoairy, R. *et al.* Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 1–9 (2017).
 500. Engel, K., Zhou, M. & Wang, J. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J. Biol. Chem.* **279**, 50042–50049 (2004).
 501. Chen, L. *et al.* Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 687–699 (2010).
 502. Mialet-Perez, J., Bianchi, P., Kunduzova, O. & Parini, A. New insights on receptor-dependent and monoamine oxidase-dependent effects of serotonin in the heart. in *Journal of Neural Transmission* vol. 114 823–827 (2007).
 503. Hajdуч, E. *et al.* Serotonin (5-hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **274**, 13563–13568 (1999).
 504. Hajdуч, E. *et al.* Biochemical localisation of the 5-HT(2A) (serotonin) receptor in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 369–372 (1999).
 505. Guillet-Deniau, I., Burnol, A. F. & Girard, J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT(2A) receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.*

- 272**, 14825–14829 (1997).
506. Watanabe, H. *et al.* Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice. *PLoS One* **11**, e0147143 (2016).
 507. Visco, D. B. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors affect structure, function and metabolism of skeletal muscle: A systematic review. *Pharmacol. Res.* **136**, 194–204 (2018).
 508. Tutakhail, A., Nazari, Q. A., Khabil, S., Gardier, A. & Coudore, F. Muscular and mitochondrial effects of long-term fluoxetine treatment in mice, combined with physical endurance exercise on treadmill. *Life Sci.* **232**, 116508 (2019).
 509. Gerry, S. P. *et al.* Serotonin as an integrator of leech behavior and muscle mechanical performance. *Zoology* **115**, 255–260 (2012).
 510. Machnik, M., Sigmund, G., Koch, A., Thevis, M. & Schänzer, W. Prevalence of antidepressants and biosimilars in elite sport. *Drug Test. Anal.* **1**, 286–291 (2009).
 511. Visco, D. B. *et al.* Early life fluoxetine treatment causes long-term lean phenotype in skeletal muscle of rats exposed to maternal lard-based high-fat diet. *Biomed. Pharmacother.* **131**, 110727 (2020).
 512. Da Silva, A. I. *et al.* Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 565–574 (2015).
 513. Coelho, W. S. & Sola-Penna, M. Serotonin regulates 6-phosphofructo-1-kinase activity in a PLC-PKC-CaMK II- and Janus kinase-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **372**, 211–220 (2013).
 514. Zaitso, K. *et al.* Metabolome analysis of the serotonin syndrome rat model: Abnormal muscular contraction is related to metabolic alterations and hyper-thermogenesis. *Life Sci.* **207**, 550–561 (2018).
 515. Kawahara, G., Maeda, H., Kikura-Hanajiri, R., Yoshida, K. ichi & Hayashi, Y. K. The psychoactive drug 25B-NBOMe recapitulates rhabdomyolysis in zebrafish larvae. *Forensic Toxicol.* **35**, 369–375 (2017).
 516. Musumeci, G., Trovato, F., Avoal, R., R, I. & Castrogiovanni, R. Serotonin / growth hormone / insulin-like growth factors axis on pre- and post-natal development : a contemporary review. *Dev. Anat.* **1**, 1–7 (2013).
 517. Dukes, A. *et al.* The aromatic amino acid tryptophan stimulates skeletal muscle IGF1/p70s6k/mTor signaling in vivo and the expression of myogenic genes in vitro. *Nutrition* **31**, 1018–1024 (2015).
 518. Musumeci, G. *et al.* Importance of serotonin (5-HT) and its precursor L-tryptophan for homeostasis and function of skeletal muscle in rats. A morphological and endocrinological study. *Acta Histochem.* **117**, 267–274 (2015).
 519. Castrogiovanni, P. *et al.* Effects of high-tryptophan diet on pre- and postnatal development in rats: A morphological study. *Eur. J. Nutr.* **53**, 297–308 (2014).
 520. Field, S. L., Marrero, M. G., Liu, L., Peñagaricano, F. & Laporta, J. Histological and transcriptomic analysis of adipose and muscle of dairy calves supplemented with 5-hydroxytryptophan. *Sci. Rep.* **11**, 1–10 (2021).
 521. Martelly, I. *et al.* Glycosaminoglycan mimetics trigger IP3-dependent intracellular calcium release in myoblasts. *Matrix Biol.* **29**, 317–329 (2010).
 522. Weiss, L. A., Abney, M., Cook, E. H. & Ober, C. Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 33–41 (2005).
 523. Mukaida, K., Shichino, T., Koyanagi, S., Himukashi, S. & Fukuda, K. Activity of the serotonergic system during isoflurane anesthesia. *Anesth. Analg.* **104**, 836–839 (2007).

524. López-Gil, X. *et al.* Role of Serotonin and Noradrenaline in the Rapid Antidepressant Action of Ketamine. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 3318–3326 (2019).
525. Daszuta, A. & Barrit, M. C. Endogenous serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) levels in large regions and in discrete brain areas of C57BL and BALBc mice at three times of the day. *Brain Res. Bull.* **8**, 477–482 (1982).
526. Yan, D. *et al.* Correlation between serotonergic measures in cerebrospinal fluid and blood of subhuman primate. *Life Sci.* **52**, 745–749 (1993).
527. Sarrias, M. J., Artigas, F., Martínez, E. & Gelpí, E. Seasonal changes of plasma serotonin and related parameters: Correlation with environmental measures. *Biol. Psychiatry* **26**, 695–706 (1989).
528. France, L. *Notice PROZAC 20 mg-5 mL, solution buvable en flacon.*
529. Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B. & Hen, R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1321–1330 (2004).
530. Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M. & Thomson, J. A. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **51**, 164–188 (2015).
531. David, D. J. & Gardier, A. M. The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response. *Encephale* **42**, 255–263 (2016).
532. Bosker, F. J. *et al.* Neurochemistry International Biochemical and behavioral effects of long-term citalopram administration and discontinuation in rats: Role of serotonin synthesis. *Neurochem. Int.* **57**, 948–957 (2010).
533. Kannen, V. *et al.* Fluoxetine induces preventive and complex effects against colon cancer development in epithelial and stromal areas in rats. *Toxicol. Lett.* **204**, 134–140 (2011).
534. Marcelli, G. & Patel, B. A. Understanding changes in uptake and release of serotonin from gastrointestinal tissue using a novel electroanalytical approach. *Analyst* **135**, 2340–2347 (2010).
535. Bhattacharyya, S. *et al.* Metabolomic signature of exposure and response to citalopram/escitalopram in depressed outpatients. *Transl. Psychiatry* **9**, (2019).
536. Manning, K. L., Novinger, S., Sullivan, P. S. & McDonald, T. P. Successful determination of platelet lifespan in C3H mice by in vivo biotinylation. *Lab. Anim. Sci.* **46**, 545–548 (1996).
537. Harker, L. A. *et al.* Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood* **95**, 2514–2522 (2000).
538. Hirowatari, Y., Hara, K., Shimura, Y. & Takahashi, H. Serotonin levels in platelet-poor plasma and whole blood from healthy subjects: Relationship with lipid markers and coronary heart disease risk score. *J. Atheroscler. Thromb.* **18**, 874–882 (2011).
539. Hara, K. *et al.* The ratio of plasma to whole-blood serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Lab. Clin. Med.* **144**, 31–37 (2004).
540. *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*. vol. 31 (Springer International Publishing, 2017).
541. Eskelund, A. *et al.* Drugs with antidepressant properties affect tryptophan metabolites differently in rodent models with depression-like behavior. *J. Neurochem.* **142**, 118–131 (2017).
542. Pietraszek, M. H. *et al.* Relationship between serotonergic measures in periphery and

- the brain of mouse. *Life Sci.* **51**, 75–82 (1992).
543. Kulikov, A. V. *et al.* Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy. *Expert opinion on therapeutic targets* vol. 22 319–330 (2018).
 544. Liu, M., Xiang, J., Zhou, J. & Ding, H. A disposable amperometric sensor for rapid detection of serotonin in the blood and brain of the depressed mice based on Nafion membrane-coated colloidal gold screen-printed electrode. *J. Electroanal. Chem.* **640**, 1–7 (2010).
 545. Sarrias, M. J., Cabré, P., Martínez, E. & Artigas, F. Relationship Between Serotonergic Measures in Blood and Cerebrospinal Fluid Simultaneously Obtained in Humans. *J. Neurochem.* **54**, 783–786 (1990).
 546. Audhya, T., Adams, J. B. & Johansen, L. Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 1496–1501 (2012).
 547. Roseboom, P. H. *et al.* Natural melatonin ‘knockdown’ in C57BL/6J mice: Rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Mol. Brain Res.* **63**, 189–197 (1998).
 548. Acevedo-Triana, C. A., León, L. A. & Cardenas, F. P. Comparing the expression of genes related to serotonin (5-HT) in C57BL/6J mice and humans based on data available at the allen mouse brain atlas and allen human brain atlas. *Neurol. Res. Int.* **2017**, 5–7 (2017).
 549. Omenetti, A. *et al.* Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G303–G315 (2011).
 550. Agudelo, L. Z. *et al.* Skeletal muscle PGC-1 α 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* **159**, 33–45 (2014).
 551. Wegner, M. *et al.* Effects of Exercise on Anxiety and Depression Disorders: Review of Meta- Analyses and Neurobiological Mechanisms. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **13**, 1002–1014 (2014).
 552. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (80-.)*. **347**, 78–81 (2015).
 553. Liu, Y., Suzuki, Y. J., Day, R. M. & Fanburg, B. L. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ. Res.* **95**, 579–586 (2004).
 554. Sarrouilhe, D. & Mesnil, M. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie* **161**, 46–50 (2019).
 555. Duerschmied, D. *et al.* Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* **121**, 1008–1015 (2013).
 556. Pacher, P., Ungvari, Z., Kecskemeti, V. & Koller, A. Serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, dilates isolated skeletal muscle arterioles. Possible role of altered Ca²⁺ sensitivity. *Br. J. Pharmacol.* **127**, 740–746 (1999).
 557. Yaman, O. M. *et al.* Remote myocardial injury: The protective role of fluoxetine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **96**, 319–327 (2018).
 558. Maingrette, F. *et al.* Psychological stress impairs ischemia-induced neovascularization: Protective effect of fluoxetine. *Atherosclerosis* **241**, 569–578 (2015).
 559. Aksu, U. *et al.* Fluoxetine ameliorates imbalance of redox homeostasis and inflammation in an acute kidney injury model. *J. Physiol. Biochem.* **70**, 925–934 (2014).
 560. de las Casas-Engel, M. *et al.* Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. *J. Immunol.* **190**, 2301–2310 (2013).
 561. Mann, D. A. & Oakley, F. Serotonin paracrine signaling in tissue fibrosis. *Biochim.*

- Biophys. Acta* **1832**, 905–10 (2013).
562. Domínguez-Soto, Á. *et al.* Serotonin drives the acquisition of a profibrotic and anti-inflammatory gene profile through the 5-HT7R-PKA signaling axis. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
 563. Corona-Avendao, S., Romero-Romo, M. A., Rojas-Hernández, A. & Ramírez-Silva, M. T. Study on the stability of the serotonin and on the determination of its acidity constants. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 621–627 (2005).
 564. Mödder, U. I. *et al.* Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 415–422 (2010).
 565. Chellini, F., Tani, A., Zecchi-Orlandini, S. & Sassoli, C. Influence of platelet-rich and platelet-poor plasma on endogenous mechanisms of skeletal muscle repair/regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
 566. Emery, A. E. H. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-A world survey. *Neuromuscul. Disord.* **1**, 19–29 (1991).
 567. Koenig, M. *et al.* Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509–517 (1987).
 568. Bell, C. D. & Conen, P. E. Histopathological changes in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* **7**, 529–544 (1968).
 569. Latroche, C. *et al.* Structural and Functional Alterations of Skeletal Muscle Microvasculature in Dystrophin-Deficient mdx Mice. *Am. J. Pathol.* **185**, 2482–2494 (2015).
 570. Manning, J. *et al.* Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **10**, 1370–1386 (2014).
 571. Carre-Pierrat, M. *et al.* Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in *C. elegans*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 253–258 (2006).
 572. Carre-Pierrat, M. *et al.* Pre-clinical study of 21 approved drugs in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 313–327 (2011).
 573. Waugh, T. A. *et al.* Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4651–4662 (2014).
 574. Tischer, T. *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) as therapy for cartilage, tendon and muscle damage – German working group position statement. *J. Exp. Orthop.* **7**, (2020).
 575. Gobin, V. *et al.* Fluoxetine reduces murine graft-versus-host disease by induction of t cell immunosuppression. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 934–943 (2013).
 576. David, D. J. *et al.* Pharmacological properties of vortioxetine and its pre-clinical consequences. *Encephale* **42**, 1S12-1S23 (2016).

Table des figures

FIGURE 1 : CONSTANTES D'INHIBITION (K_i) POUR LA RECAPTURE DE MONOAMINES DE DIFFERENTS TRAITEMENTS ANTIDEPRESSEURS, DANS DU TISSU DE CERVEAU DE RAT	17
FIGURE 2 : POURCENTAGE D'OCCUPATION DE SERT EN FONCTION DE LA POSOLOGIE DE ISRS	18
FIGURE 3 : RELATION DE RESULTATS CLINIQUES (REONSE CLINIQUE EXPRIMEE EN RISQUE RATIO ; PERDUS DE VUE POUR EFFETS INDESIRABLES ; PERDUS DE VUE POUR TOUTE CAUSE) EN FONCTION DE LA POSOLOGIE DE ISRS (EN EQUIVALENT FLUOXETINE)	20
FIGURE 4 : SCHEMA REPRESENTATIF DE LA BIOSYNTHESE DE LA SEROTONINE ET DES KYNURENINES A PARTIR DU TRYPTOPHANE	22
FIGURE 5 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION SELON LE TYPE DE RECEPTEUR 5-HT CHEZ L'HOMME	26
FIGURE 6 : IDENTIFICATION DES PROTEINES CIBLEES PAR LA SEROTONYLATION	27
FIGURE 7 : CARACTERISATION DES CONCENTRATIONS INTRATISSULAIRES DE 5-HT DANS LE MODELE MURIN KO SERT	29
FIGURE 8 : CARACTERISATION DES CONCENTRATIONS CENTRALES, PERIPHERIQUES ET CIRCULANTES DE 5-HT DANS LES MODELES MURINS KO TPH1	30
FIGURE 9 : CARACTERISATION DES MICROSYSTEMES SEROTONINERGIQUES DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE	31
FIGURE 10 : CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA SOURIS KO SERT : EXEMPLE DE L'IMPACT DE LA DYSREGULATION DU SIGNAL SEROTONINERGIQUE DANS L'ORGANISME	32
FIGURE 11 : ROLE DE LA SEROTONINE EN FONCTION DE SON ORIGINE DE PRODUCTION	33
FIGURE 12 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DE LA TRANSMISSION 5-HT ET DE SA REGULATION	35
FIGURE 13 : EFFETS INDUITS PAR UNE DOSE UNIQUE D'ISRS SUR L'ACTIVITE DES NEURONES SEROTONINERGIQUES ET LES CONCENTRATIONS DE 5-HT EXTRACELLULAIRE	37
FIGURE 14 : CINETIQUE AU COURS DU TEMPS DES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES ET INTRATISSULAIRES DE 5-HT LORS D'UN TRAITEMENT PAR ISRS	39
FIGURE 15 : TRANSMISSION SEROTONINERGIQUE DANS L'INTESTIN	42
FIGURE 16 : TRANSMISSION SEROTONINERGIQUE PAR LES PLAQUETTES	44
FIGURE 17 : CINETIQUE DES CONCENTRATIONS DE 5-HT DANS LE COMPARTIMENT CIRCULANT AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR ISRS	45
FIGURE 18 : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET POST NATAL DU SNC CHEZ LA SOURIS	50
FIGURE 19 : ALTERATIONS AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET A L'AGE ADULTE DE DIFFERENTS MODELES MURINS AVEC KO DES ACTEURS LIES A 5-HT	52
FIGURE 20 : SCHEMA REPRESENTATIF DU ROLE DE LA SEROTONINE DANS LA NEUROGENESE ADULTE HIPPOCAMPIQUE ADULTE	53
FIGURE 21 : EFFETS CHRONIQUES DE LA FLUOXETINE SUR LA NEUROGENESE ET L'ANGIOGENESE HIPPOCAMPIQUES SOUS-TENDANT LES EFFETS COMPORTEMENTAUX DE TYPE ANTIDEPRESSEUR	61
FIGURE 22 : SCHEMA REPRESENTATIF DES DIFFERENTES ETAPES DE L'HEMATOPOÏESE ADULTE, DES PHENOTYPES D'IMMUNOMARQUAGE DES CSPH AINSI QUE DES FACTEURS DE REGULATION SPECIFIQUES DE LIGNEE	68
FIGURE 23 : SCHEMA REPRESENTATIF DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE ET DE SES PARTENAIRES	74
FIGURE 24 : SCHEMA REPRESENTATIF DE LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE ET DES ACTEURS DE LA REGULATION MYOGENIQUE	76
FIGURE 25 : MARQUEURS D'ACTIVATION, DE PROLIFERATION, DE DIFFERENCIATION DES CSMU AU COURS DE LA REGENERATION MUSCULAIRE	80
FIGURE 26 : CINETIQUE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE AD INTEGRUM ET DU REMODELAGE VASCULAIRE APRES UNE BLESSURE MUSCULAIRE AIGUË PAR NOTEXINE	82
FIGURE 27 : EFFETS D'UNE AUGMENTATION SOUTENUE DE SEROTONINE BIODISPONIBLE SUR LA MORPHOLOGIE DU MUSCLE ET SUR L'EXPRESSION GENIQUE EVALUEE PAR SEQUENÇAGE D'ARN CHEZ LE VEAU AVANT SEVRAGE	87
FIGURE 28 : SCHEMA REPRESENTATIF DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'INTERVENTION PHARMACOLOGIQUE ET DE TEMPS DE MISE A MORT	91
FIGURE 29 : CINETIQUE DES CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE 5-HT ET 5-HIAA ET DU RATIO 5-HIAA/5-HT DANS LES ZONES SEROTONINERGIQUES CEREBRALES, LORS D'UN TRAITEMENT PAR FLUOXETINE	92
FIGURE 30 : CINETIQUE DES CONCENTRATIONS TISSULAIRES INTESTINALES DE 5-HT, DE 5-HIAA ET DU RATIO 5-HIAA/5-HT LORS D'UN TRAITEMENT PAR ISRS	93
FIGURE 31 : CINETIQUE DES CONCENTRATIONS DE 5-HT DANS LE COMPARTIMENT CIRCULANT LORS D'UN TRAITEMENT PAR ISRS	94
FIGURE 32 : CINETIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE TRP, KYN ET ACTIVITE D'IDO LORS D'UN TRAITEMENT PAR ISRS	95
FIGURE 33 : CORRELATIONS DES CONCENTRATIONS DE SEROTONINE ENTRE LES AIRES CEREBRALES SEROTONINERGIQUES ET DE L'INTESTIN, DU PPP OU DU SANG TOTAL	96

FIGURE 1: FLUOXETINE INCREASES THE PROLIFERATION OF SKELETAL MUSCLE STEM CELLS AND THE FUNCTIONAL VASCULARIZATION OF THE SKELETAL MUSCLE.	123
FIGURE 2: MUSCLE REGENERATION AFTER INJURIES IS EFFECTIVELY IMPROVED BY FLUOXETINE.....	125
FIGURE 3: THE PROLIFERATIVE EFFECTS OF FLUOXETINE ON MYOBLASTS ARE SEROTONIN DEPENDENT AND ACT THROUGH THE 5-HT1B RECEPTOR.	127
FIGURE 4: THE BENEFICIAL EFFECTS OF FLUOXETINE ARE ALSO MEDIATED <i>IN VIVO</i> BY 5-HT1B RECEPTOR DURING MUSCLE REGENERATION.	129
SUPPLEMENTAL FIGURE 1: FLUOXETINE INCREASES SATELLITE CELL AND VESSEL NUMBERS WITH NO EFFECT ON MUSCLE FIBERS AT STEADY STATE.	132
SUPPLEMENTAL FIGURE 2: FLUOXETINE ACCELERATES MUSCLE REGENERATION <i>AD INTEGRUM</i> AFTER INJURY.	134
SUPPLEMENTAL FIGURE 3: FLUOXETINE ACTS ON MYOBLASTS VIA THE 5-HT1B RECEPTOR	136
FIGURE SUPPLEMENTAL 4: FLUOXETINE ACTS ON MUSCLE STEM CELLS AND MUSCLE REGENERATION IN A 5-HT AND 5-HT1B DEPENDENT MANNER.	137
SUPPLEMENTAL FIGURE 5: FLUOXETINE ACTS ON MUSCLE STEM CELLS AND MUSCLE REGENERATION INDEPENDENTLY OF THE 5-HT2A RECEPTOR.	139

Table des tableaux

TABLEAU 1 : PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES DES ISRS.....	18
--	-----------

TABLE 1: INTRAMUSCULAR CYTOKINE/CHEMOKINE LEVELS AFTER PROLONGED FLUOXETINE TREATMENT AT STEADY STATE AND AFTER MUSCLE INJURY.	131
TABLE S1: LIST OF ANTIBODIES USED FOR IMMUNOSTAININGS.	142
TABLE S2: LIST OF ANTIBODIES USED FOR WESTERN BLOTS.....	147
TABLE S3: LIST OF PRIMERS USED FOR RT-qPCR.	148

Annexes :

A. Communication orale



ICN 2018

Room 3 (Hana D, 4F)

8:50-9:20

Oral 6

Nerve & Muscle

Chairs: Takashi Kanda (Yamaguchi University Graduate School of Medicine)

Kurenai Tanji (Neuromuscular Pathology Laboratory, Department of Pathology & Cell Biology, Columbia University)

O6-1 Ultrastructural mechanisms of macrophage-induced demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an observation on longitudinal sections

Haruki Koike (Nagoya University Graduate School of Medicine)

O6-2 Morphometric study of myelinated fibers in sural nerve of transthyretin familial amyloid neuropathy asymptomatic carriers: back to the archives of the Corino de Andrade Unit

Ricardo Taipa (Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto / Neuropathology Unit, Department of Neurosciences, Centro Hospitalar do Porto)

O6-3 Fluoxetine improves regenerative capacity of the skeletal muscle

Mylene Fefeu (Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo Universitaire de psychiatrie / Institut Pasteur, Experimental Neuropathology Unit, Infection and Epidemiology Department)

September 25


B. Collaboration scientifique

RESEARCH

Open Access



Defective angiogenesis in CXCL12 mutant mice impairs skeletal muscle regeneration

David Hardy¹, Mylène Fefeu¹, Aurore Besnard¹, David Briand¹, Paméla Gasse², Fernando Arenzana-Seisdedos², Pierre Rocheteau^{1,3†} and Fabrice Chrétien^{1,4,5*†} 

Abstract

Background: During muscle regeneration, the chemokine CXCL12 (SDF-1) and the synthesis of some specific heparan sulfates (HS) have been shown to be critical. CXCL12 activity has been shown to be heavily influenced by its binding to extracellular glycosaminoglycans (GAG) by modulating its presentation to its receptors and by generating haptotactic gradients. Although CXCL12 has been implicated in several phases of tissue repair, the influence of GAG binding under HS influencing conditions such as acute tissue destruction remains understudied.

Methods: To investigate the role of the CXCL12/HS proteoglycan interactions in the pathophysiology of muscle regeneration, we performed two models of muscle injuries (notexin and freeze injury) in mutant CXCL12^{Gagtm/Gagtm} mice, where the CXCL12 gene having been selectively mutated in critical binding sites of CXCL12 to interact with HS. Histological, cytometric, functional transcriptomic, and ultrastructure analysis focusing on the satellite cell behavior and the vessels were conducted on muscles before and after injuries. Unless specified, statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test.

Results: We showed that despite normal histology of the resting muscle and normal muscle stem cell behavior in the mutant mice, endothelial cells displayed an increase in the angiogenic response in resting muscle despite the downregulated transcriptomic changes induced by the CXCL12 mutation. The regenerative capacity of the CXCL12-mutated mice was only delayed after a notexin injury, but a severe damage by freeze injury revealed a persistent defect in the muscle regeneration of CXCL12 mutant mice associated with vascular defect and fibroadipose deposition with persistent immune cell infiltration.

Conclusion: The present study shows that CXCL12 is crucial for proper muscle regeneration. We highlight that this homing molecule could play an important role in drastic muscle injuries and that the regeneration defect could be due to an impairment of angiogenesis, associated with a long-lasting fibro-adipogenic scar.

Keywords: Muscle stem cells, Endothelial cells, CXCL12, Heparan sulfates, Skeletal muscle, Regeneration, Angiogenesis, Vasculogenesis, Fibrosis

Background

Wound healing is complex, and an alteration in the process can lead to chronic wound or fibrotic tissue formation. Skeletal muscle owns its remarkable capacity of regeneration to satellite cells (SCs), the main stem cells of this tissue [1]. After muscle injury, SCs are activated, proliferated, differentiated, and fused to repair damaged myofibers [2]. However, muscle regeneration

also requires specific structural and trophic cues such as the presence of functional vascular supply and neuronal activity [3, 4].

The stem cell's microenvironment is composed of a multitude of signals secreted by neighboring cells. Among chemokines, CXCL12 (SDF-1) is one of the most studied and was initially described to maintain hematopoietic stem cells within the bone marrow [5]. CXCL12 exists in three splice variants (α , β , and γ) in mice and acts on cells that are expressing the CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4) and/or 7 (CXCR7) [6]. Beyond binding to their cognate receptors, the

* Correspondence: Fabrice.chretien@pasteur.fr

[†]Pierre Rocheteau and Fabrice Chrétien contributed equally to this work.

¹Experimental Neuropathology Unit, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

⁴Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



affinity of the chemokines to the glycan moiety of proteoglycans (GAG), specifically heparan sulfates (HS), creates a concentration gradient which drives an orientated migration and recruitment of circulating cells from surrounding tissues (diffusion/chemotaxis) [7].

CXCL12 has interesting proangiogenic properties of stimulating new blood vessel (vasculogenesis) formation during both the developmental and the postnatal period [8] and on angiogenesis [9]. Under ischemic conditions, CXCL12, upregulated by HIF1- α , leads to the mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) from the bone marrow [9] to revascularize injured tissues. Further, CXCL12 was described as a local factor in driving neovascular sprouting [10] and as having a direct effect on endothelial cells (EC) proliferation and *in vitro* capillary tube formation [11]. These beneficial effects have also been confirmed *in vivo* using a Matrigel plug assay [12].

Recent studies have also described the potential involvement of the CXCL12-CXCR4 pathway in the muscle repair process. An increase of CXCL12 was shown to enhance regeneration of injured skeletal muscles by inducing stem cell mobilization and by increasing the migration of myoblasts [13]. In addition, the CXCL12-CXCR4 pathway was shown to be upregulated in response to skeletal muscle damage and a CXCR4 antagonist induced a delay in muscle regeneration [13]. Thus, the administration of CXCL12 could accelerate the skeletal muscle repair process [13].

However, the involvement of chemokines, specifically the adsorption of CXCL12 by glycosaminoglycan and their biological functions, has not been elucidated. A new CXCL12 mutant mouse (CXCL12^{Gagtm/Gagtm} mice) was recently engineered, with the CXCL12 gene having been selectively mutated (knock-in) in the critical HS-binding domain supposed to induce drastic reduction of CXCL12/HS interaction without affecting CXCR4-activation capacity [14]. CXCL12^{Gagtm/Gagtm} (KI) mice showed no developmental defects and expressed normal levels of total and CXCL12 isoform-specific mRNA. The KI mice had an increase in the concentration of circulating CXCL12 and in circulating CD34⁺ hemopoietic precursor cells. However, after acute muscle ischemia, the KI mice exhibited a defect in revascularization [14].

We therefore investigated the role of the CXCL12/HS proteoglycan interactions in the pathophysiology of muscle regeneration, focusing on the SC behavior and in vascular abnormalities. When comparing severe muscle injuries which affected all cell types and disrupted the overall architecture of the muscle, the KI mice showed more fibroadipose scarring neighboring the regenerative regions relative to their wild-type counterparts. Thus, the disruption of the CXCL12/GAG interactions may transform the muscle into a non-regenerative tissue. An important aspect of this defect

was the abnormal vascular system that developed in this fibro-adipogenic scar.

Materials and methods

Mouse experiments and muscle injuries

All procedures in this study were approved by the Animal Care and Use Committee at the Institut Pasteur (CETEA 01332.01). Unless specified, 6–10-week-old males were used in this study and housed under a 12:12 light/dark cycle in a pathogen-free facility with controlled temperature and humidity. Food and drink were given *ad libitum*. The experiments were conducted in C57BL/6J RJ mice (Janvier Labs, France) or in genetically engineered mice backcrossed with making having a C57BL/6J RJ background.

Animals were anesthetized by ketamine and xylazine (respectively 80 mg/kg and 10 mg/kg before injuries). For the freeze injury, the tibialis anterior (TA) was exposed and frozen with three consecutive cycles of freeze-thawings by applying a liquid nitrogen-cooled metallic rod for 15 s. For the myotexin injury, 10 μ L of 12.5 μ g/mL notexin (Latoxan) was injected in the TA. To limit the variability between the toxin batches, 25 batches (12.5 mg) were reconstituted, pooled, aliquoted, and stored at -20°C .

Histological staining

TAs were collected and snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane for 5 min and stored at -80°C before cryosectioning (7 μ m sections). The sections were then routinely stained with hematoxylin-eosin, Sirius Red, or Oil Red O.

To preserve GFP fluorescence for the 3D study of blood vessel organization, whole TA muscles were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 2 h, then cryopreserved in 40% sucrose overnight at 4°C before freezing in OCT (Tissue-Tek[®], Sakura[®] Finetek, CA, USA). Serial cryosections (7- μ m- or 100- μ m-thick sections for 2D and 3D analysis, respectively) were performed.

For immunostaining, the tissues were rehydrated in PBS, saturated with 3% BSA, and permeabilized with 0.5% Triton X-100. Sections were incubated with primary antibodies (CD31, BD Pharmingen, #550274; Laminin, Sigma, #L9393; Pax7, DSHB) overnight at 4°C and then with Alexa-conjugated secondary antibodies for 1 h at 37°C . Sections were counterstained with Hoechst 33342 (Life technologies[®], CA, USA) (5 min in PBS with 10 mg/mL, H3570, Invitrogen, CA, USA).

Image acquisition

Images were captured on a Nikon Eclipse E800 microscope using the Nikon ACT-1 software and DXM1200 camera for bright field image acquisition. Fluorescence images and 3D reconstructions were performed with a

Leica® TCS SPE DM 2500 and LAS AF software (Leica®, Germany).

Two-dimension analyses were performed, using ImageJ (NIH, MA, USA) and NIS-Element (Nikon) software. We measured the muscle fibers' count, diameter, and capillary number per myofiber. At least 100 randomly selected fibers were considered for each muscle.

Three-dimensional analysis was performed to evaluate the organization of the vascular network and to quantify the number of vessels sprouting. For each muscle, 10 images were collected at 4 µm intervals to create a stack in the *z* axis. 3D reconstruction of this *z*-stack image was performed using 80- to 150-µm-thick frozen sections.

Cell sorting and FACS

Using transgenic *Tg:Pax7nGFP* and *Flk1^{GFP/+}* mice allowed for selection by cytometry (FACS). Soft tissue was separated from the bone by dissection in cold DMEM, and muscles were chopped. Single cell suspensions were obtained from the TA or muscle bulk by enzymatic digestion at 37 °C with gentle agitation (collagenase (Sigma; T1426) 0.08% and trypsin (Sigma; C5138) 0.08% for SCs; collagenase B (Roche; 11088807001) 10 mg/mL and dispase II (Dutscher Dominique; 17105-041) 2.4 U/mL for other cell sorting).

After a 20-min digestion, the supernatant was collected on ice and enzymatic solution was added until the muscle was completely digested. The solution was filtered through 40 µm filter. To exclude dead cells, cells were stained by propidium iodide (Sigma, #P4170) prior to their analysis for the individual sorts of GFP-ECs and GFP-SCs. For cell sorting from uninjured and regenerating muscle of *Tg:Pax7nGFP*, ECs, macrophages, and fibro-adipogenic precursor cells were isolated using anti-FA/80-PE (Biolegend, #123110), anti-CD31-e450 (eBiosciences, #48-0311-82), anti-CD45-APC/Cy7 (Biolegend, #103116), and anti-Sca1-PE/Cy5 (Biolegend, #012463). Cell sorting was done with Aria III (BD Biosciences) and BD FACSDIVA software from BD Biosciences.

Live video microscopy

Cells isolated by FACS were plated overnight on a 24-well glass bottom plate (P24G-0-10-F; MatTek) coated with Matrigel (BD Biosciences #354234) and placed in an incubator in pre-equilibrated medium (1:1 DMEM Glutamax:MCDB (Sigma-Aldrich), 20% fetal calf serum (FCS; Biowest S1860). The plates were then incubated at 37 °C, 5% CO₂ (Zeiss, Pecon). A Zeiss Observer.Z1 connected with a LCI PlnN × 10/0.8 W phase II objective and AxioCam camera piloted with AxioVision was used. Cells were filmed for up to 5 days, and images were taken every 30 min with bright field and phase filters and MozaiX 3X3 (Zeiss).

In vivo angiogenesis assay

To assess the residual capacity of endothelial cells to respond to a normal or modified CXCL12 signaling gradient, attractor cells (SCs), which have better angiogenic properties than others as previously described [15], from *Tg:Pax7nGFP* WT and KI mice were FACS isolated and culture expanded in 22 µm filtered 1:1 DMEM Glutamax (Gibco): MCDB (Sigma-Aldrich; M6770) containing 20% fetal bovine serum (FBS), plated on Matrigel (BD Biosciences; #354234). Cells were grown in an incubator (37 °C, 5%, CO₂).

Cold Matrigel (BD Biosciences; #354234) was mixed with myoblasts (7.10⁵ cells/mL). Mice were anaesthetized using isoflurane, and cold Matrigel (0.5 mL) was injected into the abdominal subcutaneous tissue. After 21 days, mice were euthanized and Matrigel plugs were removed and fixed in JB fixative (zinc acetate 0.5%, zinc chloride 0.05%, and calcium acetate 0.05% in Tris buffer at pH = 7) for 48 h and then embedded in low-melting point paraffin (poly ethylene glycol distearate; Sigma, USA). Five-micrometer-thick paraffin sections were deparaffinized in absolute ethanol, air dried, and used for HE staining and immunolabeling for CD31/Desmin.

Blood vessel formation into the plug was quantified in one section per plug, by counting the number of cells per square millimeter using ImageJ software. Images were obtained on Leica® TCS SPE DM 2500 and LAS AF software (Leica®, Germany) microscope and expressed as mean values of 3–4 mice per condition.

Vascular functionality imaging

Perfusion imaging was performed prior to and 28 days post-FI by dynamic contrast enhancement MRI (DCE-MRI). Briefly, a bolus of contrast agent, gadoterate meglumine, was injected intravenously and followed by T1-weighted MRI imaging for more than 9 min.

The data were analyzed using Tofts/Kety model, providing an estimated blood flow.

Microarray analysis

RNA's quality and concentration of satellite cells (GFP+) and endothelial cells (GFP+) respectively sorted by FACS from TA of *Tg:Pax7nGFP* and *Flk1^{GFP/+}* WT and KI mice were assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent). RNA (RIN > 5) was processed and hybridized on a GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix).

Raw data (.CEL files) were read into the R language and environment for statistical computing (version 3.4.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.R-project.org/>) using Rstudio (version 1.0.153; Rstudio, Boston, USA; <https://www.rstudio.com/>) and the affy package (version 1.54.0). Preprocessing and quality control was performed by using the oligo package version 1.40.2.

Array data were normalized using the Robust Multi-array Average (RMA) method and summarized by median polish.

Affymetrix probe identifiers were mapped to Entrez Gene identifiers using *mogene20sttranscriptcluster.db* package (version 8.6.0), and log-transformed intensities yielded by the RMA process were averaged per Entrez Gene IDd, producing 19,685 unique identifiers.

Corresponding Gene Ontology Biological Pathways (GOBP) were retrieved using *gage* package (version 2.26.1). In each cell type, for each GOBP, the null hypothesis was an absence of CXCL12 mutation effect, that is, a repartition of the between-group rank-test statistic of genes belonging to that GOBP following the same repartition that the overall gene between-group rank-test statistics.

Non-parametric rank tests were separately performed per cell type to test for a mutation effect, using the Generally Applicable Gene-Set/Pathway Analysis in *gage* package.

For a given GOBP, CXCL12 mutation effect was considered significant below a cutoff q value of 0.1 (q value resulting from the Benjamini-Hochberg procedure). The lists of significantly affected GOBP were simplified to GO-slim generic terms with *GSEABase* package (version 1.38.2).

RTqPCR

Total RNA was isolated from cells using the RNeasy Micro kit (Qiagen) and reverse transcribed using Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen). RTqPCR was performed using Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and the rate of dye incorporation was monitored using the StepOne Plus RealTime PCR system (Applied Biosystems). Two biological replicates were used for each condition. Data were analyzed by StepOne Plus RT PCR software v2.1 and Microsoft Excel. Rpl13 transcript levels were used for the normalization of each target ($= \Delta\text{CT}$). RTqPCR CT values were analyzed using the $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$ method. The primer sequences used are listed in Additional file 1: Table S1.

Scanning electron microscopy

Samples were fixed at 37 °C in 0.05% glutaraldehyde and 2% PFA in 0.2 M Hepes for 15 min followed by fixation in 4% PFA in 0.2 M Hepes for 15 min. Samples were post-fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 °C, washed three times for 5 min in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2), treated for 1 h with 1% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, and then rinsed in distilled water. Samples were dehydrated through a graded series of 25, 50, 75, and 95% ethanol solutions for 5 min and for 10 min in 100% ethanol

followed by critical point drying with CO₂. Samples were sputtered with a 10-nm gold/palladium layer and were observed in a JEOL JSM-6700F field emission scanning electron microscope at a voltage of 5 kV. Pericytes and endothelial cells were identified as described by Sims [16].

Statistical analysis

Unless specified, the data are expressed as mean \pm SEM. When stated, the percentile 95% confidence intervals were calculated by bootstrapping the statistic using R (3.4.1) *boot* package. Statistical analysis was performed using GraphPad software (Prism, CA, USA) with the Mann-Whitney test or Wilcoxon signed rank test; $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Microarray data are presented in the form of volcano plots (integrating log₂ fold values and multiple-test adjusted probabilities) and as heat map plots, generated in R studio.

Results

CXCL12 KI mice resting muscle has a less stabilized vasculature

To investigate the muscle morphology in the CXCL12^{Gagtm/-Gagtm} knock-in (KI) mice [14], sagittal cross sections with hematoxylin-eosin (HE) staining of 8-week-old KI mice were performed. The stained cross sections did not reveal any malformation when comparing the KI mice to the C57Bl/6 mice (WT) (Fig. 1a, b). Specifically, extensive histological analyses on the skeletal muscle sections did not show any major differences between the WT and the KI mice. Tibialis anterior (TA) cross sections stained by HE showed muscle fascicles surrounded by a thin layer of perimysium individually separating each fiber with peripherally located nuclei (Fig. 1c, d). No differences were observed in either the number of the fibers nor the size of the fibers (Additional file 2: Figure S1A and S1B). In addition, the histological visualization of collagen I and III fibers by Sirius Red staining in the KI mice revealed typical organization of the connective tissues inclusive of the endomysium, the perimysium, and the epimysium layers (Fig. 1e, f; Additional file 2: Figure S1C). These data were confirmed by immunostaining against laminin, which is a component of the muscle basal lamina. Both the KI mice and the WT mice showed no abnormalities (Fig. 1g, h).

Next, to investigate the vasculature of the skeletal muscle, we assessed the number of capillary sections per myofiber (called myofiber “capillarization”) using laminin/CD31 immunolabeling (Fig. 1g, h). An insignificant increase in the capillarization of the myofibers in the TA from the KI mice over the WT mice was observed ($p = 0.09$; Additional file 2: Figure S1D). Using Flk1^{GFP/+}

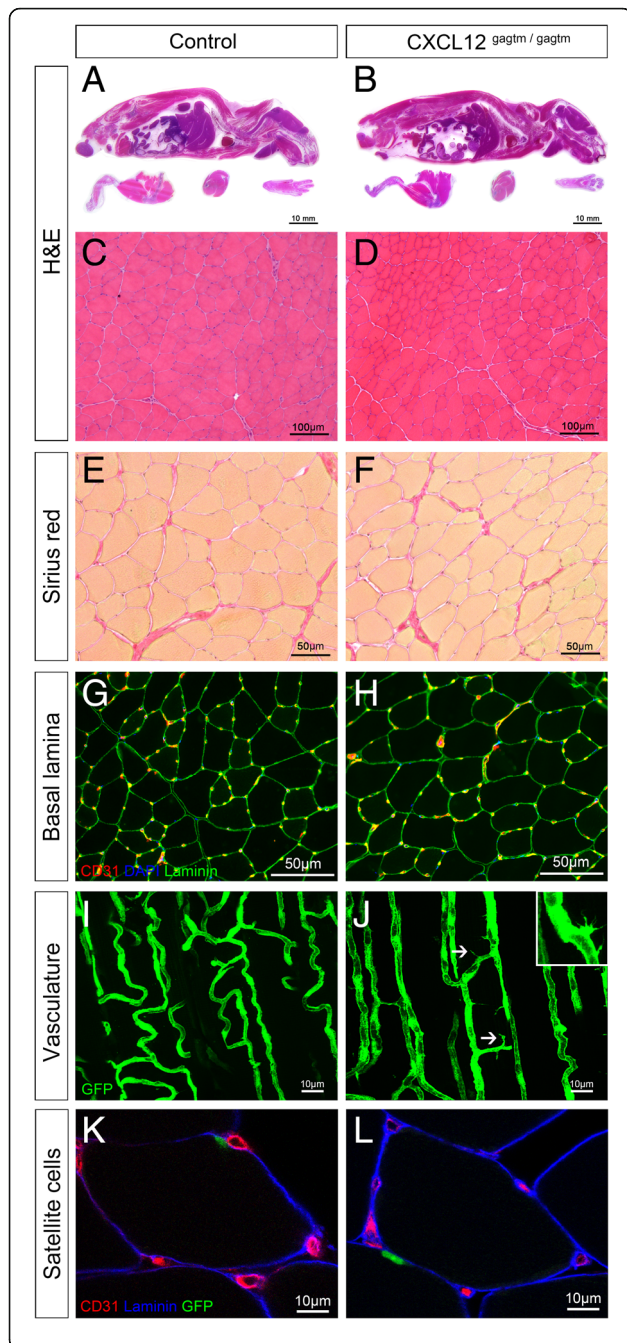


Fig. 1 CXCL12^{Gagtm/Gagtm} mice show no systemic developmental or morphological defects but signs of vascular destabilization. **a, b** Representative pictures of HE-stained sagittal cross section of 8-week-old **a** WT (C57Bl6) mice and **b** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}) mice. Scale bar represent 10 mm. Muscle morphology comparison between the KI and the WT mice on **c, d** HE stained tibialis anterior (TA) sections from **c** WT and **d** KI mice. Scale bar represent 100 μ m. **e, f** Sirius Red (collagen deposits) staining in TA sections from **e** WT and **f** KI mice. Scale bar represent 50 μ m. **g, h** Endothelium (CD31, red) and muscular basal lamina (laminin, green) immunolabeling counterstained for nuclei (DAPI, blue) in TA sections from **g** WT and **h** KI mice. Scale bar represent 50 μ m. **i, j** Longitudinal blood vessel organization of sectioned TA from **i** WT (Flk1^{GFP/+}) and **j** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm};Flk1^{GFP/+}) mice. White arrowheads point towards the sprouting structures. Scale bar represent 10 μ m. **k, l** SC (Pax7-GFP, green) location, basal lamina (laminin, blue), and vessels (CD31, red) immunostained in TA sections from **k** WT (*Tg:Pax7nGFP*) and **l** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm};Pax7nGFP) mice. Scale bar represent 10 μ m ($n = 3$ animals per condition). All the experiments were repeated independently two times

(WT-Flk1) [17] and CXCL12^{Gagtm/Gagtm};Flk1^{GFP/+} (KI-Flk1) mice, which have green fluorescent endothelial cells (ECs), cytometric analysis also showed a trend to an increase in the number of muscle ECs in the KI-Flk1 mice when compared to the WT-Flk1 mice ($p = 0.07$; Additional file 2: Figure S1E). Moreover, 3D imaging analysis revealed a well-organized vascular network in both the KI-Flk1 and the WT-Flk1 mice (Fig. 1i, j). Interestingly, we observed the presence of tip cells only within the resting muscle of the KI mice (Fig. 1j, inset), associated with a significant increase in the number of blood vessels sprouting compared to the muscle of WT mice (Additional file 2: Figure S1F).

To characterize SCs during homeostasis, we used *Tg:Pax7nGFP* (WT-Pax7) and CXCL12^{Gagtm/Gagtm};Pax7nGFP (KI-Pax7) mice in which the GFP reporter gene marks all of the SCs [18]. Histological analysis of the TA sections showed that the WT and the KI SCs were both located between the sarcolemma and the laminin-labeled basal lamina and were close to the CD31-labeled vessels (Fig. 1l, h; Additional file 2: Figure S1G). Additionally, both of the histological and the cytometric analyses showed that the numbers of the SCs in the TA were not different between the WT and the KI mice (Additional file 2: Figure S1H and S1I).

Since the organization of the connective tissues and the muscles fibers, including the SCs, was maintained, one can conclude that the disruption of the CXCL12/HS interactions did not result in major morphological modifications in the resting skeletal muscle. In contrast, the vascular structures in the KI mice displayed some abnormalities, which could reflect the destabilization of the vascular network by active angiogenesis due to sprouting.

The unchallenged SCs retain their adaptive behavior despite transcriptomic changes induced by the CXCL12 mutation

To further investigate whether the CXCL12 mutation could affect the behavior of SCs at homeostasis, we performed a genome-wide microarray analysis on FACS-sorted SCs from the uninjured TA of WT-Pax7 and KI-

Pax7 mice (Fig. 2a–c) confirmed by specific RTqPCR on the most up- and downregulated genes (Additional file 3: Figure S2A to S2C). The cell-type pathways involved in skeletal muscle development were specifically downregulated in the KI SCs, although no abnormalities were observed in the resting muscle (Fig. 1b, j). Strikingly, we showed that when compared to the WT mice, the cell

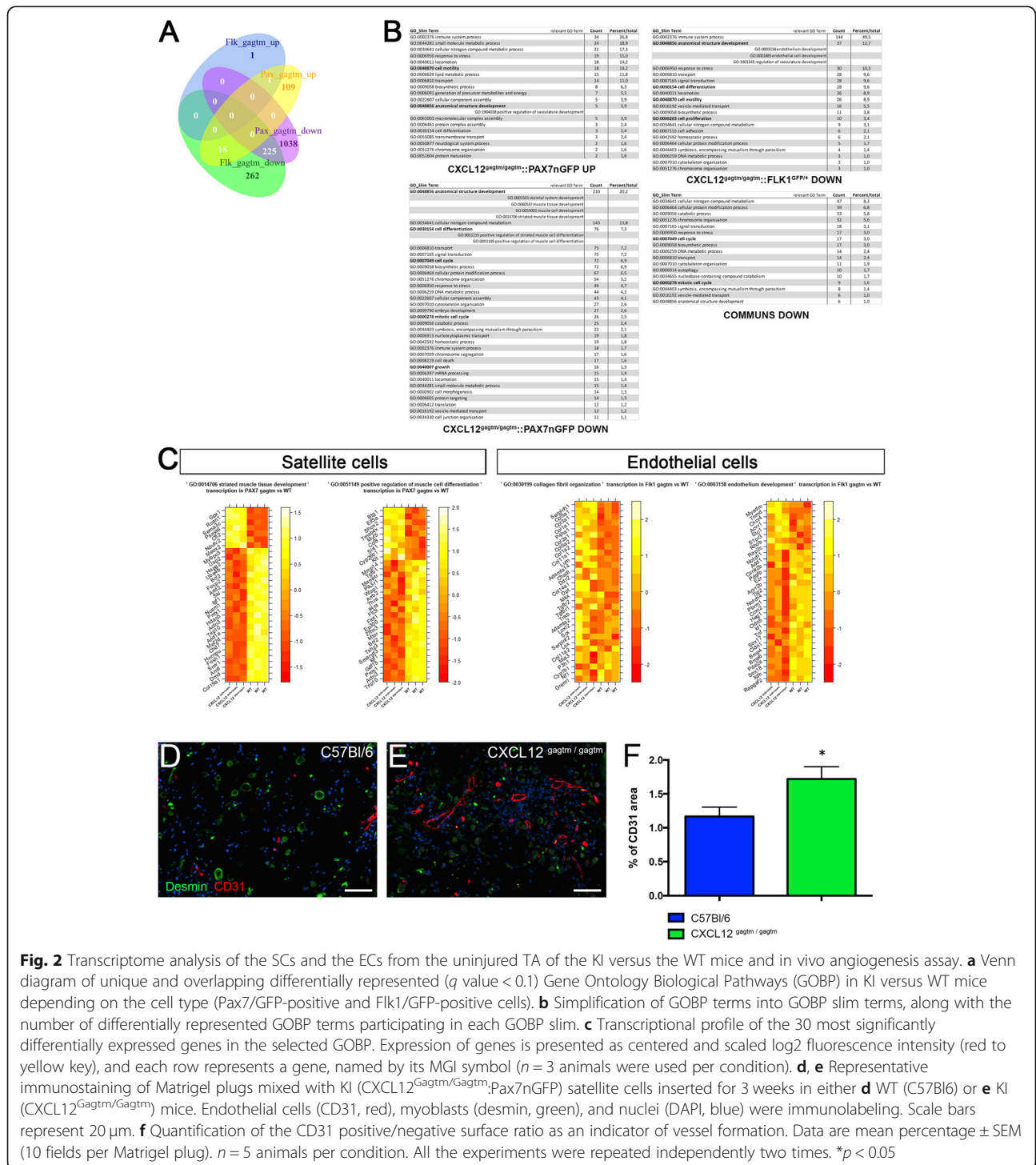


Fig. 2 Transcriptome analysis of the SCs and the ECs from the uninjured TA of the KI versus the WT mice and in vivo angiogenesis assay. **a** Venn diagram of unique and overlapping differentially represented (q value < 0.1) Gene Ontology Biological Pathways (GOBP) in KI versus WT mice depending on the cell type (Pax7/GFP-positive and Fik1/GFP-positive cells). **b** Simplification of GOBP terms into GOBP slim terms, along with the number of differentially represented GOBP terms participating in each GOBP slim. **c** Transcriptional profile of the 30 most significantly differentially expressed genes in the selected GOBP. Expression of genes is presented as centered and scaled log₂ fluorescence intensity (red to yellow key), and each row represents a gene, named by its MGI symbol ($n = 3$ animals were used per condition). **d, e** Representative immunostaining of Matrigel plugs mixed with KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}:Pax7nGFP) satellite cells inserted for 3 weeks in either **d** WT (C57Bl/6) or **e** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}) mice. Endothelial cells (CD31, red), myoblasts (desmin, green), and nuclei (DAPI, blue) were immunolabeling. Scale bars represent 20 μ m. **f** Quantification of the CD31 positive/negative surface ratio as an indicator of vessel formation. Data are mean percentage \pm SEM (10 fields per Matrigel plug). $n = 5$ animals per condition. All the experiments were repeated independently two times. * $p < 0.05$

cycle and cell differentiation-associated pathways were downregulated in the KI SCs. Conversely, the positive regulatory pathways of vasculature development including the CXCR4-related pathway were upregulated in the KI SCs.

To confirm whether the transcriptomic modifications induced by the CXCL12 mutation could modify the SCs' behavior, we assessed, *in vitro*, the parameters of the FACS-sorted SCs. Video microscopy did not show any difference between the WT-Pax7 and the KI-Pax7 SCs with respect to the velocity (Additional file 3: Figure S2D), the onset of the first cell division (Additional file 3: Figure S2E), and the division rate (Additional file 3: Figure S2F). The percentage of MyoD+ (the SC activation marker) and Myogenin+ (the SC differentiation marker) cells explored at 2 days and at 4 days post-plating did not show any difference between the two types of SCs (Additional file 3: Figure S2G).

Overall, these results suggest that the CXCL12 mutation modifies, *in vivo*, the transcriptomic landscapes in SCs. However, the muscle development and the SC location are preserved, arguing for the existence of an effective coping mechanism during both embryogenesis and homeostasis. In addition, the intrinsic adaptive capacities of SCs including activation, proliferation, migration, or differentiation are maintained *in vitro*, suggesting that the CXCL12 mutation does not have a direct impact on the myogenic process.

ECs display an increase in the angiogenic response in resting muscle despite the downregulated transcriptomic changes induced by the CXCL12 mutation

Because the resting muscle had an altered vascular network (Fig. 1j), we investigated the impact of the CXCL12 mutation on the behavior of ECs during homeostasis. We therefore performed a genome-wide microarray analysis on FACS-sorted ECs from the uninjured TA of WT-Flk1 and KI-Flk1 mice confirmed by specific RTqPCR on the most up- and downregulated genes (Additional file 4: Figure S3A to S3C). Cell cycle and cell-differentiation-associated pathways were markedly downregulated in the KI ECs, as were the positive regulatory pathways for vasculature development (Fig. 2a–c). Surprisingly, when comparing the KI vs. the WT ECs, the organization and synthesis of collagen fibrils were the only upregulated pathway, with alpha1 chains of collagens I, II, III, and V being particularly upregulated (Fig. 2c).

To confirm the role of the CXCL12/HS disruption on EC behavior, we performed an *in vivo* angiogenesis assay using Matrigel plugs containing either KI-Pax7 or WT-Pax7 SCs grafted to either WT or KI recipient mice. In the Matrigel plugs containing the KI SCs grafted into the KI mice, the number of CD31-labeled vessels

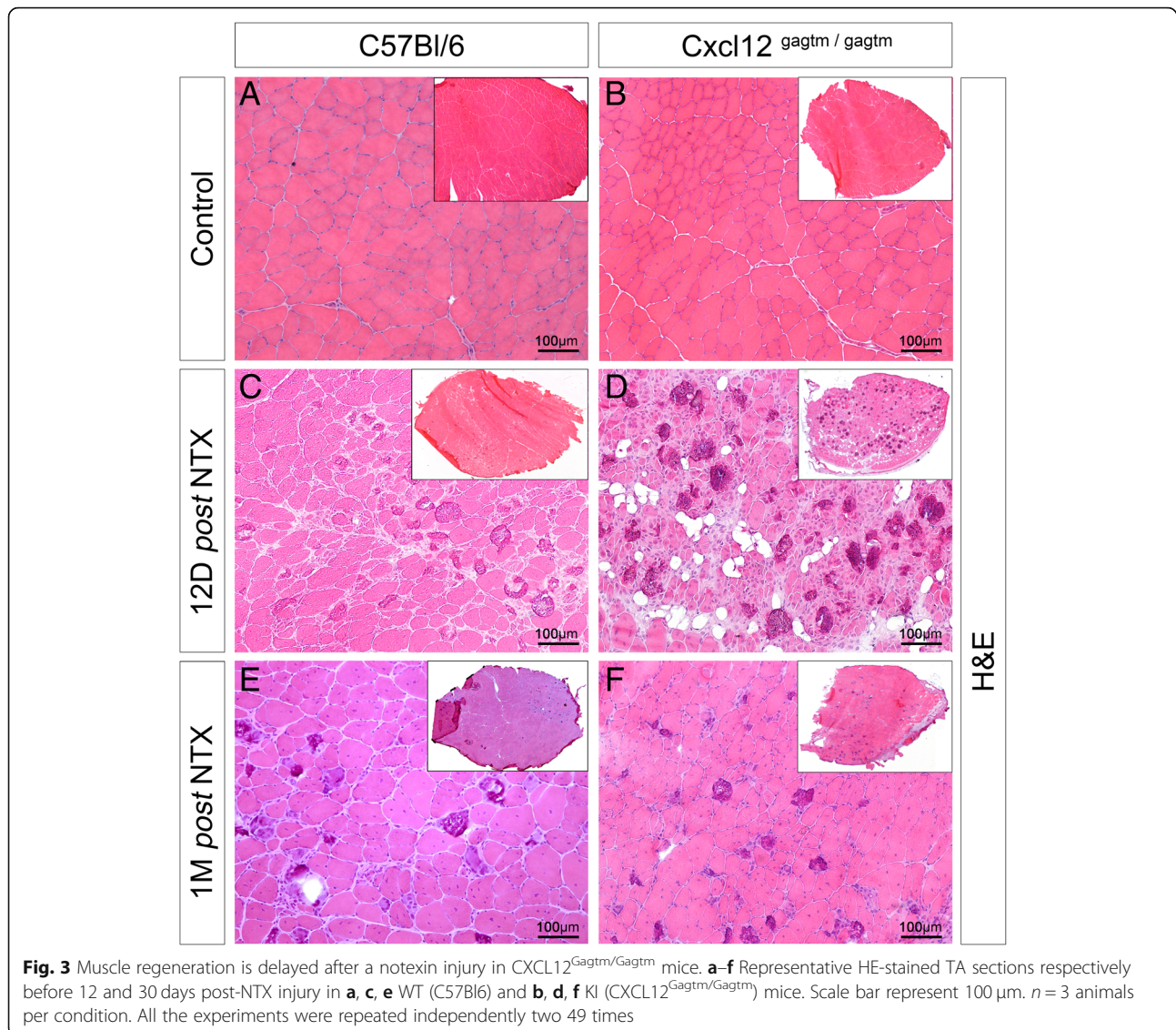
increased by 74.3% when compared to the WT mice ($p = 0.0025$; Fig. 2d–f). The newly formed vessels were functional as the lumen contained red blood cells but were strikingly misshaped in appearance (Additional file 4: Figure S3D). In addition, the percentage of CD31+ area was always higher in the Matrigel plugs containing the KI SCs grafted into the KI mice when compared to Matrigel plugs with the WT SCs grafted into either of the recipient mice (Additional file 4: Figure S3E). In contrast, we did not observe any difference in vessel formation whenever the WT SCs were used in the Matrigel plugs, in either the WT or the KI recipient mice (Additional file 4: Figure S3E).

Taken together, these results suggest that the CXCL12 mutation indirectly induced a downregulated transcriptomic landscape in ECs, although these cells exhibited an increased proangiogenic response. However, the genetic profile of the ECs indicated that the CXCL12 mutation may impact the regenerative response-associated gene expression in the KI ECs. To test this hypothesis, we studied the muscle regeneration in WT and KI mice.

The regenerative capacity of the CXCL12-mutated mice is delayed after a notexin injury

To investigate whether the CXCL12 mutation could have an effect during muscle regeneration, we began our investigation with a notexin (NTX) injection injury model that is less toxic for ECs and SCs [19]. At 12 days post-injury, the WT muscles showed partial regeneration. It was characterized by centrally nucleated small basophilic fibers that were associated with some peripheral multifocal calcium deposits, which replaced necrotic myofibers via a foreign body granulomatous reaction (Fig. 3c). Contrary to the WT muscles, the KI muscles displayed a delay in muscle regeneration with a significant increase in the number of calcium deposits (Additional file 5: Figure S4A and S4B) and with an unusual fat infiltration (Fig. 3d). One-month post-injury, the muscles from the WT and the KI mice were similarly regenerated with centrally localized nuclei (Fig. 3e, f) without any significant modification in the number of the fibers or in the size of the fibers (Additional file 5: Figure S4C and S4D). However, the KI muscles displayed a diminished increase in the myofiber's capillarization when compared to the WT group (Additional file 5: Figure S4E). Cytometric analysis revealed that both of the KI-Pax7 and the WT-Pax7 mice showed an increase in the number of SCs in the injured TA 1 month post-NTX injury (Additional file 5: Figure S4F).

The CXCL12 mutant mice exhibited a delay of muscle regeneration 12 days post-NTX injury, followed by a complete regeneration after 1 month post-injury.



Severe damage by freeze injury reveals a persistent

defect in the muscle regeneration of CXCL12 mutant mice

Next, we used a freeze injury (FI) model which induced a greater destruction of fibers, SCs, and vessels in the muscles. Twelve days post-FI, the WT mice showed a regeneration wave composed of necrotic fibers located at the superficial layer, infiltration of inflammatory cells into the intermediate layer, and regenerated myofibers in the deep layer of the tissue (Fig. 4e). Interestingly, in WT mice, we showed that total CXCL12 gene expression was upregulated at 12 days post-FI (mean expression relative to reference gene 0.06 [CI₉₅ 0.03–0.08] in uninjured, 1.90 [1.53–2.34] in FI mice, *p* = 0.03; Additional file 6: Figure S5A). Among the tested cell types, CXCL12 was specifically expressed by the fibro-adipogenic precursor cells (FAPs) and the ECs. In addition, the FAPs mainly expressed the isoform alpha of the CXCL12 gene in

contrast to the ECs that expressed the gamma isoform (Additional file 6: Figure S5B to S5D). One and two months post-FI, the muscle was fully regenerated in the WT mice (Fig. 4i, m). This specific timing of the muscle regeneration was not observed in the KI mice. At 12 days post-FI, the KI muscles showed no area of regeneration (Fig. 4f), had a larger area of fibrosis in the Sirius Red staining (*p* = 0.0021; Fig. 4g, q), and displayed an unusual fat infiltration visualized by Oil Red O staining (*p* = 0.047; Fig. 4h, r). Moreover, whereas mutation was not significantly associated with a difference in CXCL12 gene expression in uninjured mice (mean difference KI–WT – 0.03 [CI₉₅ – 0.06–0]; *p* = 0.27), this expression was significantly lower for KI mice post-FI as compared to their WT countertypes (mean difference KI–WT – 1.08 [CI₉₅ – 1.57 to – 0.65]; *p* = 0.007; Additional file 6: Figure S5A to S5D). These regenerative defects lasted up to 2 months post-FI

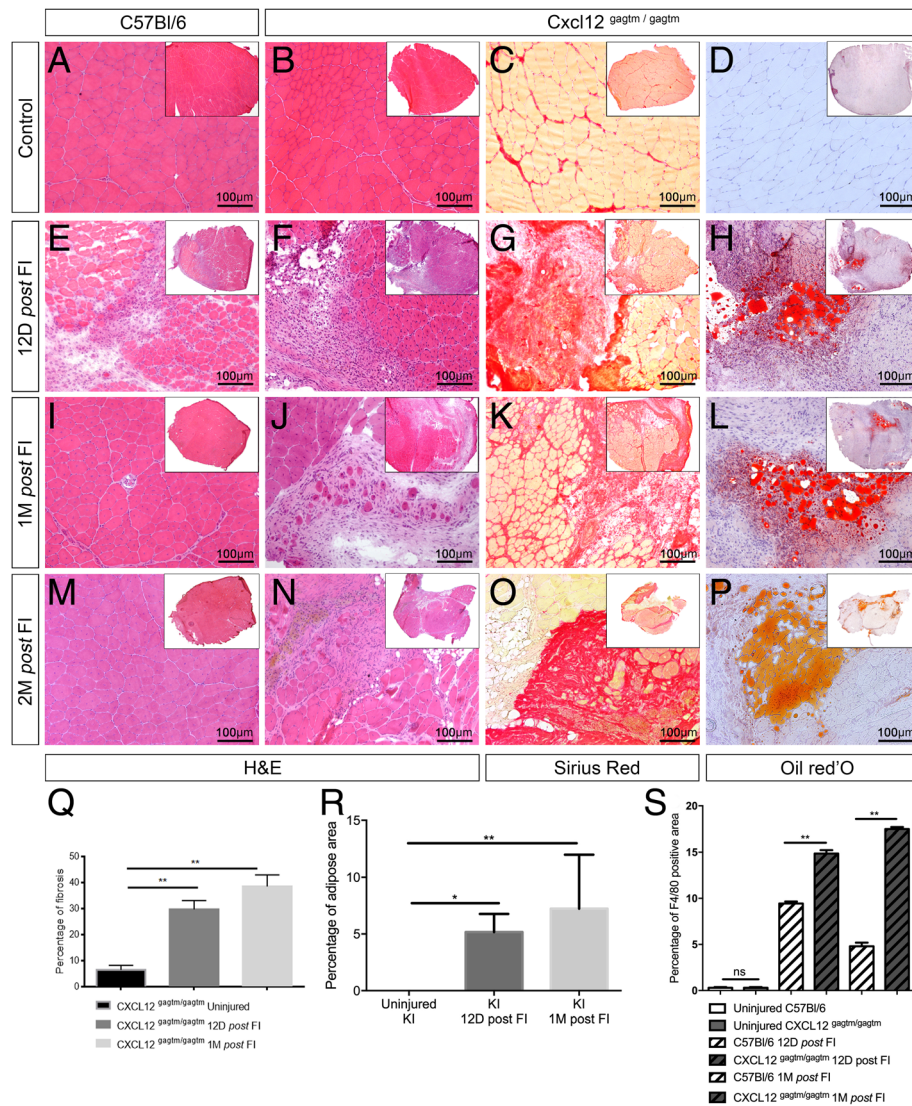


Fig. 4 Freeze injury induces an impaired muscle regeneration with a long-lasting fibro-adipogenic scar in CXCL12^{Gagtm/Gagtm} mice. Representative HE-stained TA sections respectively before 12, 30, and 60 days post-FI in **a, e, i, m** WT (C57Bl6) and **b, f, j, n** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}) mice. Scale bar represent 100 μ m. Representative fibrotic deposit staining (Sirius Red) of **c** resting, **g** 12, **k** 30, and **o** 60 days post-FI TA from KI mice. Scale bar represent 100 μ m. Representative adipocytic staining (Oil Red O) of **d** resting, **h** 12, **l** 30, and **p** 60 days post-FI of the TA from KI mice. Scale bar represent 100 μ m. **q** Fibrosis quantified with Sirius Red positive/negative surface ratio. The mean ratio \pm SEM is given for the injured TA from KI mice at three time points. **r** Adipose area quantified with Oil Red O positive/negative surface ratio. The mean ratio \pm SEM is given for the injured TA from KI mice at three time points. **s** Macrophages infiltration quantified by F4/80 positive/negative surface ratio. The mean ratio \pm SEM is given for injured TA from WT and KI mice at three time points. For all quantifications, $n = 5$ mice per condition and per time point and were repeated independently two times. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(Fig. 4j–l, n–p) with a progression of the fibrosis ($p = 0.0011$; Fig. 4q) and of the fat infiltration ($p = 0.0079$; Fig. 4r). The KI mice also exhibited an increase in macrophage (F4/80+ cells) infiltration 12 days post-FI when compared to the WT mice. This continued to increase in the KI mice 1 month post-FI, while they were transient in the WT mice ($p = 0.0079$; Fig. 4s). The muscle fibers were also affected in the KI mice at 1 month post-FI. Their size was reduced (Additional file 6: Figure S5F) and had a

trend of reduced number of capillaries (Additional file 6: Figure S5G). In addition, we observed a drastic decrease (-72%) in the number of SCs (Additional file 6: Figure S5H) in the KI muscles when compared to the WT muscles.

These results suggest that after a severe damage, the muscle regeneration capacity is severely impaired by the CXCL12 mutation. Specifically, this pathological repair affects all actors involved in muscle regeneration,

resulting in fibroadipose deposition and persistent immune cell infiltration, as well as a strong reduction in the number of SCs.

The unstable vascular network is dysfunctional in the absence of the CXCL12/HS interaction during muscle regeneration

To further study the impact of the CXCL12 mutation on the vascular network during muscle regeneration, we also performed a FI in WT-Flk1 and KI-Flk1 mice. One month post-FI, the KI-Flk1 mice exhibited vascular regeneration defects, including abnormal fusions forming large syncytia and atrophic vessels (Fig. 5a–f), associated with an increase in sprouting vessels number compared to the WT-Flk1 mice ($p = 0.005$; Additional file 7: Figure S6A).

To investigate the destabilization of the vascular network 1 month post-FI, we performed coupled immunostaining of ECs (CD31+) with perivascular cell labeling of pericytes (NG2+) and smooth muscle cells (α -SMA+). Regenerative zones in the KI mice showed no difference with those of the WT mice. We observed that each muscle fiber was surrounded mostly by capillary structures and rare arteriolar vessels associated with the expected pericytes and smooth muscle cells (Fig. 5g–j). Conversely, in the fibrotic regions observed only in the KI mice, large vascular structures were identified in the absence of close contact with perivascular cells (Fig. 5k). In addition, these vascular structures often appeared non-permeable, indicating a potentially functional defect (Fig. 5k).

To further confirm the abnormalities in vascular and perivascular structures post-FI, muscle samples were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). In the WT muscles, we observed the specific localization of a SC. It was located between the basal lamina and the myofiber and was close to an EC which was covered by a pericyte (Additional file 2: Figures S6B to S6D). In the KI muscles, the two different zones of regeneration were selected. In the regenerated area, the muscle ultrastructure was similar to the WT muscle (Additional file 7: Figure S6F). In contrast, in the non-regenerated area, the number of pericytes identified around the vessels was significantly reduced compared to the WT muscle ($p = 0.004$; Additional file 2: Figures S6G and S6H). The EC was also isolated from the other structures by a large accumulation of fibrotic tissue (Additional file 7: Figure S6G).

To identify the functional impact of the CXCL12 mutation on the vascular network, muscle vascularization was examined by DCE-MRI comparing the WT and KI mice (Fig. 5l to n). Despite vascular abnormalities at resting condition, no significant difference was found in any functional parameters of the resting muscles of the KI and the WT mice (Fig. 5l). One-month post FI

muscles from the KI mice exhibited a significant decrease in the perfusion parameters when compared to the WT mice ($p=0.01$; Fig. 5m and n). The blood flow between the injured and the contralateral muscle was lower in the KI group compared to the WT group (WT: 25.31 ± 16.8 mL/min/100mL KI: 17.02 ± 14.338 mL/min/100mL $p=0.04$) (data not shown).

These observations suggest that in the absence of the binding between CXCL12 and HS, the vascular network displayed local and heterogeneous destabilization during muscle regeneration. These abnormal vessels, having lost their cellular contact with the perivascular supporting cells, lead to a functional defect in muscle perfusion.

Discussion

Our data indicates that high-affinity CXCL12 binding to HS plays a critical role in muscle regeneration following severe injury. However, the interaction does not appear to be critical in mild injuries nor in limb morphogenesis. We showed that disruption of the CXCL12/GAG interactions leads to a loss in the regenerative capacity which involves vascular abnormalities and the persistence of fibroadipose tissue remodeling.

HS synthesis has been shown to increase and to be critical in muscle regeneration in mice [20] and in axolotl models [21]. Among the GAG binding moieties, the CXCL12 γ affinity for HS has been shown to be among the strongest ever reported for a protein [22]. This interaction has been proven to create concentration gradients crucial in the directional migration and the local retention of cells, as well as, enhancing the presentation of receptors and protecting ligands from degradation [23].

More specifically, the quantitative modulation of the CXCL12 signaling axis has already been shown to influence the kinetics and efficiency of muscle regeneration, and the volumetric muscle loss of age-associated cachexia [13, 24, 25]. CXCL12 has been shown to positively influence muscle repair by modulating SC migration [13, 24] and fusion [26] and by attracting non-muscle progenitor cells [24] with in vitro dose effects depending on the CXCL12 matrix adsorption [27]. To our knowledge, no studies have so far been conducted on the in vivo confirmation of the necessity of the CXCL12/HS binding during the muscle repair processes. Overall, the in vivo study on the CXCL12/GAG interactions which modulates a concentration gradient and/or the presentation of the molecule by the cell membrane during the skeletal muscle regeneration is a novelty.

As previously described, CXCL12^{Gagtm/Gagtm} mice reached the adult state and showed no morphological changes [14]. More specifically, the KI mice exhibited a normal histological organization of skeletal muscle. Although basal transcriptomic analysis of in vivo SCs

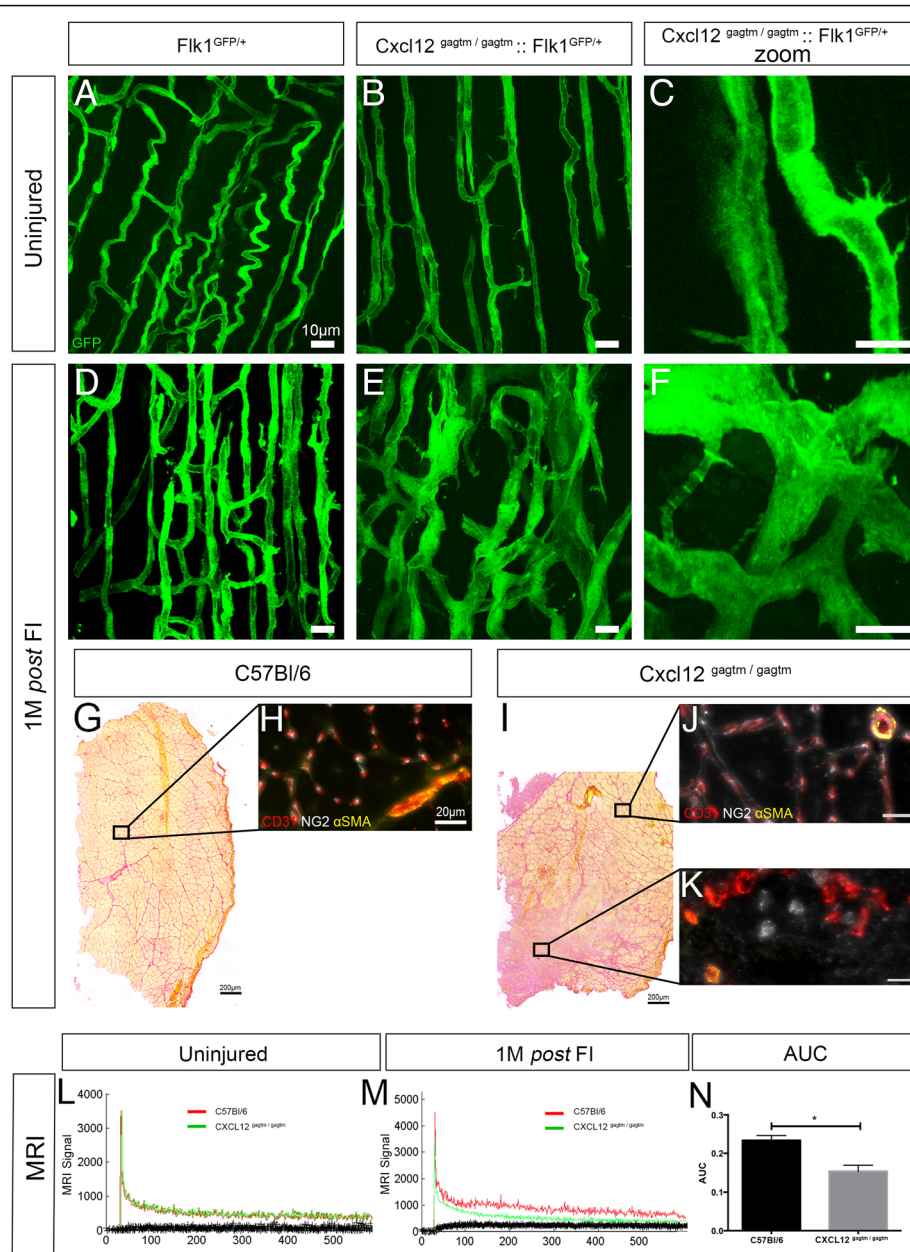


Fig. 5 The abnormalities of vascular structures are associated with an absence of close contact with perivascular cells and with a functional perfusion defect post-FI in the KI mice. **a–f** Longitudinal blood vessel organization of the TA respectively before and 30 days post-FI in **a, d** WT (Flk1^{GFP/+}) and **b, c, e, f** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm};Flk1^{GFP/+}) mice. Scale bar represent 10 μ m. $n = 3$ animals per condition and per time point. All the experiments were repeated independently two times. Representative Sirius Red staining 1 month post-FI of the TA from **g** WT (C57Bl6) and **i** KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}) mice. Scale bar represent 200 μ m. Immunostaining for ECs (CD31, red), pericytes (NG2, white), and smooth muscle cells (α -SMA, yellow) from the indicated zones of **h** injured TA from the WT, and **j** the regenerated or **k** the fibrotic TA from KI mice. Scale bar represent 20 μ m. $n = 3$ animals per condition. All the experiments were repeated independently two times. **l, m** Direct contrast enhancement MRI assessment of vascular functionality: vascular tracer signal intensity per number of acquisitions comparing one WT (C57Bl6) to one KI (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}) mouse **l** before and **m** after 1 month post-FI. **n** The mean area under curve (AUC) \pm SEM of vascular tracer intensity 1 month post-FI is given ($n = 6$ WT mice and $n = 7$ KI mice). * $p < 0.05$

revealed a dysregulation in major intracellular and developmental-related pathways, the SCs were normal in location and number. The SCs in vitro demonstrated the preserved abilities of migration, activation, proliferation,

and early differentiation. Although this in vitro phenotype has not been studied in exogenous CXCL12-free conditions, it is indicative of a lack of cumulative alterations in the KI SCs during muscle damage.

Contrary to the appearance of a normal phenotype of the KI SCs, the KI mice exhibited minor vascular abnormalities in the non-challenged muscle, including an increase in the number of sprouting vessels. These could be linked with the presence of tip cells, which could be a marker of unstable vessels. However, this increased muscle capillarization did not translate into an enhancement in limb perfusion in the angio-MRI of the uninjured KI mice, thereby hinting at an inefficient vascularization. Interestingly, we showed in an *in vivo* Matrigel plug assay that the KI vessels exhibited increased angiogenic capacity only when the KI SCs were used as bait. These results were contrasting with the transcriptomic analysis of the ECs from the uninjured KI mice, which revealed the downregulation of pathways involved in proliferation, differentiation, and motility. Conversely, no increase in neoangiogenesis in response to the WT SCs grafted in the KI mice could be found. This is observed despite other cells from the KI mouse being free to colonize the Matrigel plug and secrete mutated CXCL12. Although the potent interaction between the SCs and the ECs during *in vivo* angiogenesis assay has already been shown [15, 28, 29], the specific activation and response of the KI vessels only to the KI SCs, which are capable of producing and releasing mutated CXCL12, as we showed, or other CXCL12-regulated factors, remains to be explored.

To study the importance of the CXCL12/HS interaction during muscle regeneration, we chose two injury models differing in severity and tissue layer location. We have previously demonstrated in WT mice that NTX injury induced a reduced destruction of SCs and vessels in muscle compared to FI [19]. Contrasting to the remarkable regenerative capacity of the WT mice, the KI mice exhibited an impaired regenerative phenotype which was dependent on the severity of the injury model. In particular, the NTX-induced injury 12 days post-injury showed a broader disruption in tissue and was associated with a temporary adipogenic response in the KI mice. However, there was a similar adaptive response in the number of SCs in the KI and the WT mice. A comparable delay in the post-NTX muscle regeneration has also been described after the inhibition of the CXCL12/CXCR4 signaling with a CXCR4 antagonist [13]. Interestingly, severely FI muscles from the KI mice generated large fibrotic zones. This alteration was associated with the lack of an increase in the number of SCs in the KI mice. In addition, fibrosis is an active process which differs from the volumetric loss that is to be expected if the lack of efficiency of the regenerative myogenesis steps was the only process involved in the regeneration. We accordingly broadened the scope of our study to include cell types associated with fibrosis.

One striking observation in post-FI fibrotic zones was the infiltration of macrophages into the damaged areas.

This last observation apparently contradicts published data in which systemic administration of non-HS binding CXCL12 was shown to inhibit haptotactic leukocyte migration to sites of inflammation [30]. This discrepancy could result from design differences between the studies. In the reported study, the effect of single dose, after 24 h, of a mutated CXCL12 introduced intravenously into WT mice was studied. Conversely, in our studies, the persistent expression of a mutated chemokine and the assessment of macrophage infiltration 12 and 30 days post-injury were analyzed. The difference in the mutation of CXCL12 involved in both studies could also be an explanation. The mutated CXCL12 expressed by the KI mice in our studies has been shown to retain agonist potency without desensitizing CXCR4 [23], which was not the case in the other study.

The most salient feature of the pathological phenotype post-FI was the uncoordinated infiltration of abnormal vascular structures. Despite the apparently angiogenic-facilitating phenotype of the KI ECs, their adaptation to the local needs proved to be defective in the KI mice, as the grossly misshapen capillaries found 1 month post-FI associated with a decrease in perfusion efficiency in angio-MRIs. As previously reported when CXCL12 is overexpressed in models of limb ischemia, it supports neoangiogenesis by attracting EPCs and by increasing the number of newly formed vessels leading to an increase in blood flow [9]. In addition, CXCL12 also participates in vascular remodeling by recruiting inflammatory cells and by directly attracting smooth muscle cells [31, 32]. More specifically, the disruption of the CXCL12/GAG interaction also leads to a defect in angiogenesis and neovascularisation in a limb ischemia model, which can be rescued by the administration of exogenous CXCL12 γ [14].

Surprisingly, the transcriptomic assay of the uninjured ECs from the KI mice suggested the possibility that they might be heavily primed towards extracellular matrix synthesis, a feature that only appears after severe injury. This phenotype could be explained by a dysregulation of the endothelial pericyte and the endothelial smooth muscle cell interactions. Indeed, pericytes participate in vascular regulation and stabilization [33], but are also regulated by the endothelium. Pericytes have been shown to be one of the major sources of collagen-producing cells in a kidney fibrosis model [34]. The alteration of their interactions has been established in both the capillary rarefaction and in fibrosis induction [35]. Interestingly, it has been shown that the increased levels of CXCL12 α and the low HS binding isoform of CXCL12 participate in the kidney and myocardial fibrosis. It has been shown to directly induce a collagen-synthesizing phenotype on perivascular cells, a phenotype amenable by CXCR4 antagonist therapy [36].

Additionally, the direct stimulating role of CXCL12 in the expression of matrix proteases could be hindered and the fibrosis could result not only from an increase in collagen expression, but also from its non-degradation [13, 24].

Finally, it has been shown that chemokines cooperate by directly modifying the availability and gradient formation of each other through the competition for GAG adhesion. The exclusion of CXCL12 from this competition could lead the other chemokines to be perceived more strongly by their receptors revealing non-CXCL12 effects [37].

Conclusion

The present study shows that CXCL12 is crucial for proper muscle regeneration. We highlight that this homing molecule could play an important role in drastic muscle injuries and that the regeneration defect could be due to an inefficient angiogenesis. Endothelial cells' transcriptional priming towards extracellular matrix synthesis in uninjured KI mice could represent another facet of vascular involvement in fibrosis, if further experiments were to confirm the actual extracellular matrix molecule expression. Whether comparable skews towards fibrosis are observed in otherwise regenerating models such as hepatectomy following CXCL12/HS interaction disruption should also warrant further studies. Finally, understanding whether unbound CXCL12 alone triggers a profibrotic activity, HS-bound CXCL12 an antifibrotic activity, or whether an indirect mechanism is at play such as the displacement from HS disrupting the pattern of bound molecules could offer new insight in the occurrence of pathological scarring.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0210-5>.

Additional file 1: Table S1. Oligonucleotide primers for RTqPCR, Related to Figures 5, S2, S3.

Additional file 2: Figure S1. (Related to Figure 1). Quantitative histological and cytometric parameters of the resting muscle from WT and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Quantification of (A) fibers number and (B) fibers diameter by Hematoxylin-eosin staining in the uninjured TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (C) Quantification of Sirius Red positive/negative surface ratio. The mean ratio \pm SEM (3 sections per mice, 10 images per sections) is given for the uninjured TA from KI (CXCL12Gagtm/Gagtm) mice. (D) Quantification of vessels number by CD31 immunostaining in the uninjured TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (E) Quantification of GFP-positive cells by FACS analysis from both the TAs of WT (*Fik1GFP/+*) vs. KI (CXCL12Gagtm/Gagtm :: *Fik1GFP/+*) mice. (n=5 mice per condition). (F) Quantification of the sprouting vessels number in the resting muscle of WT (*Fik1GFP/+*) and KI (CXCL12Gagtm/Gagtm :: *Fik1GFP/+*) mice (n=5). Quantification of number of SCs by Pax7/GFP immunostaining (G) or by FACS analysis (H) in the uninjured TA from

WT (*Tg:Pax7nGFP*) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice (n=5 mice per condition). Data are given as the mean \pm SEM. **** p < 0.0001.

Additional file 3: Figure S2. (Related to Figure 2). CXCL12gagtm/gagtm and WT satellite cells show identical behavior. (A) Heat map of the three most up- and down-regulated genes identified by the genome-wide microarray analysis on FACS-sorted SCs from the uninjured TA of WT-Pax7 (n=3) and KI-Pax7 (n=3) mice. Expression of genes is presented as centered and scaled log2 fluorescence intensity (red to yellow key), each row represents a gene, named by its MGI symbol. Confirmation by specific RTqPCRs for the three most up-regulated genes (B) and the three most down-regulated genes (C). Data are represented as the fold change of expression in KI SCs (n=5) compared to WT SCs (n=5) with the use of Wilcoxon signed rank test. SCs from (n=3) WT (*Tg:Pax7nGFP*) and (n=3) KI (CXCL12Gagtm/Gagtm::Pax7nGFP) were sorted by FACS and plated to assess their behavior by live videomicroscopy: (D) the velocity, (E) the onset first cell division and (F) the division rate. (n=100 cells counted). (G) Quantification by immunostaining 2 days *post* plating of percentage of MyoD and Pax7 population in WT vs KI SCs and 4 days *post* plating of percentage of Myogenin and Pax7 population in WT vs KI SCs (n=3 mice per condition and per time point). Data are given as the mean \pm SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01.

Additional file 4: Figure S3. (Related to Figure 2). KI ECs display an increased angiogenic response. (A) Heat map of the three most up- and down-regulated genes identified by the genome-wide microarray analysis on FACS-sorted ECs from the uninjured TA of WT-Fik1 (n=3) and KI-Fik1 (n=3) mice. Expression of genes is presented as centered and scaled log2 fluorescence intensity (red to yellow key), each row represents a gene, named by its MGI symbol. Confirmation by specific RTqPCRs for the three most up-regulated genes (B) and the three most down-regulated genes (C). Data are represented as the fold change of expression in KI ECs (n=5) compared to WT ECs (n=5) with the use of Wilcoxon signed rank test. (D) Representative immunostaining of matrigel plugs mixed with KI (CXCL12Gagtm/Gagtm::Pax7nGFP) satellite cells inserted for 3 weeks in KI (CXCL12Gagtm/Gagtm) mice with endothelial cells (CD31, red) and myoblasts (Desmin, green). Scale bars represent 10 μ m. (E) Quantification of the CD31 positive/negative surface ratio in matrigel plugs mixed with the KI (CXCL12Gagtm/Gagtm::Pax7nGFP) or the WT (*Tg:Pax7nGFP*) SCs inserted for 3 weeks in either the WT (C57Bl6) or the KI (CXCL12Gagtm/Gagtm) mice. Data are mean percentage \pm SEM (10 fields per matrigel plug). Five animals (n=5) were used per condition and were repeated independently two times. Data are given as the mean \pm SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01.

Additional file 5: Figure S4. (Related to Figure 3). Quantitative histological and cytometric parameters of the muscle one month *post* NTX injury in the WT and the CXCL12Gagtm/Gagtm mice. (A) Quantification of calcium deposits number by Von Kossa staining in 12 days and one month *post* NTX injured TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (B) Representative Von Kossa stained TA section 12 *post* NTX injury in KI (CXCL12Gagtm/Gagtm) mice. Scale bar represent 100 μ m. Quantification of (C) fibers number and (D) fibers diameter by Hematoxylin-eosin staining in uninjured and *post* NTX injured TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (E) Quantification of vessels number by CD31 immunostaining in the uninjured and the *post* NTX injured TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (F) Quantification of GFP-positive cells by FACS analysis per TA of the uninjured and the *post* NTX injured WT (*Fik1GFP/+*) vs. KI (CXCL12Gagtm/Gagtm :: *Fik1GFP/+*) mice. (n=5 mice per condition). Data are given as the mean \pm SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Additional file 6: Figure S5. (Related to Figure 4). Quantitative histological and cytometric parameters of the muscle one month *post* FI in WT and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. RTqPCR gene expression in FACS-sorted MPs, FAPs, SCs, ECs from TA muscle without injury and TA 12 days *post* FI from WT-Pax7 and KI-Pax7 with relative expression, represented as a log2, of total CXCL12 gene (A), alpha CXCL12 isoform gene (B), beta CXCL12 isoform gene (C) and gamma CXCL12 isoform gene (D). The data

are represented in Log2 and n=3 animals per condition for uninjured mice, n=5 animals for injured WT-Pax7 mice and n=6 animals for injured KI-Pax7 mice. Quantification of (E) the number of fibers and (F) the fiber's diameter by Hematoxylin-eosin staining in the uninjured and *post* FI TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (G) Quantification of the number of vessels by CD31 immunostaining in the uninjured and the *post* FI injured TA from WT (C57Bl6) and CXCL12Gagtm/Gagtm mice. Three animals (n=3) were used per condition and were repeated independently two times. (H) Quantification of GFP-positive cells by FACS analysis per the TA of uninjured and *post* FI injured WT (*Flk1GFP/+*) vs. KI (CXCL12Gagtm/Gagtm :: *Flk1GFP/+*) mice. (n=5 mice per condition). Data are given as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Additional file 7: Figure S6. (Related to Figure 5). Quantitative histological and ultrastructure parameters of the vascular network of muscle one month *post* FI in WT and KI mice. (A) Quantification of the sprouting vessels number one month *post* FI in the muscle of WT (*Flk1GFP/+*) and KI (CXCL12Gagtm/Gagtm :: *Flk1GFP/+*) mice (n=5). (B and E) Scanning Electron Microscopy (SEM) sample were selected according to Sirius Red staining. Scale bar represent 200 μ m. (C and D) A set of representative images of a satellite cell (SC); a myofiber (MF); an endothelial cell (EC); a pericyte (PC) from WT (C57Bl6) muscle. Scale bar represent 1 μ m. (F-G) Representative images of a SC, a MF a EC and a PC from two different zones selected on Sirius Red section in KI (CXCL12Gagtm/Gagtm) muscles: (F) in a fully regenerated area and (G) in the non-regenerated zone. Scale bar represent 1 μ m. (H) Number of pericytes identified around vessels in the non-regenerated zone of KI muscle compared to WT muscle one month *post* FI. Ten fields including at least one vessel were randomly counted on each TA section for each condition (n=3 animals per condition). Data are given as the mean \pm SEM. $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Abbreviations

CXCR4: CXC chemokine receptor type 4; CXCR7: CXC chemokine receptor type 7; DCE-MRI: Dynamic contrast enhancement magnetic resonance imaging; EC: Endothelial cells; EPCs: Endothelial progenitor cells; FAPs: Fibro-adipogenic precursor cells; FBS: Fetal bovine serum; FI: Freeze injury; GAG: Glycan moiety of proteoglycans; GOBP: Gene Ontology Biological Pathways; HE: Hematoxylin eosin; HS: Heparan sulfates; KI: Knock-in; MPs: Macrophage; NTX: Notexin; SCs: Satellite cells; SEM: Scanning electron microscopy; TA: Tibialis anterior; WT: Wild-type

Acknowledgements

The authors thank Franck Verdonk, Sabine Maurin, Johan Bedel, and Magali Tichit from the histology service of Institut Pasteur for their excellent technical support. Authors also thank the PFC, Maryse Moya-Nilges from the UBI of the Institut Pasteur, and MRI staff of the HEGP.

Authors' contributions

DH contributed to the data collection, the analysis, the interpretation, and the manuscript writing. MF and AB established the model and performed the tests. DH and AB performed the recordings. MF and PR revised the manuscript. PR and FC designed and supervised the research and the revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was financially supported by AFM-vaincre les myopathies, Fondation "Les Gueules Cassées," Institut Pasteur, and Région Ile de France.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All procedures in this study were approved by the Animal Care and Use Committee at the Institut Pasteur (CETEA 01332.01).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Experimental Neuropathology Unit, Institut Pasteur, 75015 Paris, France. ²Viral Pathogenesis Unit, Institut Pasteur, 75015 Paris, France. ³Service Hospitalo-Universitaire de Psychiatrie, Centre Hospitalier Sainte Anne, 75014 Paris, France. ⁴Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France. ⁵Service Hospitalo-Universitaire de Neuropathologie, Centre Hospitalier Sainte Anne, 75014 Paris, France.

Received: 12 March 2019 Accepted: 5 September 2019

Published online: 18 September 2019

References

- Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;72:19–32.
- Horsley V, Pavlath GK. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs.* 2004;176:67–78.
- Moyle LA, Tedesco FS, Benedetti S. Pericytes in muscular dystrophies. In: *Advances in experimental medicine and biology*; 2019. p. 319–44.
- Rai M, Nongthomba U, Grounds MD. Skeletal muscle degeneration and regeneration in mice and flies. *Curr Top Dev Biol.* 2014;108:247–81.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006;25:977–88.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia.* 2006;20:1915–24.
- Monneau Y, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells. *J Leukoc Biol.* 2016;99:935–53.
- Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* 2007;28:299–307.
- Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 α enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation.* 2004;109:2454–61.
- Unoki N, Murakami T, Nishijima K, Ogino K, van Rooijen N, Yoshimura N. SDF-1/CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3362–71.
- Wang L, Guo S, Zhang N, Tao Y, Zhang H, Qi T, Liang F, Huang Z. The role of SDF-1/CXCR4 in the vasculogenesis and remodeling of cerebral arteriovenous malformation. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:1337–44.
- De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood.* 2004;104:3472–82.
- Bobadilla M, Sainz N, Abizanda G, Orbe J, Rodriguez JA, Páramo JA, Prósper F, Pérez-Ruiz A. The CXCR4/SDF1 axis improves muscle regeneration through MMP-10 activity. *Stem Cells Dev.* 2014;23:1417–27.
- Rueda P, Richart A, Récalde A, Gasse P, Vilar J, Guérin C, Lortat-Jacob H, Vieira P, Baleux FC, Chretien F, et al. Homeostatic and tissue repair defaults in mice carrying selective genetic inactivation of CXCL12/ proteoglycan interactions. *Circulation.* 2012;126:1882–95.
- Latroche C, Weiss-Gayet M, Muller L, Gitiaux C, Leblanc P, Liot S, Ben-Larbi S, Abou-Khalil R, Verger N, Bardot P, et al. Coupling between myogenesis and angiogenesis during skeletal muscle regeneration is stimulated by restorative macrophages. *Stem Cell Reports.* 2017;9:2018–33.
- Sims DE. The pericyte—a review. *Tissue Cell.* 1986;18:153–74.
- Ema M, Takahashi S, Rossant J. Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood.* 2006;107:111–7.
- Sambasivan R, Gayraud-Morel B, Dumas G, Cimper C, Paisant S, Kelly R, Tajbakhsh S. Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. *Dev Cell.* 2009;16:810–21.

19. Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, Pascal Q, Guguin A, Gayraud-Morel B, Cavaillon J-M, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One*. 2016;11:e0147198.
20. Casar JC, Cabello-Verrugio C, Olguin H, Aldunate R, Inestrosa NC, Brandan E. Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J Cell Sci*. 2004;117:73–84.
21. Phan AQ, Lee J, Oei M, Flath C, Hwe C, Mariano R, Vu T, Shu C, Dinh A, Simkin J, et al. Positional information in axolotl and mouse limb extracellular matrix is mediated via heparan sulfate and fibroblast growth factor during limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Regeneration*. 2015;2:182–201.
22. Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Staropoli I, Chow K, Levoye A, Laguri C, Sadir R, Delaunay T, Izquierdo E, et al. The CXCL12 γ chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*. 2008;3:e2543.
23. Connell BJ, Sadir R, Baleux F, Laguri C, Kleman J-P, Luo L, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. Heparan sulfate differentially controls CXCL12- and CXCL12-mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4. *Sci Signal*. 2016;9:ra107.
24. Brzoska E, Kowalewska M, Markowska-Zagrajek A, Kowalski K, Archacka K, Zimowska M, Grabowska I, Czerwińska AM, Czarnicka-Góra M, Stremińska W, et al. Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells. *Biol. Cell*. 2012;104:722–37.
25. Martinelli GB, Olivari D, Re Cecconi AD, Talamini L, Ottoboni L, Lecker SH, Stretch C, Baracos VE, Bathe OF, Resovi A, et al. Activation of the SDF1/CXCR4 pathway retards muscle atrophy during cancer cachexia. *Oncogene*. 2016;35:6212–22.
26. Griffin CA, Apponi LH, Long KK, Pavlath GK. Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J Cell Sci*. 2010;123:3052–60.
27. Dalonneau F, Liu XQ, Sadir R, Almodovar J, Mertani HC, Bruckert F, Albiges-Rizo C, Weidenhaupt M, Lortat-Jacob H, Picart C. The effect of delivering the chemokine SDF-1 α in a matrix-bound manner on myogenesis. *Biomaterials*. 2014;35:4525–35.
28. Christov C, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier F-J, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell*. 2007;18:1397–409.
29. Verma M, Asakura Y, Murakonda BSR, Pengo T, Latroche C, Chazaud B, McLoon LK, Asakura A. Muscle satellite cell cross-talk with a vascular niche maintains quiescence via VEGF and notch signaling. *Cell Stem Cell*. 2018;23:530–543.e9.
30. O'Boyle G, Mellor P, Kirby JA, Ali S. Anti-inflammatory therapy by intravenous delivery of non-heparan sulfate-binding CXCL12. *FASEB J*. 2009;23:3906–16.
31. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006;124:175–89.
32. Zerneck A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Möpps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005;96:784–91.
33. Davis GE, Norden PR, Bowers SLK. Molecular control of capillary morphogenesis and maturation by recognition and remodeling of the extracellular matrix: functional roles of endothelial cells and pericytes in health and disease. *Connect Tissue Res*. 2015:1–11.
34. Lin S-L, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*. 2008;173:1617–27.
35. Lin S-L, Chang F-C, Schrimpf C, Chen Y-T, Wu C-F, Wu V-C, Chiang W-C, Kuhnert F, Kuo CJ, Chen Y-M, et al. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol*. 2011;178:911–23.
36. Jackson EK, Zhang Y, Gillespie DD, Zhu X, Cheng D, Jackson TC. SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 α) induces cardiac fibroblasts, renal microvascular smooth muscle cells, and glomerular mesangial cells to proliferate, cause hypertrophy, and produce collagen. *J Am Heart Assoc*. 2017;6.
37. Verkaar F, van Offenbeek J, van der Lee MMC, van Lith LHCJ, Watts AO, Rops ALWMM, Aguilar DC, Ziarek JJ, van der Vlag J, Handel TM, et al. Chemokine cooperativity is caused by competitive glycosaminoglycan binding. *J Immunol*. 2014;192:3908–14.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)



Titre : Effets de la fluoxétine, inhibiteur de la recapture de la sérotonine, sur les cellules souches musculaires et la régénération musculaire

Résumé : La fluoxétine (FLX), premier inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine développé il y a 50 ans, est le traitement antidépresseur le plus prescrit au monde. Plusieurs mécanismes d'action sous-tendent l'effet antidépresseur de cette classe tels que le renforcement de la neurotransmission de la sérotonine (5-HT) mais également l'augmentation de la neurogenèse hippocampique, de la survie neuronale et de l'angiogenèse cérébrale. En périphérie, la sérotonine, principalement synthétisée par l'intestin et stockée dans les plaquettes, a également montré des effets positifs sur différentes cellules souches et dans plusieurs modèles de régénération tissulaire. Les effets de FLX sur le comportement de cellules souches et la régénération tissulaire au-delà du système nerveux central ont été à ce jour peu étudiés. Nos objectifs étaient, d'une part de caractériser la modulation des concentrations de 5-HT induite par FLX dans le compartiment central, périphérique et circulant, et d'autre part d'investiguer les propriétés régénératives de FLX en périphérie à l'aide du modèle de régénération *ad integrum* du muscle squelettique. Nous avons d'abord évalué par HPLC différentes concentrations de 5-HT au cours du temps chez des souris traitées par FLX ou placebo. Dans le cerveau et l'intestin, organes synthétisant la 5-HT, le traitement par FLX entraînait initialement une réduction des concentrations intratissulaires de 5-HT suivie d'une restauration de ces concentrations. A l'inverse, dans le sang total, le traitement par FLX entraînait une déplétion drastique et soutenue des concentrations de 5-HT, associée à une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques de 5-HT suivie d'une diminution durable de ces concentrations. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le signal 5-HT systémique n'est augmenté qu'en cas de traitement subaigu par FLX et que les organes, possédant un métabolisme 5-HT, restaurent une nouvelle homéostasie à l'issue d'un traitement chronique par la fluoxétine. Dans un second temps, nous avons montré que le traitement prolongé par FLX augmentait le nombre de cellules souches musculaires et l'angiogenèse musculaire chez la souris. FLX améliorait également la régénération du muscle squelettique après une blessure unique et des blessures multiples induites par l'injection intramusculaire de notexine. L'accélération de la régénération musculaire induite par FLX résultait d'une triple action marquée par une augmentation du pool de cellules souches musculaires, une augmentation de la densité des vaisseaux et une réduction des lésions fibrotiques et de l'inflammation. *In vitro*, nous avons montré que les effets prolifératifs de FLX sur des myoblastes immortalisés étaient dépendants de 5-HT et de l'activation du récepteur 5-HT1B. *In vivo*, les souris, dépourvues de 5-HT périphérique traitées par FLX, ne présentaient pas d'effets positifs pendant la régénération musculaire. De plus, l'inactivation pharmacologique et génétique du récepteur 5-HT1B dans les cellules souches musculaires abolissait également l'amélioration induite par FLX sur la régénération musculaire. En conclusion, nos résultats montrent qu'à travers la modulation du signal 5-HT en périphérie, FLX favorise une régénération musculaire harmonieuse sous-tendue par une action combinée sur la myogenèse, l'angiogenèse et l'inflammation. Ces résultats mettent en lumière l'identité sérotoninergique du muscle squelettique et dégagent une stratégie thérapeutique prometteuse pour les maladies musculaires endogènes. Au-delà du muscle et du cerveau, nos résultats soulignent que les effets des antidépresseurs sur la régénération d'organes doivent être étudiés. Enfin, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives d'investigation tant sur le rôle de la sérotonine et du récepteur 5-HT1B dans d'autres types de cellules souches que sur le potentiel thérapeutique des antidépresseurs en médecine régénérative.

Mots clés : Fluoxetine, sérotonine, 5-HT, récepteur 5-HT1B, cellules souches musculaire, régénération musculaire, angiogenèse, inflammation

Summary: Fluoxetine (FLX), the first selective serotonin reuptake inhibitor developed 50 years ago, is the most prescribed antidepressant treatment worldwide. Several mechanisms of action underlie the antidepressant effect of this class, such as the reinforcement of serotonin (5-HT) neurotransmission but also the increase in hippocampal neurogenesis, neuronal survival, and cerebral angiogenesis. Peripherally, serotonin, mainly synthesized by the gut and stored in platelets, also showed positive effects on different stem cells and in several tissue regeneration models. The effects of FLX on stem cell behavior and tissue regeneration beyond the central nervous system have been little studied to date. Our objectives were, on the one hand, to characterize the modulation of 5-HT levels induced by FLX in the central, peripheral, and circulating compartments, and on the other hand, to investigate the regenerative properties of FLX in the periphery using the skeletal muscle *ad integrum* regeneration model. We first assessed by HPLC different levels of 5-HT over time in mice treated with FLX or placebo. In the brain and intestine, organs synthesizing 5-HT, FLX treatment initially led to a reduction in intra-tissue 5-HT levels followed by a restoration of these levels. Conversely, in whole blood, FLX treatment resulted in a drastic and sustained depletion of 5-HT levels, associated with a transient increase in plasma 5-HT levels followed by a sustained decrease in these levels. Taken together, these results suggest that systemic 5-HT signaling is increased only during subacute FLX treatment and that organs, possessing 5-HT metabolism, restore a new homeostasis after chronic FLX treatment. In a second step, we showed that prolonged FLX treatment increased the number of muscle stem cells and muscle angiogenesis in mice. FLX also improved skeletal muscle regeneration after single and multiple injuries induced by intramuscular notexin injection. The acceleration of muscle regeneration induced by FLX resulted from a triple action marked by an increase in the muscle stem cell pool, an increase in vessel density and a reduction in fibrotic lesions and inflammation. *In vitro*, we showed that the proliferative effects of FLX on immortalized myoblasts were dependent on 5-HT and 5-HT1B receptor activation. *In vivo*, mice lacking peripheral 5-HT treated with FLX did not show positive effects during muscle regeneration. Moreover, pharmacological, and genetic inactivation of the 5-HT1B receptor in muscle stem cells also abolished the FLX-induced improvement in muscle regeneration. In conclusion, our results show that, through modulation of the 5-HT signal in the periphery, FLX promotes a harmonious muscle regeneration underpinned by a combined action on myogenesis, angiogenesis and inflammation. These results highlight the serotonergic identity of skeletal muscle and point to a promising therapeutic strategy for endogenous muscle diseases. Beyond muscle and brain, our results highlight that the effects of antidepressants on organ regeneration need to be studied. Finally, this work opens new perspectives of investigation both on the role of serotonin and the 5-HT1B receptor in other types of stem cells and on the therapeutic potential of antidepressants in regenerative medicine.

Keywords: Fluoxetine, serotonin, 5-HT, 5-HT1B receptor, muscle stem cells, muscle regeneration, angiogenesis, inflammation