

Université de Montréal

**MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES
LYMPHOCYTES B PAR LES MONOAMINES**

Par

Khadija IKEN

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en Pharmacologie

Décembre, 2000



© Khadija IKEN, 2000

W

4

U58

2001

v. 108

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Mécanismes de régulation de la prolifération des lymphocytes B par les
monoamines**

Présentée par
Khadija IKEN

a été évaluée par jury composé de personnes suivantes:

Louis-Eric Trudeau
Richard Momparler
Michel Charbonneau
Edouard Kouassi

Président-Rapporteur
Membre de jury
Examineur externe
Représentant du Doyen
Directeur de recherche

Thèse acceptée le

SOMMAIRE

SOMMAIRE

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) et les catécholamines (CA) sont des neurotransmetteurs du système nerveux central qui jouent le rôle de facteurs de croissance pour une variété de types cellulaires. La 5-HT et les CA sont libérées en grandes quantités dans les organes lymphoïdes et aux sites inflammatoires où elles peuvent réguler différents aspects de la réponse immunitaire. Leurs effets s'exercent via une interaction avec différents récepteurs. Des études antérieures ont montré que les CA augmentent la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS via les récepteurs β_2 -adrénergiques. Par ailleurs, les dérivés oxygénés (DO) sont des médiateurs importants de la lutte antibactérienne, mais ils peuvent aussi diminuer la prolifération cellulaire en induisant la peroxydation lipidique. Des études antérieures avaient montré que la 5-HT et les CA sont capables de piéger les DO mais le rôle de leurs propriétés anti-oxydantes dans l'immunomodulation est encore mal connu. Le but de notre étude était de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la régulation de la réponse immunitaire par les monoamines et le rôle de leurs propriétés anti-oxydantes dans ces effets.

Dans un premier temps, nous avons comparé les effets de la 5-HT et des CA sur la prolifération des lymphocytes B et avons caractérisé les récepteurs impliqués. Nos résultats démontrent que la 5-HT augmente la prolifération des lymphocytes B de souris et de rat stimulés par le LPS, de façon comparable aux effets observés avec les CA. L'effet de la 5-HT est reproduit par des agonistes sélectifs du récepteur 5-HT_{1A} et inhibé partiellement par les antagonistes de ce même récepteur, ce qui suggère son implication, mais aussi l'implication d'autres mécanismes d'action. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié l'action de la 5-HT et des CA sur le métabolisme oxydatif des lymphocytes B. Les résultats démontrent que la 5-HT et les CA diminuent de façon dépendante de la dose la chimiluminescence dans des systèmes acellulaire et cellulaire ainsi que les taux de malondialdéhyde induits dans les blastes LPS. Ces effets sont reproduits par le 8-OH-DPAT

(8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetralin), agoniste sélectif 5-HT_{1A}, mais le propranolol, antagoniste β -adrénergique/5-HT_{1A/1B} ne renverse pas les effets de 5-HT ni ceux des CA. Finalement, nous avons déterminé le rôle des propriétés anti-oxydantes des monoamines dans leurs effets sur la prolifération des lymphocytes B. Nous avons alors comparé les effets fonctionnels de la 5-HT et des CA sur la prolifération des lymphocytes B à ceux de divers agents pharmacologiques connus comme anti-oxydants. La superoxyde dismutase, la catalase, le mannitol et la taurine, qui sont des anti-oxydants très puissants, sont capables de reproduire les effets mitogéniques de la 5-HT et des CA sur la prolifération des lymphocytes B. Cependant, les monoamines amplifient la prolifération des lymphocytes B même en présence de ces anti-oxydants.

Ces résultats démontrent que: 1) la 5-HT joue le rôle de facteur de croissance pour les lymphocytes B par action sur les récepteurs 5-HT_{1A}; ces effets sont comparables à ceux des CA qui agissent sur les récepteurs β_2 -adrénergiques des cellules B; 2) la 5-HT et les CA inhibent le stress oxydatif des lymphocytes B par interaction directe avec les dérivés oxygénés; 3) les propriétés anti-oxydantes de la 5-HT et des CA jouent un rôle relativement mineur dans leurs effets amplificateurs sur la prolifération des lymphocytes B, alors que les interactions ligands-récepteurs spécifiques représentent leur mécanisme d'action principal. Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action des monoamines sur les lymphocytes B.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
PREMIÈRE PARTIE:REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	2
1. MONOAMINES BIOGÈNES ET LEURS RÉCEPTEURS.....	3
1.1. Sérotonine.....	3
1.1.1. Historique.....	3
1.1.2. Distribution.....	4
1.1.3. Synthèse et métabolisme.....	4
1.2. Récepteurs sérotoninergiques.....	5
1.2.1. Récepteurs 5-HT ₁	7
1.2.1.1. Récepteurs 5-HT _{1A}	7
1.2.1.1.1. Structure.....	7
1.2.1.1.2. Caractérisation.....	8
1.2.1.1.3. Distribution.....	10
1.2.1.2. Récepteurs 5-HT _{1B} et 5-HT _{1D}	11
1.2.1.2.1. Structure.....	11
1.2.1.2.2. Caractérisation.....	12
1.2.1.2.3. Distribution.....	12
1.2.1.3. Récepteurs 5-HT _{1E}	13
1.2.1.4. Récepteurs 5-HT _{1F} aussi appelés 5-HT _{1Eβ}	13

1.2.2. Récepteurs 5-HT ₂	14
1.2.2.1. Récepteurs 5-HT _{2A}	14
1.2.2.1.1. Caractérisation.....	14
1.2.2.1.2. Distribution	15
1.2.2.2. Récepteurs 5-HT _{2B} ou "serotonin like receptors", SRL.....	16
1.2.2.2.1. Caractérisation.....	16
1.2.2.3. Récepteurs 5-HT _{2C} (anciennement 5-HT _{1C})	16
1.2.3. Récepteurs 5-HT ₃	17
1.2.3.1. Structure	17
1.2.3.2. Caractérisation	18
1.2.3.3. Distribution.....	18
1.2.3.4. Applications thérapeutiques	19
1.2.4. Récepteurs 5-HT ₄	19
1.2.4.1. Caractérisation	19
1.2.4.2. Applications thérapeutiques	20
1.2.5. Autres récepteurs de la 5-HT	20
1.3. Applications thérapeutiques des récepteurs de la 5-HT	22
1.3.1. Aspects psychopharmacologiques	22
1.3.1.1. Anxiété.....	23
1.3.1.2. Dépression	24
1.3.1.3. Schizophrénie.....	25
1.3.2. Autres troubles	26
1.3.2.1. Douleur.....	27
1.3.2.2. Vomissement.....	27
1.3.2.3. Système cardiovasculaire.....	28
1.3.2.4. Hypertension.....	29
1.3.2.5. Migraine	29
1.3.2.6. Troubles digestifs	30

1.4. Les catécholamines.....	30
1.4.1. Synthèse	30
1.4.2. Libération et régulation.....	31
1.4.3. Métabolisme	31
1.4.4. Effets pharmacologiques des CA	32
1.5. Récepteurs adrénergiques	32
1.5.1. Récepteurs α_1 -adrénergiques.....	35
1.5.1.1. Caractéristiques communes	35
1.5.1.2. Définition pharmacologique des sous-types α_1	35
1.5.1.2.1. Récepteurs α_{1A} et α_{1B} adrénergiques	35
1.5.1.3. Signalisation	36
1.5.2. Récepteurs α_2 adrénergiques.....	36
1.5.2.1. Caractéristiques communes	36
1.5.2.1.1. Récepteurs $\alpha_{2A/2B}$ adrénergiques.....	37
1.5.2.1.2. Récepteurs α_{2C} et α_{2D} adrénergiques.....	37
1.5.2.2. Signalisation	37
1.5.3. Récepteurs β adrénergiques	38
1.5.3.1. Caractéristiques communes	38
1.5.3.2. Classification pharmacologique des récepteurs β adrénergiques.....	38
2. MONOAMINES BIOGÈNES ET SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	40
2.1. Rôle de la sérotonine dans le système immunitaire.....	42
2.1.1. Caractérisation des récepteurs et des transporteurs de la 5-HT sur les cellules immunitaires.....	42
2.1.2. Modulation de l'immunité par la sérotonine et mécanismes d'action ..	44
2.1.2.1. Chimiotactisme	44
2.1.2.2. Activité NK	45
2.1.2.3. Cytokines et sécrétion des anticorps	46

2.1.2.4. Phagocytose.....	48
2.1.2.5. Effets prolifératifs.....	49
2.1.2.5.1. Tissus tumoraux	49
2.1.2.5.2. Tissus lymphoïdes.....	50
2.2. Catécholamines et système immunitaire	54
2.2.1. Innervation sympathique des organes lymphoïdes.....	55
2.2.2. Récepteurs adrénergiques exprimés sur les cellules du SI	55
2.2.3. Influence des catécholamines sur la réponse immunitaire.....	56
2.2.3.1. Sympathectomie	57
2.2.3.2. Chimiotactisme	57
2.2.3.3. Activité NK et sécrétion des cytokines.....	58
2.2.3.4. Synthèse d'anticorps.....	59
2.2.3.5. Prolifération.....	60
3. DÉRIVÉS OXYGÉNÉS ET ANTI-OXYDANTS	61
3.1. Mode de formation et systèmes cellulaires impliqués dans la génération des dérivés oxygénés.....	62
3.1.1. Les cellules phagocytaires	62
3.1.2 Les lymphocytes B	64
3.2. Anti-oxydants biologiques	65
3.2.1. Superoxyde dismutase	65
3.2.2. Catalase	66
3.2.3. Peroxydases	66
3.3. Effets biologiques des dérivés oxygénés	67
3.3.1. Action bactéricide et tumoricide	67
3.3.2. Dommages cellulaires	68
3.3.3. Dérivés oxygénés et maladies	68
3.3.4. Rôle de messenger des dérivés oxygénés dans la prolifération cellulaire.....	70

3.3.4.1. Régulation de la prolifération par les dérivés oxygénés.....	70
3.3.4.2. Peroxydation lipidique et ses conséquences sur la prolifération cellulaire.....	75
3.4. Monoamines: propriétés anti-oxydantes et rôle de piégeage de dérivés oxygénés.....	76
3.4.1. Sérotonine et dérivés oxygénés.....	76
3.4.2. Catécholamines et anti-oxydation.....	78
3.4.3. Monoamines et peroxydation lipidique.....	80
4. IMPORTANCE ET MODÈLE D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES B.....	81
5. BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	84
DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS.....	86
CHAPITRE 2. SEROTONIN UPREGULATES MITOGEN-STIMULATED B LYMPHOCYTE PROLIFERATION THROUGH 5-HT _{1A} RECEPTORS.....	87
SUMMARY.....	89
INTRODUCTION.....	90
MATERIALS AND METHODS.....	92
Animals.....	92
Reagents.....	92
Preparation and Culture of Mouse and Rat Spleen Cells.....	92
Proliferation Assay.....	93
Measurement of Blast Transformation and Cell DNA Content by Flow Cytometry.....	93
Measurement of [³ H]8-OH-DPAT Binding.....	94
Statistical Analysis.....	95
RESULTS.....	96
Serotonin and the Selective 5-HT _{1A} Receptor Agonist 8-OH-DPAT Increase Mitogen- Stimulated B Lymphocyte Proliferation.....	96

Serotonin and 8-OH-DPAT Increase Blast Transformation and S Phase Transition of LPS-Stimulated B Cells	97
5-HT _{1A} Receptor Antagonists Block the Effects of 5-HT or 8-OH-DPAT	97
[³ H]8-OH-DPAT Specifically Binds to LPS-Activated Mouse Spleen Cells	98
DISCUSSION.....	100
REFERENCES.....	104
CHAPITRE 3. RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEROTONIN AND CATECHOLAMINES AND THEIR MITOGENIC EFFECTS ON B LYMPHOCYTES	
	117
Abstract.....	119
INTRODUCTION	120
MATERIALS AND METHODS	122
Animals.....	122
Reagents.....	122
Preparation and culture of mouse spleen cells.....	123
B-lymphocytes proliferation assay.....	123
Chemiluminescence assay.....	123
Estimation of lipid peroxidation in cultured cells.....	124
Statistical analyses	125
RESULTS	126
Effects of 5-HT and catecholamines on the H ₂ O ₂ -horseradish peroxidase system	126
Influence of 5-HT and catecholamines on the chemiluminescence signal produced by spleen cells.....	126
Effects of 5-HT and catecholamines on lipid peroxidation in cultured lymphocytes.....	127
Effects of monoamines and other antioxidants on lymphocyte proliferation.....	128
DISCUSSION.....	129
REFERENCES.....	133

TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION ET CONCLUSION.....	145
CHAPITRE 4. DISCUSSION	146
1- SÉROTONINE: FACTEUR DE CROISSANCE POUR LES LYMPHOCYTES B DE SOURIS	146
1.1. Effets de la 5-HT sur la réponse proliférative induite par le LPS dans les lymphocytes B.....	146
1.2. Caractérisation des récepteurs responsables des effets de la sérotonine sur la prolifération des lymphocytes B de souris	149
2. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA STIMULATION MITOGÉNIQUE PAR LA SÉROTONINE.....	152
2.1. La mobilisation du calcium et l'inhibition de l'adénylate cyclase ne jouent pas de rôle dans les effets amplificateurs de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B.....	152
2.2. Implication des propriétés anti-oxydantes de la 5-HT et des CA dans leurs effets prolifératifs sur les lymphocytes B	158
2.2.1. La 5-HT et les CA inhibent le métabolisme oxydatif des lymphocytes B	159
2.2.2. La 5-HT et les CA inhibent la peroxydation lipidique dans les lymphocytes B.....	161
2.2.3. Rôle des propriétés anti-oxydantes des monoamines dans l'augmentation de la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS ...	162
2.3. Modèle hypothétique des mécanismes de régulation de la prolifération des lymphocytes par la 5-HT et les CA	164
CHAPITRE 5. CONCLUSION GÉNÉRALE	167
BIBLIOGRAPHIE.....	170
ANNEXE 1.....	198

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1:	Principales caractéristiques des récepteurs 5-HT ₁	8
Tableau 2:	Principales caractéristiques des récepteurs 5-HT ₂	15
Tableau 3:	Autres récepteurs de la 5-HT.....	22
Tableau 4:	Définition pharmacologique des récepteurs adrénergiques.....	34
Tableau 5:	Récepteurs 5-HT présents sur les cellules du système immunitaire.....	43

CHAPITRE 2

Table 1:	Time-Dependent Effects of Serotonin and 8-OH-DPAT on LPS-Stimulated [³ H]TdR Uptake, Blast transformation, and Cell DNA Content.....	116
-----------------	--	-----

ANNEXE 1

Tableau 1:	Effets de la 5-HT, du DDA, et du SQ sur les taux d'AMPC induits par la forskoline dans les cellules spléniques de souris.....	202
-------------------	---	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1:** Voie de synthèse de la sérotonine.....5
- Figure 2:** Représentation schématique du récepteur 5-HT_{1A} murin.....9
- Figure 3:** Voie de synthèse des catécholamines.....31
- Figure 4:** Génération des espèces oxygénées réactives.....63

CHAPITRE 2

- Figure 1:** Effects of serotonin on mouse and rat spleen cell proliferation.....108
- Figure 2:** Effects of 5-CT (open circles) or 8-OH-DPAT (filled circles) on mitogen-stimulated mouse (A) or rat (B) spleen cell proliferation.....109
- Figure 3:** Effects of WAY 100135 on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells.....110
- Figure 4:** Effects of WAY 100135 on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of rat spleen cells stimulated with LPS (10µg/ml) plus DxS (10µg/ml).....111
- Figure 5:** Effects of propranolol on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells.....112

Figure 6:	Effects of NAN-190 on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells.....	113
Figure 7:	Effects of Ketanserin on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells.....	114
Figure 8:	Binding of [³ H]8-OH-DPAT on LPS-stimulated cells.....	115

CHAPITRE 3

Figure 1:	Effects of various compounds on the luminol-enhanced chemiluminescence in the horseradish peroxidase-H ₂ O ₂ system.....	138
Figure 2:	Influence of different concentrations of monoamines and related compounds on luminol-enhanced chemiluminescence during the respiratory burst of spleen cells.....	139
Figure 3:	Effects of increasing 5-HT, 8-OH-DPAT and ISO concentrations on LPS-induced lipid peroxidation in cultured spleen cell homogenates.....	140
Figure 4:	Effects of propranolol on serotonin- 8-OH-DPAT- or ISO-induced decrease in lipid peroxidation in mouse spleen cells homogenates.....	141
Figure 5:	Effects of SOD (A), catalase (B), mannitol (C) or taurine (D) on mouse spleen cell proliferation.....	142
Figure 6:	Effects of combination of monoamines and SOD (A), catalase (B), mannitol (C) or taurine (D) on mouse spleen cell proliferation.....	143

CHAPITRE 4

Figure 5:	Modèle hypothétique des mécanismes de régulation de la prolifération des lymphocytes B par la sérotonine.....	166
------------------	---	-----

ANNEXE 1

Figure 6:	Effets de 5-HT et ISO sur la mobilisation du Ca^{2+} dans les cellules spléniques fraîches et en culture pendant 48 ou 72h.....	204
------------------	---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetralin hydrobromide
5-HT	Sérotonine, 5-hydroxytryptamine
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
RA	Récepteurs adrénergiques
ARN	Acide riboxynucléique
CA	Catecholamines
CL	Chimiluminescence
ConA	Concanavaline A
DAG	Diacylglycérol
DO	Dérivés oxygénés
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO·	Radical hydroxyl
IL	Interleukine
IP ₃	Inositol triphosphate
ISO	Isoprotérenol
LPS	Lipopolysaccharide
MDA	Malondialdéhyde
MPO	Myeloproxidase
NE	Norépinéphrine
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NT	Neurotransmetteur
O ₂ ^{·-}	Superoxyde
PHA	Phytohémagglutinine
PKA	Protéine kinase A

PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol myristate acétate
PTK	Protéine tyrosine kinase
RE	Reticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives oxygénées
SI	Système immunitaire
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxide dismutase

À Ma mère, Rkia, À la mémoire de Mon père, M'Barak

Égale de mon Amour

À mes Soeurs et Frères

Avec ma profonde Affection

Merci d'être Vous

PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. MONOAMINES BIOGÈNES ET LEURS RÉCEPTEURS

Les amines biogènes sont un groupe de substances régulatrices qui sont largement distribuées dans le règne animal. Les monoamines norépinéphrine (NE), épinéphrine, dopamine (DA) et 5-HT sont généralement considérées comme des transmetteurs de signaux entre les cellules. Cette revue va se concentrer sur la 5-HT, la NE et l'épinéphrine ainsi que sur leurs récepteurs respectifs.

1.1. Sérotonine

1.1.1. Historique

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est une amine biogène découverte initialement dans le tube digestif (entéramine ou amine intestinale) (Vialli et Erspamer, 1933) et identifiée ensuite en 1948 (Rapport et coll., 1948) comme étant une substance vasoconstrictrice présente dans le sérum, d'où le nom de "sérotonine". Ce n'est qu'ensuite qu'on l'a découverte dans le système nerveux central (SNC) et que son rôle de neurotransmetteur (NT) a été démontré, de même que son rôle d'hormone locale dans le système vasculaire périphérique. Très vite, la démonstration de l'hétérogénéité de la distribution de la 5-HT au niveau cérébral a conduit à suggérer que cette amine y jouait le rôle de neuromédiateur. Il est aujourd'hui clairement établi que les neurones qui synthétisent et libèrent la 5-HT participent au contrôle de nombreuses fonctions centrales telles que le rythme veille/sommeil, la prise alimentaire et la thermorégulation. De plus, des altérations de la transmission sérotoninergique centrale sont associées à diverses affections psychiatriques et/ou neurologiques en particulier la dépression, l'anxiété et les démences y compris la maladie d'Alzheimer.

1.1.2. Distribution

La 5-HT existe en concentration élevée à trois niveaux différents: (i) dans la paroi de l'intestin: 90% de la quantité totale corporelle se trouve dans les cellules entérochromaffines, surtout au niveau de l'estomac et de l'intestin. Il y a aussi de la 5-HT dans les cellules nerveuses des plexus mésentériques où elle joue un rôle de NT stimulant; (ii) dans le sang: la 5-HT est présente en concentrations élevées dans les plaquettes où elle s'accumule par un mécanisme de transport actif et est libérée lors de l'agrégation plaquettaire au site de lésion tissulaire; (iii) dans le SNC, où la 5-HT joue un rôle de NT et de neuromodulateur (Essmann, 1978). Par ailleurs, la 5-HT est présente aussi dans les cellules du système immunitaire (SI) et elle y joue le rôle de facteur de croissance et d'immunomodulateur.

1.1.3. Synthèse et métabolisme

La biosynthèse de la 5-HT se fait selon un schéma similaire à celui de la norépinephrine (NE) mais l'acide aminé précurseur est le tryptophane (plutôt que la tyrosine) comme indiqué ci-après. Le tryptophane est converti en 5-hydroxytryptophane (dans les cellules chromaffines et les neurones, pas dans les plaquettes) sous l'action de la tryptophane hydroxylase. Le 5-hydroxytryptophane est ensuite décarboxylé en 5-HT par une décarboxylase non spécifique.

La 5-HT libérée au niveau de la fente synaptique peut agir, selon un mode paracrine, sur des récepteurs situés à distance des sites de libération, mais elle est le plus souvent rapidement recaptée par le neurone pré-synaptique par un mécanisme de capture à haute affinité. Par ailleurs, les plaquettes se chargent en 5-HT lors de leur passage dans la circulation intestinale où la concentration locale est élevée. La recapture de la 5-HT par les terminaisons sérotoninergiques du SNC se fait par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique associé à une ATPase dépendante du Na^+/K^+ qui est la cible de nombreux

antidépresseurs (Gonzalez-Herydrich et Peroutka, 1990). Ce processus permet de limiter et de terminer l'action de la 5-HT en réduisant la quantité de neurotransmetteur présent au niveau de la synapse.

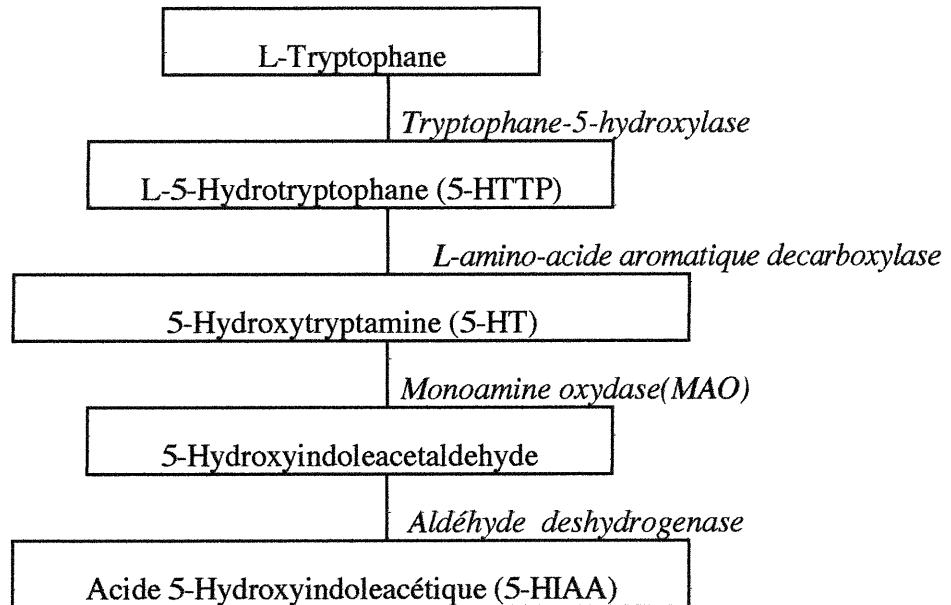


Figure 1: Voie de synthèse de la sérotonine.

La dégradation de la 5-HT se fait essentiellement par desamination oxydative, catalysée par une monoamine oxydase et formation d'un aldéhyde (cf. ci-dessus). Il y a ensuite oxydation en acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA). Ce dernier est excrété dans l'urine où son dosage est le reflet de la production corporelle de 5-HT. Une partie de la 5-HT est méthylée sur le OH avec formation de 5-méthoxytryptamine.

1.2. Récepteurs sérotoninergiques

Les hormones et les NT initient leurs actions biologiques par interaction avec des récepteurs sur ou dans la cellule. De ces récepteurs membranaires, nombreux sont ceux qui sont couplés à des effecteurs spécifiques par l'intermédiaire de protéines de couplage. Ces dernières sont connues sous le nom de protéines G du fait qu'elles lient et hydrolysent les

nucléotides guanylés GTP. La mise en évidence de plusieurs types de récepteurs de la 5-HT date de 1957. Gaddum et Picarelli ont à l'époque démontré l'existence de deux catégories de récepteurs fonctionnels de la 5-HT (récepteurs périphériques) dans l'iléon isolé de cobaye (Gaddum et Picarelli, 1957): les récepteurs **M** antagonisés par la **M**orphine, et les récepteurs **D** antagonisés par la **D**ibenzylène.

Cette classification fonctionnelle s'est rapidement révélée insuffisante pour expliquer la diversité d'action de la 5-HT. Grâce aux techniques de liaison utilisant des molécules marquées, on a pu ensuite définir deux types de récepteurs centraux, les récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂. Depuis, les recherches ont progressé par bonds, suivant en cela la synthèse de nouvelles molécules, l'avènement de nouvelles techniques biochimiques, anatomiques, électrophysiologiques et les progrès de la biologie moléculaire qui ont ensuite révélé l'extrême diversité des récepteurs à la 5-HT. La sérotonine détient certainement le record puisqu'elle active, actuellement, 16 récepteurs différents. On démontre l'existence d'au moins 7 familles de récepteurs eux-mêmes divisés en sous-types, qui diffèrent tant par leurs caractéristiques pharmacologiques que moléculaires ou fonctionnelles. Les dernières classifications de sous-types de récepteurs prennent en considération à la fois le profil pharmacologique, le couplage à des seconds messagers mais aussi la séquence en acide aminé déterminés par clonage (Humphrey et coll., 1993). En effet, les techniques de clonage des récepteurs ont identifié non seulement des récepteurs qui ont déjà été caractérisés d'un point de vue pharmacologique mais aussi de nouveaux sous-types dont l'existence n'avait pas été révélée par les techniques classiques. Un grand nombre de publications ont fait le point sur les récepteurs de la 5-HT, leur biologie moléculaire et leur classification (Hoyer et Martin, 1997; Léonard, 1996; Boess et Martin, 1994; Hoyer et coll., 1994; Peroutka et Howell, 1994). La 5-HT agit sur des récepteurs qui constituent un canal ionique (récepteur 5-HT₃), ou bien sur des récepteurs de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Ceux-ci sont actuellement au nombre de 14 au moins, et désignés comme suit: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1Dα}, 5-HT_{1Dβ}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{1like}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-

HT₄, 5-ht_{5A}, 5-ht_{5B}, 5-ht₆ et 5-HT₇ (Hoyer et Martin, 1997; Leonard, 1996; Boess et Martin, 1994; Hoyer et coll., 1994). La convention des lettres minuscules ht indique que ces récepteurs sont clonés mais ne sont pas endogènes et ne remplissent pas de rôle physiologique connu tel l'induction d'une enzyme, la modulation d'une conductance ionique ou la contraction du muscle lisse.

1.2.1. Récepteurs 5-HT₁

Il s'agit d'une famille de récepteurs couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC). Ils sont caractérisés par une haute affinité pour la 5-HT (généralement de l'ordre du nM) et par leur degré élevé d'homologie (> 60% dans les domaines transmembranaires). Ils ne contiennent pas d'introns dans leur séquence de codage. C'est une famille hétérogène comprenant au moins 5 sous-types, tous clonés, étiquetés de A à F, ayant des propriétés pharmacologiques et des distributions régionales distinctes dans le SNC et en périphérie. Les effets neuronaux qui résultent de leur stimulation sont surtout inhibiteurs, et s'exercent au niveau pré- ou post-synaptique. Dans le tableau 1, les récepteurs 5-HT_{1C} n'ont pas été inclus étant donné qu'on les classe actuellement dans la famille des récepteurs 5-HT₂.

1.2.1.1. Récepteurs 5-HT_{1A}

1.2.1.1.1. Structure

Le premier gène d'un récepteur de la 5-HT à avoir été cloné est celui du récepteur 5-HT_{1A} humain (Fargin et coll., 1989; Kobilka et coll., 1987). Il est surtout exprimé au niveau du cerveau, de la rate et des reins (Fargin et coll., 1989; Kobilka et coll., 1987). La séquence du gène de récepteur 5-HT_{1A} (figure 2) présente une forte homologie avec celle du récepteur β -adrénergique (β AR), ce qui pourrait expliquer la grande affinité de certains antagonistes adrénergiques pour ce récepteur. D'ailleurs, ce récepteur a été cloné à partir

d'une sonde β_2AR (Kobilka et coll., 1987). Ces deux récepteurs présentent une forte homologie au niveau du 6ème domaine transmembranaire et ont en commun 20 acide aminé sur 25. De plus, les gènes encodant ces deux récepteurs sont également dépourvus d'introns. Le gène du récepteur 5-HT_{1A} humain est localisé sur le chromosome 5.

Tableau 1: Principales caractéristiques des récepteurs 5-HT₁

Sous-types	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{1Dα,β}	5-ht _{1E}	5-ht _{1F}
Ancienne appellation	_____	5-HT _{1Dβ}	5-HT _{1Dα}	5-HT _{1Eα}	5-HT _{1Eβ} 5-HT ₆
Second messenger	(-) AMPc (+) Canal K ⁺ (-) Canal Ca ²⁺ (+) IP ₃ /DAG	(-) AMPc	(-) AMPc	(-) AMPc	(-) AMPc
Agonistes sélectifs	R-8-OHDPAT 8-OH-DPAT	CP93,129 L694247	Sumatriptan	BRL54443	LY334370 BRL54443
Antagonistes sélectifs	WAY100635 ou (+)WAY100135*	GR55562 SB224289	BRL15572	_____	_____
Applications thérapeutiques	Anxiété Dépression Troubles du sommeil	Dépression	Migraine Douleur Obésité Anorexie	?	?

-: inhibition; +: stimulation; * ancienne désignation.

1.2.1.1.2. Caractérisation

Il s'agit d'un sous-type particulièrement important caractérisé initialement par un agoniste sélectif, le 8-OH-DPAT, puis par d'autres agonistes plus ou moins sélectifs. C'est

Modèle du récepteur 5-HT_{1A} de souris

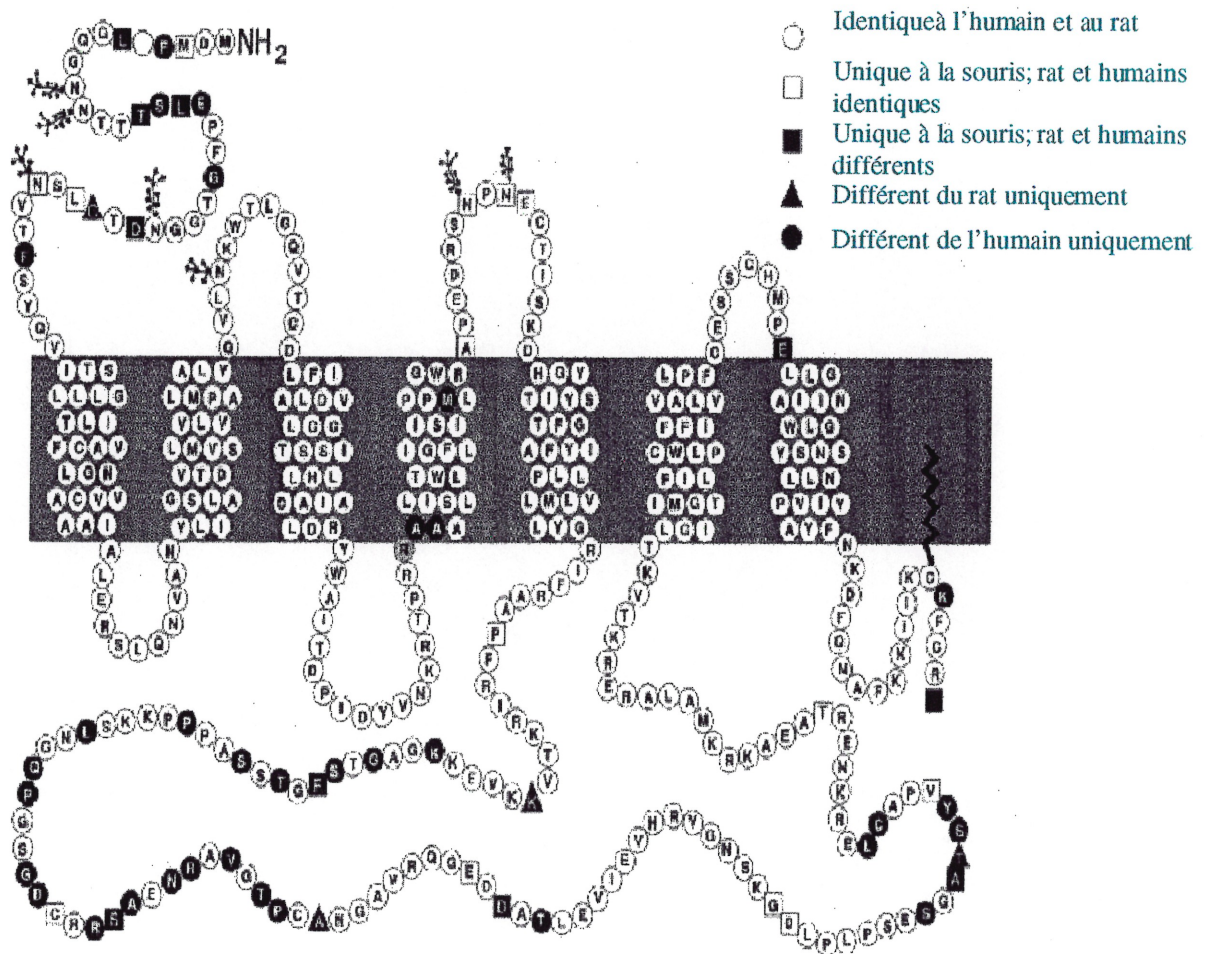


Figure 2: Représentation schématique du récepteur 5-HT_{1A}, d'après Charest et coll., 1994

une protéine de 421-422 acide aminé (selon les espèces) présentant trois sites de glycosylation et trois sites de phosphorylation (Raymond et coll., 1999). Exprimé dans diverses lignées cellulaires, le récepteur 5-HT_{1A} présente les mêmes caractéristiques pharmacologiques que celles du récepteur "naturel" dans les membranes cérébrales. La stimulation du récepteur dans les cellules transfectées conduit à une inhibition de l'activité AC comme dans le tissu cérébral (DeVivo et Maayani, 1986) ou à une stimulation de l'AC (Shenker et coll., 1985). Cependant, dans certaines lignées cellulaires, le récepteur 5-HT_{1A} peut être couplé à la phospholipase C (PLC) (Albert et coll., 1996; Liu et Albert., 1991; Fargin et coll., 1989), à l'ouverture d'une conductance potassique (Andrade et Nicoll, 1986), à la fermeture des canaux calciques (Pennington et Kelley, 1990) ou dans le cas des cellules CHO à l'inhibition des canaux anioniques de haute conductance via Gi α ₂ ou Gi α ₃. La signification potentielle de cette inhibition reste inconnue. Cependant, ces canaux anioniques semblent jouer un rôle important dans la régulation du volume cellulaire et le maintien du potentiel membranaire (Mangel et coll., 1993). Par ailleurs, le récepteur 5-HT_{1A} induit aussi la stimulation d'un échangeur Na⁺/H⁺ et d'une Na⁺/K⁺ ATPase ce qui suggère son rôle dans la régulation du volume cellulaire. Dans les cellules prostatiques de rat, le récepteur 5-HT_{1A} endogène a été montré capable d'inhiber l'activité AC tout en stimulant l'oxyde nitrique synthase (Carmena et coll., 1998).

1.2.1.1.3. Distribution

On trouve les récepteurs 5-HT_{1A} cérébraux dans les structures limbiques comme l'hippocampe, le septum, les amygdales, et le cortex frontal qui jouent un rôle clé dans le contrôle de l'humeur et des émotions. Dans le système limbique, les récepteurs 5-HT_{1A} ont une localisation post-synaptique; leur stimulation entraîne une diminution de l'activité neuronale avec des conséquences peu claires. Le buspirone et l'ipsapirone se comportent comme des agonistes partiels dans ce modèle. Une autre région qui contient une forte densité à la fois de récepteurs 5-HT_{1A} et d'ARNm correspondant est constituée par les noyaux

antérieurs du raphé (dorsal et médian) où les récepteurs sont situés à la surface des somas et des dendrites des neurones 5-HT (récepteurs somatodendritiques). La stimulation de ces autorécepteurs (car ils sont reconnus par le neuromédiateur synthétisé dans les neurones qui les expriment) par les agonistes 5-HT_{1A} (buspirone, ipsapirone) réduit l'activité électrique de la cellule sérotoninergique. Le buspirone se comporte comme un agoniste total dans ce système. En périphérie, ce récepteur est exprimé dans les tissus lymphoïdes (thymus, rate et ganglions lymphatiques), l'intestin, le muscle et le rein (Kobilka et coll., 1987) où il semble être impliqué surtout dans des mécanismes de croissance cellulaire.

1.2.1.2. Récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D}

Les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} sont considérés comme des récepteurs "semblables" mais présents dans des espèces différentes. Les récepteurs 5-HT_{1B} ont été localisés dans le SNC de rat, de souris, de hamster, les récepteurs 5-HT_{1D} ayant été observés dans le SNC de l'homme, du chien, du cobaye, avec la même distribution. Leur stimulation déclenche un frein qui se traduit par une diminution de la libération de la 5-HT (Hoyer et coll., 1994).

1.2.1.2.1. Structure

Les récepteurs 5-HT_{1B} de rat et les 2 isoformes α et β du récepteur 5-HT_{1D} de l'homme ont été clonés, ce qui a permis de confirmer que l'équivalent humain du récepteur 5-HT_{1B} du rat est le récepteur 5-HT_{1D β} . Un seul acide aminé est responsable des différences pharmacologiques entre les deux récepteurs, ils correspondent à des homologues entre espèces. Le gène du récepteur 5-HT_{1D α} est localisé sur le chromosome 1 et encode pour une protéine de 377 acide aminé. Le gène du récepteur 5-HT_{1D β} est localisé sur le chromosome 6 (Hoyer et coll., 1994).

1.2.1.2.2. Caractérisation

Les propriétés pharmacologiques, biochimiques et physiologiques de ces récepteurs sont moins bien connues que celles des récepteurs 5-HT_{1A}. Ces récepteurs sont caractérisés par une affinité de l'ordre du nanomolaire pour la 5-carboxamidotryptamine (5-CT) mais une affinité de l'ordre du micromolaire (μ M) pour le 8-OH-DPAT. Il n'y a pas de ligand sélectif qui distingue les sites 5-HT_{1B} par rapport aux sites 5-HT_{1D}. Toutefois, certains antagonistes β adrénergiques (propranolol, pindolol, cyanopindolol) ont une affinité plus grande pour les récepteurs 5-HT_{1B} que pour les récepteurs 5-HT_{1D}. Inversement, un agoniste, le sumatriptan un nouveau composé anti-migraineux, présente une certaine sélectivité pour les sites 5-HT_{1D} car son affinité est 10 à 20 fois supérieure pour ces sites que pour les 5-HT_{1B}. D'autres ligands permettent, cependant, de les distinguer. C'est notamment le cas de l'agoniste CP93,129 qui ne reconnaît que le type 5-HT_{1B}. Ce dernier est une protéine de 390 acide aminé avec des sites de phosphorylation, deux sites de glycosylation à l'extrémité C terminale qui peut être palmitoylée. L'activation du récepteur 5-HT_{1D} induit aussi une inhibition de l'AC ou une mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire selon la lignée cellulaire où il est exprimé (Zgombick et coll., 1993).

1.2.1.2.3. Distribution

La distribution des récepteurs 5-HT_{1B/1D} ne correspond pas du tout à celle de leurs ARNm. Ainsi, l'hybridation *in situ* montre que les ARNm encodant ces deux récepteurs sont abondants dans le striatum alors que c'est au niveau de la substance noire et du globus pallidus que l'on trouve les plus fortes concentrations de sites de liaison 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D}. Ces récepteurs sont localisés dans les noyaux gris centraux, le subiculum dorsal, le cervelet et dans toutes les régions où les récepteurs 5-HT_{1A} ont été localisés (y compris le raphé dorsal). Dans la substance noire, les récepteurs 5-HT_{1D} sont en partie situés sur les afférences striales et en partie sur les terminaisons corticales en tant qu'hétérorécepteurs. Les

récepteurs 5-HT_{1B} ont été localisés sur les terminaisons des neurones sérotoninergiques où ils jouent le rôle d'autorécepteurs pré-synaptiques homologues dans un système de rétrocontrôle négatif qu'exerce la 5-HT sur sa propre libération. On en trouve également sur les terminaisons de neurones dopaminergiques, noradrénergiques, cholinergiques, glutaminergiques où ils contrôlent la libération du NT, que ce soit l'acétylcholine ou l'acide glutamique dans le SNC ou la NE à la périphérie (terminaisons sympathiques). On trouve aussi des récepteurs 5-HT_{1D} dans la paroi des artères intracrâniennes. Leur stimulation provoque une vasoconstriction (Boess et coll., 1994; Hoyer et coll., 1994).

1.2.1.3. Récepteurs 5-ht_{1E}

Ce sont des sites caractérisés par une faible affinité pour la 5-CT et le sumatriptan. Ils sont présents dans le SNC de différents mammifères (dont l'Homme). On observe une densité élevée dans le noyau caudé et le putamen. Le clonage a montré que ces récepteurs possèdent un plus grand degré d'homologie avec les récepteurs 5-HT_{1D α / β} (64%) que les autres récepteurs 5-HT. Leur profil pharmacologique est le suivant (en ordre d'affinité décroissante): 5-HT > méthysergide > ergotamine > sumatriptan > spipérone. C'est une protéine de 365 acide aminé avec 7 passages transmembranaires et deux sites de glycosylation dans la partie amino-terminale. Le 3ème domaine cytoplasmique contient 90 acide aminé, un site de phosphorylation par la PKA, 5 sites pour la PKC et 3 autres pour la caséine kinase II. La stimulation de ce récepteur contrôle négativement l'activité de l'AC (Boess et coll., 1994; Gonzalez et coll., 1990).

1.2.1.4. Récepteurs 5-ht_{1F} aussi appelés 5-HT_{1E β}

Ces récepteurs sont aussi caractérisés par une faible affinité pour la 5-CT. Le clonage de ce type de récepteurs a été réalisé au niveau du SNC de la souris, de l'homme et du rat. Leur profil pharmacologique est le suivant (par ordre décroissant d'affinité): 5-HT >

sumatriptan > méthysergide > yohimbine > ergotamine. Le gène de ce récepteur encode pour une protéine de 366 acide aminé qui possède plusieurs sites de phosphorylation par la PKC (trois) et par la calmoduline kinase (deux) dans la 3ème boucle cytoplasmique. Ils sont distribués dans le SNC humain (hippocampe, cortex frontal, noyau raphé dorsal) et à la périphérie (mésentères et utérus) (Hoyer et coll., 1994).

1.2.2. Récepteurs 5-HT₂

Ce sont les récepteurs correspondant aux récepteurs **D** de la classification de Gaddum et Picarelli (1957). Ils ont une distribution plus importante à la périphérie que dans le SNC. Leur stimulation active une PLC qui catalyse l'hydrolyse du PIP₂. Les agonistes des récepteurs 5-HT₂ induisent donc l'accumulation d'IP₃ et de DAG qui mobilisent le Ca²⁺ intracellulaire. Ils provoquent une dépolarisation neuronale suite à la fermeture des canaux potassiques. On distingue actuellement 3 sous-types de récepteurs 5-HT₂: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} (tableau 2). Chacun a été cloné et, contrairement aux récepteurs 5-HT₁, les gènes du récepteur 5-HT₂ possèdent des introns et des exons. Ils diffèrent essentiellement par des différences d'affinité des ligands (antagonistes) et leur affinité pour le ligand endogène est d'environ mille fois plus faible que celle des récepteurs 5-HT₁ (Baxter et coll., 1995; Hamon et Gozlan, 1993). Le récepteur 5-HT_{2A} est la nouvelle appellation du récepteur 5-HT₂. Le récepteur 5-HT_{2C} est la nouvelle appellation du récepteur 5-HT_{1C}. Le récepteur 5-HT_{2B} est le récepteur le plus récemment cloné (parfois appelé 5-HT_{2F} ou SRL c'est-à-dire "serotonin like receptors").

1.2.2.1. Récepteurs 5-HT_{2A}

1.2.2.1.1. Caractérisation

De nombreuses substances sont des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} avec une

haute affinité. Les plus sélectifs sont la kétansérine et la pirenpérone. On possède moins d'informations sur les agonistes suivants: α -méthyl-5-hydroxytryptamine (α -CH₃-5-HT), 1-(2,5-diméthoxy-4-iodophényl)-2-amino propane (DOI) et LSD (propriétés hallucinogènes). C'est une protéine de 471 acide aminé avec 7 passages transmembranaires clonée à partir de 5-HT_{2C} avec lequel elle présente une homologie de structure, un même profil pharmacologique et un même signal de transduction. Chez le rat et l'humain, les 5 sites de glycosylation au niveau N terminal sont conservés, ainsi qu'une cystéine dans la région C terminale essentielle à l'activité du récepteur (Buck et coll., 1991), et 11 résidus serine/thréonine qui sont des cibles possibles pour la phosphorylation.

Tableau 2: Principales caractéristiques des récepteurs 5-HT₂

Sous-types	5-HT _{2A}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}
Ancienne appellation	D/5-HT ₂	5-HT _{2F}	5-HT _{1C}
Second messenger	PLC, IP ₃ /DAG	PLC, IP ₃ /DAG	PLC, IP ₃ /DAG
Agonistes sélectifs	α -CH ₃ -5-HT	α -CH ₃ -5-HT BW723C86	α -CH ₃ -5-HT
Antagonistes sélectifs	Kétansérine MDL100907	SB204741 LY53857	Methysergide SB242084
Applications thérapeutiques	Hypertension Anorexie Dépression	_____	Anorexie Anxiété Migraine

1.2.2.1.2. Distribution

Ce sont des récepteurs largement distribués à la périphérie où leur stimulation est responsable de la contraction de nombreux muscles lisses: bronches, utérus, muscle lisse de la vessie et intestin de cobaye. Ils sont aussi responsables de l'agrégation plaquettaire et de

l'augmentation de la perméabilité des capillaires induite par la 5-HT. Au niveau du SNC, ils sont présents dans toutes les espèces animales, principalement dans les cortex frontal et préfrontal. Leur répartition majoritaire au sein des couches recevant des afférences thalamiques spécifiques laisse supposer un rôle possible de ces récepteurs dans la modulation thalamo-corticale. Leur localisation est uniquement post-synaptique. Leur fonctionnement est altéré par dénervation des systèmes noradrénergiques, l'administration d'agonistes β AR et d'agonistes des récepteurs GABA_B (baclophen). Il y aurait des récepteurs 5-HT₂ sur les neurones GABA ou à somatostatine du néocortex (Hoyer et coll., 1994).

1.2.2.2. Récepteurs 5-HT_{2B} ou "serotonin like receptors", SRL

C'est le nouveau membre de cette famille. Il a été cloné et identifié comme appartenant au sous-type 5-HT₂. On connaît mal sa distribution. Outre l'estomac de rat, il est aussi présent dans l'intestin, le coeur, les reins, les poumons, les vaisseaux sanguins et le muscle lisse mais peu dans le SNC (Boess et coll., 1994).

1.2.2.2.1. Caractérisation

L'ordre de puissance décroissant suivant a été décrit pour les agonistes: 5-HT = α -CH₃-5-HT > 5-CT > quipazine > sumatriptan > 8-OH-DPAT et pour les antagonistes: rauwolscine = yohimbine > pizotifène > miansérine > pirenpérone. Il présente une similitude de séquence, des profils pharmacologiques identiques et un même signal de transduction que 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} ce qui justifie sa classification dans la famille des récepteurs 5-HT₂ (Hoyer et coll., 1997).

1.2.2.3. Récepteurs 5-HT_{2C} (anciennement 5-HT_{1C})

Le clonage du gène encodant le récepteur 5-HT_{2C} a montré qu'il avait peu

d'homologie (40% dans les domaines transmembranaires) avec celui des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B/1D}. Ainsi, et malgré leur affinité de l'ordre du nanomolaire pour la 5-HT, il est apparu que les récepteurs 5-HT_{1C} ont des propriétés proches des récepteurs 5-HT₂. Les expériences de clonage ont montré une homologie de séquence de 78% pour les récepteurs 5-HT_{1C} et 5-HT₂ dans leurs domaines transmembranaires. Par ailleurs, le gène du récepteur 5-HT_{1C} comporte des introns comme celui du récepteur 5-HT_{2C}. La nouvelle appellation du récepteur 5-HT_{2C} est donc actuellement admise. La répartition de ce récepteur est assez diffuse dans le SNC (noyaux de raphé, hippocampe, substance noire, locus caeruleus, moelle épinière) avec un enrichissement dans les plexus choroïdiens. La localisation est essentiellement post-synaptique. Il n'y a pas de molécules vraiment sélectives pour ce type de récepteurs, ce qui limite les hypothèses quant à son rôle fonctionnel. Étant donné sa grande similitude de structure avec le récepteur 5-HT_{2A}, l' α -CH₃-5-HT et le DOI sont également des agonistes puissants sur ce type de récepteur. Les antagonistes kétansérine, cinasérine, pirenpérone sont également actifs sur le récepteur 5-HT_{2C} bien qu'ils aient une certaine sélectivité pour le récepteur 5-HT_{2A}. On a attribué un rôle aux récepteurs 5-HT_{2C} dans la locomotion, le comportement alimentaire, la libération d'hormones adrénocorticales, l'anxiété, les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) et la migraine (Hoyer et coll., 1997; 1994).

1.2.3. Récepteurs 5-HT₃

1.2.3.1. Structure

À côté de la grande diversité des récepteurs de la 5-HT couplés aux protéines G, on n'a identifié jusqu'à présent qu'un seul "récepteur-canal ionique" pour ce neuromédiateur (Yakel et coll., 1990). Il s'agit du récepteur 5-HT₃ dont la stimulation entraîne l'ouverture d'un canal ionique non sélectif pour différents cations et donc distinct des autres d'un point de vue structural et fonctionnel. Il est notamment perméable aux ions sodium (Na⁺),

potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}). L'ouverture de ce récepteur canal conduit à une dépolarisation neuronale très rapide.

1.2.3.2. Caractérisation

Ces récepteurs possèdent une affinité de l'ordre du micromolaire pour la 5-HT et d'autres agonistes relativement sélectifs (2- CH_3 -5-HT, phénylbiguanide) et une affinité de l'ordre du nanomolaire pour des antagonistes comme l'ondansétron, le granisétron, le tropisétron. La région amino-terminale contient plusieurs sites de glycosylation et deux cystéines qui semblent former un pont disulfure (Hoyer et coll., 1997; Boess et coll., 1994).

1.2.3.3. Distribution

Ils ont été initialement mis en évidence dans le SN périphérique où ils induisent les effets excitateurs de la 5-HT dans les neurones entériques. Ce sont l'équivalent des récepteurs **M** de la classification de Gaddum et Picarelli (1957). Ils sont également présents dans les terminaisons sensorielles et les terminaisons afférentes parasympathiques. Dans le SNC, les récepteurs 5-HT₃ sont présents dans certains noyaux bulbaires (noyau du faisceau solitaire, noyau dorsal du vague); dans le système limbique (amygdales, hippocampe) et dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle. La densité des récepteurs 5-HT₃ cérébraux est beaucoup plus faible (10 fois inférieure) que celles des autres récepteurs de la 5-HT. Dans le noyau du faisceau solitaire, les sites 5-HT₃ sont situés sur des afférences vagales et dans les cornes dorsales de la moelle, ils sont localisés en position pré-synaptiques (sur les fibres sensibles à la capsaïcine). Quoiqu'il en soit, il semble que cette localisation soit en relation avec la capacité des ligands des récepteurs 5-HT₃ à moduler la libération de nombreux NT tel que la dopamine (DA) dans le SNC (et aussi à la périphérie) (Blandina et coll., 1988).

1.2.3.4. Applications thérapeutiques

En périphérie, la stimulation des récepteurs 5-HT₃ neuronaux (SN autonome ou neurones nociceptifs) entraîne une dépolarisation et la libération de différents NT. D'un point de vue fonctionnel, il peut en résulter une inhibition cardiaque, une vasodilatation, de la douleur ou un réflexe de vomissement. Les récepteurs 5-HT₃ ont été impliqués dans la douleur inflammatoire viscérale, certains types de bradycardie, la motricité gastro-intestinale et les réflexes vasomoteurs. Au niveau central, les récepteurs 5-HT₃ seraient également impliqués dans la facilitation de la libération pré-synaptique de la 5-HT et la modulation de la libération d'autres NT tels que la dopamine, l'acétylcholine, le GABA et la NE. En outre, étant donné la multiplicité des voies neuronales sérotoninergiques au niveau central, les antagonistes ont des potentialités thérapeutiques dans le domaine des troubles cognitifs (perte de mémoire), de l'anxiété, des psychoses, de la dépendance vis-à-vis des drogues (éthanol, cocaïne) et certains types de douleurs inflammatoires (Gyermerk, 1995; Greenshaw, 1993).

1.2.4. Récepteurs 5-HT₄

Récemment cloné, ce type de récepteurs a d'abord été caractérisé dans le SNC comme un récepteur couplé positivement à l'AC avec un profil pharmacologique inhabituel. Il a ensuite été identifié dans le tractus digestif, le coeur et la vessie (Eglen et coll., 1995; Bockaert et coll., 1992).

1.2.4.1. Caractérisation

L'affinité de ce récepteur pour le ligand endogène est environ mille fois plus faible que celle des récepteurs 5-HT₁. Ces récepteurs sont stimulés par des concentrations de l'ordre du micromolaire de 5-HT ou 5-méthoxytryptamine et par des benzamides (cisapride, zacopride, renzapride, métoclopramide). Certains de ces benzamides sont aussi des

antagonistes 5-HT₃. On connaît un seul antagoniste de haute affinité, le GR113808, qui a permis d'étudier la distribution cérébrale de ces récepteurs qui est exclusivement neuronale. Cependant, cette substance est rapidement hydrolysée, ce qui rend les études *in vivo* difficiles. De nouveaux dérivés ont récemment été synthétisés et permettront une meilleure approche du rôle de ces récepteurs (Hoyer et coll., 1997; Bockaert et coll., 1992).

1.2.4.2. Applications thérapeutiques

La stimulation des récepteurs 5-HT₄ est responsable de l'augmentation des réponses de l'iléon de cobaye à la stimulation coaxiale (par augmentation de la libération d'acétylcholine); de la contraction de l'iléon de cobaye (Eglen et coll., 1995) et du colon ascendant de cobaye (Elswood et coll., 1991); de la sécrétion d'ions Cl⁻ dans le colon distal de rat (Bunce et coll., 1991); du relâchement du muscle lisse de la muscularis mucosae de l'oesophage de rat; de la tachycardie observée dans l'oreillette de porc (Villalon et coll., 1990). Les seules applications de ce récepteur se situent actuellement dans le cadre d'une action de type gastrique (agonistes relativement peu sélectifs). Il y a une très forte densité de récepteurs 5-HT₄ dans le système limbique ce qui laisse supposer un rôle dans le processus de mémoire et d'apprentissage. Un rôle dans l'anxiété a également été évoqué. Leur stimulation induit une augmentation de la libération d'acétylcholine et peut-être de dopamine ce qui pourrait aussi donner lieu à des applications intéressantes.

1.2.5. Autres récepteurs de la 5-HT

En plus des 4 familles décrites, les techniques de clonage ont identifié d'autres récepteurs sérotoninergiques 5-ht_{5A}, 5-ht_{5B}, 5-ht₆, 5-HT₇ dont les caractéristiques pharmacologiques sont, actuellement, partiellement caractérisées, mais dont le rôle biologique doit être précisé (tableau 3). Chez la souris, on distingue deux sous-types de récepteurs 5-ht₅ ayant 68% d'identité en acide aminé. Le récepteur 5-ht_{5A} encode une

protéine de 357 acide aminé ayant deux sites de N-glycosylation et plusieurs sites de phosphorylation pour la PKC et la PKA. Le récepteur 5-ht_{5B} encode lui aussi une protéine de 370 acide aminé avec un site de N-glycosylation, un site de phosphorylation dans la 2ème boucle et deux sites dans la 3ème boucle cytoplasmique pour la PKC et un autre dans la 3ème boucle pour la PKA (Matthes et coll., 1993). Le récepteur 5-ht_{5A} est présent au niveau du cerveau et de la moelle épinière alors que le 5-ht_{5B} se localise au niveau de l'hippocampe et du noyau dorsal de raphé avec une faible expression durant le développement embryonnaire. Le récepteur 5-ht_{5A} de la souris est localisé sur le chromosome 5 et sur le chromosome 7 chez l'humain. Le récepteur 5-ht_{5B} est présent sur le chromosome 1 et son homologue humain sur le chromosome 2.

Les récepteurs 5-ht₆ et 5-HT₇ sont couplés positivement à l'AC mais leurs profils pharmacologiques sont différents de celui des récepteurs 5-HT₄. Il est intéressant de noter que le récepteur 5-ht₆ a une affinité élevée pour certains antidépresseurs et qu'il présente 36-41% d'homologie avec les autres récepteurs 5-HT (Monsma et coll., 1993). La pharmacologie du récepteur 5-HT₇ se rapproche de celle des récepteurs "5-HT_{1-like}" décrits dans le muscle lisse vasculaire où ils induisent un relâchement (Plassat et coll., 1993). Chez le rat, le récepteur 5-HT₇ est abondant dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le thalamus. En périphérie, il est présent à de faibles niveaux dans la rate et l'estomac (Shen et coll., 1993). Ce récepteur présente aussi une affinité pour le 8-OH-DPAT, agoniste 5-HT_{1A}, et une haute affinité pour certains antipsychotiques et antidépresseurs tricycliques tels que la clozapine, la loxapine et l'amitryptiline (Shen et coll., 1993).

Il existe d'autres types de récepteurs qui ne répondent pas aux critères d'admission pour les différents types de récepteurs décrits ci-dessus. Ces récepteurs appartiennent à la classe des récepteurs dits "orphelins" qui restent à mieux définir. On distingue d'une part les récepteurs 5-HT de l'endothélium vasculaire qui induisent la libération de NO et un relâchement vasculaire (Cocks et Angus, 1983). D'autre part, ceux responsables de la

dépolarisation de certains neurones de rat (Connell et Wallis, 1989), de l'inhibition de la libération de NE dans l'artère coronaire de cochon (Molderings et coll., 1989) et finalement, un récepteur atypique (5-HT_{1P}) décrit au niveau des neurones entériques (Hoyer et coll., 1994; Martin et Humphrey, 1994).

Tableau 3: Autres récepteurs de la 5-HT

Sous-types	5-ht _{5A}	5-ht _{5B}	5-ht ₆	5-HT ₇
Ancienne appellation	5-HT _{5α}	5-HT _{5β}	_____	5-HT _X 5-HT _{1-like}
Second messenger	(+) AMPc?	?	(-) AMPc	(-) AMPc
Agonistes sélectifs	_____	_____	_____	_____
Antagonistes sélectifs	_____	_____	Ro046790 Ro630563	SB258719

1.3. Applications thérapeutiques des récepteurs de la 5-HT

La stimulation des récepteurs sérotoninergiques par les agonistes et leur inhibition par des antagonistes à action plus ou moins sélective est à l'origine de nombreuses applications thérapeutiques.

1.3.1. Aspects psychopharmacologiques

Il est actuellement admis que les systèmes sérotoninergiques centraux jouent un rôle fondamental dans de nombreux comportements. Une corrélation directe a pu être établie entre le fonctionnement sérotoninergique et l'agressivité ou l'impulsivité des individus. Un taux anormalement bas de sérotonine a été mis en évidence dans le liquide céphalo-rachidien

ou dans les noyaux du cortex et du raphé (études postmortem) chez certains schizophrènes, chez des alcooliques, des boulimiques ou des sujets présentant des troubles de la personnalité. Les propriétés comportementales de la 5-HT dans l'apprentissage et les propriétés hallucinogènes du LSD semblent être induites par des récepteurs 5-HT_{2A} centraux. Il a été démontré que la transmission sérotoninergique neuronale chez l'animal génère des effets anxiolytiques et l'utilisation d'agonistes de la 5-HT a prouvé son efficacité dans le traitement de certains désordres émotionnels. Des anomalies des mécanismes sérotoninergiques centraux pourraient donc jouer un rôle dans les troubles psychologiques, les désordres affectifs, la dépression, l'anxiété, les troubles de l'appétit et du sommeil et les symptômes négatifs de la schizophrénie. Un rôle des récepteurs 5-HT₂ dans le développement de certaines psychoses a également été mis en évidence (Leonard, 1996; Schmidt et coll., 1995).

1.3.1.1. Anxiété

Plusieurs récepteurs semblent être concernés puisque des effets de types anxiolytiques ont été obtenus chez l'animal avec des agonistes 5-HT_{1A}, des antagonistes 5-HT₂ et des antagonistes 5-HT₃ (Sleight et coll., 1991). La buspirone synthétisée initialement pour des effets antipsychotiques potentiels s'est révélée être un anxiolytique dans divers modèles animaux et en même temps on s'est aperçu qu'elle avait une affinité élevée pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Depuis, la recherche relative au rôle de ce type de récepteurs s'est considérablement développée, de nombreux autres agents ont été synthétisés et de nouveaux modèles animaux, particulièrement sensibles à ce type de molécules ont été mis au point. L'intérêt de ces nouveaux composés par rapport aux benzodiazépines est évident. Contrairement à ces dernières et à d'autres tranquillisants, les ligands des récepteurs de la 5-HT n'induisent ni accoutumance ni dépendance. De plus, ils ne sont pas sédatifs, ni myorelaxants et surtout non amnésiants. La buspirone peut être considérée comme premier agent d'une nouvelle classe médicamenteuse de dérivés anxiolytiques de type non

benzodiazépine. Cependant, ses effets n'apparaissent qu'après 1 à 3 semaines de traitement.

Le 8-OH-DPAT (agoniste complet post-synaptique) n'a aucune propriété anxiolytique (mais plutôt anxiogène). Dans le cadre des troubles particuliers de l'anxiété, la fluvoxamine (inhibiteur sélectif de recapture de 5-HT) s'est révélée particulièrement efficace dans les crises de panique et la clomipramine (antidépresseur tricyclique avec effet préférentiel sur la recapture de 5-HT) est la molécule la plus efficace dans le traitement du trouble obsessionnel compulsif. Le rôle des récepteurs 5-HT₂ centraux dans la dépression et l'anxiété n'est pas clair. En revanche, il s'est avéré que la ritansérine et la kétansérine, antagonistes des récepteurs 5-HT₂ possèdent des propriétés anxiolytiques, pas seulement dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme. Elles stimulent la fonction de récupération en augmentant le taux de sommeil lent profond aussi bien chez l'animal que chez l'homme (Sleight et coll., 1991). L'ondansétron, antagoniste des récepteurs 5-HT₃ a également des propriétés anxiolytiques chez l'animal et chez l'homme, probablement par contrôle de la libération d'autres NT. C'est à la stimulation des autorécepteurs somatodendritiques dans les noyaux de raphé que ces molécules doivent leurs propriétés anxiolytiques; on attribue celles-ci à une diminution de la fréquence de décharge des neurones sérotoninergiques, et à une diminution de la transmission sérotoninergique anormalement élevée chez les animaux. Il n'est cependant pas clairement établi si ces molécules agissent en diminuant l'activité sérotoninergique (de manière aiguë) ou en diminuant chroniquement cette activité (après action sur les autorécepteurs). Si dans des modèles animaux l'effet est observé après une dose unique, chez l'homme deux à quatre semaines de traitement sont nécessaires (Leonard, 1996).

1.3.1.2. Dépression

Le rapport entre la 5-HT et les symptômes dépressifs a pu être clairement établi, et les médicaments qui agissent sélectivement sur les systèmes sérotoninergiques centraux en

facilitant la transmission sérotoninergique après inhibition sélective ou non de la recapture de la 5-HT sont les antidépresseurs les plus efficaces actuellement. Ils constituent les antidépresseurs de troisième génération incluant notamment la fluvoxamine, la paraxétine, la fluoxétine (prozac), le citalopram et le sertraline. La puissance relative de ces molécules vis-à-vis de la recapture de la 5-HT, du blocage des récepteurs 5-HT₂, de l'inhibition de la recapture d'autres amines et du blocage d'autres récepteurs tels ceux de la dopamine, de l'adrénaline (α_1), de l'histamine (H₂) et de l'acétylcholine est un facteur important de leur action pharmacologique. Il semble que l'administration répétée (plusieurs semaines) de ces molécules désensibilise les autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodendritiques et les récepteurs 5-HT_{1D} des terminaisons neuronales, le mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par la stimulation de ces récepteurs devenant alors inopérant. Dans ces conditions, on comprend pourquoi les antagonistes des autorécepteurs (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}) constituent une famille de composés d'un grand intérêt potentiel pour le traitement des dépressions (notamment en association avec les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT). Les études cliniques avec les agonistes partiels des récepteurs 5-HT_{1A} ont mis en évidence une activité antidépressive de ces molécules. Leur mécanisme d'action impliquerait une régulation négative des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₂, la balance entre ces deux types de récepteurs étant un des facteurs de la physiopathologie de la dépression (Leonard, 1996; Gardier et coll., 1995).

1.3.1.3. Schizophrénie

Une augmentation de l'activité dopaminergique dans le système mésolimbique semble être responsable de l'étiologie de la schizophrénie, et tous les antipsychotiques sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D₂ ou diminuent l'activité dopaminergique centrale. Cependant, d'autres NT ont été impliqués dans le mécanisme d'action des antipsychotiques, dont la sérotonine. Les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT₂ et 5-HT₃ pourraient exercer un rôle de modulation de la fonction dopaminergique dans le système mésolimbique

et nigrostrié. Les propriétés anti-5-HT₂ de certains antipsychotiques atypiques comme la clozapine sont associées à une augmentation de leur efficacité; il est intéressant de noter que la clozapine a une affinité plus faible que l'haloperidol sur les récepteurs D₂ et est une molécule d'efficacité supérieure à celle des neuroleptiques atypiques tout en produisant peu ou pas de dyskinésie tardive (Leonard, 1996; Meltzer et coll., 1989). Les molécules anti-5HT₂ pourraient agir en réduisant la libération de dopamine au niveau de certains territoires centraux (mésotélencéphale) et provoquer une régulation négative des récepteurs 5-HT₂ (également observée avec les antidépresseurs). Notons cependant que la ritansérine (anti-5-HT₂) n'a pas d'effet sur les symptômes de la schizophrénie, mais qu'elle peut améliorer la sociabilité des patients psychotiques et pourrait donc être un adjuvant intéressant au traitement. Enfin, il a été démontré que l'ondansétron inhibe les effets comportementaux associés à un excès de dopamine dans le système mésolimbique en y diminuant la libération de dopamine suite au blocage de récepteurs 5-HT₃ (Leonard, 1996; Abbott, 1990).

1.3.2. Autres troubles

La 5-HT est un NT hypnogène capable d'inhiber le ou les systèmes d'éveil. Elle est le neuromodulateur du sommeil. Physiologiquement, la 5-HT est un NT qui met au repos; elle est indispensable à l'endormissement. Pendant le sommeil, l'activité des neurones sérotoninergiques décroît ainsi que les taux extracellulaires de 5-HT. Les seules données certaines à l'heure actuelle concernent les effets stimulants des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ sur le sommeil lent profond. Ces molécules seraient susceptibles d'améliorer les capacités de récupération et ont un intérêt potentiel en tant que traitement de l'insomnie. En ce qui concerne les performances cognitives notamment les pertes de mémoire, on a démontré que l'ondansétron est capable d'améliorer rapidement l'apprentissage chez l'animal en augmentant la libération d'acétylcholine au niveau du cortex cérébral; une amélioration des troubles de mémoire liés à l'âge a également été démontrée (Hindle, 1994). Enfin, il s'est avéré que l'ondosétron pouvait diminuer chez l'animal les symptômes de sevrage à l'alcool, à

la cocaïne et au diazépam, mais cette influence favorable n'a toutefois pas encore été utilisée en thérapeutique (Leonard, 1996; Gyermerk, 1995).

1.3.2.1. Douleur

Des récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃ sont présents sur les afférences vagales et pourraient jouer un rôle dans la transmission de la douleur au niveau de la moelle épinière. Certains antagonistes des récepteurs 5-HT₃ bloquent la douleur induite par la 5-HT et leur mécanisme d'action serait lié à une régulation de la libération de GABA.

1.3.2.2. Vomissement

Étant donné la localisation des récepteurs 5-HT₃ au niveau des sites du SNC qui contrôlent le vomissement, les antagonistes de ces récepteurs sont des antiémétiques puissants qui agissent à la fois sur des récepteurs 5-HT₃ périphériques (afférents du nerf vague) et des récepteurs 5-HT₃ centraux. L'introduction en clinique des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ représente une amélioration considérable dans le traitement des nausées et des vomissements associés à la chimiothérapie et à la radiothérapie des cancers et à l'anesthésie (Gyermerk, 1995). Le mécanisme d'action de ces molécules est complexe et implique une action inhibitrice au niveau des récepteurs 5-HT₃ centraux et périphériques. L'avantage de ces molécules par rapport à d'autres (scopolamine, phénothiazines) est leur efficacité élevée et l'absence d'effets secondaires importants (sédation) à cause de leur action sélective sur les récepteurs 5-HT₃ (les autres molécules antiémétiques ont des propriétés anticholinergiques, anti-dopaminergiques ou/et anti-histaminiques). Les molécules actuellement utilisées en thérapeutique sont l'ondansétron et le granisétron.

1.3.2.3. Système cardiovasculaire

Les effets de la 5-HT au niveau cardiovasculaire sont très complexes et résultent de l'action sur des récepteurs tant centraux que périphériques variables selon les territoires. Les récepteurs impliqués dans ce domaine sont essentiellement de type 5-HT_{1A}, 5-HT₂ (et 5-HT₄ au niveau cardiaque) (McCall et Clement, 1994). D'un autre côté, l'administration de 5-HT *in vivo* entraîne une réponse tensionnelle complexe avec: (i) une phase hypotensive initiale due à une diminution du débit cardiaque et une bradycardie transitoire due à la stimulation de récepteurs 5-HT₃ sur les terminaisons du nerf vague; (ii) une augmentation de tension induite par des récepteurs 5-HT₂ centraux (par activation de mécanismes pré-ganglionnaires sympathiques) et périphériques (contraction des artères de calibre moyen); (iii) une deuxième phase hypotensive plus prolongée d'origine centrale et périphérique. L'hypotension centrale est induite par des récepteurs 5-HT_{1A} dont la stimulation inhibe l'activité sympathique. L'hypotension périphérique est due à la stimulation des récepteurs 5-HT₁ (5-HT₁-like) situés dans l'endothélium des artérioles; leur stimulation entraîne la libération d'EDRF (endothelial derived relaxing factor) ou NO et comme conséquence une augmentation de GMP cyclique au niveau de certains vaisseaux couplés positivement à l'AC. Enfin, une partie de l'action hypotensive de la 5-HT pourrait être due à une diminution de la libération de NE à partir des terminaisons sympathiques.

En ce qui concerne les effets vasculaires, l'activation de récepteurs centraux 5-HT₂ induit une réponse tensionnelle associée à une augmentation de l'activité sympathique et une libération de vasopressine chez certaines espèces animales, tandis que l'activation des récepteurs 5-HT₂ périphériques induit une vasoconstriction par action directe sur les vaisseaux de gros calibre.

1.3.2.4. Hypertension

Actuellement, on utilise l'uradipil dans le traitement de la crise hypertensive aiguë. Ce médicament doit ses propriétés hypotensives à une synergie d'effet agoniste sur les récepteurs 5-HT_{1A} centraux et d'effet antagoniste sur les récepteurs α -RA. Le flesinoxan, agoniste 5-HT_{1A}, dépourvu d'activité α -lytique est à l'étude. Actuellement, il n'y a pas de substance à action sélective sur les récepteurs périphériques 5-HT₁. Une substance douée de propriétés agonistes 5-HT₁ et antagoniste 5-HT₂ en périphérie serait un antihypertenseur potentiel particulièrement intéressant. La kétansérine doit ses propriétés antihypertensives à une synergie d'effets antagonistes sur les récepteurs 5-HT₂ et les récepteurs α adrénergiques.

1.3.2.5. Migraine

La migraine est une affection très invalidante qui trouve son origine à la fois au niveau des neurones cérébraux et des vaisseaux sanguins qui irriguent la tête. Le traitement de la migraine associe des mesures préventives pour les migraineux chroniques et la prise de médicaments pendant la crise. L'intérêt clinique des molécules antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} se situe principalement dans la prophylaxie de la migraine (methysergide, pizotifène, cyproheptadine), le traitement de l'anorexie (cyproheptadine) et le traitement de l'hypertension (kétansérine). En traitement préventif, on utilise de nombreux types de médicaments dont les antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C} tel le methysergide ou 5-HT_{2A} tels le pizotifène et la cyproheptadine. Ces molécules n'ont cependant pas d'action sélective (la kétansérine n'a pas d'action antimigraineuse). Dans le traitement de la crise on utilise des vasoconstricteurs agissant sur les récepteurs sérotoninergiques tels les dérivés de l'ergot de seigle qui n'ont pas d'action sélective et de nombreux effets secondaires et plus récemment, le sumatriptan, agoniste spécifiques des récepteurs 5-HT_{1D} dont l'efficacité dans le traitement de la crise de migraine est parfaitement établie. Cette molécule agit en contractant de manière

sélective les vaisseaux intracrâniens dilatés pendant la migraine, plus particulièrement les vaisseaux des méninges, et diminue les symptômes de l'aura en agissant sur les 5-HT_{1D} de la dure mère impliqués dans la réponse inflammatoire neurogène associée à la migraine (McCall et Clement, 1994).

1.3.2.6. Troubles digestifs

Le cisapride et la métoclopramide qui sont des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ périphériques et des agonistes des récepteurs 5-HT₄ sont utilisés en thérapeutique. Ils stimulent la motilité et la vidange gastrique (Lux et coll., 1994).

1.4. Les catécholamines

Les catécholamines (CA) sont les médiateurs impliqués dans la transmission adrénergique; la NE comme médiateur du tonus sympathique neurogène et l'épinéphrine libérée par la medullo-surrénale, vecteur de l'activité sympathique humorale.

1.4.1. Synthèse

Le marqueur métabolique clé des cellules catécholaminergiques est la tyrosine hydroxylase (TH) qui convertit la tyrosine en L-DOPA. Cet intermédiaire est ensuite transformé en dopamine (DA) par l'enzyme L-DOPA décarboxylase. Cette synthèse est illustrée dans la figure 3.

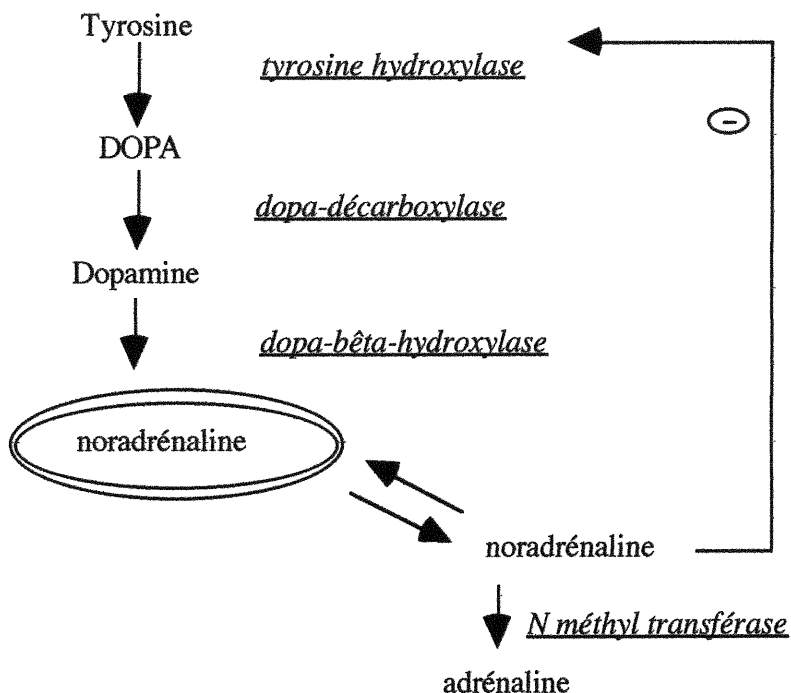


Figure 3: Voie de synthèse des catécholamines.

1.4.2. Libération et régulation

L'arrivée du potentiel d'action est associée à une entrée massive de sodium et à une dépolarisation qui provoque une entrée de calcium et la libération de médiateurs dans la fente synaptique. Une fois dans la fente synaptique, la NE va interagir avec les récepteurs post-synaptiques puis être recaptée. Elle va aussi activer des récepteurs pré-synaptiques qui modulent sa propre libération par le biais d'un rétrocontrôle négatif.

1.4.3. Métabolisme

Les enzymes impliquées, c'est-à-dire, la catécho-O-méthyl transférase cytoplasmique (COMT) et la monoamine oxydase (MAO) mitochondriale sont largement distribuées dans l'organisme, en particulier dans le foie et le rein. Comme il y a peu de COMT dans la terminaison synaptique, les MAO sont plus actives au niveau du neurone alors que les

COMT ont un rôle plus important dans les autres tissus. La désamination par les MAO est suivie d'une voie métabolique qui dépend du type de tissus: réduction dans le neurone ou oxydation dans les tissus périphériques. L'importance du phénomène de recapture neuronale explique pourquoi les effets sympathomimétiques des inhibiteurs de ces voies métaboliques (IMAO) sont relativement modestes. Le radical méthyl spécifique de l'adrénaline est coupé par les MAO. Le seul métabolite qui conserve encore le radical méthyl spécifique de l'adrénaline est la métanéphrine, les autres métabolites sont identiques à ceux de la NE, l'acide vanylmandélique étant le dernier de cette voie d'inactivation des CA. Il est prédominant dans l'urine et est exclusivement produit dans le foie (Boulton et Eisenhofer, 1998).

1.4.4. Effets pharmacologiques des CA

Les CA (DA, NE et épinéphrine) sont exprimées dans le SNC et en périphérie. Au niveau du cerveau, les CA sont impliquées dans des fonctions majeures telles que le contrôle moteur, l'émotion et la régulation viscérale. De plus, ces NT sont impliqués dans des désordres neurologiques (maladie du Parkinson) et psychiatriques (schizophrénie). En périphérie, elles régulent plusieurs fonctions cardio-vasculaires, métaboliques et immunitaires (Goldstein, 1998). Dans cette revue, on va se concentrer sur les récepteurs adrénergiques (RA) à cause de leur présence et leur implication importantes dans la modulation de la réponse immunitaire. Quant aux récepteurs dopaminergiques, leur expression sur les cellules du SI reste controversée. De plus, les effets de la DA sur le SI ne semblent pas spécifiques aux récepteurs dopaminergiques mais impliqueraient plutôt les RA (Kouassi et Revillard, 1981; Stepien et coll., 1981).

1.5. Récepteurs adrénergiques

Parmi les agents biologiques dont les actions sont induites par l'intermédiaire de

protéines G, on retrouve les catécholamines NE et épinéphrine ainsi que leurs congénères synthétiques utilisés comme agents thérapeutiques. Les RA sont présents sur presque tous les tissus périphériques et toutes les populations neuronales du SNC, et ils sont impliqués dans les actions cérébrales et périphériques des CA. Plusieurs types ont été définis selon leurs actions physiologiques distinctes et leurs spécificités pharmacologiques. Ils ont des affinités divergentes pour différents agents synthétiques d'où leur subdivision en plusieurs sous-types distincts. Récemment, le développement rapide des techniques de biologie moléculaire a eu un impact majeur sur la classification des RA. On distingue trois types majeurs (tableau 4): les récepteurs α_1 , α_2 et β adrénergiques. Cette classification est basée sur trois critères: 1) la différence d'affinité pour les drogues sélectives; 2) les seconds messagers sont différents; 3) et finalement, les séquences en acides aminés (Rohler et Kobilka, 1998; Bylund, 1992; 1985).

Les récepteurs sont définis par une échelle de sensibilité à une série d'agonistes et d'antagonistes. On reconnaît actuellement près d'une dizaine de récepteurs différents à la NE et l'épinéphrine dont seuls 4 présentent à ce jour un intérêt clinique. Ahlquist dès 1948 avait soupçonné de l'existence de deux types de récepteurs (α et β) pour la NE et ses analogues (Ahlquist, 1948). Il a fallu attendre la synthèse d'autres agonistes et antagonistes pour découvrir que chacune de ces deux classes pouvait être subdivisée en récepteurs α_1 et α_2 pour les premiers et β_1 et β_2 pour les seconds. La confirmation de l'existence de ces récepteurs a été obtenue en identifiant 4 gènes différents encodant ces 4 récepteurs. On a montré par la même occasion que chacun de ces types de récepteurs pouvait encore être subdivisé et qu'il existait un troisième type de récepteurs β au niveau du tissu adipeux et de l'iléon. La définition pharmacologique de ces différents types et sous-types est donnée dans le tableau 4. Les conséquences fonctionnelles de ces dernières subdivisions sont encore discutées. Les médiateurs endogènes sont beaucoup moins spécifiques que les molécules citées dans le tableau 4. L'adrénaline n'a aucune spécificité, sauf à faible dose où elle est plus active sur les récepteurs β . La NE est un agoniste des récepteurs α_1 , α_2 et β_1 .

L'isoprotérénol (ISO) est un agoniste non sélectif β_1/β_2 .

Tableau 4: Définition pharmacologique des récepteurs adrénergiques

Types et Sous-types	Protéines G	Puissance des CA	Agonistes spécifiques	Antagonistes spécifiques
α_1				
α_{1A}	G_q/G_{11}	NE \geq épinéphrine	A61603	KMD3213 Niguldipine
α_{1B}	G_q/G_{11}	NE = épinéphrine	_____	AH11110A
α_{1D}	G_q/G_{11}	NE = épinéphrine	_____	BMY7378
α_2				
α_{2A}	G_i/G_o	épinéphrine > NE	Oxymetazoline	BRL44408
α_{2B}	G_i/G_o	épinéphrine > NE	_____	ARC239, Prazosin Imiloxan
α_{2C}	G_i/G_o	épinéphrine > NE	_____	Prazosin, ARC239
β				
β_1	G_s	NE > épinéphrine	NE, RO363, denopamine	CGP20712A, betaxolol, aténolol
β_2	G_s	épinéphrine > NE	Procaterol Zinterol	ICI 118551
β_3	$G_s (G_i/G_o)$	NE = épinéphrine	Salmeterol BRL 37344 CL 316243 CGP 12177	SR59230A, bupranolol
β_4	G_s	NE \geq épinéphrine	_____	Bupranolol

La caractéristique majeure des RA est leur appartenance à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). L'analyse de la séquence primaire de ces récepteurs permet de prédire un motif d'organisation membranaire se composant de sept segments hydrophobes pouvant former des hélices α transmembranaires reliées entre elles par trois boucles extracellulaires et trois boucles cytoplasmiques, une extrémité aminoterminal extracellulaire et une queue carboxyterminale cytoplasmique. Cette organisation structurale parfaitement conservée constitue le trait dominant de cette superfamille de récepteurs. Les hélices α étroitement accolées définissent une fente centrale

étroite et profonde. Au fond de cette fente, on peut observer une poche hydrophobe délimitée par les hélices 3, 4, 5 et 6 et contenant les résidus impliqués dans le processus de reconnaissance du ligand: Asp₃₁₁ de l'hélice 3, Ser₅₀₅ et Ser₅₀₈ de l'hélice 5, etc. En effet, il est postulé que cette région correspond au site de liaison des agonistes. Ainsi, dans tous les récepteurs des CA on trouve dans cette poche deux résidus serine (Ser₅₀₅, Ser₅₀₈) conservés dans une position et une géométrie idéale pour interagir par liaison hydrogène avec les deux groupes hydroxyles du catéchol du médiateur. La sérotonine, en revanche, ne porte qu'un seul groupe hydroxyle: ses récepteurs ne présentent plus qu'une seule des deux serines (Ser₅₀₅), l'autre étant remplacée par une alanine.

1.5.1. Récepteurs α_1 -adrénergiques

1.5.1.1. Caractéristiques communes

C'est une famille de récepteurs très hétérogènes stimulés par les NT sympathiques NE et épinéphrine. Ces récepteurs sont bloqués par le prazosin et activent la PLC entraînant la génération de deux seconds messagers: le DAG qui active la PKC et l'IP₃ qui mobilise le calcium intracellulaire (Ford et coll., 1994; Nichols, 1991).

1.5.1.2. Définition pharmacologique des sous-types α_1

1.5.1.2.1. Récepteurs α_{1A} et α_{1B} adrénergiques

Initialement, ces deux récepteurs ont été différenciés sur la base de leur affinité pour la phentolamine et le 2(N[2,6-di-methoxyphenoxyethyl])amino-méthyl-1,4-benzodioxane (WB4101) (Ford et coll., 1994). Leur distribution tissulaire est très différente. Ainsi, la rate et le foie de rat représentent les tissus où la réponse α_1 adrénergique est induite primordialement par les récepteurs α_{1B} , alors que le cortex cérébral, l'hippocampe, le coeur

et le rein contiennent de façon mixte les deux populations de récepteurs (Minneman et Atkinson, 1991). Le récepteur α_{1A} a une affinité 10 à 100 fois plus élevée que le récepteur α_{1B} pour certains agonistes et antagonistes .

1.5.1.3. Signalisation

L'activation des récepteurs α_1 AR résulte en une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire via l'activation d'une PLC. Cette dernière hydrolyse l'IP_{4,5} biphosphate en IP₃ qui mobilise le Ca^{2+} intracellulaire et en DAG qui active à son tour la PKC. Cependant, plusieurs réponses α_1 adrénergiques nécessitent du Ca^{2+} extracellulaire provenant de canaux voltage-dépendants. Il a été postulé que le récepteur α_1 RA du muscle lisse vasculaire est lié à deux protéines G induisant ainsi l'activation de la PKC d'une part, et d'autre part, la stimulation d'un canal membranaire calcique. Dans ce modèle, la liaison d'un agoniste complet active les deux messagers alors qu'un agoniste partiel active uniquement la protéine G liée au canal calcique (Ruffolo et coll., 1991). D'autres seconds messagers secondaires au Ca^{2+} intracellulaire sont attribués aux α_1 AR tels que l'activation de la PLA₂, la PLD ainsi que les nucléotides cycliques (Insel et coll., 1998; Ford et coll., 1994; Minneman et coll., 1991).

1.5.2. Récepteurs α_2 adrénergiques

1.5.2.1. Caractéristiques communes

La classification des récepteurs α_2 adrénergiques est basée sur des études fonctionnelles et de liaison, et plusieurs protéines α_2 RA ont été clonées et exprimées. On distingue quatre sous-types de récepteurs: α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} et α_{2D} stimulés par la NE et l'épinéphrine et inhibés par la yohimbine et la rauwolscine. Les sous-types α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} sont parfois désignés par α_{2C10} , α_{2C2} et α_{2C4} . Une telle appellation est basée sur leur localisation chromosomique chez l'homme. Les récepteurs α_2 RA sont tous couplés

négativement à l'AC en plus d'autres signaux de transduction (Mackinnon et coll., 1994; Nichols, 1991).

1.5.2.1.1. Récepteurs $\alpha_{2A/2B}$ adrénergiques

Les études de liaison ont établi la présence de deux sous-types distincts de récepteurs α_2 RA basée sur leur différence d'affinité pour le prazosin. Ainsi le récepteur α_2 RA humain des plaquettes présente une faible affinité tandis que celui du poumon murin a une haute affinité. Il existe une corrélation parfaite entre la capacité du prazosin à bloquer l'inhibition de l'AC par les récepteurs α_2 RA et son affinité de liaison pour ces mêmes récepteurs (Mackinnon et coll., 1994).

1.5.2.1.2. Récepteurs α_{2C} et α_{2D} adrénergiques

Le récepteur α_{2C} adrénergique est similaire au récepteur α_{2B} adrénergiques avec une haute affinité relative pour le prazosin et une haute affinité pour la rauwolscine. Il est l'unique sous-type exprimé sur le rein de la sarigue (opossum). Le récepteur α_{2D} adrénergique est trouvé dans l'épiphyse bovine, la glande submaxillaire de rat et la lignée tumorale murine pancréatique RINm5F (Remaury et Paris, 1992; Simonneaux et coll., 1991). Il a une faible affinité pour le prazosin et la [3 H]rauwolscine. Il est maintenant clair que malgré la confusion dans la distinction des récepteurs α_{2A} des α_{2D} , ce dernier chez le rat est l'homologue du récepteur α_{2A} humain (Mackinnon et coll., 1994).

1.5.2.2. Signalisation

Il est bien établi que l'activation des récepteurs α_2 RA induit une inhibition de l'AC via une protéine G_i (Limbird, 1988). Cependant, ce signal ne semble pas être responsable de certains effets des récepteurs α_2 RA tels l'agrégation des plaquettes et l'inhibition de la

libération des NT (Clare et coll., 1984). Par ailleurs, les récepteurs α_2 RA du muscle lisse vasculaire comme les α_1 RA sont liés à un canal calcique (Nichols., 1991). D'autres signaux sont aussi associés à des récepteurs α_2 RA comme l'activation des canaux potassiques, de la PLA₂ et d'un échangeur Na⁺/H⁺ (Mackinnon et coll., 1994).

1.5.3. Récepteurs β adrénergiques

1.5.3.1. Caractéristiques communes

Ils sont en nombre de trois: β_1 , β_2 et β_3 RA clonés et caractérisés pharmacologiquement; un 4ème type β_4 semble exister mais reste à être caractérisé (tableau 4). Ces différents récepteurs ont différentes affinités pour les CA endogènes NE et épinéphrine à l'inverse des récepteurs α RA. Ainsi, ces CA sont équipotentes sur le récepteur β_3 (NE = épinéphrine), alors que épinéphrine est plus puissante sur le récepteur β_2 (épinéphrine >> NE). En revanche, la NE présente une haute affinité pour les récepteurs β_1 AR, mais supérieure ou égale à épinéphrine pour le récepteur β_4 . L'isoprotérénol, CA synthétique, est considéré comme agoniste puissant sur ces β AR, mais le propranolol, antagoniste non sélectif β_1/β_2 , reste faible sur les récepteurs β_3 . Cette famille de récepteurs est couplée positivement à l'AC qui constitue leur signal de transduction numéro un. Tous les β AR ont la 3ème boucle courte (54 - 74 résidus) et une queue carboxyterminale longue (84 - 137 résidus) (Bouvier et Rousseau, 1998).

1.5.3.2. Classification pharmacologique des récepteurs β adrénergiques

La caractérisation pharmacologique des récepteurs β_1 et β_2 fut basée sur leur ordre d'affinité pour les agonistes endogènes et synthétiques (Lands et coll., 1967). Par la suite, des antagonistes sélectifs, aténolol, betaxolol, ont été identifiés pour le récepteur β_1 et ICI118,551 pour le récepteur β_2 (Dooley et coll., 1986; O'Donnell et Wanstall, 1980). Les

récepteurs β_1 augmentent la fréquence cardiaque et la force des contractions, la stimulation de la sécrétion de la rénine et la relaxation des artères coronariennes et du muscle lisse gastro-intestinal. En revanche, le récepteur β_2 induit la relaxation du muscle lisse à tous les sites. Il est présent dans presque tous les tissus de mammifères et est responsable de la régulation de processus aussi variés que le métabolisme et la sécrétion de plusieurs hormones. Il en résulte que le sous-type β_1 est la principale cible thérapeutique cardiaque des β -bloquants alors que le sous-type β_2 est la principale cible pulmonaire des agonistes β_2 , notamment pour le traitement de l'asthme. Les récepteurs β RA sont couplés via une protéine Gs à la stimulation de l'AC qui semble induire la majorité de leur activité biologique par sa capacité à promouvoir la formation d'AMP et l'activation d'une PKA. Par contre, il a été suggéré que Gs pourrait aussi, par interaction directe, stimuler un canal calcique (Yatani et coll., 1988) et un échangeur Na^+/H^+ (Voyno-Yasenetskaya et coll., 1994) en réponse à une stimulation β adrénergique. Un couplage potentiel des récepteurs β AR aux MAP Kinases (mitogen-activated protein kinase) via la sous-unité $\beta\gamma$ a été récemment évoqué (Bouvier et Rousseau, 1998). L'un des récepteurs dont la régulation a été la plus étudiée est sans doute le récepteur β_2 -adrénergique qui est considéré à plusieurs titres comme le prototype des RCPG (Lefkowitz et Caron, 1988) et la plupart des études de la régulation du β_2 AR ont porté sur le système β_2 AR/Gs/AC.

Le récepteur β_3 est le dernier de cette famille à être cloné. C'est lors de la recherche du récepteur humain β_1 par hybridation croisée, que l'existence d'un 3ème gène encodant un récepteur β AR, apparemment homologue aux deux premiers, a été révélée. Le clonage moléculaire, le séquençage du gène et une étude fonctionnelle après transfection cellulaire, ont révélé qu'il s'agit effectivement d'un 3ème sous-type. On ne lui connaît pas d'antagonistes sélectifs, mais il est insensible à la majorité des antagonistes β adrénergiques. Les caractéristiques intrinsèques de ce récepteur peuvent se résumer ainsi: une affinité relativement faible pour les CA endogènes et pour les antagonistes conventionnels des récepteurs β_1/β_2 RA. L'expression du récepteur β_3 RA paraît limitée aux tissus adipeux blanc

et brun ainsi qu'au tractus digestif (Krief et coll., 1993). Il joue un rôle déterminant dans le contrôle noradrénergique de la lipolyse des triglycérides (adipocytes blancs), mais également de la thermogénèse (adipocytes bruns). L'ensemble de ces travaux illustre l'importance potentielle du rôle du récepteur β_3 AR comme cible thérapeutique pour le traitement moléculaire de l'obésité. Ce récepteur contribue aussi à la stimulation de la sécrétion de l'insuline à partir des îlots des cellules pancréatiques, l'inhibition de la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique et finalement l'activation contractile dans le muscle gastro-intestinal et le coeur humain (Gauthier et coll., 1996). Chaudhry et coll. (1994) ont montré que le récepteur β_3 dans des adipocytes de rat interagit avec les protéines Gs et Gi; l'interaction récepteur β_3 avec Gi limite la stimulation de l'activité AC par β_3 .

Finalement, le récepteur β_4 est le nouveau récepteur de cette famille qui reste encore peu caractérisé. Ce récepteur est atypique et résistant aux antagonistes β_1 et β_2 (aténolol, ICI). Son activation par de faibles concentrations de BRL (< nM), agoniste sélectif β_3 , dans le muscle lisse de rat stimule l'utilisation du glucose. Cependant, les mécanismes cellulaires impliqués sont inconnus (Liu et coll., 1996). Plusieurs études indiquent que les tissus cardiaques contiennent ce récepteur où il induit un effet inotrope positif (Kaumann et coll., 1998).

2. MONOAMINES BIOGÈNES ET SYSTÈME IMMUNITAIRE

La réponse immunitaire des vertébrés supérieurs comprend un ensemble complexe d'événements cellulaires et moléculaires destinés à neutraliser spécifiquement l'agent infectieux, la greffe incompatible ou la cellule tumorale. Plastique et dynamique, le système immunitaire fascine par sa spécificité, sa diversité et son adaptabilité.

Le système immunitaire, comme le système nerveux, a longtemps été considéré comme un système capable de s'autoréguler. Cependant, il est clairement démontré que ces

deux systèmes interagissent entre eux de façon bidirectionnelle. Ainsi, le SN est doté d'un pouvoir modulateur sur les fonctions immunitaires. Les facteurs psychologiques, particulièrement le stress, influencent le développement et la progression des tumeurs, des infections et des maladies auto-immunes. En effet, dans de nombreuses études cliniques impliquant des adultes normaux et des patients cancéreux, la difficulté de s'adapter au stress était associée à une dépression de l'activité des cellules NK (Natural Killer) responsables de la résistance aux cancers et aux infections virales (Besedovsky et coll., 1996). La production d'anticorps (Ac) après stimulation antigénique, et la prolifération des lymphocytes B stimulées par les lipopolysaccharides (LPS) sont diminuées chez ceux qui ont la difficulté à s'adapter au stress; il en est de même pour l'effet mitogénique de la PHA sur les lymphocytes T. En revanche, des stress répétés ou prolongés n'ont pas d'effets évidents sur l'immunité, ou même renforcent les défenses immunitaires (production des Ac) (Ader et coll., 1991). La médiation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien et la sécrétion des glucocorticoïdes, mais aussi la sécrétion de peptides opiacés, sont invoqués pour expliquer ces relations stress-immunité. L'autre voie de contrôle de la réponse immunitaire implique le SN autonome. Cette régulation se fait à trois niveaux: 1) présence d'une innervation monoaminergique des organes lymphoïdes centraux et périphériques; 2) synthèse des NT 5-HT et CA dans les organes lymphoïdes et par les lymphocytes; 3) l'expression des récepteurs spécifiques pour ces NT sur les cellules du SI et finalement, la modulation de la réponse immunitaire par les NT.

À l'inverse, le SI semble capable d'informer en permanence le SN sur son propre fonctionnement. Les cellules du SI agissent principalement par l'intermédiaire des cytokines capables d'affecter les fonctions neuro-endocriniennes (Besedovsky et coll., 1996).

2.1. Rôle de la sérotonine dans le système immunitaire

2.1.1. Caractérisation des récepteurs et des transporteurs de la 5-HT sur les cellules immunitaires

Bien que la nature exacte des récepteurs 5-HT sur les cellules lymphoïdes reste très controversée, de nombreux types et sous-types de récepteurs ont été identifiés et caractérisés sur ces cellules (Stefulj et coll., 2000). Ainsi, plusieurs évidences indiquent que les lymphocytes B (Mössner et Lesch, 1998; Choquet et Korn, 1988) et T (Meyniel et coll., 1997; Aune et coll., 1994; 1993; 1990), les macrophages (Sternberg et coll., 1987), les monocytes et les cellules NK (Hellstrand et coll., 1993; Hellstrand et Hermodsson, 1993) expriment des récepteurs 5-HT membranaires (tableau 5). Ces récepteurs ont été détectés sur les cellules de plusieurs espèces animales et chez l'humain. De plus, Fillion et coll., (1993) ont démontré la présence des ARNm correspondant aux récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, et 5-HT₂ dans le thymus de souris. Leurs études préliminaires ont aussi détecté l'ARNm pour le récepteur 5-HT_{1D}. Ces résultats indiquent que les gènes encodant les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, et 5-HT₂ sont exprimés dans le thymus et que les protéines correspondantes peuvent être produites localement (Fillion et coll., 1993). De plus, les ARNm des récepteurs 5-HT_{1B}, 1F, 2A, 2B, 6 et 7 sont présents dans le thymus, la rate et les lymphocytes du sang périphériques du rat (Stefulj et coll., 2000). L'affinité, le nombre et les mécanismes de transduction des récepteurs sérotoninergiques ont été caractérisés surtout sur la lignée cellulaire leucémique T humaine Jurkat, et sur des lymphocytes T humains normaux activés à la PHA. Ces deux types cellulaires expriment des sites de liaison de haute affinité pour le 8-OH-DPAT (Kd = 1 nM), un agoniste sélectif 5-HT_{1A}. L'analyse moléculaire de l'ARNm dans la lignée Jurkat et dans les lymphocytes T activés révèle la présence de récepteur 5-HT_{1A}. Dans la lignée Jurkat, la stimulation du récepteur 5-HT_{1A} (avec la 5-HT ou le 8-OH-DPAT) entraîne l'élévation du calcium intracellulaire, alors que dans les cellules T activées,

ce récepteur inhibe l'activité de l'AC. Ces effets sont partiellement bloqués par le spipéronne, un antagoniste non sélectif 5-HT₁/5-HT₂/D₂ dopaminergique. Choquet et Korn (1988) ont montré que la 5-HT peut aussi affecter les canaux potassiques dans une lignée cellulaire pré-B murine. Elle agit sur les processus d'activation et d'inactivation par l'intermédiaire de catégories distinctes de récepteurs. D'une part, elle augmente la conductance potassique après stimulation de récepteurs "5-HT₁-like", d'autre part, elle accélère le processus d'inactivation par l'intermédiaire de récepteurs 5-HT₃. Récemment, l'équipe de Meyniel (1997) a caractérisé de façon pharmacologique et biochimique les récepteurs 5-HT₃ sur les lymphocytes T de truite au repos et activés par la PHA; dans ces cellules, ces récepteurs sont fonctionnels et couplés à un canal sodique. Contrairement à Aune et coll. (1994) ayant observé que la stimulation mitogénique par la PHA augmente l'expression du récepteur 5-HT_{1A} sur les lymphocytes T, cette équipe a montré que la densité de récepteurs 5-HT₃ reste inchangée sur les lymphocytes au repos et après stimulation mitogénique (Meyniel et coll., 1997).

Tableau 5: Récepteurs 5-HT présents sur les cellules du système immunitaire:

Types cellulaires/tissus	5-HT₁	5-HT₂	5-HT₃	5-HT₆	5-HT₇
Lymphocytes B		2 ²	32,8		7 ⁷
Lymphocytes T	1A ¹	2 ³	34,8		
Monocytes/macrophages	1A ⁵	2 ⁶			
Thymus	1B ⁸ , 1F ⁸	2A ⁸ , 2B ⁸		6 ⁸	7 ⁸
Rate	1B ⁸ , 1F ⁸	2A ⁸ , 2B ⁸		6 ⁸	7 ⁸
Polymorphonucléaires	1B ⁸ , 1F ⁸	2A ⁸ , 2B ⁸		6 ⁸	7 ⁸

1: Aune et coll., 1993; 2: Choquet et Korn. 1988; 3: Ameisen et coll., 1989; 4: Meyniel et coll., 1997; 5: Hellstrand et coll., 1993; 6: Roszman et coll., 1985; 7: Schimpl 1989 (communication personnelle); 8: Stefulj et coll., 2000.

Bien que les cellules du système immunitaire (SI) ne présentent pas d'innervation sérotoninergique, elles possèdent en revanche un système de transporteur membranaire pour

la 5-HT. Ce dernier est dépendant de la dose, du sodium et du chlore. Il est également saturable et activé de façon maximale à 37°C. Il est inhibé par la clomipramine, la fluoxetine et l'imipramine, des antidépresseurs spécifiques du transport de la 5-HT au niveau du cerveau (Faraj et coll., 1994). Le rôle physiologique de ce transporteur et son influence sur la réponse immunitaire sont cependant inconnus. On a aussi démontré la présence de ce système de recapture de la 5-HT, possédant les mêmes propriétés qu'au niveau central, sur des macrophages de souris (Jackson et coll., 1988). Par ailleurs, l'analyse par northern blot a révélé la présence de l'ARNm du transporteur de la 5-HT dans la rate (Hoffman et coll., 1991). Récemment, il a été montré que l'IL-1 β (interleukine-1 β) est un puissant régulateur de l'expression du transporteur 5-HT dans la lignée cellulaire JAR (choriocarcinome). En effet, il y a une augmentation non seulement de l'ARNm mais aussi de la capture de la 5-HT (Ramamoorthy et coll., 1995). D'autre part, il est montré que le TNF α (tumor necrosis factor), comme l'IL-1 β , augmente la captation de la 5-HT dans ces mêmes cellules (Mössner et Lisch, 1998). À l'inverse, l'IL-4 (interleukine-4) induit une réduction de cette captation dans les lymphocytes B (Mossner et coll., 2001).

2.1.2. Modulation de l'immunité par la sérotonine et mécanismes d'action

L'existence d'une communication réciproque entre le SI et le système sérotoninergique est supportée par les études qui montrent qu'un changement dans les taux de la 5-HT dans certaines régions du cerveau diminuent les réponses humorales aux antigènes T-dépendants (Devoino et coll., 1975). Depuis, les recherches sur le rôle de la 5-HT dans la modulation de la réponse immune ont beaucoup progressé et les exemples qui suivent ne sont, certes, que les premiers d'une liste qui s'est allongée très rapidement.

2.1.2.1. Chimiotactisme

L'équipe de Foon était parmi les premières à montrer la capacité de la 5-HT à stimuler

les lymphocytes à sécréter des facteurs chimiotactiques pour les monocytes et pour les leucocytes polymorphonucléaires. Il s'agit d'une synthèse de *novo* après activation des cellules par la 5-HT et qui est bloquée par le méthysergide et la cyproheptadine (Foon et coll., 1976). Par ailleurs, dans les cellules endothéliales aortiques bovines, la 5-HT stimule la sécrétion d'un facteur chimiotactique de PM de 13-15 KDa et spécifique à la migration des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. Cette sécrétion est inhibée par les antagonistes 5-HT₂ (Farber et Beer, 1991). De plus, dans les cellules mésangiales de rat, la 5-HT augmente aussi l'expression du MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), mais de façon transitoire (Goppelt-Struebe et Stroebel, 1995). L'équipe de Laberge (1996) a montré, d'autre part, que la synthèse du facteur chimiotactique l'IL-16 est stimulée par la 5-HT. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la libération de IL-16 se fait par les lymphocytes T CD8⁺ humains, mais ce facteur chimiotactique présente une activité spécifique sur les cellules CD4⁺. C'est une synthèse de *novo* qui implique les récepteurs 5-HT₂. Une étude récente a montré que le méthysergide réduit la migration des éosinophiles de souris en réponse à l'éotaxine, chémokine C-C (cytokines caractérisées par la présence de 4 résidus de cystéines conservés dont deux sont adjacentes) activateur spécifique des éosinophiles. Cette équipe suggère que la 5-HT contribuerait au mécanisme d'activation de l'éotaxine, le dit mécanisme reste cependant indéterminé (Das et coll., 1997). En résumé, ces résultats suggèrent que la 5-HT peut jouer un rôle dans les processus inflammatoires en stimulant la production de médiateurs biologiques ayant des propriétés chimiotactiques. Elle jouerait le rôle d'un intermédiaire entre la réponse immédiate et la réponse retardée.

2.1.2.2. *Activité NK*

L'addition de 10⁻⁴ M de 5-HT à des cellules NK augmente l'activité cytotoxique, et l'expression des antigènes de surface CD16/CD56 sur ces cellules. À cette concentration, la 5-HT seule n'a pas d'activité cytotoxique. La 5-HT agit par l'intermédiaire de ses récepteurs 5-HT_{1A} en diminuant l'activité suppressive des monocytes sur les cellules NK (Hellstrand et

coll., 1993). Cette régulation de l'activité NK par la 5-HT semble importante dans les mécanismes de défense des cellules NK contre les tumeurs métastatiques. Cependant, ces résultats sont à l'opposé de ceux trouvés par l'équipe de Garssadi. Cette dernière a montré qu'à des concentrations de 10^{-10} - 10^{-4} M, la 5-HT inhibe la cytotoxicité des cellules NK dans le sang total. Cette action implique, en revanche, des récepteurs 5-HT₂, et elle est renversée par l'interféron alpha (IFN α) (Garssadi et coll., 1993).

2.1.2.3. Cytokines et sécrétion des anticorps

Les effets de la 5-HT sur la sécrétion des cytokines ont été décrits pour l'interféron γ (IFN γ). Cette lymphokine est produite en majorité par les cellules NK après stimulation par l'IL-2. Cette synthèse est régulée par les monocytes de deux façons opposées. À de faibles densités de monocytes, l'IFN γ est synthétisé en réponse à l'IL-2 par les cellules NK. Par contre, à de fortes densités, les monocytes inhibent cette synthèse. La 5-HT seule n'induit pas et n'affecte pas la production de IFN γ en réponse à l'IL-2. En revanche, en présence de monocytes à fortes densités, elle abolit les signaux suppresseurs induits par les monocytes sur la synthèse de l'IFN γ . L'effet de la 5-HT est reproduit par le 8-OH-DPAT. Il en résulte que le récepteur 5-HT_{1A} est impliqué dans la production de l'IFN γ (Hellstrand et coll., 1993).

Dans les lymphocytes T, la régulation de la production de l'IFN γ par la 5-HT dépend du stimulus utilisé. Quand ces cellules sont immunisées et stimulées par l'oxazolone, les antagonistes 5-HT_{1A} inhibent la production de l'INF γ et de l'IL-2 (cytokines Th1). Ces résultats suggèrent que dans les lymphocytes T, l'expression du récepteur 5-HT_{1A} semble jouer un rôle important dans la régulation de la production de l'INF γ et de l'IL-2 (Aune et coll., 1994). Dans les lymphocytes activés par la PHA, la 5-HT inhibe la synthèse de l'IFN γ . Cependant, les récepteurs et les mécanismes responsables ne sont pas déterminés (Finocchiaro et coll., 1988). Par ailleurs, la 5-HT est capable d'induire l'ARNm du TNF

dans des macrophages murins, mais de façon très faible (Polanski et coll., 1995).

Les effets de la 5-HT sur la réponse humorale sont variables. Les travaux de Martinez et Coleman (1990) ont montré que la 5-HT n'affecte pas la synthèse des immunoglobulines G (IgG) stimulées par le pokweed (PWM, mitogène des lymphocytes B) dans les cellules mononucléaires humaines. Cependant, d'autres travaux montrent que la sécrétion des anticorps est constamment supprimée après traitement des cellules avec la 5-HT ou après activation du système sérotoninergique. En effet, l'ablation des neurones sérotoninergiques dans le noyau de raphé est associée à l'augmentation de la réponse immune humorale (Devoino et coll., 1975). Ainsi, l'inoculation de la 5-HT ou de son précurseur 5-HTP à des animaux avant toute immunisation, supprime la production d'anticorps anti-érythrocytaires d'isotypes IgM et IgG. Par contre, l'administration du p-chlorophenylalanine (PCPA), inhibiteur de l'enzyme tryptophane hydroxylase qui diminue la libération de 5-HT, entraîne une augmentation de cette réponse (Jackson et coll., 1984). Donc, la 5-HT est capable de moduler la réponse humorale aux globules rouges de mouton, et peut être un messenger neural pour la modulation immunitaire.

Les effets neuro-immunomodulateurs de la 5-HT ne sont pas induits par le SNC, mais plutôt par un effet direct de la 5-HT sur les lymphocytes en périphérie. En effet, l'injection intracisternale de 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) à des souris pré-traitées avec le desméthylimipramine (DMI) n'a pas d'effet sur la réponse humorale aux antigènes T-dépendants. La 5,7-DHT est une neurotoxine qui détruit les neurones catécholaminergiques et sérotoninergiques. Le DMI bloque la captation de 5,7-DHT par les neurones catécholaminergiques limitant ainsi les effets de cette dernière aux neurones sérotoninergiques. Cependant, les effets supprimeurs de la 5-HT impliquent aussi le système sérotoninergique central. En effet, l'inhibition de la captation de la 5-HT avec le CGP-6085 et la sertaline induit une immunosuppression, alors que l'administration du cyproheptadine, bloqueur des récepteurs 5-HT₂ post-synaptiques, et l'activation des auto-récepteurs avec le delyside augmentent la réponse humorale (Devoino et coll., 1994). Enfin,

le traitement *in vivo* des souris avec des antagonistes 5-HT₂, methysergide ou kétansérine, entraîne la suppression de la réaction d'hypersensibilité retardée qui est induite par les cellules T. Ce résultat indique que les cellules T peuvent exprimer des récepteurs 5-HT₂ fonctionnels qui jouent un rôle dans l'activation de ces cellules et dans la synthèse de cytokines inflammatoires (Ameisen et coll., 1989). De plus, les antagonistes 5-HT_{1A} inhibent aussi la sensibilité de contact dans les cellules murines. Cette suppression est renversée par le 8-OH-DPAT. Ainsi, dans les lymphocytes T, l'expression du récepteur 5-HT_{1A} semble jouer un rôle important dans la régulation de la prolifération des lymphocytes T, la production de INF γ et IL-2, et finalement dans l'immunité cellulaire (Aune et coll., 1994). Par ailleurs, l'implication des récepteurs 5-HT₄ dans la réponse humorale *in vitro* a aussi été suggérée par l'équipe de Smejkal-Jagar, mais les mécanismes restent encore inconnus (Smejkal-Jagar et Boranic, 1995).

2.1.2.4. Phagocytose

De nombreuses publications ont porté sur la régulation de la phagocytose par la 5-HT. Ainsi, les premières études ont montré que la 5-HT stimule la phagocytose des bactéries par les cellules polymorphonucléaires (Nothover, 1961). Par conséquent, la déplétion de 5-HT chez des rats augmente leur susceptibilité à l'infection par le staphylocoque (Mishra et Sanyal, 1959). La 5-HT augmente aussi la phagocytose par les macrophages péritonéaux murins (Polanski et coll., 1995). Par ailleurs, la 5-HT module la phagocytose induite par l'INF γ dans les macrophages provenant de moelle osseuse murine. À de faibles concentrations d'INF γ , la 5-HT augmente la phagocytose, par contre, à de faibles concentrations d'INF γ , elle la supprime dans ces mêmes cellules. Ces effets sont inhibés par le spipérone, la kétansérine et le LY53857 (Sternberg et coll., 1987). Ces résultats suggèrent la présence de récepteurs 5-HT₂ fonctionnels sur les macrophages.

En revanche, la 5-HT est capable d'inhiber la phagocytose; cet effet est antagonisé

par la metergoline mais les récepteurs responsables ne sont pas caractérisés (Cassone et coll., 1974). De la même façon, dans les granulocytes humains et de rat, l'activité phagocytaire est aussi diminuée par la 5-HT mais les mécanismes impliqués ne sont pas caractérisés (Nannmark et coll., 1992). Finalement, une étude récente a montré que la 5-HT inhibe de façon dépendante dose la phagocytose induite par les polymorphonucléaires de rat, mais les récepteurs et les mécanismes impliqués demeurent indéterminés (Vial et coll., 1995).

2.1.2.5. Effets prolifératifs

La 5-HT connue essentiellement comme une amine vasoactive et NT, représente une nouvelle classe de facteur de croissance impliquant des récepteurs couplés aux protéines G. Elle est actuellement bien connue comme facteur de croissance pour une variété de types cellulaires. Grâce à l'extrême diversité de ses récepteurs, la 5-HT constitue un modèle utile pour étudier la relation entre les différentes voies de signalisation de ses récepteurs et la réponse mitogénique.

2.1.2.5.1. Tissus tumoraux

La sécrétion des facteurs de croissance par les cellules tumorales et leur rôle dans la prolifération maligne présente un intérêt croissant. L'utilisation de la sérotonine constitue une stratégie thérapeutique potentielle dans le contrôle de ces tumeurs. En effet, la lignée humaine carcinoïde BON est connue pour synthétiser la 5-HT. Dans cette lignée, c'est l'inhibition des taux d'AMPc et de la PKA via le récepteur 5-HT_{1A} qui augmente la prolifération des cellules induite par la 5-HT. Il en résulte que cette dernière joue le rôle d'un facteur de croissance pour cette lignée tumorale (Ishizuka et coll., 1992). La 5-HT est aussi libérée par la lignée cellulaire humaine GLC8 (carcinome de poumon) pour laquelle, elle joue le rôle de mitogène. Dans ce cas, le récepteur 5-HT_{1D} couplé négativement à l'AC est responsable des effets observés et ce signal est partiellement impliqué dans la croissance

cellulaire (Cattaneo et coll., 1994). D'un autre côté, des auteurs ont montré que la 5-HT augmente la capacité proliférative des cellules néoplasiques murines X63 (myélome) et SHV125 (Hybridome). Ces effets sont inhibés par le propranolol et la kétansérine, mais les récepteurs et les mécanismes responsables ne sont pas déterminés (Smejkal-Jagar et Boranic, 1995).

Des études ont montré aussi la présence de la 5-HT dans le carcinome prostatique (Abdul et coll., 1994). Dans ce dernier, le pindobind, antagoniste 5-HT_{1A}, inhibe la prolifération *in vitro* de trois lignées cellulaires tumorales indépendantes des androgènes: PC-3 (agressive), DU-145 (peu agressive) et LNCaP (non agressive). Cet effet anti-prolifératif est aussi observé *in vivo* chez des souris "nude" athymiques traitées avec les cellules cancéreuses PC-3. De plus, le pindobind est capable de réduire la taille et le poids des tumeurs PC-3 dans ces souris. Les études de liaison réalisées avec le [³H]8-OH-DPAT, agoniste 5-HT_{1A} sélectif, montrent la présence de sites de liaison 5-HT_{1A} sur les 3 lignées cellulaires, une affinité de l'ordre du μ M et une forte densité de récepteurs surtout pour la lignée cellulaire PC-3. L'ensemble de ces résultats suggère l'implication du récepteur 5-HT_{1A} dans la prolifération tumorale et le rôle clinique des antagonistes 5-HT_{1A} dans le traitement du cancer de la prostate.

2.1.2.5.2. Tissus lymphoïdes

En périphérie au niveau des organes lymphoïdes, et malgré l'absence d'une innervation sérotoninergique, la 5-HT peut être captée par les terminaisons nerveuses adrénérgiques et relâchée comme NT classique suite à une stimulation nerveuse (Cohen, 1984). De plus, les travaux de Fuchs et coll. (1988) ont montré que la 5-HT est localisée comme co-transmetteur avec la noradrénaline (NE) dans la rate de souris. La distribution de ces deux amines n'est pas homogène dans les différentes régions de la rate. Ainsi, la 5-HT se trouve associée aux cellules spléniques, alors que la majorité de la NE se trouve localisée

dans la capsule. D'autre part, les lymphocytes et les monocytes peuvent aussi synthétiser la 5-HT après stimulation par la PHA ou l'IFN γ (Finocchiaro et coll., 1988). Il en résulte un rôle d'immunomodulateur pour la 5-HT. De ce fait, la 5-HT participe à la régulation de la réponse immunitaire *in vivo* et *in vitro*. Elle est ainsi capable de moduler la réponse proliférative des cellules immunitaires induite par des mitogènes de façon négative et/ou positive.

Les premières études ont montré que l'incubation des cellules spléniques avec la 5-HT inhibe leur prolifération induite par la PHA ou par des cellules allogéniques, mais les mécanismes et les récepteurs impliqués ne sont pas décrits (Bonnet et coll., 1984). L'équipe de Smejkal-Jagar a également montré une inhibition de la prolifération des cellules spléniques stimulées par la concanavaline A (ConA). Contrairement à leurs effets sur les cellules leucémiques, le propranolol et la kétansérine ne bloquent pas les effets inhibiteurs de la 5-HT sur les cellules spléniques (Smejkal-Jagar et Boranic, 1995). L'addition de 5-HT à 10^{-3} M à des lymphocytes humains activés par la PHA inhibe aussi leur prolifération, mesurée par incorporation de $^3\text{H-TdR}$. Cette inhibition se fait par un mécanisme indépendant de la production de l'interleukine 2 (IL-2) (Finocchiaro et coll., 1988; Slauson et coll., 1984). D'autres part, l'équipe de Kut a montré que la 5-HT à de fortes concentrations inhibe la réponse proliférative des lymphocytes T murins. Cet effet est observé aussi bien avec la 5-HT exogène qu'endogène dont la synthèse est augmentée par la fenfluramine (Kut et coll., 1992). Les effets suppressifs de la 5-HT à des doses élevées présentent un intérêt davantage d'ordre pharmacologique que physiologique même si dans certaines conditions pathologiques (inflammation et ischémie) les taux de 5-HT peuvent atteindre $100\mu\text{M}$ (Betten et coll., 2001). Finalement, la 5-HT inhibe de façon dépendante de la dose (10^{-9} - 10^{-4}M) la prolifération des cellule spléniques de souris DBA/2 stimulées par le LPS (Roszman et coll., 1985).

L'équipe de Meyniel et coll. (1997) a montré que la 5-HT et le 2-méthyl-5-HT (2-

CH₃-5-HT), agoniste 5-HT₃, réduisent la prolifération des lymphocytes T de truite stimulés par la PHA de façon dépendante de la dose. De plus, 2-CH₃-5-HT bloque la transition des cellules de la phase G₀/G₁ à la phase S du cycle cellulaire. Les antagonistes 5-HT₃, ICS-205-930, MDL-72222 et metoclopramide, utilisés à de faibles concentrations renversent les effets inhibiteurs sur la prolifération. Les études de liaison ont révélé la présence de récepteurs 5-HT₃ sur les lymphocytes T du poisson. La caractérisation biochimique a montré de son côté que ce récepteur est un canal sodique. L'ensemble des résultats de cette étude montre que les lymphocytes T de truite expriment des récepteurs 5-HT₃ fonctionnels impliqués dans la prolifération, et suggère que le courant sodique serait probablement le mécanisme responsable des effets immunosuppresseurs de la 5-HT sur la prolifération.

La 5-HT ne régule pas uniquement la prolifération des cellules immunitaires de façon négative. Elle est capable aussi de stimuler cette réponse. Ainsi, l'addition de faibles concentrations de 5-HT aux cellules spléniques de souris en culture augmente leur prolifération en réponse à la ConA, et à l'IL-2. Ces effets stimulateurs de la 5-HT sont bloqués par des antagonistes 5-HT₂ (Young et coll., 1993). De plus, le pré-traitement des cellules avec le PCPA, inhibiteur de la synthèse de 5-HT, diminue la prolifération des lymphocytes T et leur capacité à exprimer des récepteurs à l'IL-2 en réponse à la ConA. Les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ sont affectés, mais l'effet est plus important sur ces derniers et est restauré partiellement en présence de 5-HT exogène. Il en résulte que la 5-HT endogène peut réguler l'activité des lymphocytes T. Cette même équipe a montré que la diminution de la prolifération des lymphocytes T en absence de 5-HT est un phénomène dépendant des macrophages. En effet, la prolifération des cellules T de souris pré-traitées avec le PCPA est rétablie en présence de macrophages provenant de souris non traitées. L'incapacité des macrophages de souris pré-traitées avec le PCPA à augmenter l'incorporation de thymidine tritiée serait due à leur déficience en 5-HT.

Les mécanismes par lesquels la 5-HT favorise les effets des macrophages restent

cependant mal connus. Deux hypothèses ont été envisagées. La première est que les macrophages dépendent complètement de la 5-HT pour induire leur fonction accessoire. L'autre possibilité est que la 5-HT renverse des effets supprimeurs induits par les macrophages (Young et Matthews, 1995; Young et coll., 1993). Cette dernière hypothèse est supportée par les études de Hellestrand et coll. (1993) qui suggèrent que les monocytes suppriment les fonctions des cellules NK, mais cette suppression est renversée après addition de la 5-HT.

D'autres auteurs montrent que l'inhibition de la synthèse de la 5-HT par le PCPA dans des blastes T humains réduit leur capacité proliférative en réponse à l'IL-2, la PHA ou un anti-CD3, OKT3 (Aune et coll., 1994). Cette inhibition est complètement renversée par le 5-hydroxytryptophane. La même équipe a montré, précédemment, que dans les cellules T humaines activées par la PHA, la prolifération est supprimée en présence de forskoline, activateur direct de l'AC. Cette inhibition est renversée par addition de 5-HT ou 8-OH-DPAT, et se fait via des récepteurs 5-HT_{1A} couplés négativement à l'AC. Il semble donc que dans les lymphocytes T, la prolifération soit sous le contrôle du récepteur 5-HT_{1A}.

Les effets immunomodulateurs de la 5-HT ne sont pas restreints aux cellules T, mais ont été décrits aussi pour les cellules NK. Ainsi, la prolifération des cellules NK stimulées par l'IL-2 est inhibée par les monocytes. L'addition de 5-HT ou 8-OH-DPAT à ces cultures cellulaires abolit les effets supprimeurs des monocytes, alors que le pindolol antagonise de façon partielle les effets 5-HT. Ces résultats suggèrent que la régulation de la prolifération des cellules NK est aussi sous contrôle du récepteur 5-HT_{1A} dont les mécanismes restent encore à déterminer (Hellestrand et Hermodsson, 1993).

Il est clair que la 5-HT est impliquée dans de nombreux processus immunologiques, et que les multiples effets de cette amine sont le résultat d'une interaction avec différents récepteurs. En dépit de ce grand intérêt, du progrès incessant, de la multiplicité des

publications dans ce domaine et de la diversité des modèles expérimentaux, le rôle régulateur de la 5-HT sur la réponse immunitaire soulève de nombreuses questions. D'abord par la divergence des résultats, leur interprétation *in vivo* et *in vitro*, et même leur contradiction d'une espèce à l'autre, d'une publication à l'autre, et parfois même à l'intérieur d'une même équipe. D'autre part, la sélectivité des ligands, les récepteurs et leur diversité et les mécanismes responsables restent encore obscurs et mal connus. De plus, le rôle physiologique et l'implication pathologique de ces effets demeurent difficiles à déterminer. Une meilleure caractérisation des récepteurs sérotoninergiques sur les cellules du système immunitaire, la connaissance approfondie de leur structure et de leur signalisation permettront de mieux éclaircir et de mieux interpréter les effets immunomodulateurs de la 5-HT.

2.2. Catécholamines et système immunitaire

Les CA en périphérie agissent comme des effecteurs pour une large variété de systèmes homéostatiques qui régulent la fonction du cœur et des vaisseaux sanguins, du métabolisme et de l'immunité. L'importance du système nerveux sympathique (SNS) dans la modulation de la réponse immunitaire en particulier est suggérée par une série d'expériences et d'études examinant les effets du stress et des facteurs psychologiques sur la santé et la maladie (Besedovsky et coll., 1996; Ader et coll., 1991). Il est actuellement clairement démontré que le SNS est impliqué dans le contrôle du SI et que les CA peuvent être synthétisées par les lymphocytes T et B (Kohm et coll., 2000; Josefsson et coll., 1996). D'autre part, les organes lymphoïdes primaires et secondaires présentent une innervation adrénergique. Finalement, les lymphocytes, les macrophages et d'autres cellules du SI portent des récepteurs adrénergiques fonctionnels. *In vitro*, les agonistes adrénergiques peuvent moduler la réponse immunitaire en altérant certaines fonctions telles que la production des cytokines, la prolifération lymphocytaire et la sécrétion d'anticorps. *In vivo*, la sympathectomie chimique supprime la réponse cellulaire T helper 1 (Th1) et augmente la réponse humorale Th2. Ces deux sous populations lymphocytaires se distinguent sur la base

de leur profil de sécrétion de cytokines (Th1: IL-2, INF γ ;Th2: IL-4, 5, 6 et 10) et sur leur fonction biologique (Felten et coll., 1998; 1987).

2.2.1. Innervation sympathique des organes lymphoïdes

De nombreuses études anatomiques ont montré que les organes lymphoïdes primaires et secondaires sont innervés par des fibres sympathiques noradrenergiques et peptidergiques. Au niveau microscopique, la majorité de cette innervation est associée à la vascularisation de ces organes (Roszman et coll., 1985). Chez les rongeurs, l'innervation sympathique des organes lymphoïdes varie avec l'âge de l'animal. Ainsi, l'innervation de la rate diminue dramatiquement chez le rat avec l'âge; avec en parallèle une diminution dans les compartiments T. Au contraire, l'innervation du thymus est relativement constante. La présence des terminaisons nerveuses sympathiques dans les organes lymphoïdes: thymus, rate, ganglions lymphatiques et la moelle osseuse, le contact étroit avec les cellules du SI et la caractérisation des récepteurs adrénergiques sur les lymphocytes suggèrent que l'innervation sympathique et le NT NE jouent un rôle déterminant dans la modulation de la réponse immunitaire (Ader et coll., 1991; Brooks et coll., 1982).

2.2.2. Récepteurs adrénergiques exprimés sur les cellules du SI

Les récepteurs α - et surtout β -adrénergiques qui sont stimulés par les CA sont les premiers récepteurs de NT qui ont été décrits chez les cellules immunitaires (Besedovsky et coll., 1979; Hadden et coll., 1970). Les récepteurs α RA sont exprimés sur des lymphocytes humains et porcins (Goin et coll., 1991; TiTinchis et Clarke. 1984). Les macrophages expriment aussi des récepteurs α_2 et β adrénergiques (Spengler et coll., 1990; Abrass et coll., 1985).

D'autres cellules hématopoïétiques impliquées dans l'inflammation expriment aussi

des β RA telles que les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles (Plaut, 1987). Cependant, la densité des récepteurs β varie parmi les populations lymphocytaires. Chez la souris, les cellules B spléniques expriment deux fois plus de récepteurs β que les lymphocytes T (Cremashi et coll., 1991; Fuchs et coll., 1988). Chez l'humain, les lymphocytes suppresseurs ont une forte densité de β RA qui est intermédiaire dans les cellules T cytotoxiques et la plus faible dans les T helper (Khan et coll., 1986). Récemment, il a été montré que les cellules Th1 (IL-2, INF γ) et les Th2 (IL-4, 5, 6 et 10) expriment des β RA de façon différentielle. Les lymphocytes Th1 expriment fortement les β RA alors qu'ils ne sont pas détectables sur les Th2 (Sanders et coll., 1994). Cette hétérogénéité dans l'expression des récepteurs peut être liée à la concentration des CA dans le microenvironnement des cellules. La densité des β RA lymphocytaires varie aussi avec le développement. Ainsi, les β RA ont été détectés sur des thymocytes de souris très précoces, et leur densité augmente avec la maturation (Singh et coll., 1979). Dans la rate de rat, les β RA augmentent presque de deux fois de la naissance au jour 14 postnatal (Ackerman, 1991). Cependant, les mécanismes responsables de ces changements dans le nombre des récepteurs lors de la maturation restent inconnus. L'activation des lymphocytes par des antigènes ou mitogènes peut aussi affecter la densité des récepteurs β RA sur ces cellules. Ainsi, l'immunisation avec des globules rouges de mouton induit une diminution de la densité des β RA de la rate (Fuchs et coll., 1988). Par ailleurs, le traitement des lymphocytes avec la ConA augmente la densité des récepteurs alors que l'activation par le PMA et un ionophore calcique diminue le nombre de récepteurs sur les lymphocytes T. Cette diminution est corrélée avec une diminution des taux d'AMPc stimulés par ISO. Ces résultats suggèrent que ce signal de transduction serait responsable des changements dans la densité des récepteurs sur les lymphocytes (Radojic et coll., 1991).

2.2.3. Influence des catécholamines sur la réponse immunitaire

2.2.3.1. Sympathectomie

De nombreuses études ont montré qu'une dénervation sympathique par la neurotoxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induit des altérations dans la fonction lymphocytaire et par conséquent dans la réponse immunitaire. Parmi ces changements, il y a une réduction de la réponse proliférative des lymphocytes, de l'hypersensibilité retardée et un changement dans la production des anticorps T-dépendants. Cette dernière réponse varie selon l'âge, l'espèce et la race animale, le type d'antigène et les techniques de mesure. En effet, chez des rats âgés et immunisés, la déplétion chimique de l'innervation noradrénergique par la 6-OH-DA augmente la production d'anticorps. Chez des rats jeunes, on observe les mêmes résultats mais de façon moins prononcée (Madden et coll., 1995; 1994).

2.2.3.2. Chimiotactisme

La stimulation adrénergique semble altérer la migration et le chimiotactisme des neutrophiles. Ainsi, l'incubation des neutrophiles de lapin avec l'épinéphrine et l'ISO inhibe leur motilité et leur chemotaxie. Cet effet est renversé par le propranolol suggérant ainsi une implication du β RA (Rivkin et coll., 1975). Quand les neutrophiles humains sont activés par deux chemoattractants, la leukotriène B4 et le N-formyl-Met-Leu-Phe (fLMP), la stimulation β AR inhibe également leur chemotaxie. En revanche, la forskoline, stimulateur puissant et direct de l'AC, n'affecte pas la chemotaxie induite par la leukotriène B4. Ces résultats suggèrent que l'AMPc n'est pas uniquement le seul signal responsable des effets chemoattractants des neutrophiles (Harvath et coll., 1991). Les CA influencent aussi la réponse immunitaire et l'accumulation aux sites d'inflammation en modulant l'adhérence et la migration des lymphocytes. En effet, l'injection des CA à des souris sympathectomisées

favorise la migration des lymphocytes vers les noeuds lymphoïdes (Madden et coll., 1994). En revanche, les CA inhibent l'adhésion des lymphocytes aux cellules endothéliales activées par l'IL-1. Cette inhibition implique des récepteurs β RA. L'absence d'une inhibition complète suggère qu'un autre signal, différent de celui induit par l'AMPc, est responsable des effets des CA sur l'adhésion des lymphocytes T.

2.2.3.3. *Activité NK et sécrétion des cytokines*

L'activité lytique des cellules NK peut aussi être altérée par les CA. Il est montré que l'activité NK mesurée par libération du chrome 51 (^{51}Cr) est inhibée par l'ISO et par d'autres activateurs de l'AMPc (Katz et coll., 1982). D'autres travaux ont montré que l'épinéphrine à 10^{-6} M inhibe, et à 10^{-8} M potentialise l'activité NK sur les cellules cibles leucémiques K562; ces effets sont renversés par le propranolol. Ces résultats montrent que l'effet des CA se fait via des récepteurs β AR présents sur les cellules NK et non à travers une interaction des CA sur les cellules K 562 (Hellstrand et coll., 1985).

L'addition d'épinéphrine et ISO aux monocytes humains ou à la lignée monocyttaire THP-1 réduit la production du TNF- β stimulée par le LPS. Dans les cellules THP-1, l'épinéphrine à 10^{-7} M inhibe complètement cette production, et elle est renversée par un β -bloqueur. La pré-incubation des cellules THP-1 avec ISO 24 h avant l'addition du LPS augmente, au contraire, cette production (Severn et coll., 1992). D'autres auteurs ont montré que la NE et le UK-14304, agoniste β_2 adrénergique, augmentent aussi la production du TNF dans les macrophages murins stimulés par le LPS, alors que ISO, agoniste β non sélectif, est inhibiteur. Ces effets sur la production du TNF correspondent à des changements dans la production d'ARNm. L'augmentation des taux du TNF et de son ARNm par le UK-14304 sont bloquées par la yohimbine, un antagoniste α_2 , et la réduction induite par ISO est renversée par le propranolol. Ainsi, la régulation de la production du TNF par les CA se fait par l'intermédiaire de catégories distinctes de récepteurs. D'une part,

les CA augmentent cette production après stimulation des récepteurs α_2 adrénergiques; d'autre part, elles la réduisent par l'intermédiaire de récepteurs β adrénergiques (Spengler et coll., 1994). Ces résultats sont confirmés par Gu et coll. (1996) qui montrent que ISO diminue significativement la production du TNF dans les macrophages alvéolaires bovins. Cette réduction est complètement renversée par le propranolol (10^{-6} M). De plus, le salbutamol reproduit les effets de ISO dans la lignée macrophagique HL-69-M stimulée par le LPS; cet effet est bloqué par le ICI118,551. Les agonistes β -adrénergiques peuvent, d'un autre côté, supprimer la synthèse de l'IL-2 par les lymphocytes T et l'expression du récepteur de faible affinité de l'IL-2 (Bartik et coll., 1993; Felten et coll., 1987), ainsi que la synthèse d'IL-1 par les macrophages (Koff et coll., 1986), même si les cibles moléculaires et les mécanismes de signalisation intracellulaire restent non caractérisés.

Les CA affectent non seulement la production des cytokines mais aussi la réponse à ces dernières. En effet, l'activation des macrophages péritonéaux par l'INF γ est inhibée par la NE et l'E à 10^{-6} M (Koff et Dunegan, 1985). Cette inhibition coïncide avec l'augmentation des taux d'AMPc. Finalement, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques en synergie avec IL-4 augmentent l'expression de l'antigène de surface CD23 sur la lignée monocyttaire humaine U937 (Paul-Eugene et coll., 1993).

2.2.3.4. Synthèse d'anticorps

Les agonistes adrénergiques affectent aussi d'autres fonctions immunitaires telle que la production d'anticorps. L'équipe de Melmon a montré que l'addition d'ISO à des cellules spléniques de souris immunisées par les globules rouges (GR) de mouton, réduit la réponse humorale (Melmon et coll., 1974). En revanche, Sanders et Munson (1984) ont montré que l'addition de NE (10^{-6} - 10^{-5} M) au début de la culture augmente la réponse humorale (anti-GR de mouton) au jour 5. Cet effet est reproduit par la terbutaline, un agoniste β_2 , et inhibé par le propranolol. La différenciation des lymphocytes B de souris stimulés par le LPS est

aussi amplifiée en présence de NE (5×10^{-6} - 10^{-5} M); cet effet est bloqué par le propranolol, et implique des récepteurs β AR. À l'inverse, la DA supprime la différenciation des lymphocytes B stimulées par LPS mais par des mécanismes différents de ceux de la NE (Li et coll., 1990; Kouassi et coll., 1988).

2.2.3.5. Prolifération

Plusieurs auteurs ont rapporté que la prolifération des lymphocytes est inhibée par la stimulation des récepteurs adrénergiques et par des inducteurs d'AMPc. En effet, des études *in vitro* réalisées par Hadden et coll. (1974) ont montré que les agonistes adrénergiques (NE, épinéphrine et ISO), et les antagonistes adrénergiques (phentolamine et propranolol) peuvent altérer la réponse proliférative des lymphocytes T humains à la PHA (mesurée par incorporation de $^3\text{HTdR}$). Ainsi, la stimulation des α RA augmente la prolifération, alors que la stimulation des β RA est inhibitrice. Par ailleurs, l'ISO à 10^{-5} M inhibe aussi la prolifération des lymphocytes T CD4^+ , CD8^+ et des T mémoires stimulés par un anticorps anti-CD3. Cette inhibition de la prolifération est en corrélation avec l'augmentation de l'AMPc intracellulaire suggérant un rôle anti-prolifératif de l'AMPc sur les lymphocytes T (Bartik et coll., 1993).

Des interactions complexes entre la stimulation des β AR et l'activité lymphocytaire ont été démontrées dans la modulation de la prolifération et la différenciation des lymphocytes B par les CA. À l'inverse des lymphocytes T, l'effet de la stimulation des β AR sur l'activité des lymphocytes B dépend du stimulus prolifératif utilisé. La prolifération et la différenciation des lymphocytes B de souris stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) est amplifiée en présence de NE (5×10^{-6} - 10^{-5} M); cet effet est bloqué par le propranolol. Cependant, l'addition tardive de NE 2 h ou plus après LPS n'affecte pas la réponse proliférative (Kouassi et coll., 1988). La dopamine (DA) exerce aussi des effets sur les lymphocytes B, mais par des mécanismes opposés à ceux de la NE. La DA supprime la

prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Ces effets ne semblent pas impliquer ni les récepteurs dopaminergiques ni les récepteurs adrénergiques. Par ailleurs, ISO (5×10^{-6} - 10^{-5} M) reproduit les effets amplificateurs de la NE sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. Cet effet est aussi bloqué par le propranolol mais non par la phentolamine, un antagoniste α adrénergique. En revanche, NE et ISO inhibent la prolifération des lymphocytes B stimulés par un anti-IgM. De plus, le dbAMPc et la forskoline ont aussi des effets inhibiteurs sur la prolifération induite par le LPS. Alors que la stimulation des β AR diminue la prolifération des lymphocytes B activés par anti-Ig par augmentation des taux d'AMPc, ces mêmes récepteurs augmentent la prolifération des lymphocytes B en réponse au LPS via un mécanisme indépendant de l'AMPc (Li et coll., 1990). Il est bien établi que anti-IgM active les lymphocytes B via des mécanismes intracellulaires différents de ceux du LPS.

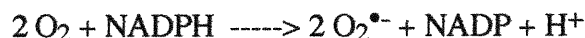
3. DÉRIVÉS OXYGÉNÉS ET ANTI-OXYDANTS

Les cellules du SI sont exposées aux espèces radicalaires oxygénées dont la source peut être extracellulaire ou intracellulaire. La production de dérivés de l'oxygène contribue à l'activité microbicide et à la destruction des tissus environnants. Les organismes vivants ont dû s'inventer au fil de l'évolution des systèmes de défense, aussi divers qu'ingénieux, pour survivre à la toxicité des dérivés oxygénés (DO) et des radicaux libres. La notion de radicaux libres est connue des chimistes depuis les années 1930, mais son entrée dans le monde de la biologie a été plus tardive. Ce n'est qu'à partir de 1969, date de la découverte de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) qu'elle a véritablement émergé. Un radical libre est par définition, toute espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Ces radicaux libres sont, en général, très réactifs; ils déclenchent des réactions en chaîne pouvant endommager les différents constituants de l'organisme vivant.

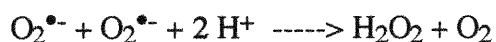
3.1. Mode de formation et systèmes cellulaires impliqués dans la génération des dérivés oxygénés

3.1.1. Les cellules phagocytaires

Le précurseur de ces espèces radicalaires est le superoxyde $O_2^{\bullet-}$ qui est généré par certaines cellules du SI: neutrophiles, eosinophiles et phagocytes mononucléaires (Babior, 1992; Hancock et coll., 1990; Kobayashi et coll., 1990; Maly et coll., 1989; 1988). La production de ces oxydants réactifs est associée à une augmentation abrupte de la consommation de l'oxygène (O_2) et l'événement métabolique dans lequel ils sont générés est appelé métabolisme oxydatif ou flambée oxydative (figure 4). L'enzyme responsable de cette production est la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase). Ce complexe enzymatique, constitué de flavoprotéine, d'un cytochrome b et probablement de molécules quinones, est localisé dans la membrane cytoplasmique et transforme, par apport d'électrons libres, l'oxygène moléculaire en anions superoxyde $O_2^{\bullet-}$ lors de la flambée respiratoire selon la réaction suivante:



Par la suite, sous l'influence de la SOD les anions superoxydes sont transformés en peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H_2O_2)



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui n'est pas un radical libre, est un puissant agent oxydant qui en présence de fer (réaction de Fenton) aboutit à la production de l'oxygène singulet et de radicaux hydroxyles OH^{\bullet} :



Le radical hydroxyle OH^{\bullet} va réagir pratiquement au niveau du site de sa création, et souvent, il va détruire son propre générateur. C'est le plus réactif et donc le plus toxique. Il est le responsable majeur des altérations cellulaires qui peuvent toucher toutes les molécules: protéines, lipides et acides nucléiques.

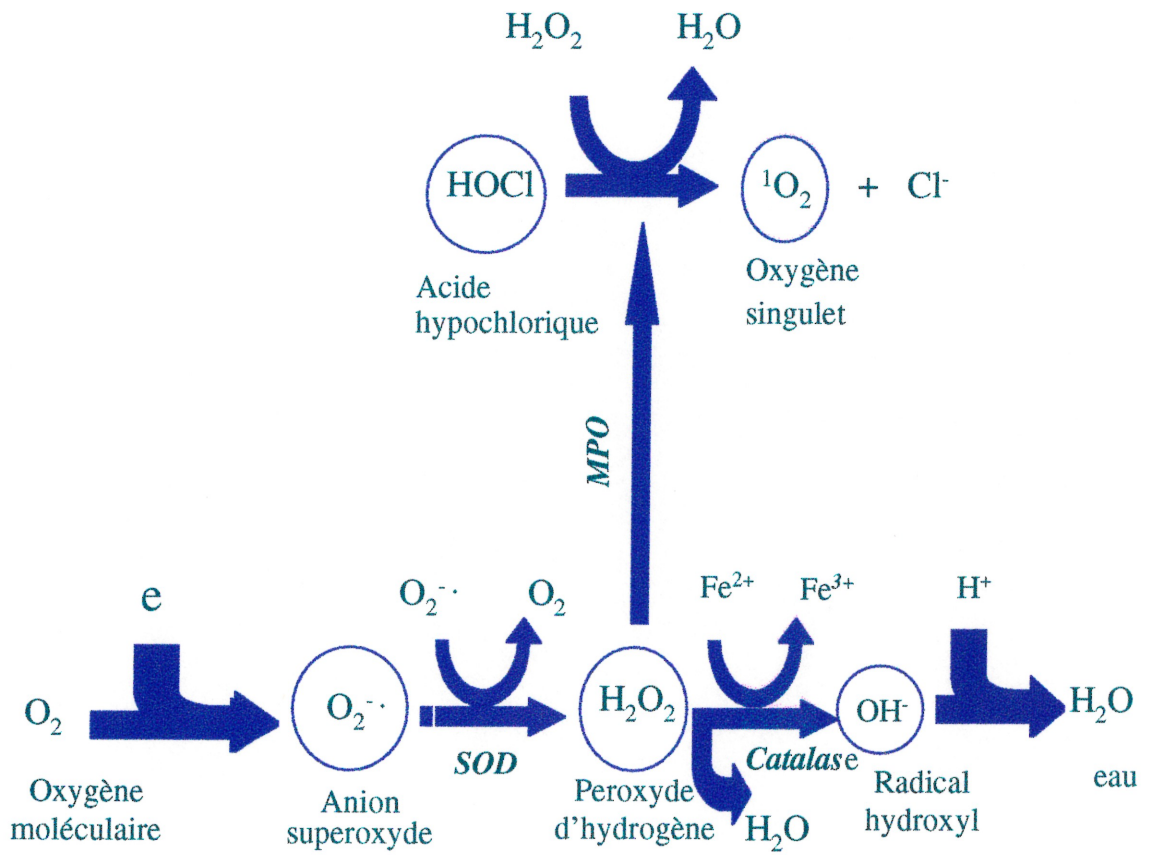


Figure 4: Génération des espèces oxygénées réactives

La production des halogènes oxygénés débute par l'oxydation de l'ion chlore Cl^- par H_2O_2 qui est produit lors de la métabolisme oxydatif. Cette oxydation est catalysée par la myéloperoxydase, une enzyme à hème, qui permet la production de l'ion hypochlorite, un agent oxydant très réactif:



Les dérivés oxygénés réactifs sont produits au sein des peroxysomes, organelles avec une membrane unitaire contenant la xanthine oxydase, génératrice d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 ; au niveau des membranes des phagosomes et sur la membrane cytoplasmique. Ceci permet leur détection par chimiluminescence (CL) (technique très sensible aux dérivés oxygénés produits lors du métabolisme oxydatif. Il se produit une interaction entre le luminol et les dérivés oxygénés pour produire des quantités de lumières plus grandes et plus mesurables). Ils peuvent enfin être produits par l'exposition à une atmosphère enrichie en oxygène, par l'action des rayons U.V., X et γ et par différentes substances chimiques.

3.1.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B, bien qu'ils soient des cellules non phagocytaires ont la capacité de générer du $\text{O}_2^{\bullet-}$ suite à une stimulation par les esters de phorbols (PMA) (Hancock et coll., 1990) ou par un anti-Ig (Leca et coll., 1991; Maly, 1990; 1989; 1988). En effet, Volkman et coll. (1994) ont observé que les lymphocytes B humains transformés par le virus d'Epstein-Barr (EBV) sont capables de réduire le tétrazolium nitrobleu (NTB) et la ferricytochrome c suite à une stimulation par le PMA. Cependant, les lymphocytes B EBV⁺ des patients ayant la granulomatose septique chronique, désignée par le sigle CGD (chronic granulomatous disease), désordre génétique caractérisé par une NADPH oxydase non fonctionnelle ou à faible activité, ne montrent pas cette propriété. Cette équipe arriva à la conclusion suivante: le système générateur $\text{O}_2^{\bullet-}$ dans ces lignées est le même que celui des

phagocytes, soit la NADPH oxydase. Des études biochimiques ont démontré la présence du cytochrome b₂₄₅ (par son potentiel moyen de - 245 mV) et d'une flavoprotéine de 45 KDa (Maly et coll., 1988). Récemment, la réduction du NBT par O₂^{•-} et l'expression du cytochrome b₂₄₅ ont été étudiées dans les lymphocytes B (Maly et coll., 1989).

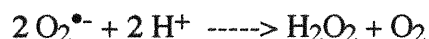
Bien que la NADPH oxydase dans les lymphocytes B soit similaire à celle des phagocytes, la capacité des lymphocytes B à générer O₂^{•-} est plus faible en comparaison de celle des phagocytes. Quantitativement, le potentiel des lymphocytes B à produire du O₂^{•-} est estimé entre 1-2 nMol/10⁶ cells/h, mais il est 50-100 fois inférieur à celui des granulocytes humains activés. En revanche, le métabolisme oxydatif des lymphocytes semble être plus soutenu dans le temps en comparaison de celui des neutrophiles. En effet, la capacité de génération de O₂^{•-} par les lymphocytes EBV⁺ stimulés par le PMA et le LPS est maximal 10 min après stimulation (Hancock et coll., 1990). Les lymphocytes continuent à générer du O₂^{•-} pendant 60 min de stimulation même si le taux commence à diminuer progressivement. Par contre, le métabolisme respiratoire des neutrophiles se termine 15 à 20 min après stimulation.

3.2. Anti-oxydants biologiques

Les dérivés oxygénés sont toxiques. À cette toxicité potentielle, l'organisme oppose différents systèmes de défense anti-oxydants, soit en inhibant les mécanismes d'activation et donc l'initiation des réactions radicalaires, soit en neutralisant les DO déjà formés. Dans le cas d'un affaiblissement de cette défense anti-oxydante ou d'un excès de production d'espèces radicalaires, un état de stress oxydatif s'installe. On appelle anti-oxydant toute substance qui en présence d'un substrat oxydatif et à des concentrations bien inférieures à celles de ce dernier, va retarder d'une façon significative l'oxydation de ce substrat, et protéger ainsi les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels de cette oxydation excessive. Les différents anti-oxydants sont décrits ci-dessous.

3.2.1. Superoxyde dismutase

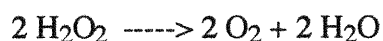
Découverte par McCord et Fridovich en 1969, la superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réaction suivante:



On connaît trois types: une SOD qui contient du cuivre (Cu) et du zinc (Zn), et est formée de deux sous-unités identiques; un second type de SOD contient du fer (Fe); un troisième du manganèse (Mn). Ces enzymes ont été isolées de sources très diverses. La comparaison de leurs séquences respectives d'acides aminés révèle l'existence d'une homologie entre la SOD-Fe et la SOD-Mn, tandis que la SOD-Cu-Zn est très différente. Cette dernière est retrouvée chez les eucaryotes, alors que les premières sont retrouvées chez les procaryotes. Une exploration du foie de poulet et de rat a permis d'établir que le cytosol contenait la SOD-Cu-Zn tandis que les mitochondries contenaient une SOD-Mn (Morikawa et Morikawa, 1996; Wong et coll., 1989). Malgré sa localisation intracellulaire, la SOD est aussi trouvée dans le sérum humain en grandes quantités. De plus, des anticorps anti-MnSOD ont été détectés dans du sérum de patients infectés par le virus Epstein-Barr (Ritter et coll., 1994).

3.2.2. Catalase

C'est l'anti-oxydant majeur qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (H₂O) permettant ainsi d'éviter la genèse de radical hydroxyle (OH[•]) très réactif.



Les catalases se concentrent en particulier dans le foie et les érythrocytes. Elles contiennent 4 sous-unités protéiques, chacune avec un fer ferrique (Fe³⁺) hémique dans le site actif. Il existe également des catalases à manganèse. Des études antérieures ont montré que les niveaux de catalase dans les lymphocytes sont faibles et la dégradation de H₂O₂ par la

catalase intracellulaire des lymphocytes serait plus faible en comparaison avec les monocytes (Sagone et coll., 1984).

3.2.3. Peroxydases

Elles protègent contre le peroxyde d'hydrogène en catalysant la réaction suivante:



où SH₂ est le substrat qui va subir l'oxydation. On distingue plusieurs peroxydases dont surtout: la glutathion réductase (GSH réductase) et la myéloperoxydase trouvée dans les phagocytes. Il en résulte que le superoxyde et le peroxyde, métabolites ubiquitaires de l'oxygène, sont sous le contrôle d'une catalyse enzymatique efficace, où des réducteurs métaboliques (NADPH/H⁺, GSH) vont servir de donneurs d'électrons.

Finalement, on trouve également diverses molécules qui agissent comme substrats suicides. Elles opèrent comme un bouclier anti-oxydant et protègent les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Parmi ces molécules, certaines opèrent en phase lipidique telles que les tocophérols (vitamine épinéphrine) qui ont démontré leur efficacité quant à l'inhibition de la propagation de la peroxydation lipidique (Burton et coll., 1982). D'autres molécules sont à caractère lipophile, essentiellement l'acide ascorbique qui est actif en milieu hydrique.

3.3. Effets biologiques des dérivés oxygénés

3.3.1. Action bactéricide et tumoricide

Bien que les DO soient considérés comme des agents destructeurs, ils sont néanmoins, parfois utiles. Ils jouent un rôle crucial, initialement pour limiter les dommages tissulaires, prévenir ou inhiber l'infection, secondairement pour amplifier et prolonger cette

réaction. Les micro-organismes infestants ou corps étrangers vont être ingérés par les cellules phagocytaires, la bactérie ou la particule phagocytée se retrouvant enveloppée dans une vésicule de membrane plasmique et exposée à un flux important de DO. En ce qui concerne les cibles plus grosses, le phagocyte va travailler de l'extérieur. Celui-ci s'étire sur la surface de la cible et les dérivés oxygénés sont libérés dans l'espace entre sa paroi et la cible (Babior, 1984).

3.3.2. Dommages cellulaires

Dans le cas d'un affaiblissement de la défense anti-oxydante ou d'un excès de production d'espèces radicalaires, ces dernières vont endommager différentes cibles biologiques: lipides, protéines et ADN. Les dérivés oxygénés, en particulier, l'ion hydroxyle, peuvent réagir avec toutes les macromolécules biologiques. La cible la plus importante est les acides gras polyinsaturés et le plus important dommage cellulaire causé par les dérivés oxygénés est la peroxydation lipidique. La peroxydation des membranes entraîne une désorganisation et une destruction des lipides membranaires. Les dérivés oxygénés peuvent aussi attaquer l'ADN et causer des mutations (Yu, 1994).

Peroxydation lipidique: Les acides gras polyinsaturés sont particulièrement susceptibles à la peroxydation en raison de leurs hydrogènes bi-allyliques facilement oxydables ce qui conduit à la formation de différents hydroperoxydes (AGI-OOH) très instables. Ces derniers vont alors engendrer des composés de coupures constituées d'acides, de traces d'hydrocarbures et d'aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA).

Oxydation des protéines: Ces oxydations entraînent une modification des structures des protéines pouvant être responsables d'une modification d'activité ou une fragilité accrue à une protéolyse ultérieure par les protéases.

Oxydation de l'ADN: Les lésions oxydatives peuvent conduire à des anomalies de la

multiplication cellulaire, de la synthèses protéique et de transmission du messager génétique.

3.3.3. Dérivés oxygénés et maladies

La production d'espèces réactives oxygénées et les défenses anti-oxydantes sont en équilibre fragile. Il est relativement facile de faire basculer cet équilibre en faveur des radicaux libres et entraîner diverses maladies.

La maladie de Parkinson: Certains auteurs ont proposé que les neurones dopaminergiques qui meurent chez les sujets parkinsoniens sont particulièrement exposés à un stress oxydatif. Ces neurones sont extrêmement riches en mitochondries. Ils consomment donc une quantité importante d'oxygène au cours de la phosphorylation oxydative, avec un risque accru de surproduction de radicaux superoxydes (Hirsch, 1993).

Athérosclérose: L'athérosclérose résulte d'interactions multiples et complexes entre des stimuli nuisibles et la réponse de la paroi artérielle. L'hypothèse oxydative de l'athérosclérose suggère que les modifications oxydatives des lipoprotéines de faible densité (LDL) ou d'autres lipoprotéines telles que la Lp(a) sont importantes dans la pathogénèse de la lésion athérosclérotique. L'inhibition de l'oxydation des LDL pourrait donc diminuer ou prévenir l'athérosclérose et ses conséquences cliniques (Witztum, 1994).

Carcinogénèse: Le cancer chez l'homme et l'animal est une maladie qui dans sa pathogénèse, procède par deux étapes: à partir d'une cellule unique appartenant initialement à un tissu normal, on va aboutir à un groupe de cellules malignes qui peuvent éventuellement s'infiltrer dans l'organisme et provoquer sa transformation maligne. Les radicaux libres se comporteraient également en médiateurs de la carcinogénèse. Ils ont, en effet, montré *in vitro* leur capacité d'induire des changements de la structure d'ADN, d'activer des voies de transduction ou de moduler l'activité des gènes. Ils participent ainsi dans l'initiation tumorale

par leur pouvoir mutagène, par l'activation de proto-oncogènes, essentiellement ceux de la famille *ras*, ou par l'inhibition des gènes suppresseurs tumoraux en particuliers les gènes *p53* (Burdon et coll., 1990).

Radicaux libres et vieillissement: Le vieillissement des êtres vivants est un phénomène biologique universel. Plusieurs auteurs considèrent le vieillissement comme l'accumulation de changements délétères produits par les réactions radicalaires. Ainsi, une plus grande longévité serait associée à un meilleur statut anti-oxydant. De même, une diminution de la genèse de radicaux libres par restriction calorique pourrait améliorer cette longévité.

3.3.4. Rôle de messager des dérivés oxygénés dans la prolifération cellulaire

Les DO sont capables d'induire différents processus biologiques tels que: croissance cellulaire, apoptose, adhésion cellulaire et activation virale (activation du VIH) probablement par stimulation de signaux de transduction. D'importants progrès ont été accomplis en matière d'élucidation des mécanismes moléculaires qui régulent la prolifération cellulaire des mammifères. Le contrôle de la prolifération cellulaire implique une variété de facteurs génétiques et biochimiques qui sont encore peu connus et dont la dérégulation entraîne une croissance incontrôlable, caractéristique des cellules cancéreuses. La liaison d'un récepteur membranaire par son ligand, facteur de croissance, cytokine ou hormone, déclenche une séquence d'événements qui caractérisent le processus d'activation, lequel conduit à l'entrée de la cellule en phase G_1 du cycle cellulaire. Plusieurs facteurs sont capables d'influencer ce cycle tels que l'altération du transport ionique à travers la membrane plasmique, et le changement du pH cellulaire.

3.3.4.1. Régulation de la prolifération par les dérivés oxygénés

Récemment, des évidences ont suggéré que les DO ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2) peuvent jouer un

rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire. Cependant, dépendamment du type cellulaire étudié, le rôle des DO dans ces événements reste très controversé; ils sont tantôt capables de stimuler, tantôt d'inhiber la prolifération. En effet, des études antérieures ont montré que $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 sont capables chacun de stimuler la croissance cellulaire dans une variété de cellules. Ainsi, $O_2^{\bullet-}$ stimule la prolifération des fibroblastes de hamster (BHK-21) (Burdon et coll., 1990; 1989), des cellules épidermales de souris (JB6) (Crawford et coll., 1989) et des fibroblastes humains (Murrell et coll., 1990). Dans ces derniers, de faibles concentrations stimulent la prolifération alors que les fortes concentrations sont toxiques. Les mécanismes impliqués dans cette stimulation restent indéterminés. Cependant, les résultats de cette étude indiquent que H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ en sont responsables, H_2O_2 ayant une plus grande puissance. D'autre part, des études menées avec H_2O_2 montrent aussi une régulation positive de la prolifération des fibroblastes de Hamster (BHK-21), et de rat (208F) (Burdon et coll., 1990; 1989). De plus, dans les cellules JB6 et BALb/3T3, ces DO stimulent l'expression des gènes de croissance *c-fos* et *c-jun* (Shibanuma et coll., 1990; Crawford et coll., 1989). Les propriétés prolifératives des DO ont été aussi démontrées pour les cellules du muscle aortique. Bhunia et coll. (1997) ont montré que les lactosylceramides stimulent la production de $O_2^{\bullet-}$ par activation de la NADPH oxydase. Cette augmentation active à son tour la $p21^{ras}$; il y a alors échange de GDP en GTP sur la $p21^{ras}$. Il s'ensuit une phosphorylation et une activation de la cascade des kinases cytoplasmiques MAPK et particulièrement la p44 MAPK. Le résultat final de cette cascade est l'induction de l'ARNm des gènes de transcription *c-fos* menant à la prolifération cellulaire

Les cellules du SI sont aussi exposées aux espèces radicalaires oxygénées dont la source peut être extracellulaire ou intracellulaire. Bien qu'ils soient considérés comme agents destructeurs, leur genèse physiologique semble être nécessaire pour l'activation des lymphocytes. En effet, la relation entre l'oxydation et la régulation de la prolifération des lymphocytes est démontrée par de nombreux auteurs. Ainsi, l'équipe de Novogrodsky a montré que les piègeurs de radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) inhibent la prolifération des

lymphocytes humains stimulés par le PMA. L'activation de la guanylate cyclase (GMPC) par OH^\bullet serait responsable du signal mitogénique (Novogrodsky et coll., 1982). Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré que les agents detoxifiants ou inhibant la formation des $\text{D}\bar{\text{O}}$ inhibent la synthèse d'ADN dans les lymphocytes humains stimulés par la combinaison PMA/ionomycine ou PHA, et dans les lymphocytes B de souris stimulés par le LPS, mais les mécanismes impliqués restent encore mal connus (Hunt et coll., 1991). De plus, l'équipe de Tatla a récemment montré que l'activation des cellules T par le PMA en présence des cellules accessoires (monocytes) induit une augmentation de la production de DO (Tatla et coll., 1999). Cette dernière est amplifiée en présence d'ionophore calcique ou d'un anticorps anti-CD3. Cette synergie induit aussi une augmentation de la prolifération qui est inhibée par les anti-oxydants. Cependant, ce signal (DO) ne semble pas être suffisant pour initier l'activation des lymphocytes T. L'ensemble de ces observations suggèrent que $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 jouent le rôle de mitogène en utilisant des voies biochimiques communes aux facteurs de croissance.

Il est bien établi que la production des dérivés oxygénés par les cellules phagocytaires stimulées par les cytokines contribue à l'activité microbicide et à la destruction des tissus environnants. En effet, d'autres cellules du SI, les lymphocytes (T et B) sont sensibles au stress oxydatif. Il est aujourd'hui généralement admis que les DO sont capables de supprimer la prolifération des lymphocytes et d'induire des dommages à l'ADN. Effectivement, des auteurs ont montré que les macrophages suppriment la prolifération des cellules spléniques de souris stimulées par la ConA. Cette suppression est renversée de façon partielle par la catalase suggérant que H_2O_2 contribuerait à cet effet (Metzger et coll., 1980). D'autres équipes ont montré aussi un effet protecteur de la catalase sur la prolifération des cellules mononucléées humaines stimulées par le PMA. Cette augmentation disparaît quand les cellules sont stimulées par la PHA. Ces résultats suggèrent que H_2O_2 libéré par les monocytes dans les suspensions cellulaires serait responsable de la diminution de la prolifération induite par le PMA (Sagone et coll., 1984).

Par ailleurs, l'équipe de Huang (1992) a aussi montré que l'emodin, une anthraquinone, supprime non seulement la prolifération des lymphocytes humains stimulés par la PHA, mais aussi la production de IL-1 et IL-2. Les effets suppresseurs de l'emodin seraient induits partiellement par la présence d'un groupement hydroxyle libre à la position β du noyau anthraquinone et sont renversés par la catalase, piègeur de H_2O_2 . Alors que la voie de la guanylate cyclase ne semble pas être impliquée, celle du métabolisme de l'acide arachidonique contribuerait aux effets suppresseurs de l'emodin.

H_2O_2 supprime aussi la prolifération des lymphocytes T de souris stimulés par la ConA et la synthèse de IL-2. Il y a même une corrélation entre la suppression de la production de IL-2 et celle de l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa-B) et NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Ceci suggère que le stress oxydatif interfère avec les signaux dans les étapes précoces de l'activation mitogénique des lymphocytes T (Pahlavani et Harris, 1998).

Le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) est un hétérodimère complexe composé de deux sous-unités (p65 et p50). Dans la plupart des types cellulaires, le NF- κ B séjourne dans le cytoplasme sous forme inactive en association avec son inhibiteur, I κ B. À la suite d'une stimulation cellulaire par divers agents tels que cytokines, mitogènes ou virus, l'I κ B est dissocié du complexe soit par phosphorylation et/ou par dégradation protéolytique laissant libre le NF- κ B qui va migrer vers le noyau, se lier sur l'ADN avec une haute affinité sur les sites spécifiques des régions promotrices des gènes cibles et stimuler leur transcription. Récemment, on a décrit un nouveau mécanisme d'activation du NF- κ B. On a évoqué les DO comme second messager pour l'activation de ce facteur nucléaire en réponse à une large gamme de stimuli. Le modèle expérimental a utilisé H_2O_2 pour activer le NF- κ B cellulaire. En effet, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, H_2O_2 active NF- κ B dans la lignée T Jurkat. Cette activation est empêchée en présence du N-acetyl-L-cystéine (NAC), anti-

oxydant et piègeur de radical. Le NAC inhibe aussi l'activation du NF- κ B induite par la cycloheximide, le TNF, le PMA, le LPS et l'IL-1. Ceci suggère que ces différents agents ayant différents mécanismes stimulent le NF- κ B selon un mécanisme commun impliquant la synthèse de DO, mais les mécanismes impliqués pour induire la même réaction par ces différents stimuli sont peu connus (Baeuerle et Henkel, 1994; Meyer et coll., 1993; Müller et coll., 1993). Il a été proposé que ces DO joueraient le rôle de second messager pour libérer I κ B du complexe NF- κ B ou inactiver I κ B (Schreck et coll., 1992; 1991). Cependant, ce mécanisme d'activation du NF- κ B par les DO n'est démontré que pour certains types cellulaires comme le sous-clone des cellules T jurkat appelé cellules WURZBURG (Schreck et coll., 1992; 1991); pour d'autres clones dans les mêmes conditions d'oxydation, une inhibition de la liaison du NF- κ B à l'ADN a été observée (Brennan et O'Neill, 1995).

À l'instar des autres cellules du SI, les lymphocytes B n'échappent pas aux effets des DO. Ainsi, il a été montré que la SOD augmente la prolifération et la différenciation des lymphocytes B humains en culture. Les effets de la SOD sur la prolifération des lymphocytes B sont observés uniquement avec des agents générateurs de $O_2^{\bullet-}$. Il en résulte que les effets amplificateurs de la SOD sur la prolifération des lymphocytes B sont liés à son activité enzymatique comme piègeur de superoxyde. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que $O_2^{\bullet-}$ serait responsable des effets inhibiteurs sur la prolifération (Morikawa et Morikawa, 1996). D'un autre côté, il est montré que la catalase augmente l'incorporation de 3H TdR dans les lymphocytes humains induite par le PWM, et contrairement aux études précédentes, elle est sans effet sur la prolifération induite par la PHA ou un anti-CD3. En revanche, l'addition des anti-oxydants qui interfèrent avec $O_2^{\bullet-}$ ou OH^{\bullet} n'affecte pas la réponse proliférative au PWM. De cette étude, il résulte que les DO semblent influencer la prolifération des lymphocytes selon le type de mitogène (Whitacre et Cathcart, 1992). Par ailleurs, le traitement des lignées cellulaires pré-B transformées par le virus Epstein-Barr avec le LPS induit une augmentation de 6 à 10 fois de la libération du $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 . Dans la lignée cellulaire pré-B, NF- κ B peut être induit par le LPS et les anti-oxydants ont un effet

suppresseur sur cette activation (Schreck et coll., 1992). Récemment, il a été observé que certaines kinases sont sélectivement activées par des oxydants dans les lymphocytes B suggérant qu'un sous-type de kinases (p56^{lck}, p59^{fyn}) ou phosphatases serait des transducteurs sensibles aux DO (Schieven et coll., 1993).

3.3.4.2. Peroxydation lipidique et ses conséquences sur la prolifération cellulaire

Les phospholipides membranaires sont la cible préférentielle des dommages oxydatifs en raison de leurs acides gras polyinsaturés (AGPI-H) susceptibles à la peroxydation lipidique. Ceci entraîne des changements dans la fluidité et la perméabilité membranaires. Ainsi en fonction du nombre d'insaturation de la structure lipidique, la peroxydation conduit à la formation de différents hydroperoxydes (AGPI-OOH). Le clivage de ces derniers peut aussi induire la formation des hydroxyalkénals, notamment le 4-hydroxynonéal capable de modifier l'activité enzymatique associée aux membranes. Les hydroxyperoxydes, du fait de leur instabilité, engendrent à leur tour des aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) capable de réagir avec les groupements thiols des protéines. Ces oxydations entraînent une modification de structure des protéines pouvant être responsables d'une modification d'activité et d'une fragilité accrue à une protéolyse par les protéases. Il en résulte une perturbation des protéines responsables du transport ionique à travers la membrane, mais aussi des protéines impliquées dans les signaux cellulaires de la croissance cellulaire. Plusieurs observations ont montré une relation inversement proportionnelle entre la croissance cellulaire et la peroxydation lipidique. Ainsi, l'addition des acides gras (AG) cis-insaturés inhibent l'incorporation de ³HTdR dans des cultures de lymphocytes humains stimulés par la PHA. Cette suppression est renversée par la vitamine E et la SOD. De plus, ces AG sont capables d'augmenter la peroxydation lipidique dans ces cultures cellulaires.

L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T stimulés par la PHA semble être un

processus dépendant des radicaux libres et impliquant la peroxydation lipidique (Madhavi et coll., 1994). Par ailleurs, des études *in vitro* montrent que H_2O_2 est un puissant inhibiteur de la prolifération des lymphocytes T humains stimulés par la PHA ou la ConA. Cet effet semble toucher les événements précoces de l'activation des lymphocytes car l'addition tardive de H_2O_2 renverse les effets suppresseurs. Ces derniers sont bloqués par des anti-oxydants lipidiques. L'ensemble de ces résultats suggèrent que H_2O_2 inhibe l'activation des lymphocytes T par induction de peroxydation lipidique (Freed et coll., 1987).

Il est bien connu qu'avec l'âge, il y a accumulation de produits d'oxydation tels que les aldéhydes maloniques (MDA). En effet, des études récentes ont montré qu'il y a une diminution de la capacité proliférative à la PHA et à la ConA des lymphocytes de rats âgés. Au même moment, on assiste à une augmentation du taux MDA mesuré par la méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA), ainsi qu'une oxydation des protéines. Ces effets sont renversés ou réduits dans des splénocytes de rat soumis à une diète ou à une restriction calorique. Ces résultats suggèrent une diminution de la réponse immune en fonction de l'âge induite par une augmentation des dommages oxydatifs (Tian et coll., 1995)

3.4. Monoamines: propriétés anti-oxydantes et rôle de piégeage de dérivés oxygénés

3.4.1. Sérotonine et dérivés oxygénés

La production des espèces radicalaires oxygénées toxiques au cours du stress oxydatif par les polynucléaires, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes stimulés par IL-1 et TNF permet de produire localement au site inflammatoire un environnement toxique. La production de dérivés de l'oxygène par les cellules phagocytaires stimulés par les cytokines contribue à l'activité microbicide et à la destruction des tissus environnants. La protection contre cette toxicité se fait par différents systèmes de défense

anti-oxydante tels que la SOD, la catalase, les vitamines épinéphrine et C, l'acide urique et la glutathione reductase. Il est actuellement bien connu que les composés phénoliques (CA) et indoliques (5-HT) sont susceptibles à l'oxydation et ont des effets inhibiteurs sur la production des DO par les cellules phagocytaires. En effet, les études de Nanmark et coll. (1992) ont montré que la 5-HT inhibe de façon dépendante de la dose la CL dépendante du luminol et induite par le zymozan opsonisé (le zymosan et sa composante β -glucan activent le métabolisme oxydatif des phagocytes après la liaison à un domaine lectine-like de la chaîne α du récepteur du complément type 3, CR3 (CD11b/CD18)) dans les polymorphonucléaires humains et de rat (Nanmark et coll., 1992).

D'autres auteurs ont suggéré que la 5-HT est un important modulateur de la fonction NK. Il a été démontré que les granulocytes, comme les monocytes, suppriment la fonction NK. Cependant, la suppression de la fonction NK après incubation avec les granulocytes est partiellement renversée par la 5-HT. Ces résultats suggèrent que les effets de la 5-HT sont reliés à la formation des DO par les granulocytes. En effet, la catalase est capable de reproduire les effets de la 5-HT en renversant la suppression sur les cellules NK. Il en résulte que l' H_2O_2 est un médiateur des effets supresseurs des monocytes/granulocytes sur les cellules NK. De plus, la 5-HT inhibe la CL dans les granulocytes stimulés par le fLMP (Hellstrand et coll., 1993). Récemment, l'équipe de Schuff-Werner (1995) a montré le rôle anti-oxydant et piègeur de dérivés oxygénés de la 5-HT. Le système acellulaire peroxydase/ H_2O_2 a été utilisé comme modèle pour montrer les propriétés anti-oxydantes de la 5-HT et caractériser les produits d'oxydation. Dans ce système acellulaire peroxydase/ H_2O_2 , la CL est inhibée de façon dépendante de la dose par la 5-HT. Cette oxydation est empêchée en présence d'anti-oxydants, NADH₂, acide ascorbique et tocophérol. De plus, durant ce métabolisme oxydatif, il a été montré que la 5-HT est convertie en produits de dégradation. L'analyse des produits de dégradation révèle la formation majeure d'un dimère 5-HT, le 5,5'-dihydroxy-4,4'-bitryptamine (DHBT). D'autre part, la 5-HT inhibe aussi la CL dans les phagocytes polymorphonucléaires et dans la

microglie. Cet effet est indépendant du stimulus utilisé pour induire la réponse CL et se traduit par l'oxydation de la 5-HT donnant lieu à la formation de dimères et protégeant ainsi les cellules des effets toxiques des DO (Huether et coll., 1997; Huether et Schuff-werner, 1996).

La 5-HT est également facilement oxydée par le sérum humain (Blum et Ling, 1959), les microsomes de foie et de cerveau (Uemura et coll., 1980) et par des homogénats de rate (Nelson et Huggins, 1975). Cependant, les produits de dégradation ne sont pas bien caractérisés dans ces différents tissus. La suppression *in vitro* de la CL par la 5-HT est aussi observée dans les lymphocytes du sang périphérique de rat stimulés par le PMA (Vial et coll., 1995). *In vivo*, l'administration de 5-HT à des rats induit aussi une inhibition de la CL. En revanche, les mécanismes impliqués restent non élucidés. Des résultats préliminaires ont montré que le SDZ 216-525, antagoniste sélectif 5-HT_{1A}, le metiothepin, antagoniste non sélectif 5-HT_{1/2}, la kétansérine, antagoniste sélectif 5-HT₂, et le granisétron, antagoniste sélectif 5-HT₃, n'ont aucun effet sur la réponse CL ce qui suggère des effets indépendants des récepteurs (Vial et coll., 1995).

3.4.2. Catécholamines et anti-oxydation

Les effets inhibiteurs sur les DO concernent aussi les CA. En effet, la CL dépendante de la lucigénine et mesurée dans les polymorphonucléaires humains stimulés par le fLMP ou un ionophore calcique est inhibée en présence d'ISO, agoniste β -adrénergique. Cette suppression de la CL concerne la phase précoce d'activation par ces deux stimuli, alors que la phase tardive ne semble pas être affectée. De plus, ISO inhibe le Ca²⁺ intracellulaire induit par le fLMP ou l'ionophore calcique. Ces résultats suggèrent que ISO module l'activation des polymorphonucléaires Ca²⁺-dépendante via une augmentation d'AMPc (Nielson, 1987). La production de H₂O₂ par les macrophages de porc activés par le PMA est aussi réduite par la dobutamine, un agoniste β_1 . À l'inverse, le salbutamol, un agoniste β_2 , n'affecte pas cette

production. Ce résultat semble impliquer le récepteur β_1 AR mais les mécanismes responsables restent inconnus (Henricks et coll., 1986). D'autre part, le fenoterol, un agoniste β_2 , inhibe aussi la CL induite par le zymozan dans les cellules phagocytaires humaines de façon dépendante de la dose. Cet effet est partiellement renversé par le propranolol. Il en résulte que le contrôle du métabolisme oxydatif des polymorphonucléaires et des monocytes humains se fait, en partie, par la stimulation β_2 adrénergique (Schopf et Lemmel, 1983).

L'équipe de Gibson-Berry (1993) a montré que les agonistes β adrénergiques (ISO) inhibent la production de l'anion superoxyde dans les neutrophiles humains stimulés par le fLMP. Cet effet est reproduit par le dbAMPc, analogue non hydrolysable de l'AMPc, et antagonisé par l'alprénolol. Ceci suggère que les récepteurs couplés à l'AC sont responsables de cette inhibition. Par ailleurs, Conlon et coll. (1988) ont montré que la production des radicaux oxygénés réactifs mesurée par CL dépendante du luminol dans des macrophages alvéolaires pulmonaires bovins activés par le zymozan opsonisé est réduite en présence de dobutamine et ISO, des agonistes β_1 et β_2 , respectivement. Ces effets sont renversés par l'aténolol et le propranolol respectivement. Le salbutamol, un agoniste β_2 , est capable aussi de reproduire l'effet de ISO. Son effet est significativement réduit par la présence de ICI 118,551, un antagoniste sélectif pour le β_2 . L'ensemble de ces résultats suggère que des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques fonctionnels sont présents sur les macrophages alvéolaires et sont impliqués dans la production des radicaux oxygénés par ces cellules. Des études récentes ont montré que le salbutamol et ISO inhibent la production de $O_2^{\bullet-}$ mesurée par une sonde fluorescente DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) dans la lignée macrophagique HL-60-M. Cette inhibition est totalement renversée par ICI118,551 et le propranolol respectivement, ce qui suggère l'implication des récepteurs β AR et probablement une augmentation d'AMPc (Gu et coll., 1996). Les CA, composés phénoliques caractérisés par des groupements catéchols, sont susceptibles à l'oxydation. En effet, Liu et coll. (1993) ont montré que les CA et leurs métabolites sont d'excellents

scavengers des radicaux DPPH (1,1-diphényl-2-picryl hydroxyl) dans une solution organique et des radicaux superoxydes et hydroxyles dans une solution aqueuse (Cohen et coll., 1983). La NE inhibe aussi la formation du radical hydroxyl dans un système Fe^{3+} - H_2O_2 -carbonate (Iwahashi et coll., 1990).

3.4.3. Monoamines et peroxydation lipidique

Il est bien connu que la peroxydation lipidique est l'une des conséquences majeures des effets néfastes des DO. Les CA et la 5-HT sont aussi capables d'influencer cette réponse oxydative. Ainsi, la 5-HT, la NE et la DA sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique dans des homogénats de cerveau de rat, dans des microsomes et des mitochondries. Cette propriété leur confère un rôle anti-oxydant majeur et protecteur au niveau du cerveau (Liu et Mori, 1993). Le 2, 2'-azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) est un générateur de radical peroxy (ROO^{\bullet}) et inducteur de peroxydation lipidique. Il a été montré que les monoamines NE, DA, DOPA et 5-HT inhibent fortement la peroxydation lipidique induite par AAPH dans des microsomes de foie de rat. Ces résultats suggèrent que les amines inhibent la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes induits par l'AAPH. De plus, il a été démontré que les dérivés métoxy tels que l'acide 3,4-diméthoxyphénylacétique et le 5-méthoxytryptophane n'affectent pas la peroxydation lipidique. L'ensemble de ces résultats démontre que les groupements hydroxyles sont essentiels à l'inhibition de la peroxydation lipidique (Miura et coll., 1996).

D'autres auteurs ont observé une inhibition de la peroxydation lipidique par les monoamines dans des homogénats et des microsomes de cerveau et de foie (Reyftman et coll., 1990). De plus, la 5-HT inhibe de façon significative l'accumulation des peroxydes lipidiques dans les cellules gliales C6 de rat. La 5-HT protège ainsi ces cellules contre la toxicité induite par le glutamate (Shinagawa, 1994). Les modifications oxydatives des LDL sont impliquées dans la pathogenèse de la lésion athérosclérotique. De ce fait, l'inhibition de

l'oxydation des LDL pourrait donc diminuer ou prévenir l'athérosclérose et ses conséquences cliniques. La capacité de la 5-HT et des CA à inhiber l'oxydation des LDL a été testée en présence du Cu^{2+} . Dans ce modèle, les monoamines 5-HT et CA inhibent de façon dépendante de la dose la peroxydation lipidique des LDL mesurée par le taux de MDA (Huether et Schuff-Werner, 1996).

L'ensemble de ces résultats montre que les monoamines constituent un groupe d'inhibiteurs de la peroxydation lipidique et jouent, en plus de leur rôle de NT, le rôle d'anti-oxydants endogènes protégeant ainsi les cellules des dommages causés par les DO.

4. IMPORTANCE ET MODÈLES D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES

B

Les lymphocytes B jouent un rôle important dans la reconnaissance des antigènes, la synthèse des anticorps et la modulation de la réponse immunitaire. Ils constituent ainsi les cellules responsables des réactions immunitaires spécifiques à médiation humorale. Ils sont les précurseurs des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines, et portent à leur surface plusieurs catégories de récepteurs dont les immunoglobulines de surface (sIg), et les récepteurs pour les mitogènes. La stimulation des lymphocytes B au repos entraîne leur expansion clonale et leur différenciation en plasmocytes. Ainsi on distingue plusieurs étapes dans le cycle cellulaire des cellules B:

- La phase G_0 de repos;
- La phase G_{OB} de décondensation de la chromatine;
- Le passage de G_{OB} à G_{IA} , marqué par l'augmentation de taille des cellules (on parle alors de cellules blastiques ou blastes) l'augmentation d'expression d'antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, l'augmentation de synthèse d'ARN, et la perte concomitante des IgD de surface;
- La phase G_{IB} d'augmentation de l'expression du récepteur de la transférine; au

cours de cette phase les cellules continuent d'augmenter de taille et de synthétiser de l'ARN;

- La phase S de synthèse d'ADN;
- et l'étape de différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgM, d'IgG, d'IgA et d'IgE.

Ces différents processus sont régulés de façon complexe par des molécules exogènes telles que des antigènes, des produits bactériens, des cytokines sécrétées par les lymphocytes T et les macrophages. Au niveau intracellulaire, l'activation des lymphocytes B par l'intermédiaire des sIg entraîne une série d'événements métaboliques débutant par une induction rapide d'une activité protéine tyrosine kinase (PTK) responsable de la phosphorylation d'une série de substrats (Lane et coll., 1991; Gold et coll., 1990). Ceci précède et probablement contrôle l'activité d'autres seconds messagers comme la PLC (Lane et coll., 1991). Cette dernière ainsi activée hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate, et permet la génération de deux seconds messagers, l'IP₃ qui induit la mobilisation du calcium intracellulaire, et le DAG qui active la PKC permettant sa translocation vers la membrane.

Le LPS a des effets mitogéniques puissants sur les lymphocytes B matures de souris en induisant l'entrée dans le cycle cellulaire, la synthèse d'ADN et la synthèse d'anticorps. Le LPS est capable d'induire aussi, sur des cellules pré-B et des B immatures, l'apparition de marqueurs de surface, caractéristiques des cellules B matures (Paige et coll., 1981). C'est aussi un puissant activateur des macrophages qui leur permet de sécréter une multitude de substances immunorégulatrices incluant l'interleukine 1, l'interleukine 6, le TNF, les interférons α et β et les prostaglandines, notamment (PGE) qui sont capables à leur tour d'agir sur les lymphocytes T et B. La majorité des effets biologiques du LPS sont attribués au lipide A qui constitue sa fraction biologiquement active. Ce mitogène active probablement les cellules B selon différents mécanismes de signalisation qui ne mettent en jeu ni le métabolisme des phosphoinositides, ni la mobilisation du calcium intracellulaire, ni

l'activation de la PKC (Cambier et Ransom, 1987; Bijsterbosch et coll., 1985). Il semble induire certains de ses effets par son interaction directe avec la PKC (Boscà et Diaz-Guerra, 1988). Le LPS peut aussi inhiber l'activité de l'AC à l'état basal ou suite à la stimulation par PGE2 et ISO, dans le lymphome B murin WEHI-231, et dans la lignée macrophagique murine P388D (Defranco et coll., 1987). Le rôle d'une protéine Gi sensible à la toxine de *Bordetella Pertussis* a été suggéré dans ses effets sur la cyclase (Dziarski, 1989), ce qui implique l'interaction possible du LPS avec des récepteurs membranaires.

La liaison du LPS aux membranes cellulaires interviendrait en deux temps : une première étape rapide et indépendante de la température, correspondant à la fixation spécifique du LPS; et une deuxième étape dépendante du temps et de la température qui correspondrait à l'intercalation de la partie lipidique du LPS à l'intérieur de la bicouche lipidique (Jacobs, 1984). Des études de plusieurs laboratoires ont identifié et caractérisé des protéines membranaires liant le LPS sur les cellules du système immunitaire (cellules spléniques B, T et macrophages; lignée pré-B murine 70Z/3, lignées T murines YAC-1 et EL4, et la lignée macrophagique murine J774.1), et sur des cellules du sang périphérique humain (monocytes, lymphocytes et polymorphonucléaires) (pour revue, voir Morrison et coll., 1993). L'ensemble de ces travaux indique l'existence de deux protéines membranaires capables de lier le LPS : 1) une protéine dominante de 70-80 KDa qui agit probablement comme récepteur fonctionnel, et comme molécule de transduction du signal de LPS, cette protéine présentant une spécificité pour la portion active, le lipide A; 2) une protéine de 30-40 KDa dont le rôle fonctionnel est encore inconnu. D'autres protéines membranaires ayant des fonctions importantes dans les réponses cellulaires au LPS sont impliquées dans cette liaison (Fenton et coll., 1998; Jabra et Vercelli, 1994), parmi lesquelles CD14 (exprimé principalement sur les monocytes/macrophages), les molécules d'adhésion de la famille des intégrines CD11/CD18 (exprimées sur tous les leucocytes), et récemment, la famille des TLR (Toll-like receptor) (Chow et coll., 1999). C'est une famille de protéines transmembranaires ayant une région extracellulaire riche en leucine et un domaine cytoplasmique homologue au

récepteur de l'interleukine 1. Chez les mammifères, ils sont en nombre de 10 dont trois (TLR2, TLR4, TLR9) ayant un ligand connu. Le TLR4 est le récepteur prédominant pour le LPS. Cependant, les mécanismes intracellulaires impliqués dans la transduction du signal médié par LPS, et dans ses effets biologiques sur l'activation des cellules B et des monocytes/macrophages restent inconnus. Le LPS est un excellent modèle d'activation des lymphocytes B car il est capable d'induire les différentes étapes d'activation des lymphocytes allant des étapes précoces jusqu'aux étapes tardives caractérisées par la sécrétion des anticorps.

Plusieurs études ont évalué les effets des monoamines biogènes sur les lymphocytes T et les cellules NK (Cf. page 40). Cependant, on connaît relativement peu de choses sur la modulation de la prolifération des lymphocytes B par ces amines notamment par la sérotonine. Compte tenu de l'importance de ces cellules dans la réponse immunitaire, il était primordial de caractériser les effets de la 5-HT sur ces dernières en utilisant le modèle d'activation par le LPS.

5. BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Le but de ce travail était de mieux caractériser les effets des monoamines sérotonine et catécholamines sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le lipopolysaccharide.

Les objectifs spécifiques sont:

- 1- Étudier les effets de la sérotonine sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le lipopolysaccharide;
- 2- Déterminer les récepteurs impliqués dans les effets de la sérotonine sur la prolifération des cellules B;

- 3- Évaluer les effets de la sérotonine et des catécholamines sur le métabolisme oxydatif des lymphocytes B;
- 4- Déterminer le rôle des propriétés anti-oxydantes des monoamines dans leurs effets sur la prolifération des cellules B.

En premier lieu, nous avons étudié l'effet de la sérotonine sur la prolifération des lymphocytes B. À l'aide d'agonistes et d'antagonistes sélectifs, nous avons caractérisé les récepteurs impliqués. La deuxième partie des expériences a porté sur les effets des monoamines sérotonine et catécholamines sur le stress oxydatif dans les lymphocytes B ainsi que sur la peroxydation lipidique comme conséquence majeure des dommages induits par les DO. Dans cette partie, nous avons évalué également les liens entre les propriétés anti-oxydantes des monoamines et leurs effets sur la prolifération des cellules B.

DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

**CHAPITRE 2. SEROTONIN UPREGULATES MITOGEN-STIMULATED B
LYMPHOCYTE PROLIFERATION THROUGH 5-HT_{1A} RECEPTORS**

Cellular Immunology 163:1-9, 1995

**SEROTONIN UPREGULATES MITOGEN-STIMULATED B LYMPHOCYTE
PROLIFERATION THROUGH 5-HT_{1A} RECEPTORS.**

Khadija Iken,^{*†} Susana Chheng,[†] Annick Fargin,^{*}
Anne-Christine Goulet,^{*†} and Edouard Kouassi^{*†1}

^{*}Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada
and [†]Maisonneuve-Rosemont Hospital Centre, Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada

1 To whom correspondence should be addressed at Maisonneuve-Rosemont Hospital
Research Centre, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal (Quebec) H1T 2M4, Canada.
Fax : (514) 252-3569

Abbreviations used: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; LPS, lipopolysaccharide; DxS, dextran
sulfate; TdR, thymidine; Ac, adenylyl cyclase; IP, inositol phosphate.

SUMMARY

Serotonin is a well-known neurotransmitter and neuroimmunomodulator which has been reported to modulate T cell and NK cell proliferation. In this study, we investigated whether serotonin could regulate mitogen-stimulated proliferation of the mature B lymphocyte. Mouse and rat spleen cells were cultured with serotonin in the presence or absence of a combination of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and dextran sulfate, and proliferation was assessed by [³H]thymidine uptake or propidium iodide staining of DNA. Serotonin alone had no effect on spleen cell proliferation, while it increased mitogen-stimulated B cell proliferation in a dose- and time-dependent manner. These effects were reproduced by the selective 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT ((8-hydroxy-2-di-n-propylamino)-tetralin). Serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation could be blocked by the 5-HT_{1A} receptor antagonists (+) WAY 100135 and propranolol. Moreover, lipopolysaccharide-activated mouse spleen cells expressed specific binding sites for [³H]8-OH-DPAT. These results show that serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors, thus providing an important link between this neurotransmitter and the immune system.

INTRODUCTION

The neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)² exerts an extraordinarily wide range of biological activities through interaction with multiple receptors (for review, see 1-3). The 5-HT receptors that have been characterized pharmacologically and associated to some degree with biological functions are divided into 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, and 5-HT₄ receptor types. The 5-HT₁ receptor type is further subdivided into 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, and 5-HT_{1F} receptor subtypes, lower case letters being used to distinguish recombinant receptors from those identified in native tissues. Similarly, the 5-HT₂ receptor type is subdivided into 5-HT_{2A} (previously 5-HT₂), 5-HT_{2B}, and 5-HT_{2C} (previously 5-HT_{1C}) subtypes. Serotonin is stored in large amounts in peripheral tissues by mast cells, platelets, and it is synthesized by enterochromaffin cells of the gut mucosa. Serotonin is also coreleased with norepinephrine from noradrenergic fibers innervating the mouse spleen where it can regulate humoral immune responses (4). It has been shown in the mouse model that 5-HT released at local inflammatory sites by mast cells initiates delayed-type hypersensitivity (DTH) by activating local endothelial cells for recruitment of DTH effector T cells, and also by activating 5-HT₂ receptors on these recruited T cells for production of their inflammatory cytokines (5-8). The expression of G-21 mRNA has been found in human lymphoid tissues including lymph node, spleen, and thymus (9), and this DNA (G-21) has later been found to encode for the 5-HT_{1A} receptor (10), suggesting a role for this receptor in immunoregulation. In *in vitro* systems, serotonin has been shown to suppress IFN γ -induced Ia antigens expression on macrophages (11) and to increase IFN γ -induced phagocytosis (12), to regulate mitogen-activated T cell proliferation (13-17), and to increase cytokine-activated NK cell cytotoxicity (18-20) and NK cell proliferation (20). Experiments using various 5-HT receptor agonists and antagonists have also shown that 5-HT can regulate voltage-gated potassium channels in a murine pre-B cell line by activating 5-HT₁-like and 5-HT₃ receptors (21).

Although mature B lymphocytes represent a potential target for serotonin in the immune system, the precise effects of the neurotransmitter on these cells remain unknown. The objective of this study was to determine whether serotonin could regulate proliferation of normal mature B lymphocytes, and to characterize the 5-HT receptors involved. Using the functional model of mouse spleen cells stimulated with the potent polyclonal B cell activator lipopolysaccharide (LPS), and rat spleen cells stimulated with a combination of LPS and dextran sulfate (DxS), we show here that serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors.

MATERIALS AND METHODS

Animals

BALB/c mice and Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada) and housed in our animal facilities until use at the age of 6-8 weeks.

Reagents

All culture media were purchased from Gibco (Burlington, Ontario, Canada). D_xS (MW 500,000) was obtained from Pharmacia (Baie d'Urfe, Québec, Canada). Escherichia coli LPS (serotype 0111:B4), serotonin hydrochloride, S-(-)-propranolol hydrochloride, atenolol, and L-ascorbic acid were from Sigma (St. Louis, MO). ((±)-8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-di-n-propylamino)-tetralin hydrobromide), 5-CT (5-carboxamidotryptamine maleate), NAN-190 (1-(2-methoxyphenyl)-4-[4-(2-phthalimido)butyl]piperazine hydrobromide), ketanserin tartrate, and ICI-118,551 hydrochloride were from RBI (Natick, MA). (+) WAY 100135 (N-tert-butyl-3-(4-[2-methoxyphenyl]piperazin-1-yl)-2-phenylpropionamide dihydrochloride) was a generous gift of épinéphrine. Muth (Wyeth-Ayerst Research, Princeton, NJ). This compound is the most active enantiomer of the novel selective 5-HT_{1A} receptor antagonist ((±) WAY 100135 (22). [³H]TDR) (specific activity 2 Ci/mmol) was obtained from Du Pont NEN (Mississauga, Ontario, Canada), and [³H]8OH-DPAT (231 Ci/mmol) was from Amersham (Oakville, Ontario, Canada). Drugs were dissolved in appropriate solvents and further diluted in RPMI 1640 just prior to use. Controls were made with solvent alone and were included in all experiments.

Preparation and Culture of Mouse and Rat Spleen Cells

Mouse or rat spleens were aseptically removed and placed into cold Hank's balanced salt solution (HBSS). Cell suspensions were obtained by gentle teasing, and allowed to

sediment for 2 min to remove large cell clumps and tissue debris. Cells were then washed three times by centrifugation at 250g in HBSS and resuspended in a culture medium consisting of RPMI 1640 medium supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), L-glutamine (2 mM), and 10% fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Logan, UT). Ascorbic acid (10^{-4} M) was added to prevent serotonin oxidation. Cells were cultured in flat-bottomed 96-well culture plates (Gibco) at a density of 4×10^5 lymphocytes/well in a total volume of 200 μ l at 37°C in humidified air containing 5% CO₂.

Proliferation Assay

Cells were cultured for 48-72 hr with or without mitogens in the presence or absence of the drugs, and proliferation was measured by [³H]TdR uptake. The mitogens were either LPS alone (10 μ g/ml) for stimulation of mouse B lymphocyte proliferation, or a combination of LPS (10 μ g/ml) plus DxS (10 μ g/ml) for stimulation of rat B lymphocyte proliferation. These culture duration times and combinations of mitogens induced optimal [³H]TdR uptake as shown by preliminary kinetic and dose-response studies. Serotonin and 5-HT receptor agonists were added to cell suspensions together with the mitogens, while the drugs used as antagonists were added 30 min before agonists. Cultures were pulsed with 1 μ Ci of [³H]TdR for the last 6 hr of incubation, and cells were harvested on glass fiber filters with a semiautomatic cell harvester (Cambridge Technology, Watertown, MA). After addition of 4 ml of Formula-963 scintillation cocktail (DuPont NEN), radioactivity was counted with a Wallac System 1409 scintillation counter (Wallac Oy, Turku, Finland) that was programmed to measure and to correct for chemical quench, color quench, and chemiluminescence. Determinations of [³H]TdR uptake were made in triplicate wells and results were expressed as arithmetic means of counts per minute (cpm) \pm standard deviation (SD).

Measurement of Blast Transformation and Cell DNA Content by Flow Cytometry

Mouse spleen cells were cultured for 48-72 hr as indicated above, in the presence or absence of LPS (10 μ g/ml) with or without serotonin (10^{-4} M) or 8-OH-DPAT (5×10^{-5} M).

At the end of the culture, cell suspensions were collected, and dead cells and residual erythrocytes were removed by density gradient centrifugation on Lympholyte-M ($d = 1.0875 \pm 0.0030$ g/ml) (Cederlane, Hornby, Ontario, Canada). Viable cells were then washed twice in HBSS containing 5% FCS and analyzed for blast transformation and cell DNA content.

For study of blast transformation, cells were resuspended at 1×10^6 /ml in PBS, and 10^4 cells were analyzed with a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) for their forward-scattered light (FSC) and side-scattered light (SSC) using the Lysis II program. FSC and SSC are related to cell size and cell granularity, respectively, and both are increased in mitogen-activated blast B lymphocytes in the G_{1A} phase of the cell cycle, as compared to resting lymphocytes in G_0 .

For DNA content analysis, preparation of cell nuclei and their staining with propidium iodide (PI) were performed with 2×10^6 cells/sample by using modified Krishan buffer (23) containing 0.1% sodium citrate, 0.02 mg/ml RNase, 0.3% NP-40, and 0.05 mg/ml PI (Molecular Probes, Eugene, OR), and 10^4 nuclei/sample were analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) using the CellFIT software provided by the manufacturer. Duplicate samples were run in parallel. To determine the percentage of cells in G_0/G_1 , S, and G_2/M phases of the cell cycle, fluorescence histograms were integrated using the SFIT model, after exclusion of dead cells, and doublets.

Measurement of [3 H]8-OH-DPAT Binding

The presence of specific binding sites for 8-OH-DPAT on LPS-activated spleen cells was investigated by measuring specific binding of [3 H]8OH-DPAT as described previously with minor modifications (16). LPS-activated cells were prepared by incubating mouse spleen cells for 54 hr at 37°C in the presence of $10 \mu\text{g/ml}$ of LPS as described above. The cells were then harvested by three washings in RPMI, and viable cells were isolated using density gradient centrifugation on Lympholyte-M (Cederlane). Aliquots of 2×10^6 cells/sample were incubated at 4°C in 13×100 mm borosilicate glass tubes (Baxter, McGraw Park, IL) in a total volume of $250 \mu\text{l}$ of RPMI in the presence of [3 H]8OH-DPAT

(20 nM) with or without excess unlabeled 5-HT (10 μ M) for 0-45 min. Each sample was run in triplicate. Cells were collected onto GF/C filters (Whatman) using a 1225 Sampling Manifold vacuum filtration apparatus (Millipore, Bedford, MA). The tubes and filters were then washed three times with 5 ml of ice-cold PBS containing ascorbic acid (10⁻⁴ M) to reduce nonspecific binding. The filters were air dried and placed in 10 ml scintillation vials, to which 4 ml of Universol scintillation cocktail (ICN, Costa Mesa, CA) was added, and the radioactivity was counted in the Wallac System 1409 scintillation counter (Wallac Oy). The total cpm added in the presence of 20 nM of [³H]8-OH-DPAT was 10⁶, and only 1000 cpm was retained on the filters from control samples that lacked cells. This was independent of the presence of unlabeled 5-HT. Specific binding of [³H]8-OH-DPAT was the difference between [³H]8-OH-DPAT binding in the absence (total binding) and presence (nonspecific binding) of unlabeled 5-HT. At binding equilibrium, typical total binding was about 6000 to 8000 cpm, and specific binding represented 20-30% of the total binding.

Statistical Analysis

Difference between control and experimental groups was determined by Student's t test. Results are representative of at least three separate experiments. The error bars in all figures represent standard deviation of triplicate values, and the asterisk in all competition curves indicates $P < 0.05$ comparing cpm values in the presence of agonist and antagonist to that with agonist alone.

RESULTS

Serotonin and the Selective 5-HT_{1A} Receptor Agonist 8-OH-DPAT Increase Mitogen-Stimulated B Lymphocyte Proliferation

Serotonin increased in a dose-dependent manner the proliferation of mouse spleen cells in response to LPS, and the proliferation of rat spleen cells in response to a combination of LPS and DxS as measured by [³H]TdR uptake (Fig. 1). The effect of serotonin was apparent at 3×10^{-6} M, and it reached a maximum at 10^{-4} M, with about 100-200% increase of mitogen-stimulated proliferation at this concentration, depending on the experiments. The half-maximally effective concentration (EC₅₀) was 3×10^{-5} M on mouse spleen cells, and 6×10^{-5} M on rat spleen cells. Serotonin had no effect on mouse and rat spleen cell proliferation in the absence of the mitogens, showing that serotonin was not active on its own, but was actually regulating the response induced by the mitogens.

The selective 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT mimicked the increasing effect of 5-HT on the mouse (Fig. 2A) and rat (Fig. 2B) spleen cells, with an EC₅₀ of 10^{-5} M. The maximally effective concentration was 3×10^{-5} M in both species, yielding about 100% increase over mitogen control levels. Under the same conditions, the nonselective 5-HT₁ agonist 5-CT that possesses higher affinity than 8-OH-DPAT for 5-HT_{1B} sites was much less active than 5-HT or 8-OH-DPAT to increase LPS-stimulated mouse spleen cell proliferation, with an EC₅₀ of 2×10^{-4} M, and a maximum effect of about 40% increase at 3×10^{-4} M (Fig. 2A). Both 8-OH-DPAT and 5-CT alone had no effect on mouse or rat spleen cell proliferation (data not shown).

Serotonin and 8-OH-DPAT Increase Blast Transformation and S Phase Transition of LPS-Stimulated B Cells

To determine whether serotonin and 8-OH-DPAT affected blast transformation and cell cycle progression of mitogen-stimulated B cells, mouse spleen cells were cultured for 48 or 72 hr with or without LPS (10 μ g/ml) in the presence or absence of the drugs. As shown in table 1, the drugs did not affect [3 H]TdR uptake measured at 48 hr post-treatment, whereas a 40-50% increase was observed at 72 hr. Similarly, the percentage of LPS-stimulated blast cells was not modified at 48 hr, but it is increased by 110-115% at 72 hr. Immunophenotypic experiments with fluorescein-conjugated goat-anti-mouse immunoglobulin (Ig) antibodies demonstrated that the majority (>90%) of these blast cells expressed surface Ig, confirming their B cell phenotype (data not shown).

The measurement of cell DNA contents showed that 10.8% of the spleen cells were in the S phase in LPS-stimulated cultures after 48 hr of incubation and this percentage was not changed by the presence of the drugs. After 72 hr of culture, the S phase population was 9.8% in the LPS control, and it reached 14.5% (48% increase) and 13.2% (35% increase) in the presence of LPS plus serotonin or LPS plus 8-OH-DPAT, respectively. Therefore, the results from two different approaches, [3 H]TdR uptake and flow cytometry analysis of cell DNA content, showed that the drugs were increasing mitogen-stimulated DNA synthesis in the B lymphocytes.

5-HT_{1A} Receptor Antagonists Block the Effects of 5-HT or 8-OH-DPAT

To further determine the specificity of the upregulating effects of serotonin and 8-OH-DPAT on B cell proliferation, competition studies were performed with various 5-HT receptor antagonists. The 5-HT_{1A} receptor antagonist (+) WAY 100135 strongly and dose-

dependently inhibited serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in mitogen-stimulated mouse (Fig. 3) and rat (Fig. 4) B lymphocyte proliferation. The antagonist alone was devoid of any effect on mitogen-stimulated B cell proliferation (Fig. 3A and 4A). The nonselective β_1 and β_2 -adrenergic blocker propranolol that is known to have high affinity for 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors was also able to inhibit serotonin- or 8-OH-DPAT-induced upregulation of LPS-stimulated B mouse cell proliferation (Fig. 5), while the selective β_1 -adrenergic blocker atenolol and the selective β_2 -adrenergic blocker ICI-118,551 had no effect (data not shown). Another selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, NAN-190, was tested. As shown in Fig. 6A, low concentrations of NAN-190 (10^{-10} - 10^{-7} M) had no effect on their own (Fig. 6A), but synergized the increasing effect of serotonin (Fig. 6B) and 8-OH-DPAT (Fig. 6C). With higher concentrations (10^{-6} - 10^{-4} M), NAN-190 alone induced an increase in LPS-stimulated B cell proliferation (Fig. 6A), comparable to that induced by serotonin or 8-OH-DPAT. At these concentrations, there was no additive or synergistic effect when NAN-190 was used in conjunction with serotonin or 8-OH-DPAT.

As shown in fig. 7A, the 5-HT_{2A} receptor antagonist ketanserin had no effect on LPS-stimulated B lymphocyte proliferation, except at the highest concentration (10^{-5} M) that induced 49% increase in proliferation. Higher concentrations of ketanserin decreased cell viability as assessed by Trypan blue staining (data not shown). In addition, at the concentrations tested, ketanserin had no effect on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in LPS-stimulated B lymphocyte proliferation (Figs. 7B and 7C).

[³H]8-OH-DPAT Specifically Binds to LPS-Activated Mouse Spleen Cells

The kinetics and specificity of the binding of the selective 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT were examined on mouse spleen cells activated for 54 hr with LPS (10 μ g/ml). After culture, the cells were incubated at 4°C (0-45 min) with [³H]8-OH-DPAT (20 nM) with or without unlabeled serotonin (10 μ M) to detect specific binding on 5-HT_{1A} receptors. As

shown in Fig. 8, specific binding was detectable at 2 min after incubation of LPS-activated cells with the radioligand, and maximum binding was obtained within 10 min. These results indicated that rapid and specific 8-OH-DPAT binding to LPS-activated spleen cells was demonstrable at 4°C with binding equilibrium occurring by 10 min.

DISCUSSION

The cell growth activity of serotonin has been recognized recently on a limited number of nonlymphoid cells (1), and this has been observed only on human T lymphocytes (16) and NK cells (20) in the immune system. This report demonstrates for the first time that serotonin upregulates mitogen-stimulated spleen B lymphocyte proliferation in the mouse and rat, with similar results in both species as measured by [³H]TdR uptake into DNA. Flow cytometry determination of cell DNA content shows that serotonin increases the relative proportion of the S phase population, concomitant with a decrease in the G₀/G₁ population, confirming that the drug is upregulating DNA synthesis in mitogen-stimulated B cells. Our data also reveal that serotonin upregulates LPS-stimulated blast cell transformation, which is an earlier index of B lymphocyte activation occurring during the G₀ to G_{1A} transition, and continuing during further transition from G_{1A} to G_{1B} and S phase (24, 25).

The upregulating effects of serotonin could be due to the recruitment of new, previously unstimulated B cells into the mitogenic response, but this is unlikely because serotonin alone has no effect on spleen cell proliferation. However, serotonin may behave as a cofactor to facilitate B cell proliferation, by acting directly on LPS-responsive B cells. Also, serotonin may reverse some suppressive signals of the B cell response to LPS. The latter hypothesis is supported by the relatively delayed activity of serotonin that is revealed when proliferation is measured after 72 hr of culture, whereas little or no effect is observed after 48 hr (Table 1). Additional kinetic data (not shown) indicate that the enhancing effect observed after 72 hr is maintained at later culture time points, and it is present even if serotonin is added as late as 48 hr after LPS. In the absence of serotonin, the LPS-stimulated B cell proliferation reaches a maximum at 48 hr, and decreases thereafter, probably under the influence of these suppressive signals that are blocked by serotonin. Although the nature of such suppressive signals is not yet identified, potential candidates are macrophages and their

secretory products. Previous studies on human peripheral blood lymphocytes have shown that serotonin can reverse macrophage-induced inhibition of NK cell proliferation (20), and cAMP-induced inhibition of T cell proliferation (16), whereas the neurotransmitter is devoid of any effect in these systems if the suppressive signals of the NK or T cells are absent.

The pharmacology of 5-HT receptors has been extensively reviewed recently (2), showing the existence of at least 14 receptor types or subtypes, including eight native receptors identified in whole tissues (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, and 5-HT₄) and six recombinant receptors without native counterparts so far (5-ht_{1E}, 5-ht_{1F}, 5-ht_{5A}, 5-ht₆, and 5-ht₇). With the exception of the 5-HT₃ receptor, which is a ligand-gated cationic channel, all 5-HT receptors belong to the G-protein-coupled superfamily. Various 5-HT receptors have been proposed for serotonin-induced stimulation of proliferation in nonlymphoid cells (3, 26-31), but only the 5-HT_{1A} receptor subtype has been consistently implicated in upregulation of T cell (16) and NK cell proliferation (20). Our pharmacological data show that the effects of serotonin on B cell blast transformation, [³H]TdR uptake, and S phase transition are all reproduced by the selective 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, (Fig. 2, Table 1), whereas the non selective 5-HT₁ receptor agonist, 5-CT, has little effect (Fig. 2A). The latter has been reported to be more potent than 8-OH-DPAT on 5-HT_{1B} sites (reviewed in 2). Inhibition experiments in the presence of 5-HT receptor antagonists show that the effects of serotonin and 8-OH-DPAT can be blocked by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist (+)WAY 100135 (22), and by the β -adrenergic blocker propranolol which binds 5-HT_{1A} receptors with high affinity (32). In contrast, the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist, ketanserin, fails to inhibit serotonin or 8-OH-DPAT-induced upregulation of B cell proliferation. In addition, radioligand binding studies demonstrate the expression of specific binding sites for [³H] 8-OH-DPAT on LPS-activated mouse spleen cells (Fig. 8). These results indicate that 5-HT_{1A} receptors are involved in the upregulating activity of serotonin on LPS-stimulated B cell proliferation. The fact that stimulation of the mouse and rat 5-HT_{1A} receptors triggers identical effects on mitogen-

activated B cell proliferation, suggests that these effects are not species specific. Similarly, previous structural studies have shown that the 5-HT_{1A} receptors cloned in the human (9,10) and rat (33) have nearly identical amino acid sequences. Our data also demonstrate that the 5-HT_{1A} receptor antagonist NAN-190 leads to stimulation of B cell growth and synergizes the upregulatory effects of serotonin and 8-OH-DPAT (Fig. 6). Previous studies have also shown that NAN-190 as well as several other 5-HT_{1A} receptor antagonists display both agonist and antagonist properties depending on 5-HT_{1A} receptor density and the nature of 5-HT_{1A} receptor-effector coupling in the system investigated (34-36). Therefore, one can think that similar mechanisms are responsible for the intrinsic activity of NAN-190 in the model of mitogen-stimulated B cell proliferation. In addition, it is possible that there is another and uncharacterized receptor involved in the stimulatory and synergistic effects of NAN-190 in B cells.

The molecular mechanisms whereby serotonin stimulates cell growth remain speculative. It is noteworthy that the 5-HT_{1A} receptor can link to multiple transducing systems depending on the cell type (37-39). Those described in the immune system include inhibition of adenylyl cyclase (AC) found in PHA-activated human T cells (16), and stimulation of inositol phosphate (IP) production with subsequent increase in cytosolic free calcium in the human lymphoma T cell line Jurkat (16,40). Inhibition of AC is common to all 5-HT₁ receptor subtypes (2), and this mechanism has been proposed to be responsible for 5-HT_{1A}-mediated reversal of forskolin-induced inhibition of T cell proliferation (16). However, neither inhibition of AC nor stimulation of IP production was found to be sufficient to explain serotonin-stimulated proliferation of Chinese hamster fibroblasts, while other unknown mechanisms may be operating (1). Another possibility is the opening of K⁺ channels as suggested by the following evidence: (i) serotonin increases K⁺ conductance in murine pre B cells through 5-HT₁-like receptors that have been partially characterized (21); (ii) LPS activation dramatically increases the number of voltage gated K⁺ channels on murine B cell blasts (41); and (iii) several inhibitors of these channels can inhibit LPS-stimulated B

cell proliferation by acting at a critical stage in the G₁ phase of the B cell cycle (42). Therefore, in contrast to the K⁺ channel inhibitors, serotonin could increase the LPS response by opening these channels. Finally, tyrosine phosphorylation triggered by membrane transport of serotonin has been proposed recently to mediate stimulation of cell growth in bovine pulmonary artery smooth muscle cells (31). The precise contribution of one or another of the aforementioned signaling mechanisms in upregulation of B cell mitogenesis by serotonin is the subject of a detailed investigation in our laboratory.

The studies reported here provide strong evidence that serotonin can control B cell growth, thus establishing a link between this important neurotransmitter and the B lymphocyte. These effects will have physiological and pathological significance in view of the large amounts of serotonin present at inflammatory sites and in lymphoid tissues. Consequently, serotonin may contribute to maintain or to amplify inflammatory responses to bacterial LPS or other polyclonal B cell activators. Moreover, the growth activity of serotonin on LPS-stimulated B cells through 5-HT_{1A} receptor will serve as a valuable tool to elucidate the mechanisms underlying cell growth promotion by G-protein-coupled receptors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Beaudry for excellent technical assistance, and C. Baron for her help in flow cytometry. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, FRSQ, and Université de Montréal, and by a research career award in medicine from PMAC-HRF/MRC to E.K.

REFERENCES

1. Seuwen, K., and Pouyssegur, J., *Biochem. Pharmacol.* **39**, 985, 1990.
2. Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P., R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.A., *Pharmacol. Rev.* **46**, 157, 1994.
3. Peroutka, S. J., and Howell, T.A., *Neuropharmacology* **33**, 319, 1994.
4. Fuchs, B. A., Campbell, K.S., and Munson, A.E., *Cell.Immunol.* **117**, 339, 1988.
5. Gershon, R. K., Askenase, P. W., and Gershon, M., *J. Exp. Med.* **142**, 732, 1975.
6. Askenase, P.W., Meltzer, C. M., and Gershon, R. K., *Immunology* **47**, 239, 1982.
7. Ameisen, J. C., Meade, R., and Askenase, P. W., *J. Immunol.* **142**, 3171, 1989.
8. Askenase, P. W., Herzog, W. R., Millet, I., Paliwal, V., Ramabhadran, R., Rochester, C., Geba, G. P., and Ptak, W., *Skin Pharmacol.* **4(suppl. 1)**, 25, 1991.
9. Kobilka, B. K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R., J., and Caron, M. G., *Nature* **329**, 75, 1987.
10. Fargin, A., Raymond, J. R., Lohse, M. J., Kobilka, B. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., *Nature* **335**, 358, 1988.
11. Sternberg, E., M., Trial, J., and Parker, C.W., *J. Immunol.* **137**, 276, 1986.
12. Sternberg, E., Wedner, H. J., Leung, M. K., and Parker, C. W., *J. Immunol.* **138**, 4360, 1987.
13. Bonnet, M., Lespinat, G., and Burtin, C., *Cell. Immunol.* **83**, 1984.

14. Slauson, D., O., Walker, C., Kristensen, F., Wang, Y., De Weck, A. L., *Cell. Immunol.* **84**, 240, 1984.
15. Nordlind, K., and Sundstrom, E., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **87**, 317, 1988.
16. Aune, T. M., McGrath, K. M., Sarr, T., Bombara, M. P., and Kelley, K. A., *J. Immunol.* **151**, 1175, 1993.
17. Aune, T.M., Golden, H.W., and McGrath, K. M., *J. Immunol.* **153**, 489, 1994.
18. Hellstrand, K., and Hermodsson, S., *Cell. Immunol.* **127**, 199, 1990.
19. Hellstrand, K., Hylefjord, H., Asea, A., and Hermodsson, S. *J. Interferon Res.* **12**, 199, 1992.
20. Hellstrand, K., and Hermodsson, S., *Scan. J. Immunol.* **37**, 7, 1993.
21. Choquet, D., and Korn, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4557, 1988.
22. Fletcher, A., Bill, D., Bill, S. J., Cliffe, I. A., Dover, G. M., Forster, E. A., Haskins, J. T., Jones, D., Mansell, H. L., and Reilly, Y., *Eur. J. Pharmacol.* **237**, 283, 1993.
23. Dressler, L. G., and Bartow, S. A., *Seminars Diagnostic Pathol.* **6**, 55, 1989.
24. Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., and Melamed, M. R., *Cytometry* **1**, 98, 1980.
25. Thompson, C. B., Scher, I., Scaeter, M. E., Lindsten, T., Finkelman, F. D., and Mond, J.J., *J. Immunol.* **133**, 2333, 1984.
26. Nemecek, G. M., Coughlin, S. R., Handley, D.A., and Moskowitz, M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 674, 1986.
27. Seuwen, K., Magnaldo, I., and Pouyssegur, J., *Nature* **335**, 254, 1988.

28. Takuma, N., Ganz, M., Takuwa, Y., Sterzel, R. B., and Rasmussen, H., *Am. J. Physiol.* **257**, F431, 1989.
29. Ishizuka, J., Beauchamp, R. D., Townsend, C. M., Jr., Greeley, G. H., and Thompson, J. C., *J. Cell. Physiol.* **150**, 1, 1992.
30. Cattaneo, M. G., Codignola, A., Vicentini, L.M., Clementi, F., and Sher, E., *Cancer Res.* **53**, 5566, 1993.
31. Lee, S.-L., Wang, W. W., Lanzillo, J. J., and Fanburg, B. L., *Am. J. Physiol.* **266**, L53, 1994.
32. Guan, X. M., Peroutka, S. J., and Kobilka, B., *Mol. Pharmacol.* **41**, 695, 1992.
33. Albert, P. R., Zhou, Q.-Y., Van Tol., H. H. M., Bunzow, J. R., and Civelli, O., *J. Biol. Chem.* **265**, 5825, 1990.
34. Hjorth, S., and Sharp, T., *Life Sci.* **46**, 955, 1990.
35. Rydelek-Fitzgerald, L., Teitler, M., Fletcher, P. W., Ismaiel, A. M. and Glennon, R. A., *Brain Res.* **532**, 191, 1990.
36. Wozniak, K. M., Durcan, M.J., and Linnoila, M., *Eur. J. Pharmacol.* **193**, 253, 1991.
37. Andrade, R., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A., *Science* **234** 1261, 1986.
38. Fargin, A., Raymond, J. R., Regan, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G., *J. Biol. Chem.* **264**, 14848, 1989.
39. Liu, Y.F., and Albert, P. R., *J. Biol. Chem.* **266**, 23689, 1991.
40. Aune, T. M., Kelley, K. A., Ranges, G. E., and Bombara, M. P., *J. Immunol.* **145**, 1826, 1990.

41. Choquet, D., Sarthou, P., Primi, D., Cazenave, P.-A., and Korn, H., *Science* **235**, 1211, 1987.
42. Amigorena, S., Choquet, D., Teillaud, J.-L., Korn, H., and Fridman, W. H., *J. Immunol.* **144**, 2038, 1990.

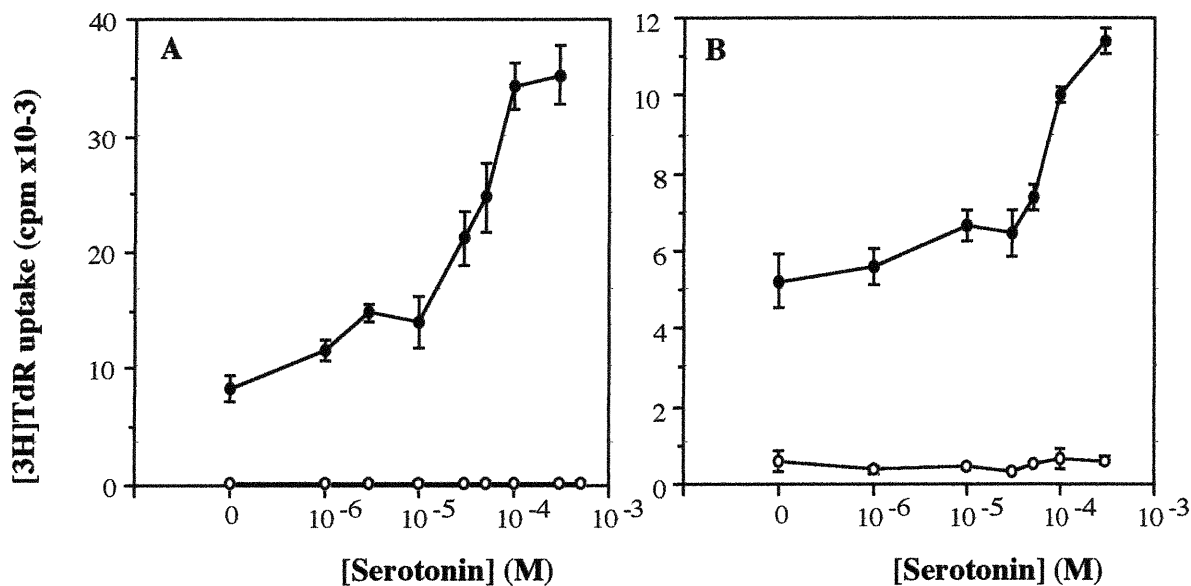


Figure 1: Effects of serotonin on mouse and rat spleen cell proliferation. (A) Mouse spleen cells were incubated for 72 hr with increasing concentrations of serotonin in the absence (open circles) or presence (filled circles) of LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), and proliferation was measured by [³H]TdR uptake during the last 6 hr of culture. (B) Spleen cells were obtained from rat and incubated under the same conditions as in (A) except the mitogen was LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) plus DxS (10 $\mu\text{g/ml}$). Results are mean cpm \pm SD of triplicate wells. Note that the ordinate scales are different in (A) and (B).

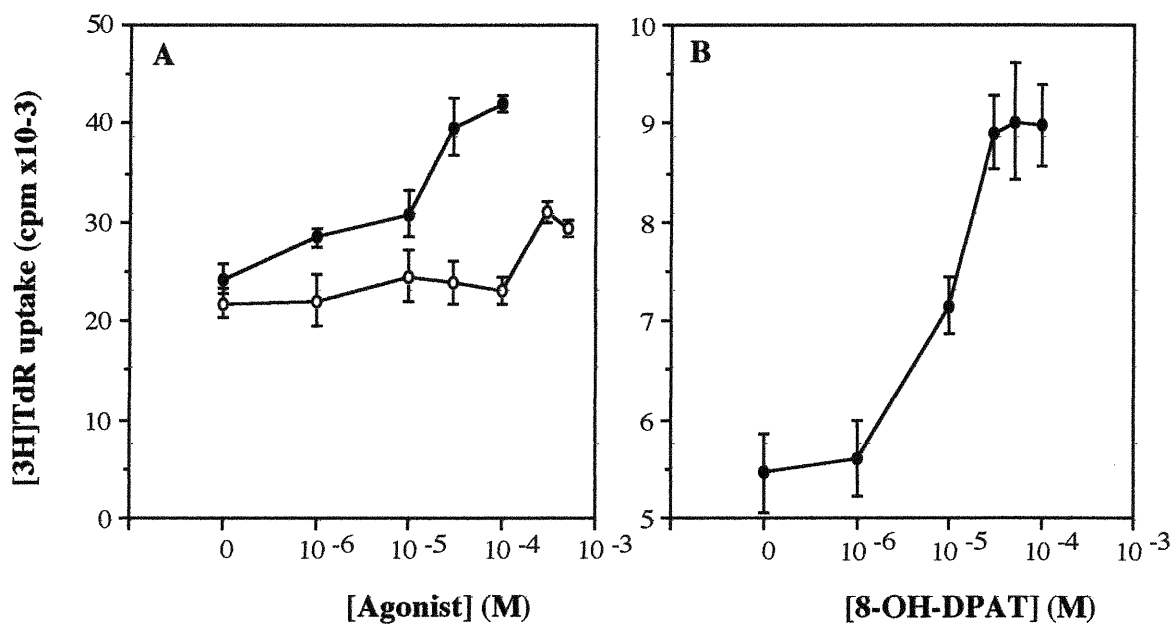


Figure 2: Effects of 5-CT (open circles) or 8-OH-DPAT (filled circles) on mitogen-stimulated mouse (A) or rat (B) spleen cell proliferation. Mouse spleen cells were incubated for 72 hr in the presence of the indicated concentrations of 5-CT or 8-OH-DPAT together with LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), and rat spleen cells in the presence of 8-OH-DPAT with LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) plus D_xS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Proliferation was assessed by $[^3\text{H}]\text{TdR}$ uptake. Note that the ordinate scales are different in (A) and (B).

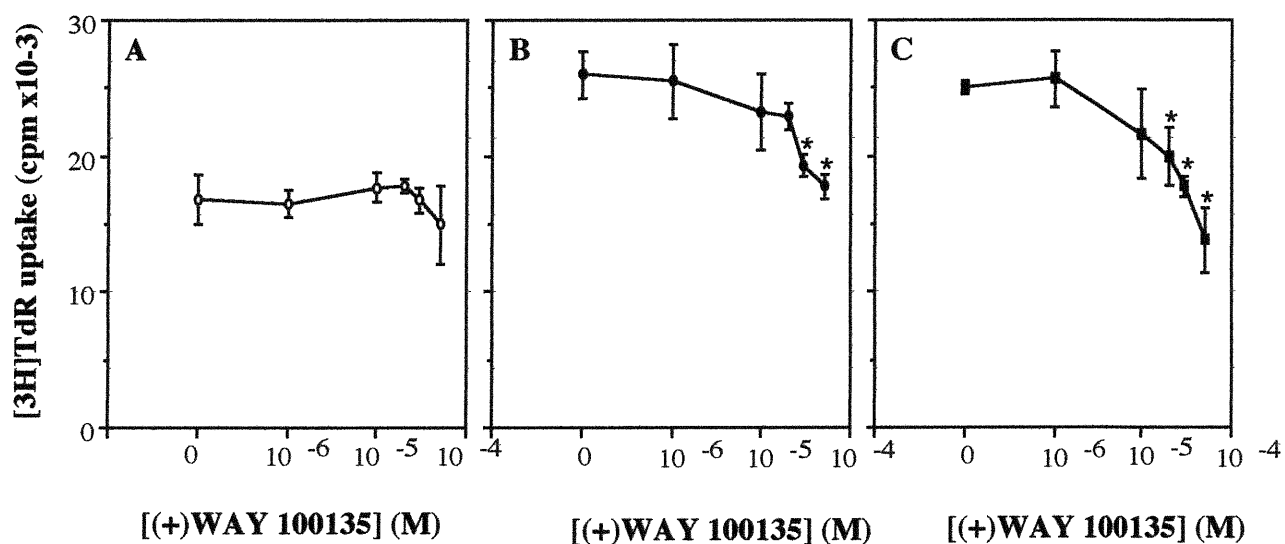


Figure 3: Effects of WAY 100135 on serotonin or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells. Cells were preincubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of WAY 100135 and then LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) was added alone (A) or in combination with serotonin (10^{-4}M) (B) or 8-OH-DPAT ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) (C). Proliferation was measured by $[^3\text{H}]\text{TdR}$ uptake.

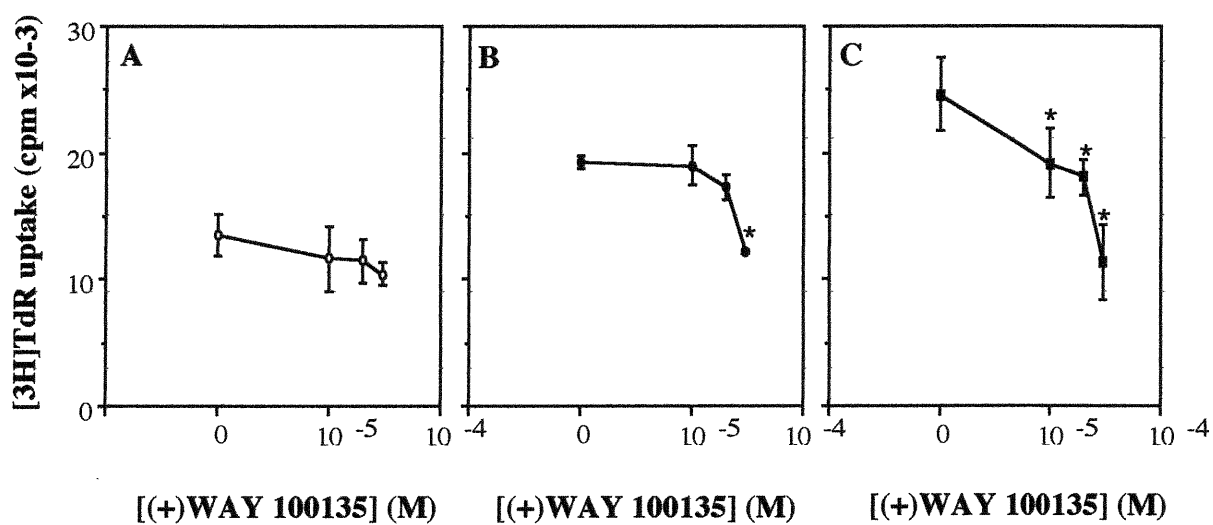


Figure 4: Effects of WAY 100135 on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of rat spleen cells stimulated with LPS (10 μ g/ml) plus DxS (10 μ g/ml). Cells were preincubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of WAY 100135, and then LPS plus DxS were added alone (A) or in combination with serotonin (10⁻⁴M) (B) or 8-OH-DPAT (5 X 10⁻⁵M) (C). proliferation was measured by [³H]TdR uptake.

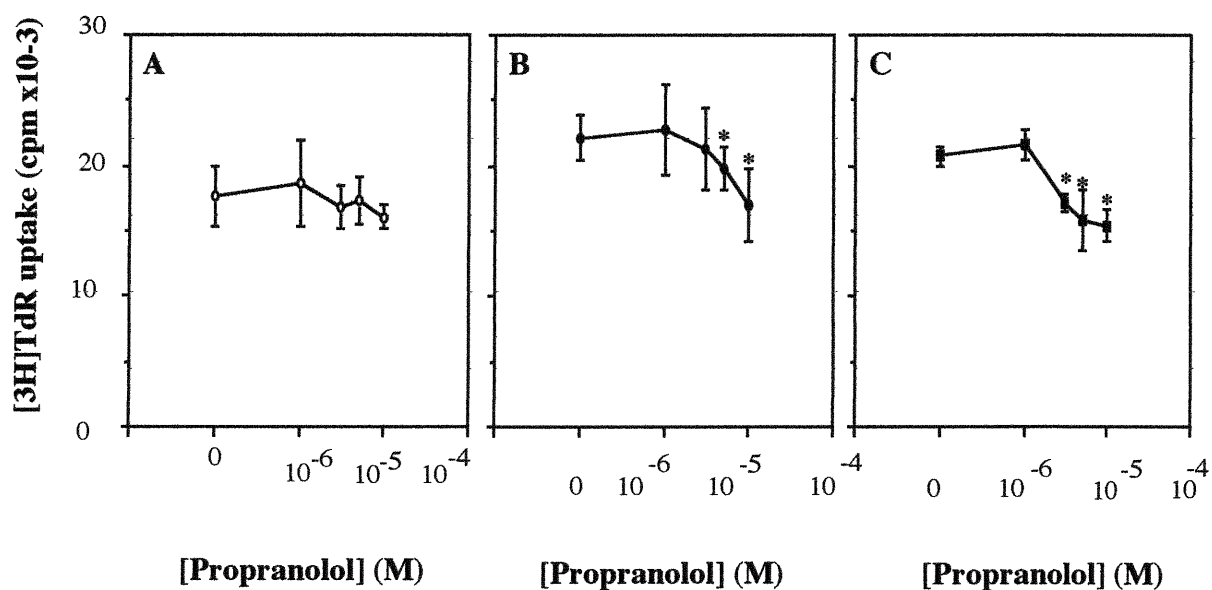


Figure 5: Effects of propranolol on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells. Cells were preincubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of propranolol, and then LPS (10 μ g/ml) was added alone (A) or in combination with serotonin (10⁻⁴M) (B) or 8-OH-DPAT (5 X 10⁻⁵M) (C). Proliferation was measured by [³H]TR uptake.

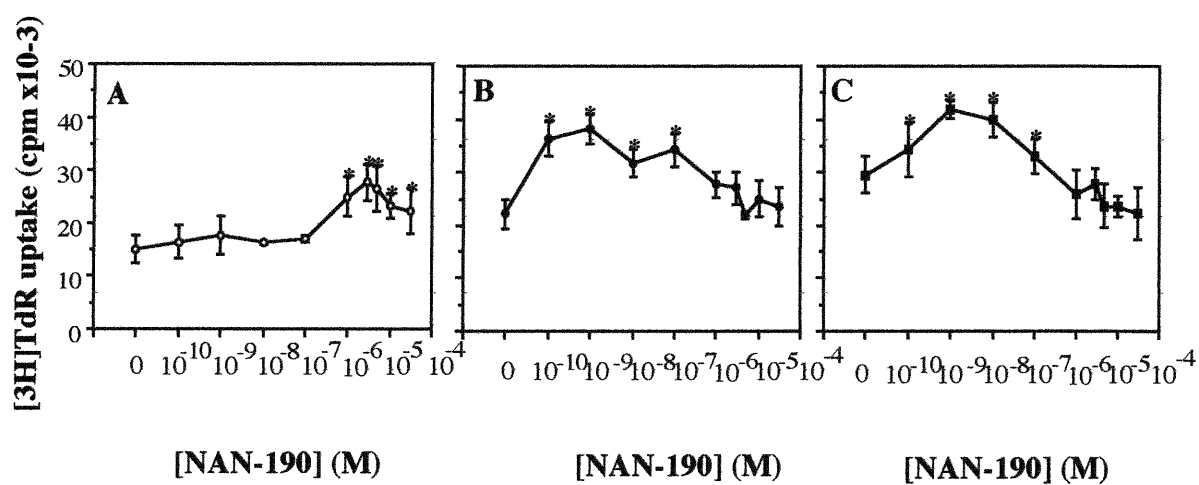


Figure 6: Effects of NAN-190 on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells. Cells were preincubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of NAN-190, and then LPS (10 μ g/ml) was added alone (A) or in combination with serotonin (10⁻⁴M) (B) or 8-OH-DPAT (5 X 10⁻⁵M) (C). Proliferation was measured by [³H]TdR uptake.

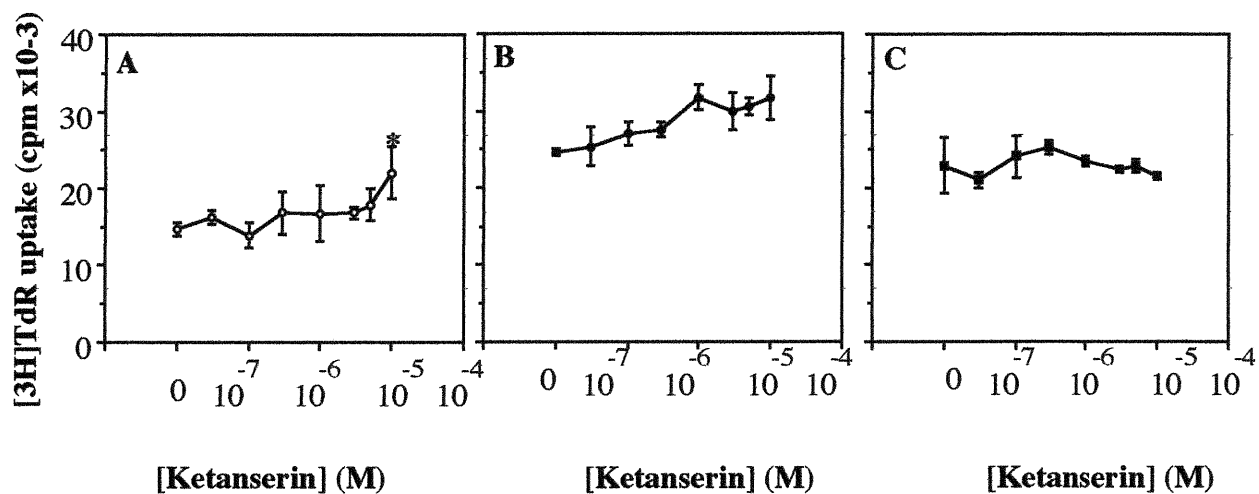


Figure 7: Effects of Ketanserin on serotonin- or 8-OH-DPAT-induced increase in proliferation of LPS-stimulated mouse spleen cells. Cells were preincubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of Ketanserin, and then LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) was added alone (A) or in combination with serotonin (10^{-4} M) (B) or 8-OH-DPAT (5×10^{-5} M) (C). Proliferation was measured by $[^3\text{H}]\text{TdR}$ uptake.

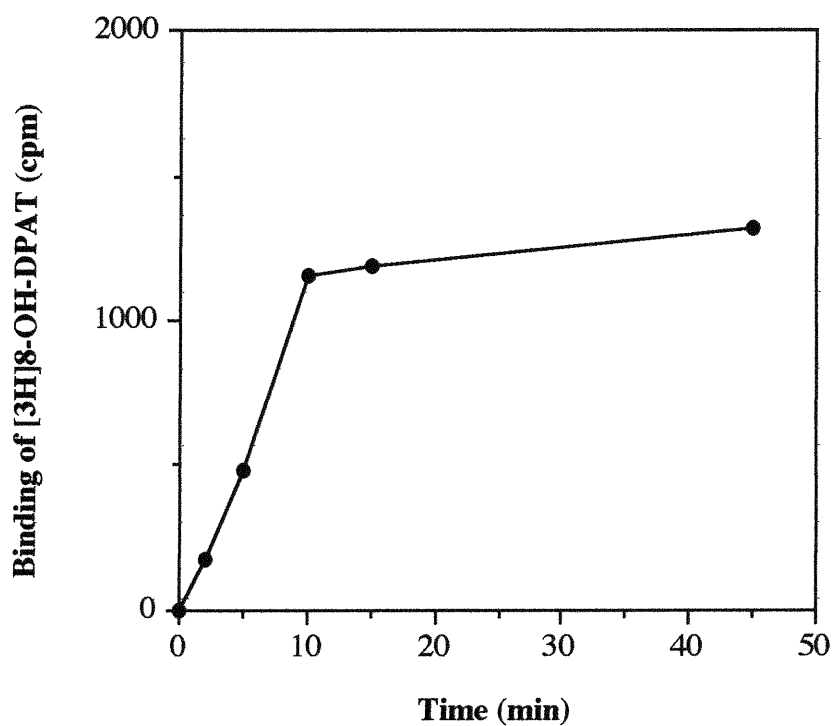


Figure 8: Binding of [³H]8-OH-DPAT on LPS-stimulated cells. Mouse spleen cells were cultured with LPS (10 μ g/ml) for 54 hr, and the presence of [³H]8-OH-DPAT binding sites was assessed by incubating triplicate samples (2 X 10⁶ cells/sample) at 4°C for the indicated times with the radioligand (20 nM) in the absence (total binding) or presence (nonspecific binding) of 500-fold excess unlabeled serotonin. Specific binding of [³H]8-OH-DPAT.

TABLE 1

Time-dependent effects of serotonin and 8-OH-DPAT on LPS-stimulated ^3H -TdR uptake, blast transformation and cell DNA content

Incubation time (h)	Additive	^3H -TdR uptake (cpm)	Blast cells (%)	Cell DNA content		
				G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
48	None	2,246 ± 253	5	98.9	0.9	0.3
	LPS	29,447 ± 1625	31	87.6	10.8	1.8
	LPS + serotonin	27,627 ± 1810	36	87.3	10.9	1.8
	LPS + 8-OH-DPAT	30,725 ± 3899	31	85.7	12.9	1.4
72	None	2,468 ± 399	5	99.4	0.2	0.4
	LPS	25,801 ± 2870	20	88.1	9.8	2.2
	LPS + serotonin	36,010 ± 3920*	42*	82.8	14.5*	2.8
	LPS + 8-OH-DPAT	38,081 ± 3828*	43*	82.2	13.2*	4.6

Note. Mouse spleen cells were cultured for 48 or 72 h with the listed additives. The final concentrations of LPS, serotonin, and 8-OH-DPAT were 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10⁻⁴M and 5 x 10⁻⁵M, respectively. Proliferation was determined by pulsing the cells for the final 6 h of culture with 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ of ^3H -TdR. Samples run in parallel in the same conditions as above were analyzed by flow cytometry, for their FSC/SSC to determine the proportion of blast cells among the lymphocytes, and for their DNA content by PI staining of their nuclei to determine the relative proportions of G₀/G₁, S, and G₂/M populations. The data shown are means ± SD of triplicate wells for ^3H -TdR uptake, and means of duplicate determinations from a pool of at least 48 wells/additive for FSC/SSC and cell DNA content.

**CHAPITRE 3. RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT
PROPERTIES OF SEROTONIN AND CATECHOLAMINES AND THEIR
MITOGENIC EFFECTS ON B LYMPHOCYTES**

Soumis à Life Sciences

**RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF
SEROTONIN AND CATECHOLAMINES AND THEIR MITOGENIC
EFFECTS ON B LYMPHOCYTES**

Khadija IKEN ^a and Edouard KOUASSI ^a

^a Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada, and Human Health Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Québec, Canada

* Address correspondence to:

Edouard Kouassi, Ph.D

Human Health Research Center

INRS-Institut Armand-Frappier

245 boul. Hymus

Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6, Canada

Tel. 514-630-8851

Fax 514-630-8850

E-mail: edouard.kouassi@inrs-sante.quebec.ca

Abstract-We have shown previously that serotonin (5-HT) and catecholamines (CA) have a growth stimulatory effect on mouse B cells. This effect is partially mediated through stimulation of 5-HT_{1A} and β_2 -adrenergic receptors, respectively. 5-HT and CA are also known as antioxidants that behave as free radical scavengers. In the present study we investigated whether the antioxidant activity of these monoamines contributes to their increasing effects on mouse B lymphocyte proliferation. We first showed that 5-HT, norepinephrine (NE) and isoproterenol (ISO) had similar potency in suppressing luminol-enhanced chemiluminescence (CL) in a radical generating cell-free system with IC₅₀ values of 4×10^{-8} M, 3.5×10^{-8} M, and 4×10^{-8} M, respectively. Both the CL response of mouse spleen cells stimulated *in vitro* with phorbol myristate acetate (PMA) and lipid peroxidation of spleen cells stimulated with the B cell mitogen *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) were inhibited by 5-HT and CA at relatively high concentrations, with IC₅₀ values of 10^{-4} M or above. These concentrations are about 10 times higher than the EC₅₀ values reported previously for increases of mitogen-stimulated B cell proliferation by 5-HT and CA. Furthermore, the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT whose increasing effect on mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation was similar to that of 5-HT had lower antioxidant activity than the latter. To further evaluate the potential contribution of the antioxidant activity of the monoamines in their increasing effects on B lymphocyte proliferation, we studied the effects of 5-HT and ISO in combination with other potent antioxidants including superoxide dismutase, catalase, mannitol, and taurine on LPS-stimulated B cell proliferation. In the absence of 5-HT and ISO each antioxidant could increase B cell proliferation. However, the augmentation of mitogen-stimulated B cell proliferation by 5-HT and ISO was maintained in the presence of the antioxidants. These findings suggest that the antioxidant activity of 5-HT and CA may play a minor role in their mitogenic effects on B lymphocytes, further supporting a more important role for lymphocyte 5-HT_{1A} and β_2 -adrenergic receptors in these effects.

Keywords-Monoamines, Serotonin, Isoproterenol, 5-HT_{1A} agonist:8-OH-DPAT, Proliferation, Free radical, Chemiluminescence, Lipid peroxidation.

INTRODUCTION

Cells of the immune system use reactive oxygen species (ROS) and free radicals as the first line of defense against bacterial/viral pathogens. A large amount of ROS are produced by activated macrophages and neutrophils that participate in immune and inflammatory responses. While the oxygen free radicals generated by phagocytes help to fight against invading organisms, they may be deleterious to surrounding host cells and tissues. Immune cells likely to be exposed to oxygen free radicals are T and B lymphocytes that are exposed to both endogenous and exogenous oxidative stress and appear to be more sensitive to oxidative stress than other cells.¹ In addition, B lymphocytes, but not T lymphocytes, have been shown to possess a superoxide generating system, which can be stimulated by phorbol esters and by cross-linking of surface IgG, although the level of superoxide anion produced in these conditions is lower than that observed in activated phagocytes²⁻⁶.

Biogenic amines are a group of regulatory substances that are widely distributed in the brain and in the periphery. Indeed, catecholamines (CA) are actively produced by lymphocytes.^{7,8} Moreover, during inflammatory processes, large amounts of serotonin (5-HT) are released by local mast cell degranulation in rodents and by aggregated platelets in rodents and mammals.⁸⁻¹⁰ Both 5-HT and CA have been shown to react with free radicals¹¹⁻¹⁵ and to inhibit ROS production by phagocytes.^{16,17-20} Also, we have shown previously that 5-HT²¹ and CA²² can upregulate LPS-stimulated mouse B lymphocyte proliferation, in part by interacting with specific 5-HT_{1A} and β_2 -adrenergic receptors, respectively, but other unknown mechanisms may be involved.

ROS generation has been associated previously with inhibition of mitogen-stimulated human²³⁻²⁶ and mouse²⁷ lymphocyte proliferation, and some antioxidants have been shown to enhance mitogen-stimulated human B cell proliferation.^{26,28} Therefore, we hypothesized

that part of the upregulating effects of 5-HT and CA on mitogen-stimulated mouse B lymphocyte proliferation is due to their antioxidant activity. To this end, it was evaluated whether the amines could inhibit ROS generation in mouse spleen lymphocytes, and if they could protect the cells against oxidative injuries such as lipid peroxidation. In addition, the effect of the amines was studied in combination with other known and potent antioxidants including superoxide dismutase (SOD), catalase, mannitol, and taurine on LPS-stimulated B lymphocyte proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

BALB/c mice were purchased from Charles River (St-Constant, Qc) and housed in our animal facilities until use at the age of 8-12 weeks.

Reagents

All cultures media were purchased from Gibco (Burlington, ON). Lipopolysaccharide (LPS) (from *Escherichia coli*, serotype 0111:B4), serotonin hydrochloride, (\pm) Isoproterenol HCl, (\pm) Norepinephrine HCl, S-(-)-propranolol, SOD, mannitol and taurine were from Sigma (St. Louis, MO). L-Tryptophan, melatonin, 5-carboxamidotryptamine (5-CT), α methyl-5-hydroxytryptamine (α -CH₃-5-HT), and 8-hydroxy-2-di-*n*-propylamino-tetralin hydrobromide ((\pm)-8-OH-DPAT) were obtained from RBI (Natick, MA). Catalase was from Calbiochem (La Jolla, CA). Ferrous sulfate (FeSO₄), phorbol myristate acetate (PMA) and luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4 phtlazedine) were obtained from Sigma (St-Louis, MO). Stock solutions of PMA and luminol in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St-Louis, MO) at a concentration of 2 mg/ml, 10⁻² M and 10⁻² M, respectively, were prepared and stored in small aliquots at -80°C. Immediately prior to use, the stock solutions were diluted in PBS to give the desired concentration. Malondialdehyde bis(dimethylacetal) (MDA) was purchased from Aldrich chemical company Inc. (Milwaukee, WI), 2-thiobarbituric acid (TBA) from Sigma (St-Louis, MO), trichloroacetic acid (TCA) and chloridric acid (HCl) from VWR Canlab (Mont-Royal, Qc). The horseradish peroxidase (HRP) and H₂O₂ were obtained from Sigma (St-Louis, MO). [³H]thymidine ([³H]TdR) (specific activity 2 Ci/mmol) was purchased from DuPont NEN (Mississauga, ON). Drugs were dissolved in appropriate solvents and further diluted in RPMI 1640 just prior to use. Controls were made with solvent alone and were included in all experiments.

Preparation and culture of mouse spleen cells

Mouse spleens were aseptically removed and placed into cold Hank's balanced salt solution (HBSS). Cell suspensions were obtained by gentle teasing, and allowed to sediment for 2 min to remove large cell clumps and tissue debris. Cells were then washed three times by centrifugation at $250 \times g$ in HBSS and resuspended in RPMI 1640 medium without phenol red for chemiluminescence assay or in a culture medium consisting of RPMI 1640 medium supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), L-glutamate (2 mM), and 10% fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Logan, UT) for proliferation assay. Cell viability was assessed by trypan blue staining, and only non cytotoxic drug concentrations were used throughout this study.

B-lymphocytes proliferation assay

Lymphocytes were cultured at 37°C in an air/ CO_2 atmosphere in 96-well microtiter cultures plates (4×10^5 cells/well and a final culture volume of 200 μl) in a culture medium. 5-HT, ISO and antioxidants were added to the cell suspension together with lipopolysaccharide (LPS:10 $\mu\text{g/ml}$) for 72 hr. Cultures were pulsed with 1 μCi of [^3H]TdR for the last 6 hr of incubation, and cells were harvested onto glass fiber filters and washed and dried using a semi automatic cell harvester (Cambridge Technology, Watertown, MA). [^3H]TdR incorporation was measured by liquid scintillation counting (DuPont, NEN). Determination of [^3H]TdR uptake were made in triplicate wells and results were expressed as arithmetic means of counts per minute (cpm) \pm standard error (SE).

Chemiluminescence assay

The release of ROS during the respiratory burst was assessed by luminol-amplified chemiluminescence using a LKB Wallac 1251 luminometer combined with a micro-computer and a printer; maximal light emission (peak chemiluminescence) and time of peak chemiluminescence (t_{max}) were measured. The luminol interacts with the oxidizing species to produce larger and more measurable amounts of light at a peak wavelength of approximately

425 nm.

The spleen cells chemiluminescence assay was performed in a total volume of 1000 μl consisting of 500 μl cell suspension (3×10^6), 200 μl luminol (2×10^{-5} M, final concentration), 100 μl PMA (10^{-7} M) and 100 μl monoamines or others compounds at serial dilutions in phosphate buffered saline (PBS 1X). The total volume was adjusted to 1.0 ml with PBS. The reaction was started by addition of the cell suspension. The reaction was recorded in 4.0 ml cylindrical polystyrene cuvettes at 37°C under continuous mixing for at least 60 min in the *in vitro* study and the CL was expressed as millivolts²⁹.

The cell-free chemiluminescence assay was also carried out in a total test volume of 1000 μl containing 200 μl luminol (2×10^{-5} M), 100 μl peroxidase (4.8 mU) and 500 μl H_2O_2 (5×10^{-5} M). Monoamines or others compounds were added in 100 μl aliquots on a serial dilution in PBS 1X. The reaction was started by adding H_2O_2 as substrate.

Estimation of lipid peroxidation in cultured cells

Lymphocytes were cultured as described above but at a concentration of 4×10^6 cells/well and a total culture volume of 2 ml in 24-well culture plates. After 72 hours of culture, freshly prepared 10^{-4} M FeSO_4 solution was added to medium to stimulate lipid peroxidation. The lymphocytes exposed to FeSO_4 were maintained for 1 hr at 37°C in a humidified air containing 5 % CO_2 . After the incubation, the cells were removed, washed in phosphate buffer pH = 7, resuspended in the same buffer and homogenized briefly in sonifier cell disrupter (Plainview, L. I., N. Y) at speed setting 7. Relative levels of lipid peroxidation in cultured cells were quantified as thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) using the thiobarbituric acid test and the level of malondialdehyde (MDA) was used to represent the amount of lipid peroxides formed during incubation. The method used is described by Buege and Aust.^{30,31} Briefly, a small volume of homogenate (500 μl) was mixed with 1.5 ml of a solution of 13.5 % (w/v) trichloroacetic acid and 0.33 % (w/v)

thiobarbituric prepared in 0.884 N HCl. The complete mixture is heated on a boiling water bath at 100°C for 15 min and then cooled. A volume of 1 ml of TCA 70 % is then added to precipitate the proteins and the sample was centrifuged at 800 g for 10 min to remove any precipitate in the sample. Light absorbance in the supernatant was measured using a fluorescence spectrophotometer (LS-5, Perkin-Elmer, Canada) at 553 nm with 515 nm excitation. The MDA concentration can be determined directly by comparison against a standard curve obtained by reaction of known concentration of malondialdehyde. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard.³²

Statistical analyses

Difference between control and experimental groups was determined by ANOVA followed by Sidak's correction for post hoc comparisons. All data were represented as mean \pm SEM and the level of significance was accepted at $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of 5-HT and catecholamines on the H₂O₂-horseradish peroxidase system

The capacity of the peroxidase system to oxidize indolic and phenolic compounds has been known for many years, and a number of the oxidation products have been characterized. Previous studies indicated that monoamines compounds reacted with H₂O₂-peroxidase assay system. The effects of various compounds including 5-hydroxyindoles, non-hydroxylated indoles, hydroxylated non-indolic and catecholamines, are summarized in Fig. 1. We first determined the kinetic of the CL response in the H₂O₂-horseradish peroxidase system (Fig. 1B). CL appeared just after the addition of peroxidase, increased, reached a maximum and gradually decreased thereafter. These results show that indolic compounds possessing a hydroxyl group at C₅ position (5-HT, α -CH₃-5-HT) are good inhibitors of H₂O₂-peroxidase reaction exhibiting an IC₅₀ of approximately 4×10^{-8} M. Indolic compounds devoid of a nuclear substituted hydroxyl group (5-CT, melatonin, L-tryptophan) are relatively poor inhibitors of the peroxidase reaction. The hydroxylated non indolic compound 8-OH-DPAT, which is a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, is also inhibitory with an IC₅₀ of 3×10^{-7} M. The catecholamines NE and ISO are excellent inhibitors of H₂O₂-peroxidase reaction with IC₅₀ of approximately 3.5×10^{-8} and 4×10^{-8} M respectively (Fig. 1C).

Influence of 5-HT and catecholamines on the chemiluminescence signal produced by spleen cells

As shown in Fig. 2, the mouse spleen cells produced a rapid rise of chemiluminescence; the release of RLO occurred within minutes following application, as the CL signal reached a maximum after 2 min of stimulation by PMA and then declined gradually back to baseline levels during the next 60 min (Fig. 2A). Stimulation by LPS has no detectable effect on the CL response. The addition of 5-HT to mouse spleen cells

stimulated with PMA caused a dose-dependent inhibition of the luminol-enhanced CL with an IC_{50} of 10^{-4} M (Fig. 2B). 5-HT had no effect on mouse spleen cell CL in the absence of PMA (data not shown). The selective 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT mimicked the inhibitory effect of 5-HT on the mouse spleen cells, with an IC_{50} of $> 10^{-4}$ M. The maximally effective concentration was 10^{-4} M yielding about a 31 % suppression of the CL signal (Fig. 2B). Under the same conditions, 5-CT was much less active than 5-HT or 8-OH-DPAT to suppress the PMA-induced respiratory burst activity in spleen cells, with no effect at 10^{-4} M and only 22 % inhibition at 10^{-3} M (Fig. 2B). ISO showed also low inhibitory effects with only 28 % on the CL response even at its highest non cytotoxic concentration, 5×10^{-5} M.

In order to test whether the suppressed generation of light observed in the presence of 8-OH-DPAT or ISO was mediated through the specific stimulation of 5-HT_{1A} or β -adrenergic receptors (β -AR), we evaluated whether the non selective β_1 - and β_2 -adrenergic blocker propranolol, that is known to have high affinity for 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors, could antagonize CL suppression. Propranolol (10^{-5} M) was not able to block the suppressive effect of CL induced by 8-OH-DPAT nor by ISO (data not shown).

Effects of 5-HT and catecholamines on lipid peroxidation in cultured lymphocytes

The ability of monoamines to inhibit lipid peroxidation was tested in a system in which FeSO₄ was used as a trigger for lipid peroxidation. Lipid peroxidation was evaluated by measuring MDA with TBA technique. Fig. 3 shows that level of LPS-stimulated lipid peroxidation in splenic lymphocyte homogenates expressed as MDA levels, decreased significantly with 5-HT in the range of 10^{-5} - 5×10^{-4} M after 72 hr-culture (Fig. 3). The effective concentrations of 5-HT for reducing LPS-induced lipid peroxidation in culture were 10^{-5} - 5×10^{-4} M with a decrease from 9 % to 56 %. 8-OH-DPAT also inhibited the LPS-increased MDA levels as shown in Fig. 3, with a reduction in MDA levels from 22 % to 26 %. ISO, like 5-HT and 8-OH-DPAT, inhibited the LPS-induced lipid peroxidation with a

maximal protection (38 %) was seen at an ISO concentration of about 5×10^{-5} M.

To further evaluate the specificity of the decreasing effect of 5-HT, 8-OH-DPAT and ISO on lipid peroxidation, competition studies were performed with antagonists. As shown in Fig. 4, the non selective β_1 - and β_2 -adrenergic blocker propranolol (10^{-5} M) had no effect on 5-HT-, 8-OH-DPAT- or ISO-induced decrease in LPS-stimulated lipid peroxidation after 72 hr of culture.

Effects of monoamines and other antioxidants on lymphocyte proliferation

In order to investigate the contribution of the antioxidant properties of 5-HT and CA in the amplification of the B cell proliferative response, the proliferative assay was carried out in the presence of 5-HT or ISO in combination with four antioxidants, each with a completely different mode of action. These include SOD, catalase, mannitol or taurine which are scavengers of $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, HOCl respectively. When used individually, in the absence of monoamines, these antioxidants can enhance LPS-stimulated B cell proliferation in a dose-dependent manner (Fig. 5). The optimal concentrations were 150 U/ml, 1000 U/ml, 10^{-4} M, and 10^{-4} M for SOD, catalase, mannitol and taurine respectively. Combination of these optimal concentrations of antioxidants with 5-HT (10^{-4} M) or ISO (10^{-5} M) resulted in further increase in LPS-stimulated B cell proliferation (Fig. 6).

DISCUSSION

Increased ROS generation has been associated previously with inhibition of lymphocyte proliferation, and various antioxidants have been shown to reverse these inhibitory effects, including on mitogen-stimulated B lymphocytes.^{26,28} In addition, it has been shown that 5-HT can reverse the suppressive effects of monocytes on NK cell activity and proliferation, in part by inhibiting monocyte-derived ROS.¹⁷ This prompted us to search for a potential contribution of the antioxidant activities of 5-HT and CA in their previously documented upregulating effects on LPS-stimulated B lymphocyte proliferation.^{21,22} We first showed that 5-HT, NE, and ISO exert a free radical scavenging activity in a cell-free system using CL detection, with similar IC_{50} values of about 10^{-8} M. The same amines dose-dependently inhibited the CL response of mouse spleen cells stimulated by PMA, as well as lipid peroxidation in spleen cell cultures stimulated by LPS, and the IC_{50} values in both cases were about 10^{-4} M or above. These results indicate that 5-HT and CA cause a reduction in ROD formation in on mitogen-stimulated mouse B cells, which is much lower than its antioxidant activity in a cell-free system, with about 4-log difference in the IC_{50} values of the amines between the cell-free and the cell culture systems.

The relatively high IC_{50} values of 5-HT and CA for inhibition of the CL response and inhibition of lipid peroxidation of mitogen-stimulated spleen cells are well in agreement with those found with these amines in other cell systems, including rat PBL¹⁶, human PMN^{33,12}, human PBMC¹², and rat microglia¹³. The low sensitivity of the CL response of various cell systems to inhibition by monoamines can be explained by the lower rate of ROS generation in these systems, as compared to cell-free systems. This is particularly valid for mitogen-stimulated B lymphocytes whose ROS generating capacity was found to be 10 times lower than that of the cell-free system as detected by CL in this study. Another possibility is that monoamines can be taken up by lymphocytes, so that the actual concentrations available for scavenging ROS released in the extracellular medium are lower than expected. Indeed,

murine splenocytes possess a specific, active, and high affinity uptake mechanism for 5-HT³³, and human lymphocytes also express a high affinity transport system for several monoamines, including 5-HT and CA^{35,36}.

The IC₅₀ values of 5-HT and ISO for inhibition of spleen cell oxidative metabolism as shown here are at least 10 times higher than their corresponding EC₅₀ values for enhancement of mitogen-stimulated B cell proliferation as shown previously.^{21,22} Therefore, the antioxidant activity of monoamines does not correlate well with their mitogenic effects on mouse B cells. Also, the relatively selective 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT, which increases efficiently LPS-stimulated B lymphocyte proliferation with an EC₅₀ of 10⁻⁵ M, has little antioxidant activity with an IC₅₀ value above 10⁻⁴ M on mitogen-stimulated spleen cells, which is higher than that of 5-HT. Again, this argues against a major role for the antioxidant activity of this 5-HT_{1A} agonist in its increasing effect on B cell proliferation.

The inhibitory effects of 5-HT, 8-OH-DPAT and ISO on spleen cell CL response and on lipid peroxidation appear to be independent from 5-HT_{1A} and β₁/β₂-adrenergic receptors, respectively since propranolol pretreatment has no influence on these effects. Although other undetermined receptors could be involved, it is more likely that the antioxidant effect of these drugs on spleen cell cultures is due to their ROS scavenging property as demonstrated in the cell-free system. This is consistent with the results of Vial et al.¹⁶ showing that neither 5-HT_{1A}, nor 5-HT₂, or 5-HT₃ receptors were involved in inhibition of activated rat PBL CL response by 5-HT. No receptor specificity was demonstrated in the inhibitory effect of 5-HT on human monocyte CL response.¹⁷

Although 5-HT and CA released in lymphoid organs and/or at inflammatory sites may provide a significant antioxidant protection to activated lymphocytes, this property may play only a minor role in enhancement of cell proliferation. The present findings further support the notion that increases of B cell proliferation by 5-HT and CA is mediated

essentially by specific interactions of these amines with lymphocyte 5-HT_{1A}^{21,37} and β₂-adrenergic receptors²², respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Medical Research Council (MRC) of Canada Grant MT-13259.

K.I. is a recipient of student fellowship from the government of Morocco and from the Université de Montréal.

REFERENCES

- [1] Ames, B. N.; Shigenaga, M. K. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7915-7922; 1993.
- [2] Maly, F. E. The B lymphocyte: A newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Rad. Res. Comm.* **8**:143-148; 1990.
- [3] Maly, F. E.; Nakamura, M.; Gauchat, J. F.; Urwyler, A.; Walker, C.; Dahinden, C. A.; Cross, A. R.; Jones, O. T.; De Weck, A. L. Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b₂₄₅ components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *J. Immunol.* **142**:1260-1267; 1989.
- [4] Maly, F. E.; Cross, A.; Jones, O. T. G.; Wolf-Vorberck, G.; Walker, C.; Dahinden, C. A.; De Weck, A. L. The superoxide generating system of B cell lines: Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. *J. Immunol.* **140**:2334-2339; 1988.
- [5] Hancock, J. T.; Henderson, L. M.; Jones, O. T. Superoxide generation by EBV-transformed B lymphocytes. Activation by IL-1 β , TNF- α and receptor independent stimuli. *Immunology* **71**:213-217; 1990.
- [6] Leca, G.; Benichou, G.; Bensussan A.; Mitenne, F.; Galanaud, P.; Vazquez, A. Respiratory burst in human B lymphocytes: Triggering of surface Ig receptors induces modulation of chemiluminescence signal. *J. Immunol.* **146**:3542-3549; 1991.
- [7] Josefsson, E.; Bergquist, J.; Ekman, R.; Tarkowski, A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* **88**:140-146; 1996.
- [8] Felten, D. L.; Felten, S. Y.; Bellinger, D. L.; Carlson, S. L.; Ackerman, K. D.; Madden, K. S.; Olschowka, J. A.; Livnat, S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system : Structure and function. *Immunol. Rev.* **100**:225-260; 1987.
- [9] Konttinen, Y. T.; Kempinen, P.; Segerberg, M. Peripheral and spinal neural mechanism

in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthr. Rheum.* **37**:965-982; 1994.

[10] Pletscher, A. The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int. J. Cardiol.* **14**:177-188; 1987.

[11] Huether, G; Reimer, A.; Schmidt, F.; Schuff-Werner, P.; Brudny, M. M. Oxidation of the indole nucleus of 5-hydroxytryptamine and formation of dimers in the presence of peroxidase and H₂O₂. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* **32**:249-257; 1990.

[12] Schuff-Werner, P.; Splettstosser, W.; Schmidt, F.; Huether, G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of human mononuclear and polymorphonuclear phagocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* **25**:477-484; 1995.

[13] Huether, G.; Fettkotter, I.; Keilhoff, G.; Wolf, G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of activated microglia. *J. Neurochem.* **69**:2096-2101; 1997.

[14] Liu, J.; Mori, A. Monoamine metabolism provides an antioxydant defense in the brain against oxidant- and free radical-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**:118-127; 1993.

[15] Cohen, G. The pathobiology of Parkinson's disease: biochemical aspects of dopamine neuron senescence. *J. Neural. Transm. Suppl.* **19**:89-103; 1983.

[16] Vial, T.; Tedone, R.; Patriarca, C.; Descotes, J. Effect of serotonin on the chemiluminescence response of rat peripheral blood leukocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**:813-819; 1995.

[17] Hellstrand, K.; Dahlgren, C.; Hermodsson, S. Serotonergic regulation of natural killer cells: a minireview. In: Vanhoutte, P. M.; Saxena, P. R.; Paoletti, R.; Brunello, N.; Jackson, A. S., eds. *Serotonin from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers and Fondazione Giovanni Lorenzini; 1993:345-351.

[18]. Conlon, P. D.; Ogunbiyi, P. O.; Black, W. D.; Eyre, P. β -adrenergic receptor

function and oxygen radical production in bovine pulmonary alveolar macrophages. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **66**:1538-1541; 1988.

[19] Henricks, P. A. J.; Van Esch, B.; Nijkamp, F. P. Beta-agonists can depress oxidative metabolism of alveolar macrophages. *Agents and Action.* **19**:353-354; 1986.

[20] Schopf, R. E.; Lemmel, E. M. Control of the production of oxygen intermediates of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes by beta adrenergic receptors. *J. Immunopharmacol.* **5**:203-216; 1983.

[21] Iken, K.; Chheng, S.; Fargin, A.; Goulet, A. C.; Kouassi, E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. *Cell. Immunol.* **163**:1-9; 1995.

[22] Kouassi, E.; Li, Y. S.; Boukhris, W.; Millet, I.; Revillard, J. P. Opposite effects of the catecholamines dopamine and norepinephrine on murine polyclonal B-cell activation. *Immunopharmacology* **16**:125-137; 1988.

[23] Huang, H. C.; Chang, J. H.; Tung, S. F.; Wu, R. T.; Foegh, M. L.; Chu, S. H. Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *Eur. J. Pharmacol.* **211**:359-364; 1992.

[24] Madhavi, N.; Das, U. N.; Prabha, P. S.; Kumar, G. S.; Koratkar, R.; Sagar, P. S. Suppression of human T-cell growth *in vitro* by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Prostag. Leukotr. & Ess. Fatty Acids* **51**:33-40; 1994.

[25] Freed, B. M.; Rapoport, R. Inhibition of early events in the human T-lymphocyte response to mitogens and alloantigens by hydrogen peroxide. *Arch. Surg.* **122**:99-104; 1987.

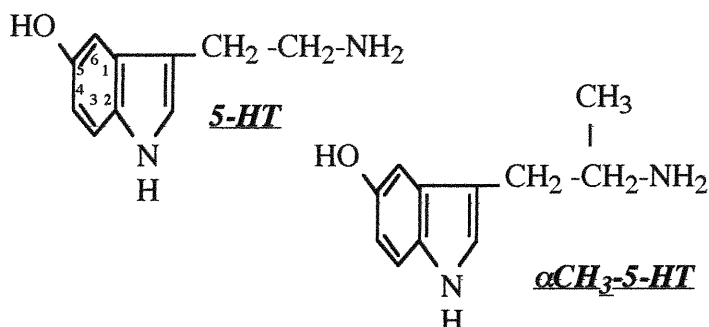
[26] Morikawa, K.; Morikawa, S. Immunomodulatory effect of recombinant human superoxide dismutase (SOD) on human B lymphocyte function *in vitro*. *Cell. Immunol.* **172**:70-76; 1996.

- [27] Metzger, Z.; Hoffeld, J. T.; Oppenheim, J. J. Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* **124**:983-988; 1980.
- [28] Whitacre, C. M.; Cathcart, M. K. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens. *Cell. Immunol.* **144**:287-295; 1992.
- [29] Kouassi, E.; Hmama, Z.; Lina, G.; Vial, J.; Faure-Barba, F.; Normier, G.; Binz, H.; Revillard, J.-P.. Activation of human monocyte chemiluminescence response by acylpoly(1,3)galactosides derived from *Klebsiella pneumoniae*. *J Leukoc Biol.* **52**: 529-536; 1992.
- [30] Esterbauer, H; Cheesman, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* **186**:407-421; 1990.
- [31] Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **52C**: 302-310; 1978.
- [32] Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254; 1976.
- [33] Nannmark, U.; Sennerby, L.; Bjursten, L. M.; Skolnik, G.; Bagge, U. Inhibition of leukocytes phagocytosis by serotonin and its possible role in tumor cell destruction. *Cancer Lett.* **62**:83-86; 1992.
- [34] Jackson, J. C.; Walker, R. F.; Brooks, W. H.; Roszman, T. L. Specific uptake of serotonin by murine macrophages. *Life Sci.* **42**:1641-1650; 1988.
- [35] Faraj, B. A.; Olkowski, Z. L.; Jackson, R. T. Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **16**:561-567; 1994.
- [36] Mossner R., Daniel S., Schmitt A., Albert D., Lesch K. P. Modulation of serotonin transporter function by interleukin-4. *Life Sci.* **68**:873-880; 2001.

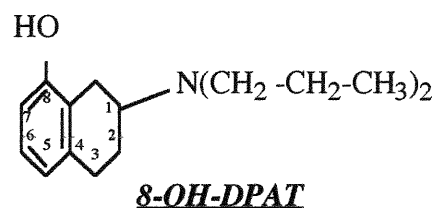
[37] Abdouh M., Storing J. M, Riad M., Paquette Y., Albert P. R., Drobetsky E., Kouassi E. Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in activated B and T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **276**:4382-4388; 2001.

A

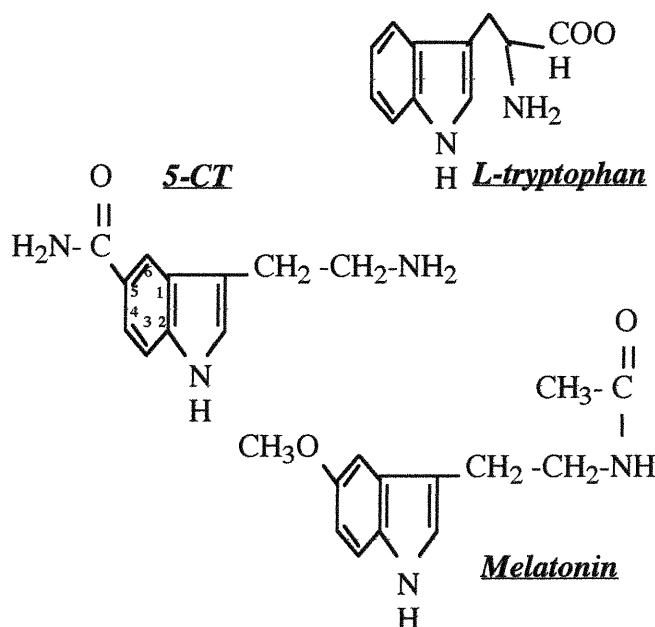
Indolic compounds with a hydroxyl group at C₅



Hydroxylated non indolic compounds



Indolic compounds without a hydroxyl group at C₅



Catecholamines

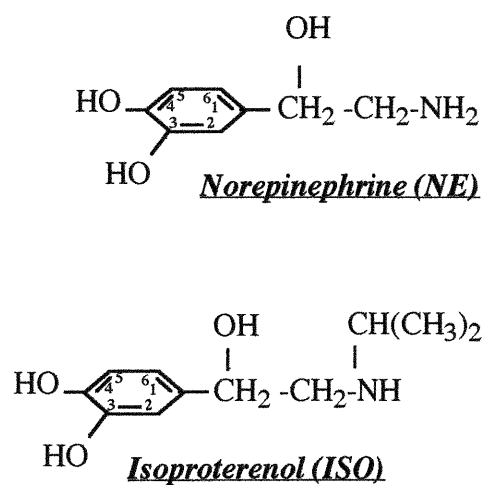
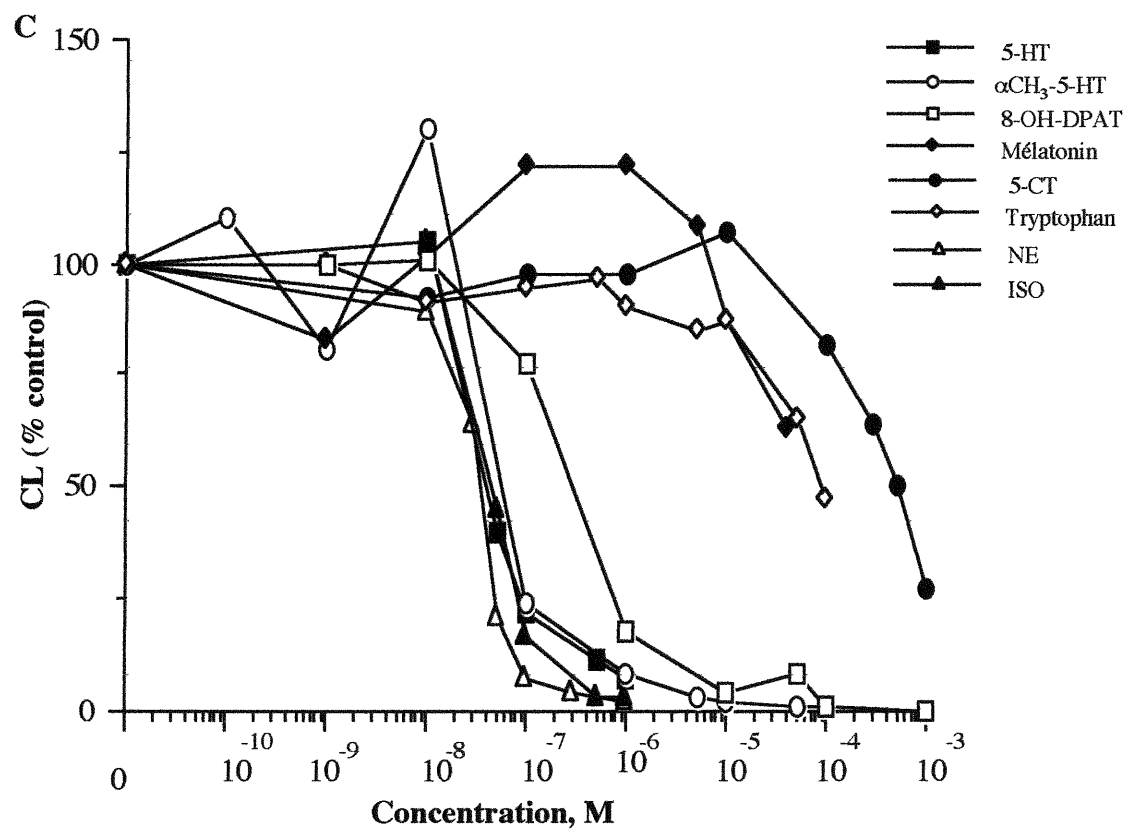
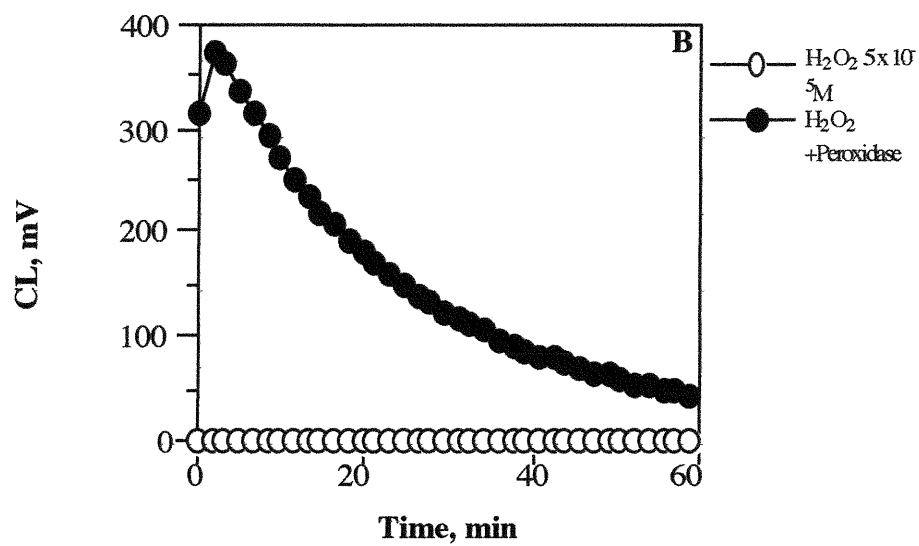


Fig. 1: (A) Chemical structures of the compounds are shown for 5-HT, α CH₃-5-HT, 8-OH-DPAT, 5-CT, L-tryptophan, Melatonin, ISO and NE). (B) Effects of various compounds on luminol-enhanced chemiluminescence in the horseradish peroxidase-H₂O₂ system. (C) Time course of chemiluminescence intensity in the horseradish peroxidase-H₂O₂ system. The cell free assay was started by the addition of H₂O₂ as substrate. Data show the results of one representative experiment out of 3 to 6 experiments.



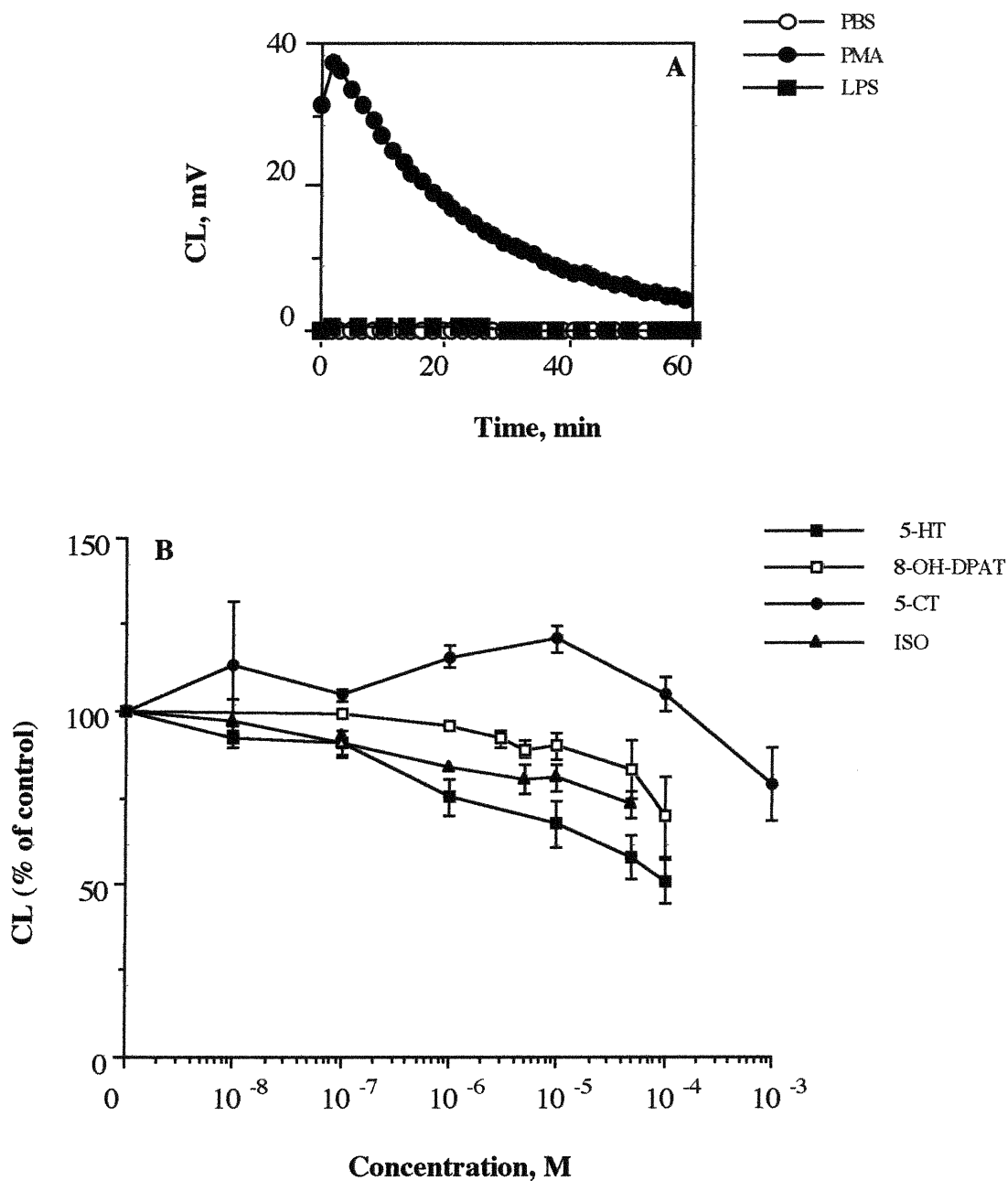


Fig. 2: (A) Influence of different concentrations of monoamines and related compounds on luminol-enhanced chemiluminescence during the respiratory burst of spleen cells. The respiratory burst was elicited by the addition of PMA. (B) Time course of chemiluminescence intensity from B lymphocytes stimulated with PMA. Data show the results of 3 experiments.

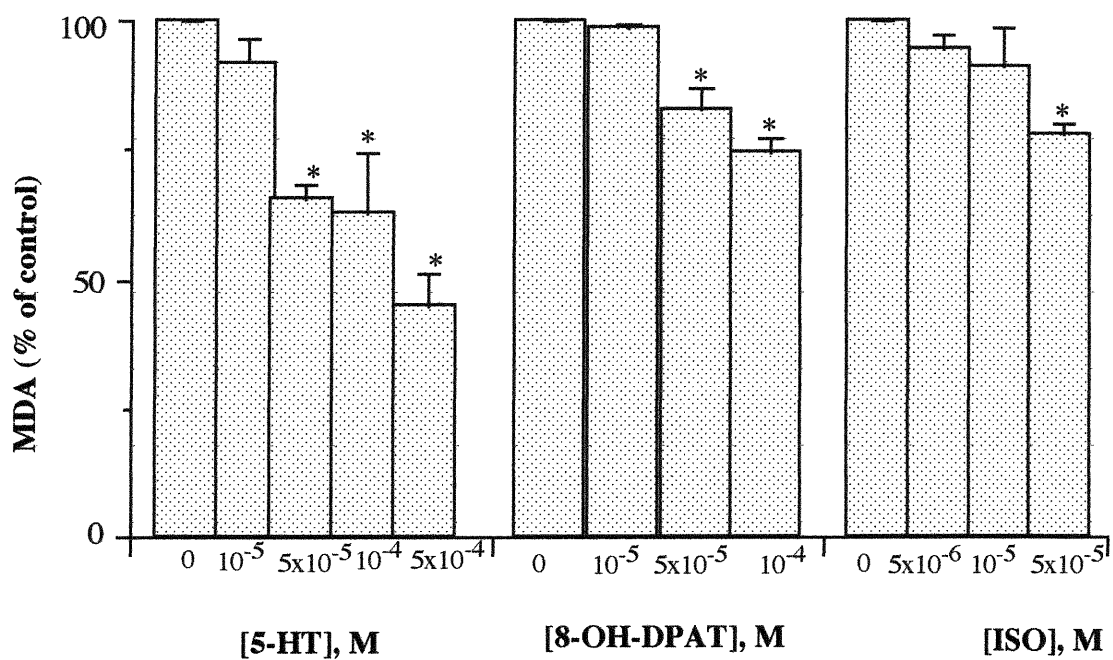


Fig. 3: Effects of increasing concentrations of 5-HT, 8-OH-DPAT and ISO on LPS-induced lipid peroxidation in cultured spleen cell homogenates. Values are means \pm SEM of duplicate determinations from 3 to 5 experiments. Difference between control and experimental groups was determined by ANOVA followed by Sidak's correction for post hoc comparisons. All data were represented as mean \pm SEM and the level of significance was accepted at $p < 0.05$.

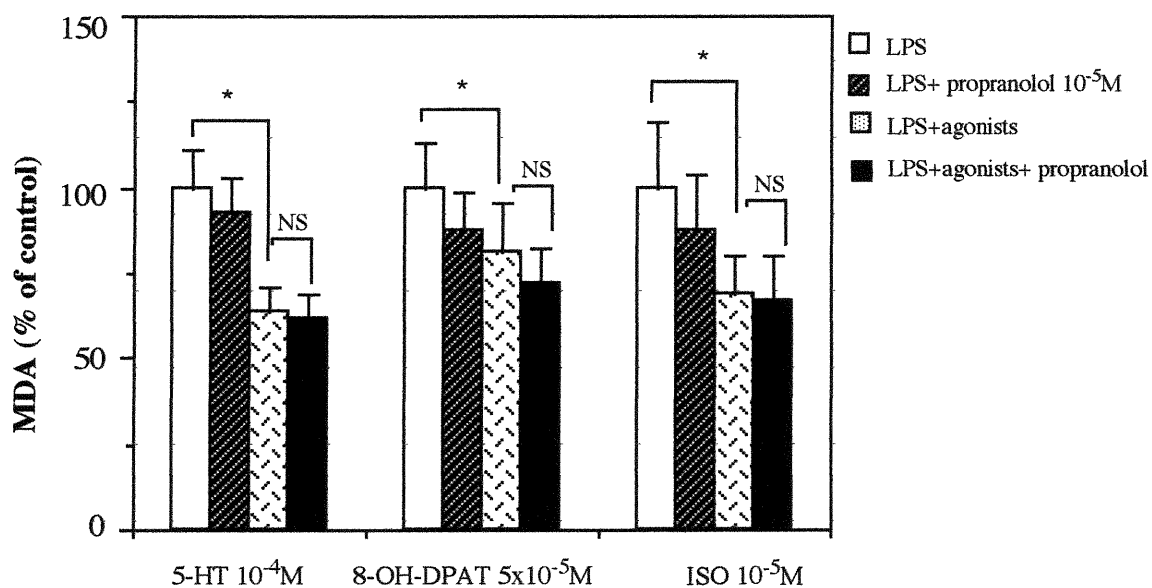


Fig. 4: Effects of propranolol on 5-HT-, 8-OH-DPAT-, or ISO-induced decrease in lipid peroxidation in mouse spleen cells homogenates. Values are means \pm SEM of triplicate determinations from 3 to 9 experiments. Difference between control and experimental groups was determined by ANOVA followed by Sidak's correction for post hoc comparisons. * $p < 0.05$ LPS+agonists vs LPS alone. NS (not significant) LPS+agonists +propranolol vs LPS+propranolol.

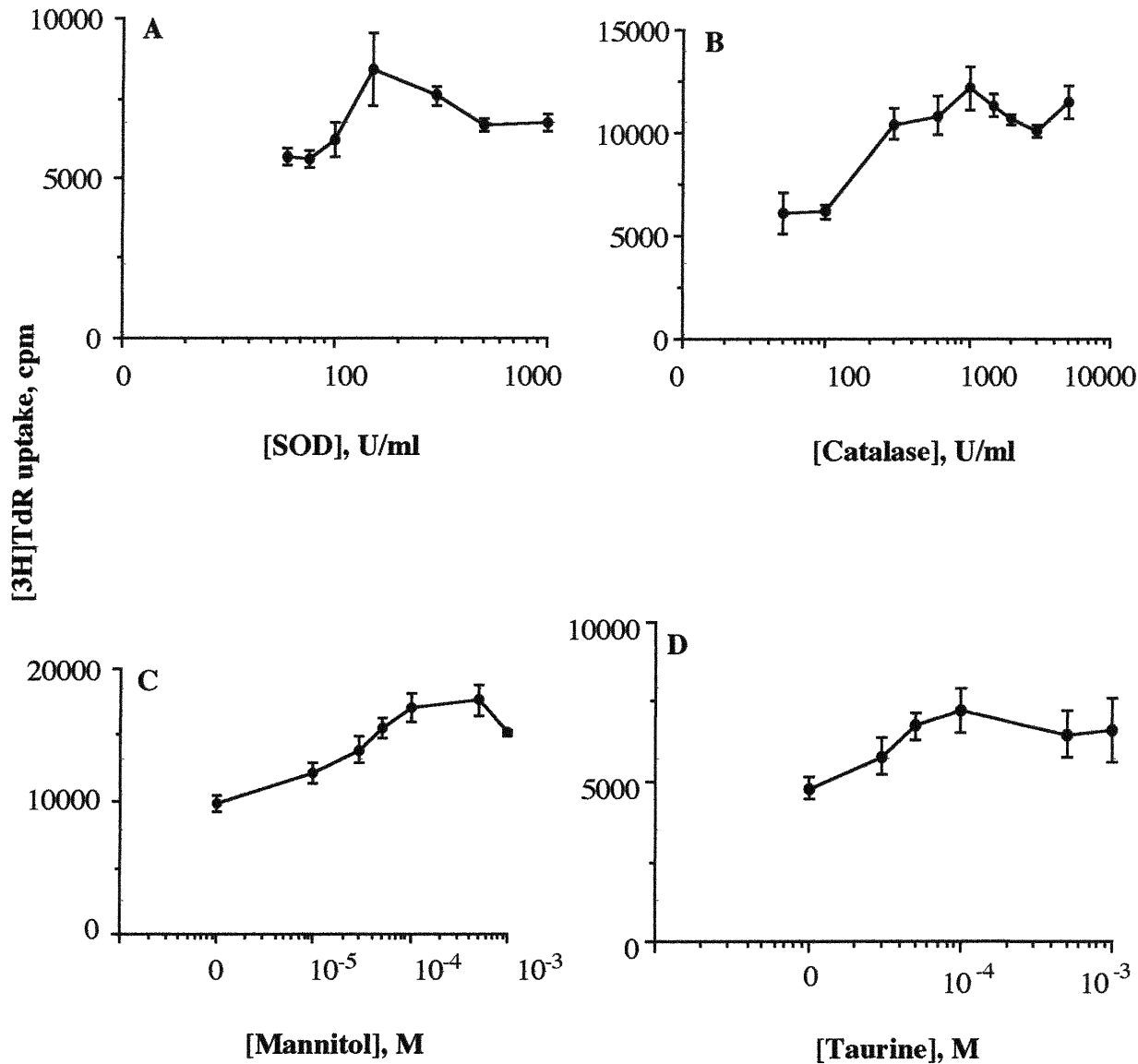


Fig. 5: Effects of SOD (A), catalase (B) mannitol (C) or taurine (D) on mouse spleen cell proliferation. Mouse spleen cells were incubated for 72 hr with increasing concentrations of SOD, catalase, mannitol or taurine in the presence of LPS ($10\mu\text{g}/\text{ml}$), and proliferation was measured by $[^3\text{H}]\text{TdR}$ uptake during the last 6 hr of culture. Difference between control and experimental groups was determined by ANOVA followed by Sidak's correction for post hoc comparisons. Results are means of $\text{cpm} \pm \text{SEM}$ of triplicate wells.

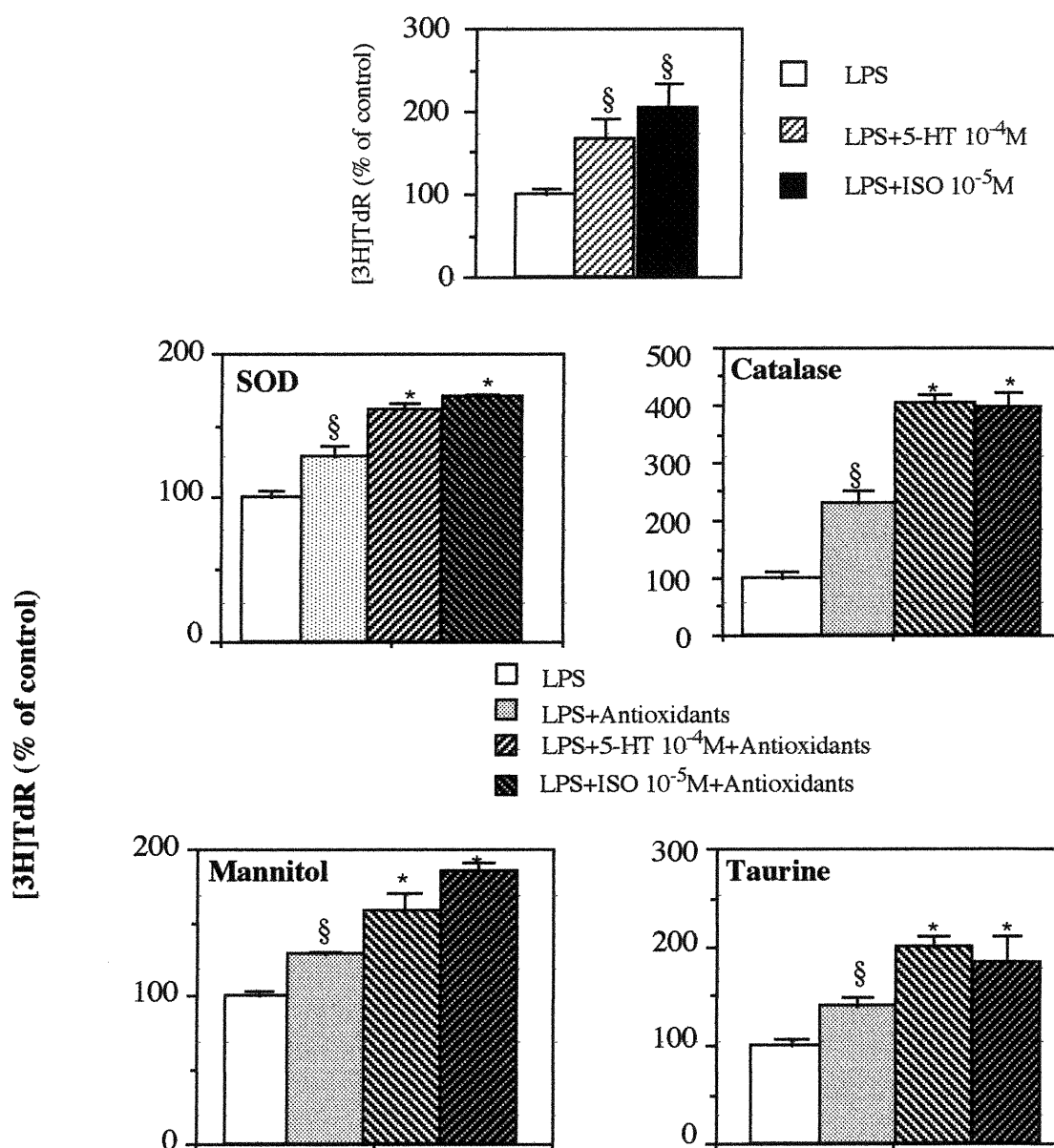


Fig. 6: Effects of combinations of monoamines and SOD (150 U/ml), catalase (1000 U/ml) mannitol (10^{-4} M) or taurine (5×10^{-5} M) on LPS-induced mouse spleen cell proliferation. Mouse spleen cells were incubated for 72 hr in the presence of LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) with combination of monoamines and SOD, catalase, mannitol or taurine. Proliferation was measured by [^3H]TdR uptake during the last 6 hr of culture. Results are means of cpm \pm SEM of triplicate wells. Difference between control and experimental groups was determined by ANOVA followed by Sidak's correction for post hoc comparisons. $\S p < 0.05$ LPS+ amines or antioxidants vs LPS. $* p < 0.05$ LPS+ amines +antioxidants vs LPS+antioxidants.

TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION ET CONCLUSION

CHAPITRE 4. DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons entrepris ce projet de recherche dans le but de mieux comprendre et de mieux caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la régulation de la réponse immunitaire par les monoamines, sérotonine et catécholamines. Nous avons alors décidé de comparer les effets *in vitro* de la 5-HT et des CA et d'élucider leurs mécanismes d'action sur la prolifération des lymphocytes B. Des travaux antérieurs avaient montré que les CA augmentent la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. Cet effet implique des récepteurs β_2 -adrénergiques (Li et coll., 1990; Kouassi et coll., 1988). Il était donc important d'évaluer, dans un premier temps, le rôle de la sérotonine dans la prolifération des lymphocytes B stimulés par le lipopolysaccharide. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé les récepteurs impliqués dans ces effets. Nous avons par la suite étudié l'interaction de la 5-HT et des CA avec le métabolisme oxydatif des lymphocytes B ainsi que leurs effets sur la peroxydation lipidique, conséquence majeure des effets néfastes des dérivés oxygénés. Finalement, nous avons étudié l'association entre les propriétés mitogéniques des monoamines et leurs propriétés anti-oxydantes sur la prolifération des lymphocytes B. Les résultats de ces travaux sont discutés ci-dessous.

1- SÉROTONINE: FACTEUR DE CROISSANCE POUR LES LYMPHOCYTES B DE SOURIS

1.1. Effets de la 5-HT sur la réponse proliférative induite par le LPS dans les lymphocytes B

La 5-HT et les CA sont des amines biogènes libérées par le SNC et intervenant dans de nombreuses fonctions cérébrales. Des déficits en 5-HT et les CA sont associés à diverses affections psychiatriques et neurologiques comme les dépressions, l'anxiété, les démences, la maladie de Parkinson et la schizophrénie. Les monoamines et leurs récepteurs représentent

alors la cible de nombreux médicaments pour traiter ces pathologies. En dehors du cerveau, ces amines jouent le rôle d'effecteurs pour une variété de systèmes et particulièrement pour le système immunitaire. Des études récentes ont montré que les monoamines sont synthétisées par les lymphocytes et sont capables de réguler différents aspects de la réponse immunitaire. Elles jouent le rôle de mitogène dans une variété de types cellulaires et représentent une nouvelle classe de facteurs de croissance interagissant avec des récepteurs couplés aux protéines G (Kelleher et coll., 1995; Lee et coll., 1994; Corson et coll., 1992; Meloche et coll., 1992; Varrault et coll., 1992; Parrot et coll., 1991; Nemecek et coll., 1986; Seuwen et coll., 1988).

Au niveau immunitaire, l'activité mitogénique de la 5-HT a été observée uniquement dans les lymphocytes T humains (Aune et coll., 1993) et dans les cellules NK humaines (Hellstrand et coll., 1993), mais son effet sur les lymphocytes B n'était pas connu avant les études présentées ici. Ces derniers expriment à leur surface des immunoglobulines de membrane (mIg) qui sont les récepteurs à l'antigène. L'agrégation ou le pontage de ces récepteurs par les antigènes multivalents ou des anticorps anti-mIg déclenche une séquence d'événements qui caractérisent le processus d'activation, lequel conduit à l'entrée des cellules en phase G₁ du cycle cellulaire. D'autres agents, tels que des antigènes bactériens (LPS) sont capables de déclencher une activation polyclonale des lymphocytes B. Généralement, la progression des cellules dans le cycle cellulaire et leur prolifération nécessitent un second signal. Celui-ci peut prendre la forme d'une interaction avec des lymphocytes T et/ou avec des facteurs de croissance tels que les interleukines. Dans le cas du LPS, l'activation des lymphocytes B se fait indépendamment des lymphocytes T. Nos résultats montrent pour la première fois que la 5-HT induit un effet amplificateur de la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS, et joue ainsi le rôle d'un nouveau facteur de croissance pour ces cellules. La 5-HT seule n'affecte pas l'incorporation de ³HTdR dans ces cellules.

Afin de déterminer sur quelle phase du cycle cellulaire la 5-HT exerce son effet

amplificateur sur la réponse proliférative des lymphocytes B, les phases G₀/G₁, la phase S et la phase G₂/M ont été évaluées par cytométrie en flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP). Ce dernier est un colorant qui se fixe sélectivement sur l'ADN et permet de déterminer le pourcentage de cellules en phase G₀/G₁, les cellules en phase S et les cellules en phase G₂/M du cycle cellulaire. Nos résultats montrent que la 5-HT stimule le passage des cellules B de la phase G₁ à la phase S entraînant ainsi une augmentation de la proportion des lymphocytes B blastiques induite par le LPS. Quand les cellules sont incubées en présence du LPS et de la 5-HT, on n'observe pas de modification de l'incorporation de ³HTdR à 48 h de culture, alors que la réponse proliférative au LPS est augmentée à 72 h. Ces résultats montrent que la 5-HT maintient de façon importante et soutenue dans le temps la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. De ce fait, l'effet amplificateur de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS est reproduit de façon concordante avec les deux approches méthodologiques différentes et concerne la phase de synthèse d'ADN dans les cellules B.

1.2. Caractérisation des récepteurs responsables des effets de la sérotonine sur la prolifération des lymphocytes B de souris

La 5-HT est également stockée au niveau des tissus périphériques dans les mastocytes (chez les rongeurs uniquement), les plaquettes et les cellules entérochromaffines de l'intestin, dans les monocytes et dans les lymphocytes. De grandes quantités de 5-HT sont présentes au niveau des organes lymphoïdes et aux sites de l'inflammation, témoins d'une dégranulation locale des mastocytes et d'une libération lors de l'agrégation des plaquettes. De plus, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ et 5-HT₇ ont été identifiés sur les cellules du SI (Mössner et Lesch, 1998; Meyniel et coll., 1997; Aune et coll., 1993; Shen et coll., 1993; Sternberg et coll., 1987). Cependant, les effets prolifératifs de la 5-HT sur les lymphocytes T et NK humains semblent être attribués uniquement au récepteur 5-HT_{1A} (Ferriere et coll., 1996; Aune et coll., 1993; Hellstrand et coll., 1993).

Nous nous sommes intéressés alors au rôle de ce récepteur dans les effets amplificateurs de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B. Nos études à l'aide d'agents pharmacologiques sélectifs montrent que la sérotonine augmente la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. De plus, le 8-OH-DPAT, un agoniste sélectif 5-HT_{1A}, reproduit les effets de la 5-HT sur l'incorporation de ³HTdR et sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Dans les mêmes conditions, la 5-carboxamidotryptamine (5-CT), un agoniste 5-HT₁ non sélectif, a peu d'effet sur la réponse proliférative au LPS. Nos études de compétition avec le WAY 100135, un antagoniste sélectif 5-HT_{1A}, et le propranolol, un antagoniste β_1/β_2 non sélectif et qui a une grande affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A/1B}, montrent que ces deux antagonistes sont capables de bloquer, mais de façon partielle, les effets amplificateurs de la 5-HT et du 8-OH-DPAT. Un antagoniste sélectif 5-HT₂, la kétansérine, n'inhibe pas les effets amplificateurs de la 5-HT et du 8-OH-DPAT sur la prolifération des cellules B stimulées par le LPS. De plus, les études de liaison montrent que le [³H]8-OH-DPAT se lie à des sites spécifiques sur les lymphocytes B stimulés par le LPS.

Le récepteur 5-HT₇ a été cloné et identifié dans la rate de rat et chez l'humain, mais à des niveaux plus faibles que dans le cerveau. Sa présence a été démontrée spécifiquement sur les lymphocytes B (Mössner et Lesch, 1997, Shen et coll., 1993). La particularité de ce récepteur est de partager l'activité agoniste du 8-OH-DPAT avec le récepteur 5-HT_{1A} et de nombreux antagonistes avec le récepteur 5-HT₂ (Boess et Martin, 1994). Cependant, d'autres résultats dans notre laboratoire ont montré que le R-8-OH-DPAT, un agoniste sélectif 5-HT_{1A}, reproduit les effets amplificateurs de la 5-HT sur la prolifération des cellules B et T (Abdouh et coll., 2001). Aussi bien le R-8-OH-DPAT que le WAY100135 ne semblent avoir d'affinité pour 5-HT₇. L'ensemble de nos résultats montre que des récepteurs fonctionnels 5-HT_{1A} sont présents sur les lymphocytes B stimulés par le LPS et sont impliqués dans les effets amplificateurs de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. Nos résultats sont comparables à ceux sur les lymphocytes T humains (Aune et coll., 1993) et les cellules NK humaines (Hellstrand et coll., 1993).

L'équipe de Ferriere a montré des effets inhibiteurs de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B de truite stimulés par le LPS (Ferriere et coll., 1996). Cette immunosuppression implique le récepteur 5-HT_{1A} caractérisé partiellement et de façon pharmacologique sur ces cellules. Ces résultats sont à l'opposé de nos observations sur les lymphocytes B de souris. Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par une différence d'espèce (souris vs truite), de source des lymphocytes (rate vs sang périphérique), ainsi que de conditions de culture.

Nos études de compétition avec le NAN-190 (antagoniste 5-HT_{1A}) et la kétansérine (antagoniste 5-HT_{2A}) montrent que dans les conditions expérimentales utilisées, ces deux antagonistes induisent à eux seuls une augmentation de la prolifération des cellules B stimulées par le LPS, et se comportent ainsi comme des agonistes partiels. Ces deux produits sont donc de peu d'utilité comme antagonistes dans notre modèle. Le NAN-190 est un analogue arylpipérazine qui démontre des propriétés antagonistes sur le récepteur 5-HT_{1A} dans des systèmes d'AC stimulée par la forskoline *in vitro* dans des membranes de l'hippocampe (Glenon et coll., 1989; 1988; Yocca et coll., 1987). Il bloque également les modifications de comportement induites par le 8-OH-DPAT chez des rats traités avec la réserpine (Hjorth et Sharp, 1990). Ces études démontrent des propriétés antagonistes de NAN-190 au niveau des récepteurs 5-HT_{1A} post-synaptiques. Cependant, Hjorth et Sharp (1990) ont décrit une réduction de la relâche de la 5-HT par le NAN-190 dans l'hippocampe suggérant un effet agoniste au niveau des autorécepteurs pré-synaptiques situés dans les neurones sérotoninergiques du noyau dorsal de raphé. Ces effets agonistes ont été observés également dans des études de liaison avec des radioligands testant les effets des nucléotides guanyliques (Rydelek-Fitzgerold et coll., 1990). Dans notre système, les mécanismes qui sont responsables de l'activité intrinsèque du NAN-190, et celle de la kétansérine sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS restent à préciser. Comme la nature exacte des récepteurs de la 5-HT sur les cellules immunitaires reste encore très controversée, il est possible que dans notre cas, un récepteur 5-HT non encore identifié soit impliqué dans

les effets amplificateurs et synergiques observés avec le NAN-190 et la kétansérine.

2. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA STIMULATION MITOGÉNIQUE PAR LA SÉROTONINE

2.1. La mobilisation du calcium et l'inhibition de l'adénylate cyclase ne jouent pas de rôle dans les effets amplificateurs de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B

La régulation de la prolifération est assurée par un grand nombre de signaux cellulaires. L'interaction de certains facteurs de croissance avec leurs récepteurs respectifs déclenche une cascade d'événements intracellulaires qui conduit à la formation de seconds messagers. La 5-HT fait partie d'un groupe endogène de facteurs de croissance qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G. Dans certains cas, la 5-HT seule peut suffire pour induire la croissance cellulaire, alors que dans d'autres cas, elle agit de façon synergique avec d'autres facteurs de croissance qui stimulent des récepteurs possédant un domaine tyrosine kinases (Varrault et coll., 1992; Seuwen et coll., 1988). Les effets amplificateurs de la 5-HT sur les lymphocytes B pourraient s'expliquer d'une part, par un recrutement d'un nombre important de cellules B ne répondant pas au LPS, bien que cette hypothèse soit peu probable car la 5-HT seule n'affecte pas la prolifération des lymphocytes B. D'autre part, elle induit un effet synergique sur la réponse proliférative du LPS. Il en résulte donc que la 5-HT pourrait agir sur des blastes B et donc à un stade tardif du cycle cellulaire situé entre la phase G_1 tardive et la phase S.

Nous nous sommes par la suite intéressés à déterminer les signaux du récepteur 5-HT_{1A} dans les lymphocytes B et les mécanismes responsables des effets prolifératifs de la 5-HT sur les cellules B stimulés par le LPS. Le récepteur 5-HT_{1A} est d'un intérêt particulier à cause de ses multiples systèmes effecteurs et de son implication dans les processus de la

croissance cellulaire. Classiquement, les agonistes 5-HT_{1A} inhibent l'activation de l'AC, signal commun à tous les récepteurs 5-HT₁ (De Vivo et Maayani, 1986) et ouvrent des canaux potassiques (Andrade et coll., 1986). Ils peuvent également stimuler l'AC et inhiber la PLC activée par le carbachol dans l'hippocampe (Shenker et coll., 1985). Finalement, la stimulation de ces récepteurs inhibent les courants calciques dans les neurones dorsaux de raphé. Les expériences de transfection ont révélé que ces récepteurs peuvent être couplés à différents systèmes: inhibition de l'AC, stimulation de la PLC et de l'activité ATPase Na⁺/K⁺ (Liu et Albert, 1991; Fargin et coll., 1989). Plusieurs signaux ont été associés aux effets mitogéniques de la 5-HT sur les différents types cellulaires incluant la mobilisation du Ca²⁺ (Abdel-baset et coll., 1992), des PTK (Lee et coll., 1994), des MAPK (Kelleher et coll., 1995; Meloche et coll., 1992), et l'inhibition de l'AC (Aune et coll., 1993).

Depuis longtemps, l'AMPc était considéré comme un important régulateur de la prolifération cellulaire. Il existe des récepteurs stimulateurs et des récepteurs inhibiteurs de la production d'AMPc qui sont couplés à l'adénylate cyclase (AC) par l'intermédiaire de protéines G spécifiques, G_s pour les stimulateurs, G_i pour les inhibiteurs. À l'intérieur de la cellule, l'AMPc agit en activant la protéine kinase A (PKA). Cette dernière comporte deux sous-unités, une sous-unité catalytique et une sous-unité de régulation. L'AMPc en se fixant sur la sous-unité régulatrice provoque la dissociation de ce complexe, la sous-unité catalytique libre pouvant alors phosphoryler des protéines spécifiques. Dans plusieurs types cellulaires, l'augmentation d'AMPc en réponse à différents mitogènes coïncide avec la synthèse d'ADN. Cependant, une exposition continue de certaines cellules à cette augmentation engendre une inhibition des processus de la division cellulaire (Giasson et coll., 1997; Dumont et coll., 1989; Pastan et coll., 1975). Ainsi, les effets de l'AMPc dépendent du stade de différenciation et du type cellulaire. En revanche, quelque soit son effet, sa capacité de réguler l'activité de différentes kinases est bien établie (Giasson et coll., 1997). De plus, l'AMPc peut directement réguler un grand nombre de gènes de transcription (Dumont et coll., 1989).

Un lien direct entre le récepteur 5-HT_{1A} et la cascade d'événements aboutissant à la croissance cellulaire n'est pas encore déterminé dans les cellules transfectées ou exprimant le récepteur naturellement. En effet, Abdel-Baset et coll. (1992) ont transfecté des fibroblastes BALB/c-3T3 avec le récepteur 5-HT_{1A} de rat et ont montré que la 5-HT induit une augmentation de l'incorporation de ³HTdR. Un traitement prolongé des cultures cellulaires induit une transformation phénotypique et la formation de "foci" dans les cellules transfectées. Ces effets sont sensibles à la toxine pertussique (PTX) et sont attribués à l'activation de la PLC-PI (Abdel-Baset et coll., 1992). Un autre groupe a montré que le récepteur 5-HT_{1A} exprimé dans les cellules NIH-3T3 induit la formation de "foci", stimule faiblement la synthèse d'ADN, mais potentialise celle induite par l'EGF (epidermal growth factor) (Varrault et coll., 1992). Ces effets sont sensibles à la PTX et ne semblent pas impliquer la voie de la PLC ni l'inhibition de l'AC.

Deux systèmes de signalisation ont été identifiés pour le récepteur 5-HT_{1A} dans les cellules immunitaires. Dans la lignée T humaine Jurkat, ce récepteur induit une stimulation de la PLC, alors que dans les lymphocytes T humains, il est couplé de façon négative à l'AC. Ce dernier signal serait responsable de la prolifération des lymphocytes T humains (Aune et coll., 1993; 1990). Cependant, des études réalisées sur des fibroblastes ont montré que ni l'inhibition de l'AC ni l'hydrolyse des IP ne peuvent expliquer les effets prolifératifs de la 5-HT sur ces cellules (Varrault et coll., 1992; Seuwen et coll., 1988). Dans notre système, le récepteur 5-HT_{1A} n'induit pas de mobilisation de Ca²⁺ intracellulaire mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'une sonde fluorescente, la fluo-3 (annexe 1, figure 1). D'autre part, nos résultats avec l'AMPc montrent que la 5-HT n'induit pas une baisse significative des taux d'AMPc stimulés par la forskoline dans les cellules fraîches ni dans les blastes LPS (annexe 1, tableau1).

Nous suggérons que la régulation de l'AC par le récepteur 5-HT_{1A} pourrait dépendre du taux cellulaire et du type de cette enzyme; on en dénombre 9 types distincts (Hurley,

1999). Par ailleurs, il a été montré que le récepteur 5-HT_{1A} inhibe l'AC via les protéines Gi α ₃ et Gi α ₂ (Raymond et coll., 1993; Fargin et coll., 1991) dans les cellules HeLa et CHO, Gi α ₂ étant plus importante dans les cellules CHO. Cette différence dans l'importance relative de Gi α ₂ et Gi α ₃ est probablement influencée par l'abondance des sous-unités α dans les cellules HeLa et CHO. Dans les premières, Gi α ₃ est plus fortement exprimée que Gi α ₂, alors que dans les cellules CHO, il y a 9 fois plus de Gi α ₂ que de Gi α ₃ (Raymond et coll., 1993). Dans notre système, les résultats suggèrent que le récepteur 5-HT_{1A} n'est pas couplé à l'inhibition de l'AC; il est aussi probable que les protéines Gi α ₂ et Gi α ₃ ne soient pas exprimées en quantité suffisante pour induire une inhibition de l'AC. D'autres études sont nécessaires pour élucider le couplage de cette voie au récepteur 5-HT_{1A} et son implication dans les effets mitogéniques de la 5-HT sur les lymphocytes B.

Il est possible, bien que nous n'ayons pas la preuve directe, que d'autres signaux intracellulaires soient responsables des effets prolifératifs de la 5-HT. Ainsi, les canaux ioniques constituent aussi une cible potentielle de choix. Ces protéines transmembranaires ont généralement un large domaine extracellulaire aisément accessible aux composés chimiques et qui ont montré leur rôle dans la signalisation mitogénique, particulièrement celle des lymphocytes B. Les flux ioniques forment un chaînon important de certaines voies de signalisation intracellulaire impliquées dans les fonctions et la prolifération des lymphocytes. Le rôle et les propriétés des flux ioniques ont été principalement étudiés lors des phases d'activation et de prolifération. Il semble que leur intervention est déterminante lors des événements précoces d'activation qui suivent la stimulation des récepteurs à l'antigène ainsi que le passage des lymphocytes à travers la phase G du cycle cellulaire (Dubois et Rouzère-Dubois., 1993; Lewis et Cahalan, 1995). En effet, le blockage des canaux potassiques et calciques, inhibe l'activation des lymphocytes en réponse à l'antigène (Lewis et Cahalan, 1995)

Le récepteur 5-HT₃ a été identifié et caractérisé sur les lymphocytes T de la truite. Ce

récepteur est couplé à une conductance sodique et il est responsable des effets de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes T stimulés par la PHA (Meyniel et coll., 1997). Des études antérieures ont montré que la 5-HT a un effet biphasique sur la conductance potassique. Cette dernière est augmentée après stimulation de récepteurs de type 5-HT₁ partiellement caractérisé, dans une lignée cellulaire pré-B murine (Choquet et Korn, 1988), alors que l'accélération de son inactivation implique des récepteurs 5-HT₃. De plus, Amigorena et coll., ont montré l'importance de ces canaux K⁺ dans la progression des lymphocytes B murines durant le cycle cellulaire. Ces auteurs ont montré, d'une part, que le LPS augmente la densité des canaux K⁺ sensibles au voltage sur les lymphocytes B et, d'autre part, que l'inhibition de ces canaux bloque la prolifération des cellules en phase G₁ (Amigorena et coll., 1990). Une hypothèse est que la 5-HT amplifie la prolifération des cellules B stimulées par le LPS en provoquant une augmentation d'une conductance potassique et donc une ouverture des canaux potassiques des lymphocytes B. Des études évaluant si la 5-HT active ces canaux dans les lymphocytes B pourraient permettre d'élucider les voies de signalisation impliquées dans l'action de la 5-HT sur la prolifération des cellules B.

En plus des différentes voies mitogéniques mentionnées plus haut, un autre mécanisme peut également être opérationnel. Cette voie implique l'activation des PTK. En effet, plusieurs évidences ont suggéré que les PTK jouent un rôle dans la réponse proliférative des agonistes des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, des inhibiteurs sélectifs des tyrosines kinases peuvent bloquer la synthèse d'ADN induite par les facteurs de croissance tels que la thrombine (Weiss et Nuccitelli, 1992), l'endotheline (Simonson et Herman, 1993) et la bombésine (Seckl et Rozengurt, 1993). La stimulation de l'activité tyrosine kinase et l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines par la 5-HT ont été montrées par l'équipe de Lee (1994). Ces derniers ont montré que la 5-HT augmente la prolifération des cellules du muscle lisse bovin mesurée par incorporation de ³HTdR. Cependant, cet effet est indépendant des récepteurs à la 5-HT et se fait par internalisation de la 5-HT via un phénomène de transport (captation). En effet, l'inhibition de ce dernier par

des antidépresseurs bloque l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ dans ces cellules. Par ailleurs, la genistine, inhibiteur sélectif des PTK renverse les effets stimulateurs de la 5-HT sur la prolifération des cellules musculaires. L'ensemble de ces résultats suggère que la captation de la 5-HT stimule la prolifération. Cette internalisation activerait des PTK non encore identifiées qui vont initier l'expression des gènes et par la suite la prolifération cellulaire.

Plusieurs groupes ont montré que le récepteur 5-HT_{1A} active la voie des MAP kinases et ils ont identifié un grand nombre de molécules de signalisation impliquées dans cette voie (Garnovskaya et coll., 1996). De plus, plusieurs études ont suggéré que les MAPK peuvent jouer un rôle dans la prolifération cellulaire (Bhunja et coll., 1994; Meloche et coll., 1992). Ces dernières sont une famille de kinases cytosoliques serine/thréonine de 40-46 KDa qui participent à la transduction des signaux mitogéniques au noyau. Elles occupent une position centrale dans la régulation de la transition G_0/G_1 dans le cycle cellulaire. Leur activation est très rapide et peut être stimulée par des récepteurs tyrosine kinases et par des récepteurs couplés aux protéines G (Meloche et coll., 1992). Ainsi, ces auteurs ont démontré une activation de la $pp44^{\text{mapk}}$ après quelques minutes d'exposition à la 5-HT dans des cellules de muscle lisse bovin (trachée), alors que la phase tardive d'activation de ces kinases n'est pas affectée. De plus, la kétansérine, un antagoniste 5-HT_2 , inhibe de 70% l'effet de 5-HT sur la phase précoce d'activation des MAPKinases, ce qui suggère l'implication du récepteur 5-HT_2 . Cependant, ce signal ne semble pas être responsable des effets mitogéniques de la 5-HT dans ces mêmes cellules. En effet, cette équipe a montré que l'activation mitogénique des fibroblastes CCL39 dépend de l'activation soutenue des MAPK qui semble être un événement obligatoire pour la progression dans le cycle cellulaire induit par les facteurs de croissance. Il est donc possible que l'une ou la combinaison de ces différentes voies de signalisation soit impliquée dans les effets prolifératifs de la 5-HT dans les lymphocytes B.

Une partie des travaux futurs consisterait à évaluer de façon directe ces différents

voies de signalisation et leurs implications dans les processus prolifératifs induits par la 5-HT dans les lymphocytes de souris stimulés par le LPS.

2.2. Implication des propriétés anti-oxydantes de la 5-HT et des CA dans leurs effets prolifératifs sur les lymphocytes B

Récemment, une explosion de travaux a révélé que les DO tels que O_2^\bullet , OH^\bullet et H_2O_2 joueraient un rôle dans la régulation négative des processus de prolifération cellulaire (Pahlavani et Haris, 1998; Morikawa et Morikawa, 1996; Huang et coll., 1992; Sagone et coll., 1984; Metzger et coll., 1980). Ainsi, une des hypothèse que nous avons formulé est que l'action de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B de souris stimulés par le LPS se fait par une abolition des effets supresseurs des DO. En effet, l'action de la 5-HT est maximale lorsque l'incorporation de 3HTdR induite par le LPS est entrain de décroître probablement en raison de la présence de ces facteurs supresseurs dans les cultures cellulaires contenant des polymorphonucléaires, des macrophages et des lymphocytes stimulés par le LPS. Ces facteurs supresseurs seraient surtout le fruit des macrophages et de leurs produits de sécrétion. En effet, une étude a montré que la diminution de la prolifération des lymphocytes T en absence de 5-HT est un phénomène qui dépend des macrophages (Young et Matthews, 1995; Young et coll., 1993). Ainsi, la prolifération des cellules T de souris pré-traitées avec le PCPA, un inhibiteur de la synthèse de la 5-HT, est rétablie en présence de macrophages provenant de souris non traitées. L'incapacité des macrophages traités au PCPA à augmenter l'incorporation de 3HTdR serait due à leur déficience en 5-HT. Les mécanismes par lesquels la 5-HT favorise les effets des macrophages restent, cependant, mal connus. Deux hypothèses ont été envisagées par ces auteurs. La première est que les macrophages dépendent complètement de la 5-HT pour induire leur fonction accessoire. L'autre possibilité est que la 5-HT renverse certains effets supresseurs induits pas les macrophages (Young et Matthews, 1995; Young et coll., 1993). Cette dernière hypothèse est renforcée par une autre étude démontrant que la 5-HT renverse

les effets supresseurs induits par les monocytes sur la prolifération des lymphocytes NK humains (Hellstrand et coll., 1993).

2.2.1. La 5-HT et les CA inhibent le métabolisme oxydatif des lymphocytes B

Les DO sont des médiateurs importants dans la lutte antibactérienne mais peuvent aussi diminuer la prolifération cellulaire en induisant des phénomènes de peroxydation lipidique. Des études antérieures avaient montré que la 5-HT et les CA possèdent des propriétés anti-oxydantes en piégeant les DO. Nous avons étudié l'interaction des monoamines avec les DO dans les cellules spléniques de souris stimulées par le LPS et son rôle dans les effets amplificateurs de la prolifération par la 5-HT. Nous avons montré que la 5-HT et les CA inhibent la chimiluminescence dépendante du luminol dans les cellules spléniques, avec des IC_{50} supérieures ou égales à $10^{-4}M$ ($100\mu M$). Bien que ces IC_{50} soient élevées, nos résultats sont comparables à ceux d'autres équipes qui ont observé une diminution de la CL à des concentrations de l'ordre de 10^{-5} - $10^{-4}M$ (10 - $100\mu M$) dans plusieurs types cellulaires (Huether et coll., 1997; Schuff-Werner et coll., 1995; Vial et coll., 1995; Nannmark et coll., 1992).

La question qui se pose est donc de savoir si les concentrations des monoamines *in vivo* peuvent atteindre les niveaux suffisants pour inhiber le stress oxydatif? La 5-HT est stockée dans les plaquettes par un mécanisme de transport actif. Elle est présente dans les mastocytes murins et dans les cellules entérochromaffines surtout au niveau de l'estomac et de l'intestin. Elle est aussi synthétisée par les lymphocytes humains et les monocytes (Laberge et coll., 1996). Elle est présente en concentrations élevées dans les sites inflammatoires et les réactions immunitaires lors de l'agrégation plaquettaire au site de lésion tissulaire (Betten et coll., 2001). La libération locale de la 5-HT à partir des plaquettes est aussi stimulée par les réactions immunologiques humorales, par les phagocytes activés et par les endotoxines bactériennes (Davis et coll., 1961). Ainsi des concentrations de l'ordre de

10^{-4} M (100 μ M), comparables à celles qui diminuent la CL dans les cellules B, peuvent être atteintes dans les sites inflammatoires à partir de thrombocytes activées (Benedict et coll., 1986). De telles concentrations sont suffisantes pour atténuer les dommages induits par les DO durant le métabolisme oxydatif des lymphocytes B. De la même façon, les terminaisons nerveuses noradrénergiques innervant les organes lymphoïdes sont en mesure de fournir des concentrations élevées en CA ($> 10^{-6}$ M) (1 μ M) (Felten et coll., 1998), qui sont susceptibles de piéger les DO *in vivo*.

Il est bien établi que la 5-HT régule la réponse immunitaire par l'intermédiaire de récepteurs différents, fonctionnels et présents sur les cellules du SI. À l'aide de différents agents pharmacologiques, nous avons caractérisé les récepteurs impliqués dans l'effet de la 5-HT sur le métabolisme oxydatif des lymphocytes B. Le 8-OH-DPAT est capable d'inhiber la CL, mais son effet est plus faible en comparaison avec celui de la 5-HT. Par ailleurs, les études réalisées avec le propranolol montrent que ce dernier est incapable de renverser la suppression de la CL induite par la 5-HT ou l'ISO. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la CL par les monoamines n'implique pas de récepteurs spécifiques. Les résultats préliminaires de l'équipe de Vial ont montré aussi que les antagonistes SDZ216-525 (antagoniste 5-HT_{1A}), methitepin (antagoniste 5-HT₁/5-HT₂), kétansérine (antagoniste 5-HT₂ sélectif) ou le granisetron (antagoniste 5-HT₃ sélectif), à des concentrations de l'ordre de 0.1-10 μ M n'affectent pas l'inhibition de la CL par la 5-HT dans des leucocytes de rat stimulés par le zymosan (Vial et coll., 1995). Il en résulte que les monoamines inhibent probablement la CL par interaction directe avec les DO. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons étudié l'action des monoamines sur la CL en utilisant un système acellulaire peroxydase/H₂O₂ (HRP/H₂O₂). Dans ce modèle, la 5-HT et les CA sont capables de supprimer la CL de façon dépendante de la dose et avec la même puissance. Ces résultats montrent que les monoamines jouent le rôle de piègeur de DO et par conséquent de protecteur contre les dommages induits par ces derniers. Le 8-OH-DPAT est capable aussi de reproduire les effets inhibiteurs de la 5-HT sur la CL dans le système HRP/H₂O₂. Ceci

confère un nouveau rôle pour cet agoniste comme piègeur de DO. Cependant, la mélatonine (*N*-acetyl-5-métoxytryptamine), indole non hydroxylé, est dépourvue d'activité anti-oxydante dans notre système ce qui suggère que la présence du groupement hydroxyl serait responsable de cette interaction de la 5-HT avec les DO.

Plusieurs publications ont porté sur l'oxydation de la 5-HT, mais la nature chimique des produits de dégradation, leur rôle possible et leurs implications pathologiques sont peu connus. L'équipe de Schuff-Werner a identifié et caractérisé le produit majeur de l'oxydation de la 5-HT à l'aide de la spectrométrie de masse. Ce métabolite correspond à une oxydation de la 5-HT en un dimère 5-HT dont la structure probable est le 5, 5'-dihydroxy-4,4'-bitryptamine (DHBT). Il a été aussi identifié lors du métabolisme oxydatif des monocytes/granulocytes humains activés et de la microglie (Huether et coll., 1997; Schuff-Werner et coll., 1995). Même si nos études ne déterminent pas le métabolite formé au cours de l'oxydation de 5-HT, il est possible que la 5-HT agit de la même façon pour piéger les DO dans les lymphocytes B en formant des dimères 5-HT. Ainsi, son activité anti-oxydante pourrait réduire les effets néfastes des DO sur les cellules B.

2.2.2. La 5-HT et les CA inhibent la peroxydation lipidique dans les lymphocytes B

Les phospholipides membranaires constituent une cible préférentielle des dommages oxydatifs par la présence d'acides gras polyinsaturés susceptibles à la peroxydation lipidique. Il en résulte des changements drastiques dans la fluidité et la perméabilité membranaires. La capacité des monoamines 5-HT et CA à inhiber la peroxydation lipidique a été testée dans un système avec FeSO₄ connu pour accélérer la peroxydation lipidique et le taux de MDA est mesuré par la méthode du TBA avec lequel il forme un composé rose. Nos résultats démontrent que la 5-HT et l'ISO inhibent les taux de MDA dans les cultures cellulaires stimulées par le LPS. Ces résultats renforcent et sont concordants avec ceux de la CL. Des études antérieures ont rapporté aussi une inhibition de la peroxydation lipidique par les

monoamines dans d'autres systèmes. En effet, la 5-HT inhibe la peroxydation lipidique dans les microsomes de foie, des liposomes et dans des préparations micellaires d'acide arachidonique (Reyftman et coll., 1990). Elle est aussi capable de maintenir des taux faibles en MDA dans des cellules C64 suite à une exposition au glutamate. Elle jouerait ainsi un rôle protecteur contre la mort cellulaire induite par ce dernier (Shinagawa, 1994).

On a montré que les monoamines dopa, dopamine, adrénaline et 5-HT, en piégeant les radicaux peroxydes (ROO^{*}), inhibent la peroxydation lipidique induite par AAPH (générateur de radicaux peroxydes) chez le rat (Miura et coll., 1996). Finalement, dans des homogénats de cerveau et de mitochondries, les CA et la 5-HT protègent contre la peroxydation lipidique induite par les ions cuivriques (Liu et coll., 1993). Il en résulte donc que les monoamines constituent un groupe d'inhibiteurs endogènes qui agissent comme piègeurs des DO. Nos études avec le 8-OH-DPAT montrent qu'il est capable de reproduire mais à un degré plus faible, les effets inhibiteurs de 5-HT et de ISO sur les taux du MDA. Cependant, le propranolol est incapable de renverser les effets supprimeurs sur la peroxydation lipidique. L'ensemble de ces résultats montre que la peroxydation lipidique comme la chimiluminescence est un phénomène indépendant des récepteurs et se fait par piégeage de DO par les monoamines. Ainsi, en plus de leur rôle de neurotransmetteur, les amines pourraient avoir un rôle d'anti-oxydants endogènes au niveau central et périphérique par inhibition des mécanismes d'initiation des réactions radicalaires en neutralisant les DO déjà formés et arrêtant ainsi les chaînes de propagation.

2.2.3. Rôle des propriétés anti-oxydantes des monoamines dans l'augmentation de la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS

Les DO sont considérés comme des agents destructeurs qui vont endommager différentes cibles biologiques. En effet, ils ont montré *in vitro* leur capacité d'induire des changements de la structure de l'ADN ou de moduler l'activité des gènes interférant ainsi

avec les processus mitogéniques en particulier au niveau du SI. Cependant, à ces effets néfastes s'oppose une défense anti-oxydante telles que les enzymes détoxifiantes. En effet, il est montré que la catalase rétablit la prolifération lymphocytaire qui est inhibée en présence de H_2O_2 (Metzger et coll., 1980) ou d'émodin, une anthraquinone (Huang et coll., 1992). Par ailleurs, Hellstrand et coll. (1993) ont montré que la 5-HT renverse les effets supprimeurs induits par les monocytes sur les cellules NK. Les effets de la 5-HT sont reproduits par la catalase, responsable de la dismutation de H_2O_2 en oxygène et en eau. De ce fait, la 5-HT pourrait agir en inhibant la formation des DO générés par les monocytes durant le métabolisme oxydatif.

Les monoamines peuvent atteindre dans des conditions pathologiques (inflammation, ischémie, thrombose) des concentrations élevées dans certaines régions du cerveau et en périphérie (Mössner et Lesch., 1998; Benedict et coll., 1986). Ceci est l'une des raisons, sinon la plus importante, pour considérer ces composés comme des anti-oxydants efficaces. Nous avons émis l'hypothèse que la 5-HT et les CA favorisent l'amplification de la prolifération des lymphocytes B en piégeant les DO. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons alors comparé les effets de la 5-HT et de l'ISO à ceux d'autres anti-oxydants connus sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. Nos résultats montrent que la SOD, la catalase, le mannitol et la taurine qui sont des anti-oxydants très puissants sont capables d'augmenter de façon dépendante de la dose la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. Ceci suggère donc que les DO sont impliqués dans la régulation négative de la prolifération des lymphocytes B. Il a été montré que la prolifération et la différenciation des lymphocytes B humains augmentent en présence de SOD (Morikawa et Morikawa, 1996). D'autre part, l'incubation des lymphocytes humains stimulés par le PWM en présence de la catalase augmente aussi leur prolifération (Whitacre et Cathcart, 1992). Par la suite, nous avons incubé les cellules en présence des monoamines et des anti-oxydants. Dans ces conditions, les monoamines continuent d'augmenter la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS.

L'ensemble de nos travaux suggère que l'activité mitogénique des monoamines pourrait résulter en partie de leurs activités anti-oxydantes et d'autre part, de leurs interactions avec leurs récepteurs respectifs 5-HT_{1A} et β_2 AR. Cependant, les activités anti-oxydantes des monoamines jouent probablement un rôle relativement mineur dans leurs effets mitogéniques pour les raisons suivantes: (i) les concentrations de monoamines qui entraînent des effets anti-oxydants *in vitro* sont environ 10 fois supérieures à celles qui amplifient la prolifération des cellules B; (ii) l'agoniste relativement sélectif 5-HT_{1A}, le 8-OH-DPAT possède une activité anti-oxydante relativement faible par rapport à la 5-HT, alors qu'il est aussi efficace que cette dernière pour augmenter la prolifération des cellules B; et (iii) la combinaison des monoamines ou du 8-OH-DPAT avec d'autres anti-oxydants puissants n'empêche pas les effets amplificateurs des premiers sur la prolifération cellulaire.

2.3. Modèle hypothétique des mécanismes de régulation de la prolifération des lymphocytes par la 5-HT et les CA

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail de thèse permet de proposer un modèle d'action de la sérotonine sur la prolifération des lymphocytes B (figure 5). Dans le modèle illustré ci-dessous, on remarque que la 5-HT agirait selon deux voies. La 5-HT d'origine centrale, captée et libérée par les terminaisons noradrénergiques comme co-transmetteur avec la NA, ou d'origine périphérique, stockée dans les plaquettes ou synthétisée par les cellules du système immunitaire, va agir par l'intermédiaire de son récepteur 5-HT_{1A} présent sur les lymphocytes B. Cette action de la 5-HT sur son récepteur 5-HT_{1A} va déclencher une cascade d'événements biochimiques dont la résultante est l'activation d'effecteurs intracellulaires et par conséquent, la formation de seconds messagers qui restent encore non identifiés.

Par ailleurs, la 5-HT présente dans le milieu extracellulaire en fortes concentrations

est capable de piéger les DO produits par les suspensions cellulaires mixtes (polynucléaires, macrophages et lymphocytes B stimulés par LPS), et diminuer ainsi leurs effets néfastes sur les lymphocytes B. De plus, la 5-HT pourrait être internalisée à l'intérieur des lymphocytes B par l'intermédiaire d'un transporteur dont la caractérisation sur ces cellules reste encore indéterminée. Une fois à l'intérieur de la cellule, la 5-HT grâce à ses propriétés anti-oxydantes va atténuer les concentrations des DO et inhiber leurs dommages aux cellules. Nos résultats montrent que la chimiluminescence et la peroxydation lipidique sont des phénomènes indépendants du récepteur 5-HT_{1A} et se font par interaction directe de la 5-HT avec les DO formant probablement des dimères 5-HT. Cette action anti-oxydante de la 5-HT favoriserait la prolifération des lymphocytes B.

Des mécanismes semblables sont valables pour les CA qui amplifient aussi la prolifération des cellules B. Ainsi, l'implication des récepteurs β_2 -adrénergiques exprimés sur les lymphocytes B et une certaine contribution du piégeage des DO seraient responsables des effets prolifératifs. Il est important de noter que dans le cas de la 5-HT, comme dans celui des CA, les interactions spécifiques avec les récepteurs 5-HT_{1A} et β_2 -adrénergiques respectifs exprimés sur les cellules B représentent leur principal mécanisme d'action dans les effets mitogéniques, tandis que le piégeage des DO, bien que présent, ne joue qu'un rôle secondaire.

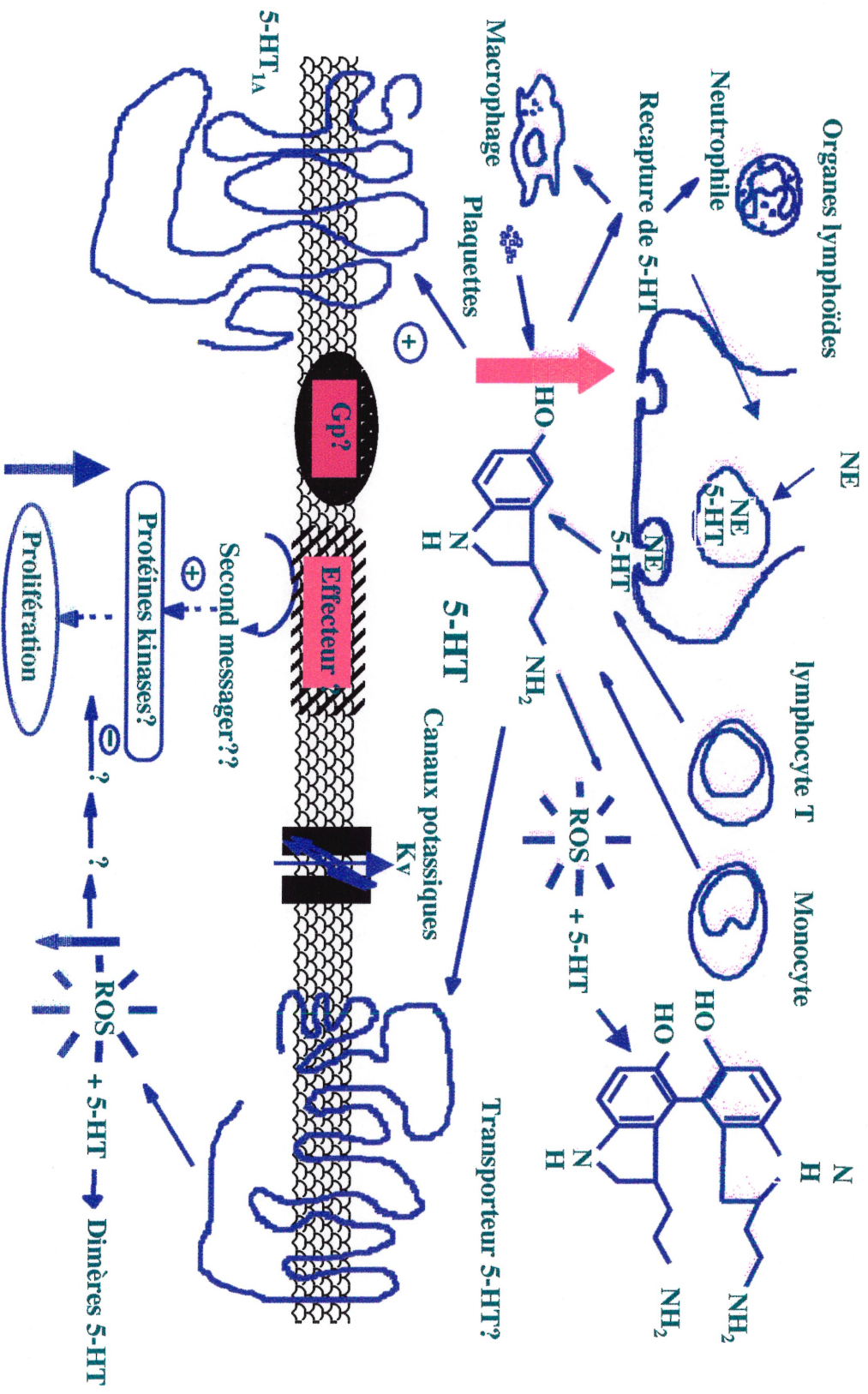


Figure 6: Modèle hypothétique des mécanismes de régulation de la prolifération des lymphocytes B par la sérotonine

CHAPITRE 5. CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nos travaux ont porté sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la régulation de la prolifération des lymphocytes B par la sérotonine. Nos résultats démontrent que la sérotonine régule de façon positive la prolifération des lymphocytes B de souris et de rat stimulés par le lipopolysaccharide d'*E. coli* et joue ainsi le rôle d'un nouveau co-facteur de croissance pour ces cellules. Dans notre modèle, à l'aide des études opérationnelles avec des agonistes et antagonistes sélectifs et des études de liaison avec le 8-OH-DPAT, nous avons montré que l'effet mitogénique de la 5-HT est dépendant du récepteur 5-HT_{1A}, mais aussi d'autres mécanismes d'action. Nous avons aussi montré que la mobilisation du Ca²⁺ et l'inhibition des taux d'AMPc intracellulaires ne sont pas les signaux du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes B, et ceux-ci ne sont donc pas impliqués dans les effets amplificateurs de la 5-HT sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS. Des études ultérieures seront nécessaires pour élucider les mécanismes de signalisation de ce récepteur dans les lymphocytes B et leur implication dans les effets mitogéniques de la 5-HT.

Nous avons également montré que la 5-HT et les CA diminuent la chimiluminescence dépendante du luminol dans des systèmes acellulaires et cellulaires. La 5-HT et les CA inhibent aussi de façon dépendante de la dose les taux du MDA dans les blastes LPS. À l'inverse de la réponse proliférative, les effets des monoamines sur le stress oxydatif des lymphocytes B se font selon un mécanisme indépendant des récepteurs 5-HT_{1A} ou β_2 AR. En effet, le propranolol, un antagoniste β adrénergique/5-HT_{1A/1B} ne renverse pas les effets de la 5-HT ni ceux des CA sur la chimiluminescence ni sur la peroxydation lipidique. Il s'agit donc d'une interaction directe entre les monoamines et les DO. Nos résultats montrent aussi pour la première fois un nouveau rôle de piègeur des DO du 8-OH-DPAT, un agoniste sélectif 5-HT_{1A}, mais dont la signification biologique reste à déterminer. Nous avons par la suite étudié la relation entre les propriétés anti-oxydantes des monoamines et leurs effets mitogéniques. Nos résultats montrent que la SOD, la catalase, le mannitol et la taurine

connus comme étant des anti-oxydants très puissants, augmentent la prolifération des lymphocytes B stimulés par LPS. Cependant, la présence de ces anti-oxydants n'empêche pas l'induction des effets amplificateurs des monoamines sur la prolifération des cellules B, ce qui suggère que l'activité anti-oxydante des monoamines joue un rôle mineur dans leurs effets mitogéniques. En résumé, nos travaux permettent de tirer les conclusions suivantes: 1) la 5-HT est un co-facteur de croissance des lymphocytes B; 2) le récepteur 5-HT_{1A} est responsable des effets amplificateurs observés; 3) les monoamines 5-HT et CA inhibent les effets du stress oxydatif sur les lymphocytes B par interaction directe avec les DO, mais cette activité joue un rôle mineur dans les effets mitogéniques des monoamines.

L'ensemble de ces travaux nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action des monoamines sur les lymphocytes B et le degré de leur complexité. Ils ont aussi permis d'établir l'importance relative des interactions ligands-récepteurs, et des activités anti-oxydantes des monoamines, dans leurs effets amplificateurs sur la prolifération des lymphocytes B. De plus, nos travaux suggèrent un rôle des monoamines comme mécanisme efficace pour potentialiser d'une part le système de défense cellulaire, et d'autre part pour minimiser les dommages induits par les DO aux tissus hôtes. Ces résultats fournissent des bases rationnelles pour la manipulation éventuelle des récepteurs lymphocytaires des monoamines à des fins thérapeutiques, notamment pour lutter efficacement contre les infections et les inflammations.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott A. 5-HT₃ antagonists and ligands for dopamine D₁ and autoreceptors offer new leads for antipsychotic drugs. Trends Pharmacol. Sci. 11:49-51; 1990.

Abdel-Baset H., Bozovick V., Szyf M., Albert P. R. Conditional transformation mediated via a pertussi toxin-sensitive receptor signalling pathway. Mol. Endo. 6:730-740; 1992.

Abdouh M., Storing J. M., Riad M., Paquette Y., Albert P. R., Drobetsky E., Kouassi E. Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT_{1A} receptors mRNA and protein in activated B and T lymphocytes. J. Biol. Chem. 276:4382-4388; 2001.

Abdul M., Anezinis P. E., Logothetis C. J., Hoosein N. M. Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. Anticancer Res. 14:1215-1220; 1994.

Abrass C. K., O'Connor S. W., Scarpace P. J., Abrass I. B. Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. J. Immunol. 135:1338-1341; 1985.

Ackerman K. D. 1991; P:71-125 dans Ader R, Felten DL, Cohen N. Eds. 1991. Psychoneuroimmunology-II. San Diego. Academic 1218pp.

Ader R., Felten D. L., Cohen N., eds. 1991. Psychoneuroimmunology. Academic press, San Diego, Calif.

Ahlquist R. P. A study of the adrenotropic receptors. Am. J. Physiol. 153:586-600; 1948.

Albert P. R., Lembo P., Storing J. M., Charest A., Saucier C. The 5-HT_{1A} receptor: signaling, desensitization, and gene transcription. Neuropsychopharmacology 14:19-25; 1996.

Albert P. R., Zhou Q.-Y., Van Tol H. H. M., Bunzow J. R., Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. J. Biol. Chem. 265:5825-5832; 1990.

Ameisen J. C., Meade R., Askenase P. W. A new interpretation of the involvement of serotonin in delayed-type hypersensitivity. Serotonin-2 receptor antagonists inhibit contact by an effect on T cells. J. Immunol. 142 : 3171-3179; 1989.

Amigorena S., Choquet D., Remvikos G., Teillaud J. L., Korn H., Fridman W. H. Ion channel blockers inhibit B cell activation at a precise stage of the G₁ phase of the cell cycle: possible involvement of K⁺ channels. J. Immunol. 144:2038-2045; 1990.

Andrade R., Malenka R. C., Nicoll R. A. A G-protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. Science 234:1261-1265; 1986.

Aune T. M., Golden H. W., Mcgrath K. M. Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1A receptors inhibit T lymphocyte function *in vitro* and cell-mediated immunity *in vivo*. J. Immunol. 153:489-498; 1994.

Aune T. M., Kelly K. A., Ranges G. E., Bombara M. P. Serotonin-activated signal transduction via serotonin receptors on Jurkat cells. J. Immunol. 145:1826-1831; 1990.

Aune T. M., McGrath M. K. Sarr T., Bombara M. P., Kelly K. A. Expression of 5-HT_{1A} receptors on activated human T cells : Regulation of cyclic AMP levels on T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. J. Immunol. 151:1175-1183; 1993.

Babior B. M. The respiratory burst of phagocytes. J. Clin. Invest. 73: 599-602; 1984.

Babior B. M. The respiratory burst oxidase. Adv.Enzymol. 65:49-95; 1992.

Baeuerle P. A., Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. Ann. Rev. Immunol. 12:141-179; 1994.

Bartik M. M., Brooks W. H., Roszman T. L. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the beta-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. Cell. Immunol. 148:408-421; 1993.

Baxter G., Kennett G., Blaney F., Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited? TIPS. 16:105-110; 1995.

Benedict C. R., Mathew B., Rex K. A., Cartwright J. Jr., Sordahl L. A. Correlation of plasma serotonin changes with platelet aggregation in an *in vivo* dog model of spontaneous occlusive coronary thrombus formation. Cir. Res. 58:58-67; 1986.

Besedovsky H. O., Herberman R. B., Temohok L. R., Sando F. Psychoneuroimmunology and cancer: fifteenth saporro cancer seminar. Cancer. Res. 56:4278-4281; 1996.

Besedovsky H., Del Rey A., Sorkin E., Da Prada M., Keller H. H. Immunoregulation mediated by sympathetic nervous system. Cell. Immunol. 48:346-355; 1979.

Betten A., Dahlgren C., Hermodsson S., Hellstrand K. Serotonin protects NK cells against oxidatively induced functional inhibition and apoptosis. J. Leukocyte Biol. 70: 65-72; 2001.

Bhunia A. K., Han H., Snowden A., Chatterjee S. Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 272:15642-15649; 1997.

Bijsterbosch M. K., Meade C. J., Turner G. A., Klaus G. G. B. B lymphocyte receptors and polyphosphoinositide degradation. Cell 41 : 999-1006; 1985.

Blandina P., Golfarb J., Green J. P. Activation of 5-HT₃ receptor releases dopamine from rat strial slice. Eur. J. Pharmacol. 155:349-350; 1988.

Blum J. J., Ling N. S. Oxidation of serotonin and 5-hydroxyindoles during the denaturation of oxyhaemoglobin. Biochem. J. 73:530-535; 1959.

Bockaert J. , Fozard J. R., Dumuis A., Clarke D. E. The 5-HT₄ receptor: A place in the sun. TIPS. 13:141-145; 1992.

Boess F. G., Martin I. L. Molecular biology of 5-HT receptors. Neuropharmacology 33:275-317; 1994.

Bonnet M., Lespinats G., Burtin C. Histamine and serotonin suppression of lymphocyte response to phytohemagglutinin and allogeneic cells. Cell. Immunol. 83:280-291; 1984.

Boscà L., Diaz-Guerra M. J. M. Activation of protéine kinase C from B lymphocytes by lipid A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 152 : 149-154; 1988.

Boulton A. A.; Eisenhofer G. Catecholamines metabolism. From molecular understanding to clinical diagnostis and treatment. Advances in pharmacology 42:273-292; 1998.

Bouvier M., Rousseau G. Subtype-specific regulation of the β -adrenergic receptors. Advances in pharmacology 42:433-438; 1998.

Brennan P., O'Neill L. A. J. Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor κ B activation in three different cell lines: Evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. Biochem. Biophys. Acta. 1260:167-175; 1995.

Brooks W. H., Cross R. J., Roszman T. L., Markesbery W. R. Neuroimmunomodulation : Neural anatomical basis for impairment and facilitation. Ann. Neuro. 12:56-61; 1982.

Buck F., Meyerhof W., Werr H., Richter D. Characterization of N- and C-terminal deletion mutants of the rat serotonin HT₂ receptor in *Xenopus laevis* oocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 178:1421-1428; 1991.

Bunce K. T., Elswood C. J., Ball M. T. Investigation of 5-hydroxytryptamine receptor mechanism mediating the short circuit current response in rat colon. Br. J. Pharmacol. 102:811-816; 1991.

Burdon R. H., Gill V., Rice-Evans C. Cell proliferation and oxidative stress. Free Rad. Res. Comm. 7: 149-159; 1989.

Burdon R. H., Gill V., Rice-Evans C. Oxidative stress and tumor cell proliferation. Free Rad. Res. Comm. 11:65-76; 1990.

Burton G. W., Joyce A., Ingold K. U. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. Lancet 2:327; 1982.

- Bylund D. B. Heterogeneity of α_2 -adrenergic receptors. Pharmacol. Biochem. Behav. 22:835-843; 1985.
- Bylund D. B. Subtypes of α_1 - and α_2 -adrenergic receptors. FASEB J. 6:832-839; 1992.
- Cambier J. C, Ransom J. T. Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. Ann. Rev. Immunol. 5 : 175-199; 1987.
- Carmena M. J., Carmacho A., Solano R. M, Montalvo L., Garcia-Lopez E., Arias A., Prieto J. C. 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated effects on adenylyl cyclase and nitric oxide synthase activities in rat ventral prostate. Cell. Signal. 10:583-587; 1998.
- Cassone M. C., Fundaro A., Molinengo L. Action of 5-hydroxytryptamine, histamine and methergoline on phagocytosis. Pharmacology 11:199-206; 1974.
- Cattaneo M. G., Palazzi E., Bondiolotti G., Vicentini L. M. 5-HT_{1D} receptor type is involved in stimulation of cell proliferation by serotonin in human small cell lung carcinoma. Eur. J. Pharmacol. 268:425-430; 1994.
- Charest A., Wainer B. H., Albert P. R. Cloning and differentiation-induced expression of a murine serotonin_{1A} receptor in a septal cell line. J. Neurosci. 13:5164-5171; 1993.
- Chaudhry A., Mackenzie R. G., Georgic L. M., Granneman J. G. Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. Cell. Signal. 6:457-465; 1994.
- Choquet D., Korn H. Dual effects of serotonin on a voltage-gated conductance in lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4547-4561; 1988.
- Chow J. C., Young D. W., Golenbock D. T., Christ W. J., Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J. Biol. Chem. 274(16):10689-92; 1999.
- Clare K. A., Scrutton M. C., Thompson N. T. Effects of α_2 -adrenoceptor agonists and of

related compounds on aggregation of, and on adenylate cyclase activity in, human platelets. Br. J. Pharmacol. 82:467-476; 1984.

Cocks T. M., Angus J. A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. Nature 305: 627-630; 1983.

Cohen R. A. Platelet-induced neurogenic coronary contractions due to accumulation of the false neurotransmitter, 5-hydroxytryptamine. J. Clin. Invest. 75:286-292; 1984.

Conlon P. D., Ogunbiyi P. O., Black W. D., Eyre P. β -adrenergic receptor function and oxygen radical production in bovine pulmonary alveolar macrophages. Can. J. Physiol. Pharmacol. 66:1538-1541; 1988.

Connell L. A., Wallis D. I. 5-Hydroxytryptamine depolarises neonatal rat motoneurons through a receptor unrelated to an identified binding site. Neuropharmacology 28:625-634; 1989.

Corson M. A., Alexander R. W., Berk B. C. 5-HT₂ receptor mRNA is overexpressed in cultured rat aortic smooth muscle cells relative to normal aorta. Am. J. Physiol. 262:C309-C315; 1992.

Crawford D., Zbinden I., Amstad P., Cerutti P. Oxidant stress induces the protooncogene *c-fos* and *c-myc* in mouse epidermal cells. Oncogene 3:27-32; 1989.

Cremaschi G. A., Fisher P., Boege F. β -adrenoceptor distribution in murine lymphoid cell lines. Immunopharmacology 22:195-206; 1991

Crowley S. T., Dempsey E. C., Horwitz K. B., Horwitz L. D. Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factor serotonin and adenosine diphosphate. Circulation 90:1908-1918; 1994.

Das A. M., Flower R. J., Perretti M. Eotaxin-induced eosinophil migration in the peritoneal cavity of ovalbumin-sensitized mice. J. Immunol. 159:1466-1473; 1997.

Davis, R. B.; Meeker, W. R. jr.; Bailey, W. L. Serotonin release by bacterial endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108:775; 1961.

DeFranco A. L., Gold M. R., Jakway J. P. B-lymphocyte signal transduction in response to anti-immunoglobulin and bacterial lipopolysaccharide. Immunol. Rev. 95 : 161-176; 1987.

DeVivo M., Maayani S. Characterisation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 238:248-253; 1986.

Devoino L., Eliseeva L., Eremina O., Idova G., Cheido M. 5-Hydroxytryptophan effect on the development of the immune response : IgM and IgG antibodies and rosette formation in primary and secondary responses. Eur. J. Immunol. 5:394-399; 1975.

Devoino L., Idova G., Alprina E., Cheido M. Brain neuromediator system in the immune response control: pharmacological analysis of pre- and postsynaptic mechanisms. Br. Res. 633: 267-274; 1994.

Dooley D. J., Bittiger H., Reymann N. C. CGP 20712A: a useful tool for quantitating β_1 - and β_2 -adrenoceptors. Eur. J. Pharmacol. 130:137-139; 1986.

Dubois J. M., Rouzair-Dubois B. Role of potassium channels in mitogenesis. Prog. Biophys. Mol. Biol. 59:1-21; 1993.

Dumont J. E., Jauniaux J-C., Roger P. P. The cyclic AMP mediated stimulation of cell proliferation. Trends Biochem. Sci. 14:67-71; 1989.

Dziarski Roman. Correlation between ribosylation of pertussis toxin substrates and inhibition of peptidoglycan-, muramyl dipeptide- and lipopolysaccharide-induced mitogenic stimulation in B lymphocytes. Eur. J. Immunol. 19 : 125-130;1989.

Eglen R. M., Wong E. H., Dumuis A., Bockaert J. Central 5-HT₄ receptors. TIPS. 16:391-398; 1995.

Elswood C. J., Bunce K. T., Humphrey P. P. A. Identification of putative 5-HT₄ receptors

in guinea-pig ascending colon. Eur. J. Pharmacol. 196:149-155; 1991.

Essmann, W. B. Serotonin distribution in tissues and fluids. In W. B. Essmann (Ed), serotonin in health and disease, Vol. 1. Spectrum; New York. 1978.

Faraj B. A., Olkowski Z. L., Jackson R. T. Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. Int. J. Immunopharmacol. 16:561-567; 1994.

Farber H. W., Beer D. J. Restricted secretion of a T-lymphocyte chemotactic cytokine by serotonin-stimulated cultured aortic endothelial cells. Cir. Res. 69:257-265; 1991.

Fargin A., Raymond J. R., Regan J. W., Cotecchia S., Lefkowitz R. J., Caron M. G. Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. J. Biol. Chem. 264:14848-14852; 1989.

Fargin A., Yamamoto K., Cotecchia S., Goldsmith P. K., Spiegel A. M., Lapetina E. G., Raymond J. R., Caron M. G., Lefkowitz R. J. Dual coupling of the cloned 5-HT_{1A} receptor to both adenylyl cyclase and phospholipase C is mediated via the same G_i protein. Cell. Signal. 3:547-557; 1991

Felten D. L., Felten S. Y., Bellinger D. L., Carlson S. L., Ackerman K. D., Madden K. S., Olschowka J. A., Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system : Structure and function. Immunol. Rev. 100:225-260; 1987.

Felten S. Y., Madden K. S., Bellinger D. L., Kruszewska B., Moynihan J. A., Felten D. L. The role of sympathetic nervous system in the modulation of immune responses. Advances in pharmacology. Academic Press. p:583-587; 1998.

Fenton N. J., Golenbock D. T. LPS-binding proteins and receptors. J. Leukocyte Biol. 64:25-32; 1998.

Ferriere F., Khan N. A., Troutaud D., Deschaux P. Serotonin modulation of lymphocyte proliferation via 5-HT_{1A} receptors in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev. Comp. Immunol. 20:273-283; 1996.

Fillion G.; Fillion M. P.; Cloes-Tayarani I.; Sarhan H.; Haour F.; Bolanos F. 5-HT and the immune system *in Serotonin from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Kluwer academic publishers and fondazione Giovanni Lorenzini. 329:335; 1993.

Finocchiaro L. M. E., Artz E. S., Fernandez-Castelo S., Criscuolo M., Finkielman S., Nahmod V. E. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon- γ as part of an immunomodulatory pathway. J. Interferon. Res. 8:705-716; 1988.

Foon K. A., Wahl S. M., Oppenheim J. J., Rosenstreich D. L. Serotonin-induced production of a monocyte chemotactic factor by human peripheral blood leukocytes. J. Immunol. 117:1545-1552; 1976.

Ford A. P., Williams T. J., Blue D. R., Clarke D. E. α_1 -adrenoceptor classification: sharpening occam's razor. TiPS. 15:167-173; 1994.

Freed B. M., Rapport R., Lempert N. Inhibition of early events in human T-lymphocyte response to mitogens and alloantigens by hydrogen peroxide. Arch. Surg. 122:99-104; 1987.

Fuchs B. A., Campbell K. S., Munson A. E. Norepinephrine and serotonin content of the murine spleen : its relationship to lymphocytes β -adrenergic receptor density and the humoral immune response *in vivo* and *in vitro*. Cell. Immunol. 117:339-351; 1988.

Gaddum J. G., Picarelli Z. P. Two kinds of tryptamine receptors. Neuropharmacology 23:1473-1486; 1957.

Gardier A. M., Jacquot C., Artigas F. Base neurobiologique du rôle des récepteurs 5-HT_{1A} dans le mode d'action des antidépresseurs serotoninergiques. Médecine/sciences 11:1407-1417; 1995.

Garnovskaya, M. N.; van Biesen, T.; Hawes, B.; Casanas Ramos, S.; Lefkowitz, R.; Raymond, J. R. Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT_{1A} receptor via a G protein β -subunit-initiated pathway. Biochem. 272:13716-13722;

1996.

Garssadi S. I., Mandi Y., Régely K., Tarodi B., Bélàdi I. The inhibitory effect of interferon-alpha on the serotonin induced impairment of human NK cell activity in whole blood. Br. Beh. Immun. 7:164-175; 1993.

Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., Langin D. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. J. Clin. Invest. 98:556-562; 1996.

Giasson E., Servant M. J., Meloche S. Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 272:26879-26886; 1997.

Gibson-Berry K. L., Whitin J. C., Cohen H. J. Modulation of the respiratory burst in human neutrophils by isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP. J. Neuroimmunol. 43:59-68; 1993.

Glenon R. A., Naiman N. A., Pierson M. E., Titler M., Lyon R. A., Herndon J. E., Misenheimer B. Stimulus properties of arylpiperazines : NAN-190, a potential 5-HT_{1A} serotonin antagonist. Drug Dev. Res. 16:35-343; 1989.

Glenon R. A., Naiman N. A., Pierson M. E., Titler M., Lyon R. A., Weisberg E. NAN-190 : an arylpiperazine analog that antagonizes the stimulus effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). Eur. J. Pharmacol. 154:339-341; 1988.

Goin J. C., Sterin-Borda L., Borda E. S., Finiasz M., Fernandez J., de Bracco M. M. Active alpha 2 and beta adrenoceptors in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. Int. J. Can. 49:178-81; 1991.

Gold M. R., Law D. A., DeFranco A. L. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. Nature 345 : 810-813; 1990.

Goldstein G. S. Catecholamines in the periphery. Advances in pharmacology 42:529-539; 1998.

Gonzalez-Herydrich J., Peroutka S. J. Serotonin receptor and reuptake sites: Pharmacologic significance. J. Clin. Psych. 51:5-13; 1990.

Goppelt-Struebe M., Stroebel M. Synergistic induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by platelet-derived growth factor and interleukin-1. FEBS Lett. 374:375-378; 1995.

Greenshaw A. J. Behavioural pharmacology of 5-HT₃ receptor antagonists: a critical update on therapeutic potential. TiPS. 14:265-270; 1993.

Gu Y., Seidel A. Influence of salbutamol and isoproterenol on the production of TNF and reactive oxygen species by bovine alveolar macrophages and calcitriol differentiated HL-60 cells. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 18:115-128; 1996.

Gyermerk L. 5-HT₃ receptors: Pharmacologic and therapeutic aspects. J. Clin. Pharmacol. 35:845-855; 1995.

Hadden J. W., Hadden M. E., Middleton E., Jr. Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. Cell. Immunol. 1:583-595; 1970.

Hamon M., Gozlan H. Les récepteurs centraux de la sérotonine. Médecine/Sciences 9:21-30; 1993.

Hancock J. T., Henderson L. M., Jones O. T. G. Superoxide generation by EBV-transformed B lymphocytes. Activation by IL-1 β , TNF- α and receptor independent stimuli. J. Immunol. 71:213; 1990.

Harvath L., Robbins J. D., Russell A. A., Seamon K. B. cAMP and human neutrophil chemotaxis. Elevation of cAMP differentially affects chemotactic responsiveness. J. Immunol. 146:224-232; 1991.

Hellstrand K., Czerkinsky C., Rickstein A., Jansson B., Asea A., Kylefjord H., Hermodsson S. Role of serotonin in the regulation of interferon- γ production by human natural killer cells. J. Interferon Res. 13:33-38; 1993.

Hellstrand K., Hermodsson S. Serotonergic 5-HT_{1A} receptors regulate a cell contact-mediated interaction between natural killer cells and monocytes. Scand. J. Immunol. 37:7-18; 1993.

Hellstrand K., Hermodsson S., Strannegard O. Evidence for a beta-adrenoceptor-mediated regulation of human natural killer cells. J. Immunol. 134:4095-4099; 1985.

Hellstrand K.; Dahlgren C.; Hermodsson S. Serotonergic regulation of natural killer cells: a minireview. *in* serotonin from cell biology to pharmacology and therapeutics, Kluwer Academic Publishers and Fondazione Giovanni Lorenzini, Netherlands, pp:345-351; 1993.

Henricks P. A. J., Van Esch B., Nijkamp F. P. Beta-agonists can depress oxidative metabolism of alveolar macrophages. Agents and Action. 19:353-354; 1986.

Hindle A. T. Recent developments in the physiology and pharmacology of 5-hydroxytryptamine. Br. J. Anaesthesia 73:275-317; 1994.

Hirsch E. C. Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease? Eur. Neurol. 33: Suppl. 1:52-59; 1993.

Hjorth S., Sharp T. Mixed agonist/antagonist properties of NAN-190 at 5-HT_{1A} receptor : behavioural and *in vivo* brain microdialysis studies. Life Sci. 46:955-963; 1990.

Hoffman B. J., Mezey E., Brownstein J. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. Science 254:579-580; 1991.

Hoyer D., Clarke D. E., Fozard J. R., Hartig P. R., Martin G. R., Mylecharane E. J., Saxena P. R., Humphrey P. A. VII. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). Pharmacol. Rev. 46:157-203; 1994.

Hoyer D., Martin G. 5-HT receptors classification and nomenclature: towards a harmonization with human genome. Neuropharmacology 36:419-428; 1997.

Huang H. C., Chang J. H., Tung S. F., Wu R. T., Foegh M. L., Chu S. H. Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. Eur. J. Pharmacol. 211:359-364; 1992.

Huether G., Fettkötter I., Keilhoff G., Wolf G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of activated microglia. J. Neurochem. 69:2096-2101; 1997.

Huether G., Schuff-Werner P. Platelet serotonin acts as a locally releasable antioxidant. Recent advances in tryptophan research, edited by Grazielle Allegri Filippini et al. Penum Press, New York. 1996.

Humphrey P. P. A., Hartig P., Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. TIPS. 14 : 233-236; 1993.

Hunt N. H. , Cook E. P., Fragonas J. C. Interference with oxidative processes inhibits proliferation of human peripheral blood lymphocytes and murine B-lymphocytes. Int. J. Immunopharmacol. 13:1019-1026; 1991.

Hurley J. H. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. 274:7599-7602; 1999.

Insel P. A., Balboa M. A., Mochizuki M., Post S. R., Urasawa K., Xing M. Mechanisms for activation of multiple effectors by alpha 1-adrenergic receptors. Advances in pharmacology p:451-453; 1998.

Ishizuka I., Beauchamp R. D., Townsend J. C., Greeley G. H., Thompson J. C. Receptor-mediated autocrine growth-stimulatory effect of 5-hydroxytryptamine on cultured human pancreatic carcinoid cells. J. Cell. Physiol. 150:1-7; 1992.

Iwahashi H., Ishii T., Sugata R., Kido R. Arch. Biochem. Biophys. 276:242-247; 1990.

Jabara H. H., Vercelli D. Engagement of CD14 on monocytes inhibits the synthesis for Igs, including IgE. J. Immunol. 153: 972-978; 1994.

Jackson J. C., Cross R. J., Walker R. F., Markesbery W. R., Brooks W. H., Roszman T. L. Influence of serotonin in the immune response. Immunology 54:505-512; 1984.

Jackson J. C., Walker R. F., Brooks W. H., Roszman T. L. Specific uptake of serotonin by murine macrophages. Life. Sci. 42:1641-1650; 1988.

Jacobs Diane M. Structural features of binding of lipopolysaccharides to murine lymphocytes. Rev. Infect. Dis. 6 : 501-505; 1984.

Josefsson E., Bergquist J., Ekman R., Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. Immunology 88:140-146; 1996.

Katz P., Zaytoun A. M., Fauci A. S. Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. I. Modulation of natural killer cell activity by cyclic nucleotides. J. Immunol. 129:287-296; 1982.

Kaumann A. J., Preitner F., Sarsero D., Molenaar P., Revelli J. P., Giacobino J. P. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. Mol. Pharmacol. 53:670-675; 1998.

Kelleher M. D., Abe M. K., Chao T-S. O., Jain M., Green M., Solway J., Rosner M. R., Hershenson M. B. Role of MAP kinase activation in bovine tracheal smooth muscle mitogenesis. Am. J. Physiol. 268:L894-L901; 1995.

Khan M. M., Sansoni P., Silverman E. D., Engelman E. G., Melmon K. L. Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. Biochem. Pharmacol. 35:1137-1142; 1986.

Kobayashi S., Imajoh-Ohmi S., Nakamura M., Kanegasaki S. Occurrence of cytochrome b558 in B-cell lineage of human lymphocytes. Blood 75:458-461; 1990.

Kobilka B. K., Frielle T., Collins S., Yang-Feng T., Kobilka T. S., Francke U., Lefkowitz R. J., Caron M. G. An intronless gene encoding a potential member of the family of

receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Nature 329:75-79; 1987.

Koff W. C., Dunegan M. A. Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. J. Immunol. 135:350-354; 1985.

Koff W. C., Fann A. V., Dunegan M. A., Lachman L. B. Catecholamine-induced suppression of interleukin-1 production. Lymphokine Res. 5:239-247; 1986.

Kohm A. P., Sanders M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. Immunol. Today 21:539-542; 2000.

Kouassi E., Li Y. S., Boukhris W., Millet I., Revillard J. P. Opposite effects of the catecholamines dopamine and norepinephrine on murine polyclonal B-cell activation. Immunopharmacology 16:125-137; 1988.

Kouassi E., and Revillard J.P. Contribution of β -adrenoceptors to the dopamine-induced elevation of cyclic 3'5'-adenosine monophosphate levels in mouse lymphocytes. Eur. J. Pharmacol. 144: 97-100, 1987.

Krief S., Lonquist F., Raimbault S., Baude B., van Sponen A., Arner P., Strosberg A. D., Ricquier E., Emorine L. J. Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptors mRNA in man. J. Clin. Inv. 91:344-349; 1993.

Kut J. L., Young M. R. I., Crayton J. W., Wright M. A., Young M. E. Regulation of murine T-lymphocyte function by spleen cell-derived and exogenous serotonin. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 14:783-796; 1992.

Laberge S., Cruikshank W. W., Beer D. J., Center D. M. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8⁺ T cells *in vitro*. J. Immunol. 156: 310-315; 1996.

Lands A. M., Arnold A., McAuliff J. P., Luduena F. P., Brown T. G. Differentiation of receptor system activated by sympathomimetic amines. Nature 214:597-598; 1967.

Lane P. J. L., Ledbetter J. A., McConnell F. M., Draves K., Deans J., Schieven G. L.,

Clark E. A. The role of tyrosine phosphorylation in signal transduction through surface Ig in human B cells. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents intracellular calcium release. J. Immunol. 146 : 715-722; 1991.

Leca G., Benichou G., Bensussan A., Mitenne F., Galanaud P., Vazquez A. Respiratory burst in human B lymphocytes. Triggering of surface Ig receptors induces modulation of chemiluminescence signal. J. Immunol. 146:3542-3549; 1991.

Lee S. L., Wang W. W., Lanzillo J. J., Fanburg B. L. Serotonin produces both hyperplasia and hypertrophy of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in cultures. Am. J. Physiol. 266:L46-L52; 1994.

Lefkowitz R. J., Caron M. G. Adrenergic receptors. J. Biol. Chem. 263:4993-4996; 1988.

Leonard B. E. Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety, disorders and depression. Psychoth. Psychosom. 65:66-75; 1996.

Lewis R. S., Cahalan M. D. Potassium and calcium channels in lymphocytes. Ann. Rev. Immunol. 13:623-653; 1995.

Li Y. S., Kouassi E., Revillard J. P. Differential regulation of mouse B-cell activation by β -adrenoceptor stimulation depending on type of mitogens. Immunol. 69:367-372; 1990.

Limbird L. E. Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. FASEB J. 2:2686-2695; 1988.

Liu J., Mori A. Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against oxidant- and free radical-induced damage. Arch. Biochem. Biophys. 302:118-127; 1993.

Liu Y. F., Albert P. R. Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. J. Biol. Chem. 226:23689-23697; 1991.

Liu Y. L., Cawthorne M. A., Stock N. J. Biphasic effects of the beta-adrenoceptor agonist, BRL 37344, on glucose utilization in rat isolated skeletal muscle. Br. J. Pharmacol.

117:1355-1361; 1996.

Lux G., Katschinski M., Ludwing S., Lederer P., Ellerman A., Domschke W. The effect of cisapride and metoclopramide on human digestive and interdigestive antroduodenal motility. Scand. J. Gastroent. 29:1105-1110; 1994.

Mackinnon A. C., Spending M., Brown C. M. α -2 adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences. TiPS. 15:119-123; 1994.

Madden K. S., Felten S. Y., Felten D. L., Bellinger D. L. Sympathetic nervous system-immune system interactions in young and old Fischer 344 rats. Ann. NY. Acad. Sc. 771:523-534; 1995.

Madhavi N., Das U. N., Surya Prabha P., Kumar Sravan. G., Koratkar R., Sangeeta Sagar P. Suppression of human T-cell growth *in vitro* by Cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids. 51:33-40; 1994.

Maly F. E., Cross A. R., Jones O. T. G., Wolf-Vorbeck G., Walker C., Dahinden A. C., De Weck A. L. The superoxide generating system of B cell lines. Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. J. Immunol. 140:2334-2339; 1988.

Maly F. E., Nakamura M., Gauchat J. F., Urwyler A., Walker C., Dahinden A. C., Cross A. R., Jones O. T. G., De Weck A. L. Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b₂₄₅ components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. J. Immunol. 142:1260-1267; 1989.

Mangel A. W., Raymond J. R., Fitz J. G. Regulation of high-conductance anion channels by G proteins and 5-HT_{1A} receptors in CHO cells. Am. J. Physiol. 264:F490-F495; 1993.

Martin G. R., Humphrey P. P. A. Classification review. Receptors for 5-hydroxytryptamine: Current perspectives on classification and nomenclature. Neuropharmacol. 33:261-273; 1994.

Martinez F., Coleman J. W. A comparison of the effects of chlorpromazine and more

selective histamine and 5-hydroxytryptamine antagonists on human IgG synthesis *in vitro*. Int. J. Immunopharmacol. 12:185-191; 1990.

Matthes H., Boschert U., Amlaiky N., Grailhe R., Plassat J. L., Muscatelli F., Mattei M. G., Hen R. Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. Mol. Pharmacol. 43:313-319; 1993.

McCall R. B., Clement M. E. Role of serotonin_{1A} and serotonin₂ receptors in the central regulation of the cardiovasculaire system. Pharmacol. Rev. 46:231-243; 1994.

McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function of erythrocyte (hemocuperein). J. Biol. Chem. 244:6049-6055; 1969.

Melmon K. L., Bourne H. R., Weinstein Y., Shearer G. M., Kram J., Bauminger S. Hemolytic plaque formation by leukocytes *in vitro*. Control by vasoactive hormones. J. Clin. Invest. 53:13-21; 1974.

Meloche S.; Seuwen K.; Pouyssegur J. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. Mol. Endoc. 6:845-854; 1992.

Meltzer H. Y.; Matsubara S.; Lee J. C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of D1, D2 and 5-HT₂ pKi values. J. Pharmacol. Exp. Ther. 251:238-246; 1989.

Metzger Z., Hoffeld J. T., Oppenheim J. J. Macrophage-mediated suppression. I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. J. Immunol. 124:983-988; 1980.

Meyer M., Schreck R., Baeuerle P. A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-respective factor. Embo J. 12:2005-2015; 1993.

Meyniel J. P. Khan N. A., Ferrière F., Deschaux P. Identification of lymphocyte 5-HT₃

receptor subtype and its implication in fish T-cell proliferation. Immunol. Letters 55:151-169; 1997.

Minneman K. P., Atkinson B. A. Interaction of subtypes-selective antagonists with α_1 -adrenergic receptor mediated second messenger responses in rat brain. Mol. Pharmacol. 40:523-530; 1991.

Mishra, B. P.; Sanyal, R. K. Staphylococcal infection in histamine and 5-hydroxytryptamine depleted rats. J. Pharm. Pharmacol. 11:127-128; 1959.

Miura T., Muraoka S., Ogiso T. Lipid peroxidation inhibited by monoamines. Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol. 93:57-67; 1996.

Molderings G. J., Göthert M., Fink M., Roth E., Schlicker E. Inhibition of noradrenaline release in the pig coronary artery via a novel serotonin receptor. Eur. J. Pharmacol. 164: 213-222; 1989.

Monsma F. J., Shen Y., Ward R. P., Hamblin M., W., Sibley D. R. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. Mol. Pharmacol. 43:320-327; 1993.

Morikawa K., Morikawa S. Immunomodulatory effect of recombinant human superoxide dismutase (SOD) on human B lymphocyte function *in vitro*. Cell. Immunol. 172:70-76; 1996.

Morrison D. C., Lei M. G., Kirikae T., Chen T. Y. Endotoxin receptors on mammalian cells. Immunobiology. 187 : 212-226; 1993.

Mossner R., Daniel S., Schmitt A., Albert D., Lesch K. P. Modulation of serotonin transporter function by interleukin-4. Life Sci. 68:873-880; 2001.

Mössner R., Lesch K. P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. Br. Beh. Immun. 12:249-271; 1998.

Müller J. M., Löms Z-H., Baeuerle P. A. Nuclear factor kappa B, a mediator of

lipopolysaccharide effects. Immunobiology 187:233-256; 1993.

Murrell G. A. C., Francis M. J. O., Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. Biochem. J. 265:659-665; 1990.

Nannmark, U.; Sennerby, L.; Bjursten, L. M.; Skolnik, G.; Bagge, U. Inhibition of leukocytes phagocytosis by serotonin and its possible role in tumour cell destruction. Cancer Letters 62:83-86; 1992.

Nelson, D. R., Huggins, A. G. The interaction of 5-HT and related hydroxyindoles with horseradish and mammalian peroxidase systems. Biochem. Pharmacol. 24:181-192; 1975.

Nemecek G. M., Coughlin S. R., Handley D.A., Moskowitz M. A. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:674-678; 1986.

Nichols A. J. α -adrenoceptor signal transduction mechanisms. In α -adrenoceptors: Molecular biology, biochemistry and pharmacology, edited by R. R. Ruffolo, Jr., pp44-74, Karger, Basel, Switzerland; 1991.

Nielson C. P. β -adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. J. Immunol. 139:2392-2397; 1987.

Northover B. J. The effect of histamine and 5-hydroxytryptamine on phagocytosis of staphylococci *in vitro* by polymorphs and macrophages. J. Path. Bacteriol. 82:355-361; 1961.

Novogrodsky A., Ravid A., Rubin A. L., Stenzel K. H. Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 179:1171-1174; 1982.

O'Donnell S. R., Wanstall J. C. Evidence that ICI 118,551 is a potent highly beta-2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize beta-adrenoceptor populations in tissues. Life. Sci. 27: 671-677; 1980.

Pahlavani M. A., Harris M. D. Effect of *in vitro* generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. Free Rad. Biol. Med. 25:903-913; 1998.

Paige C. J., Kincade P. W., Ralph P. Independent control of immunoglobulin heavy and light chain expression in murine pre-B-cell line. Nature 292 : 631-633; 1981.

Parrot D. P., Lockey P. M., Bright C. P. Comparison of the mitogenic activity of angiotensin II and serotonin on porcine arterial smooth muscle cells. Atherosclerosis 88:213-218; 1991.

Pastan I. H., Johnson G. S., Anderson W. B. Role of cyclic nucleotides in growth control. Ann. Rev. Biochem. 44:491-523; 1975.

Paul-Eugene N., Dugas B., Gordon J., Kolb J. P., Cairns J. A., Paubert-Braquet M., Mencia-Huerta J. M., Braquet P. Beta 2-adrenoceptors stimulation augments the IL-4-induced CD23 expression and release and the expression of differentiation markers (CD14, CD18) by the human monocytic cell line U 037. Clin. Exp. All. 23:317-325; 1993.

Pennington N. J., Kelley J. S. Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron. Neuron 4:751-758; 1990.

Peroutka S. J., Howell T. A. The molecular evolution of G protein-coupled receptors : focus on 5-hydroxytryptamine receptors. Neuropharmacology 33:319-324; 1994.

Plassat J. L., Amlaiky N., Hen R. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. Mol. Pharmacol. 44:229-236; 1993.

Plaut M. Lymphocyte hormone receptors. Ann. Rev. Immunol. 5:621-669; 1987.

Polanski M., Vermeulen M. W., Wu J., Karnovsky M. L. Muramyl dipeptide mimicry in the regulation of murine macrophages activation by serotonin. Int. J. Immunopharmacol. 17:225-232; 1995.

Radojcic T., Baird S., Darko D., Smith D., Bulloch K. Changes in beta-adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: an analysis of T cells and macrophages. J. Neurosci. Res. 30:328-335; 1991.

Ramamoorthy S., Ramamoorthy J. D., Prasad P. D., Bhat G. K., Mahesh V. B., Leibach F. H., Ganapathy V. Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. Biochem. Biophys. Res. Comm. 216:560-567; 1995.

Rapport M. M., Green A. A., Page I. H. Serum vasoconstrictor (serotonin): Isolation and characterization. J. Biol. Chem. 176:1243-51; 1948.

Raymond J. R., Mukhin Y. V., Getty T. W., Garnovskaya M. N. The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. Br. J. Pharmacol. 127:1751-1764; 1999.

Raymond J. R., Olsen C. L., Gettys T. W. Cell-specific physical and functional coupling of human 5-HT_{1A} receptors to inhibitory G protein α -subunits and lack of coupling to G_{s α} . Biochemistry 32:11604-11073; 1993.

Remaury A., Paris H. The insulin-secreting cell line RINm5F, expresses an alpha-2D adrenoceptor and nonadrenergic idazoxan-binding sites. J. Pharmacol. Exp. Ther. 260:417-426; 1992.

Reyftman J. P., Santus R., Mazière J. C., Morlière P., Salmon S., Candide C., Mazière C., Haigle J. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autoperoxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. Biochem. Biophys. Acta 1042:159-167; 1990.

Ritter K. J., Kuhl R. J., Semrau F., Eiffert H., Kratzin H. D., Thomssen R. Manganese superoxide dismutase as a target of autoantibodies in acute Epstein-Barr virus infection. J. Exp. Med. 180:1995-1998; 1994.

Rivkin I., Rosenblatt J., Becker E. L. The role of cyclic AMP in the chemotactic responsiveness and spontaneous motility of rabbit peritoneal neutrophils. The inhibition of

neutrophil movement and the elevation of cyclic AMP levels by catecholamines, prostaglandins, theophyllin and cholera toxin. J. Immunol. 115:1126-34; 1975.

Rohler D. K., Kobilka B. K. Insights from *in vivo* modification of adrenergic receptor gene expression. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38:351-373; 1998.

Roszman T. L., Jackson J. C., Cross R. J., Titus M. J., Markesbery W. R., Brooks W. H. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. J. Immunol. 135:769s-772s; 1985.

Ruffolo R. R., Nicholas A. J., Stadel J. M., Hieble J. P. Structure and function of α -adrenoceptors. Pharmacol. Rev. 43:475-505; 1991.

Rydelek-Fitzgerald L., Teitler M., Fletcher P. W., Ismaiel A. M., Glennon R. A. NAN-190 : agonist and antagonist interactions with brain 5-HT_{1A} receptors. Br. Res. 532:191-196; 1990.

Sagone A. L., Husney R., Guter H., Clark L. Effect of catalase on the proliferation of human lymphocytes to phorbol myristate acetate. J. Immunol. 133:1488-1494; 1984.

Sanders V. M., Munson A. E. Kinetics of the enhancing effect produced by norepinephrine and terbutaline on the murine primary antibody response *in vitro*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 231:527-531; 1984.

Sanders V. M., Street N. E., Fuchs B. A. Differential expression of the β -adrenoceptor subset of T-helper lymphocytes. FASEB J. 8:A114, abstract 662; 1994.

Schieven G. L., Kirihara J. M., Myers D. E., Ledbetter J. A., Uckun F. M. Reactive oxygen intermediates activate NF- κ B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56^{lck} and p59^{fyn} tyrosine kinases in human lymphocytes. Blood 82:1212-1220; 1993.

Schmidt C. J., Sorensen S. M., Kehne J. H., Carr A. A., Palfreyman M. G. The role of 5-HT_{2A} receptors in antipsychotic activity. Life Sci. 56:2209-2222; 1995.

Schopf R. E., Lemmel E. M. Control of the production of oxygen intermediates of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes by beta adrenergic receptors. J. Immunopharmacol. 5: 203-216; 1983.

Schreck R. , Albermann K., Baeuerle A. Nuclear factor κ B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). Free Rad. Res. Comm. 17:221-237; 1992.

Schrek R., Rieber P., Baeuerle P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. EMBO J. 10:2247-2258; 1991.

Schuff-Werner P., Splettstosser W., Huether G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory bursts of human mononuclear and polymorphonuclear phagocytoses. Eur. J. Clin. Inv. 25: 477-484; 1995.

Seckl M., Rozengurt E. Tyrphostin inhibits bombesin stimulation of tyrosine phosphorylation, c-fos expression, and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem. 268:9548-9554; 1993.

Seuwen K., Magnaldo I., Pouysségur J. Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT_{1B} receptors coupled to a Gi-protein. Nature 335:254-256; 1988.

Severn A., Rapson N. T., Hunter C. A., Liew F. Y. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. J. Immunol. 148:3441-3445; 1992.

Shen Y., Monsma F. J. jr., Metcalf M. A., Jose P. A., Hamblin M. W., Sibley D. R. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. J. Biol. Chem. 268:18200-18204; 1993.

Shenker A., Maayani S., Weinstein H., Green J. P. Two 5-HT receptors linked to adenylate cyclase in guinea pig hippocampus are discriminated by 5-carboxamidotryptamine and spiperone. Eur. J. Pharmacol. 109:427-429; 1985.

Shibanuma M., Kuroki T., Nose K. Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent

Balb/3T3 cells. Oncogene 3:27-32; 1990.

Shinagawa S. Serotonin protects C6 glioma cells from glutamate toxicity. Neuroscience 59:1043-1050; 1994.

Simonneaux V., Ebadi M., Bylund D. B. Identification and characterization of α_2D -adrenergic receptors in bovine pineal gland. Mol. Pharmacol. 40:235-241; 1991.

Simonson M. S., Herman W. H. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. J. Biol. Chem. 268:9347-9357; 1993.

Singh U., Millson D. S., Smith P. A., Owen J. J. T. Identification of β adrenoceptors during thymocytes ontogeny in mice. Eur. J. Immunol. 9:31-35; 1979.

Slauson D. O., Walker C., Kristensen F., Wang Y., De Wekc A. L. Mechanism of serotonin-induced lymphocyte proliferation inhibition. Cell. Immunol. 84:240-252; 1984.

Sleight A. J., Perce P. A., Schmidt A. W., Hekmatpanah C. R., Peroutka S. The clinical utility of serotonin receptor active agents in neuropsychiatric disease; in Peroutka S. (ed): Serotonin receptor sub-types: Basic and clinical aspects. New York, Wiley-Liss pp211-227; 1991.

Smejkal-Jagar L., Boranic M. Serotonin and serotonergic agents affect proliferation of normal and transformed lymphoid cells. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 17:151-162; 1995.

Smejkal-Jagar L., Boranic M. Serotonin, serotonergic agents and their antagonists suppress humoral immune reaction in vitro. Res. Exp. Med. 194: 297-304; 1995.

Spengler R. N., Allen R. M., Remick D. G., Strieter R. M., Kunkel S. L. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. J. Immunol. 145:1430-1434; 1990.

Spengler R. N., Chensue S. W., Giacherio D. A., Blenk N., Kunkel S. L. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor- α production from macrophages *in vitro*. J. Immunol. 152:3024-3031; 1994.

Stefuj J., Jerney B., Cicin-Sain L., Rinner I., Schauenstein K. mRNA Expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. Br. Beh. Immun. 14:219-224; 2000.

Sternberg E. M., Wedner J. H., Leung M. K., Parker C. W. Effect of serotonin (5-HT) and other monoamines on murine macrophages: Modulation of interferon- γ induced phagocytosis. J. Immunol. 138:4360-4365; 1987.

Stepien H., Kunert-Radek J., Karasek E., Pawlikowski M. Dopamine increases cyclic AMP concentration in the rat spleen lymphocytes *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101(3):1057-63; 1981.

Takasu N., Komatsu M., Aizawa T., Yamada T. Hydrogen peroxide generation in whole rat pancreatic islets: synergistic regulation by cytoplasmic free calcium and protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Comm. 155:569-575; 1988.

Tatla S., Woodhead V., Foreman J. C., Chain B. M. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. Free Rad. Biol. Med. 26:14-24; 1999.

Tian L., Cai Q., Bowen R., Wei H. Effects of caloric restriction on age-related oxidative modifications of macromolecules and lymphocyte proliferation in rats. Free Rad. Biol. Med. 19:859-865; 1995.

TiTinichis S., Clarke B. Alpha 2-adrenoceptors in human lymphocytes: direct characterization by [3 H]yohimbine binding. Biochem. Biophys. Res. Comm. 121:1-7; 1984.

Uemura T., Shimazu T., Miura R., Yamano T. NADPH-dependent melanin pigment formation from 5-OH-indolealkyl-amines by hepatic and cerebral microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93:1074-1081; 1980.

Varrault. A., Bockaert J., Waeber C. Activation of 5-HT_{1A} receptors expressed in NIH-3T3

cells induces focus formation and potentiates EGF effect on DNA synthesis. Mol. Biol. Cell. 3:961-969; 1992.

Vial T., Tedone R., Patriarca C., Descotes J. Effect of serotonin on the chemiluminescence response of rat peripheral blood leucocytes. Int. J. Immunopharmac. 17:813-819; 1995.

Vialli M., Erspamer V. Cellule enterocromaffini e cellule basigranulose acidofile nei vertebrati. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 19:743; 1933.

Villalon C. M., den Boer M. O., Heiligers J. P. C., Saxena P. R. Mediation of 5-hydroxytryptamine-induced tachycardia in the pig by the putative 5-HT₄ receptor. Br. J. Pharmacol. 100:665-667; 1990.

Volkman J. D., Buescher E. S., Gallin J. I., Fauci A. S. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. J. Immunol. 133:3006-3009; 1984.

Voyno-Yasenetskaya T., Conklin B. R., Gilbert R. L., Hooley R., Bourne H. R., Barber D. L. G-alpha 13 stimulates Na-H exchange. J. Biol. Chem. 269:4721-4724; 1994.

Weiss R. H., Nuccitelli R. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents thrombin-induced mitogenesis, but not intracellular free calcium release, in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 267:5608-5613; 1992

Whitacre C. M., Cathcart M. K. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens. Cell. Immunol. 144:287-295; 1992.

Witztum J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet 344:793-795; 1994.

Wong G. H., Elwell J. H., Oberley L. W., Goeddel D. V. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. Cell 58:923-931; 1989.

Wrona M. Z., Yang Z., McAdams M., O'Connor-Coates S., Dryhurst G. Hydroxyl

radical-mediated oxidation of serotonin: potential insights into the neurotoxicity of methamphetamine. J. Neurochem. 64:1390-1400; 1995.

Yakel J. L., Shao X. M., Jackson M. B. The selectivity of the channel coupled to 5-HT₃ receptor. Brain Res. 533 : 46-52; 1990.

Yatani A., Imoto Y., Codina J., Hamilton S. L., Brown A. M., Birnbaumer L. The stimulating G-protein of adenylyl cyclase, G_s, also stimulating dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels. J. Biol. Chem. 263:201-206; 1988.

Yocca F. D., Hyslop D. K., Smith D. W., Maayani S. BMY7378, a buspirone analog with high affinity, selectivity and low intrinsic activity at the 5-HT_{1A} receptor in rat and guinea pig hippocampal membranes. Eur. J. Pharmacol. 137:293-294; 1987.

Young M. I. R., Kut J. L., Coogan M. P., Wright M. A., Young M. E., Matthews J. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. Immunology 80:395-400; 1993.

Young M. I. R., Matthews J. Serotonin regulation of T-cell subpopulation and macrophage accessory function. Immunology 84:148-152; 1995.

Yu B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 74:139-162; 1994.

Zgombick J. M., Borden L. A., Cochran T. L., Kucharewicz S. A., Weishank R. L., Branchek T. A. Dual coupling of cloned human 5-hydroxytryptamine_{1D} alpha and 5-hydroxytryptamine_{1D} beta receptors stably expressed in murine fibroblasts: inhibition of adenylate cyclase and elevation of intracellular calcium concentrations via pertussis toxin-sensitive G protein(s). Mol. Pharmacol. 44:575-582; 1993.

ANNEXE 1

INTRODUCTION

Cette annexe permet de présenter des résultats non-mentionnés dans les articles et complète ainsi la thèse. Dans une première partie, nous incluons les matériels et méthodes utilisés. Les méthodes mentionnées sont la mesure de l'AMPc par dosage radioimmunologique et du Ca^{2+} intracellulaire par cytométrie en flux. Nous présentons aussi les résultats des effets de la 5-HT et l'ISO sur les taux d'AMPc et la mobilisation du Ca^{2+} dans les lymphocytes B.

Les résultats de cette annexe indiquent que la 5-HT n'inhibe pas l'activité AC, et n'induit pas de mobilisation de Ca^{2+} ni dans les cellules fraîches ni dans les blastes LPS. Ceci suggère que le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes B n'est pas couplé à ces deux signaux intracellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Mesure de l'AMPc

Les cellules spléniques fraîches ou en culture en présence ou en l'absence de LPS sont incubées avec 100 μM d'isobutyl methylxanthine (IBMX, inhibiteur des phosphodiésterases) pendant 60 minutes à 37°C et l'addition des stimuli dans des tubes en verre dans un volume final de 1 ml contenant 3×10^6 cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37°C après addition des différents agents pharmacologiques. La réaction est arrêtée en ajoutant 2 ml d'éthanol froid (-20°C). Les échantillons sont ensuite évaporés ou séchés (70°C), reconstitués dans 500 μl d'un tampon acétate de sodium (pH 6.2) et acétylés pour augmenter la sensibilité du dosage. Les taux d'AMPc sont déterminés par dosage radioimmunologique (RIA) à l'aide d'un kit commercial ^{125}I AMPc (Mandel Scientific). Les résultats sont exprimés en fmol/ 10^6 cellules et chaque point de mesure représente la moyenne arithmétique de 6 échantillons \pm SEM.

Mesure du calcium intracellulaire

La mobilisation du calcium intracellulaire a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'une sonde fluorescente Fluo-3. Les cellules spléniques fraîches ou en culture en présence du LPS sont resuspendues dans un tampon RPMI 1640 + 2% HEPES, pH 7.0 à une concentration de 1×10^6 cellules/ml. Elles sont ensuite chargées avec la sonde Fluo-3AM (1 μM) et du pluronic 25% (5 μM) pendant 45 minutes à la noirceur dans un bain agitateur à 37°C. À la fin de l'incubation, les cellules sont amenées à un volume de 10 ml avec un second tampon (RPMI 1640, 5% sérum de veau foetal (FBS), 2% HEPES (20 mM), pH 7.4) à une concentration de 5×10^5 cellule /ml pendant 15 minutes. Cette dernière incubation permet le clivage de la portion acétométhyl ester de la sonde internalisée. Les cellules sont

ensuite centrifugées à 800 x g pendant 10 minutes à 4°C (pour éliminer les fluorochromes non incorporés) et resuspendues dans un troisième tampon (RPMI 1640, 5 % FBS, 2 % Hepes (20 mM) et 10 µg/ml de DNase, pH 7.2). Après deux lavages, les cellules sont resuspendues dans ce même tampon à la concentration de 5 x 10⁶ cellules/ml, gardées à la température de la pièce et à la noirceur. La mesure de [Ca²⁺]_i se fait par cytométrie en flux à l'aide d'un FACStar Plus équipé d'un laser à l'argon pour une excitation dans le visible (Becton Dickinson). Des échantillons de 5 µl sont mis dans un tube de 2 ml qui est incubé dans un bain agitateur maintenu à 37°C. Les cellules au repos et les blastes LPS sont identifiés par leur taille et leur granulosité (FCS/SSC). La fluorescence basale est ajustée à 100 unités de fluorescence et les différents agents pharmacologiques sont ajoutés au bout de 2 minutes à la suspension cellulaire. Les changements de fluorescence résultants sont mesurés sur une période de 8 min. Les résultats sont analysés par le logiciel CHRONYS et exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

RÉSULTATS

Effet de 5-HT sur les taux d'AMPC dans les cellules spléniques fraîches et en culture pendant 48h

Le récepteur 5-HT_{1A} a la particularité d'être couplé de façon négative à l'adénylate cyclase. Nous avons alors déterminé l'effet de la 5-HT sur les taux d'AMPC stimulés par la forskoline (5x10⁻⁵M) dans les cellules spléniques fraîches et en culture avec LPS pendant 48 h. Nos résultats montrent que le taux basal (653.13 ± 399 fmol/10⁶ cellules) n'est pas influencé par l'état d'activation des cellules spléniques par le LPS (680.4 ± 309.9 fmol/10⁶ cellules). Cependant, le taux d'AMPC stimulé par de la forskoline est significativement important dans les blastes LPS (3336.24 ± 1733 fmol/10⁶ cellules) comparativement aux cellules fraîches (2136.36 ± 1403.8 fmol/10⁶ cellules) (p < 0.05). Par ailleurs, dans huit expériences, la 5-HT (10⁻⁴M) n'affecte pas les taux d'AMPC induits par la forskoline (5x10⁻⁵M).

5M) dans les cellules au repos (109.78% du contrôle) ni dans les blastes LPS (107.47% du contrôle) (tableau 1, annexe 1). Le DDA et le SQ qui sont des inhibiteurs directs de l'AC inhibent de façon significative le taux d'AMPc induit par la forskoline aussi bien dans les cellules fraîches (37.6% et 42%) que dans les blastes (48.5% et 68.5%).

Tableau 1: Effets de la 5-HT, du DDA, et du SQ sur les taux d'AMPc induits par la forskoline dans les cellules spléniques de souris

Cellules	Traitement	Taux d'AMPc (% du contrôle)
		$X \pm \text{SEM}$
Cellules fraîches	5-HT (10^{-4}M)	109.8 ± 15.4
	DDA (10^{-4}M)	$62.4 \pm 12.5 *$
	SQ ($5 \times 10^{-4}\text{M}$)	$58 \pm 24 *$
Blastes LPS	5-HT (10^{-4}M)	107.5 ± 19.6
	DDA (10^{-4}M)	$51.5 \pm 19.7 *$
	SQ ($5 \times 10^{-4}\text{M}$)	$31.45 \pm 21.7 *$

Les cellules spléniques fraîches ou les blastes LPS sont incubés pendant 30 minutes à 37°C après addition des différents agents pharmacologiques. Les concentrations finales de forskoline, 5-HT, DDA et SQ sont $5 \times 10^{-5}\text{M}$, 10^{-4}M , 10^{-4}M et $5 \times 10^{-4}\text{M}$ respectivement. Les taux d'AMPc sont déterminés par RIA. Les résultats sont exprimés en % du contrôle forskoline et chaque point de mesure représente la moyenne arithmétique de 6 échantillons \pm SEM. * $p < .05$ DDA/SQ+Forskoline vs Forskoline.

Effets de 5-HT et ISO sur la mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$ dans des cellules spléniques fraîches et en culture pendant 48 ou 72h

Nous avons comparé la réponse calcique induite par les monoamines 5-HT et ISO dans les cellules fraîches et en culture. La stimulation par les monoamines n'induit pas de mobilisation du Ca^{2+} ni dans les cellules fraîches ni dans les cellules en culture pendant 48 ou 72h (Figure 6). En revanche, l'anti-Ig M, activateur de la mobilisation du Ca^{2+} , induit une augmentation de l'IMF qui est transitoire avec un retour progressif à la ligne de base. De plus, nos résultats montrent que la 5-HT et l'ISO n'affectent pas la réponse calcique induite par l'anti-Ig M dans les cellules fraîches. Par ailleurs, l'ionomycine qui est un inophore qui traverse les membranes et mobilise le Ca^{2+} intracellulaire et extracellulaire stimule la réponse calcique dans les cellules fraîches et en culture.

L'ensemble de nos résultats montre que la 5-HT n'inhibe pas l'activité AC, et n'induit pas de mobilisation de Ca^{2+} ni dans les cellules fraîches ni dans les blastes LPS. Ceci suggère que le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes B n'est pas couplé à ces deux signaux intracellulaires.

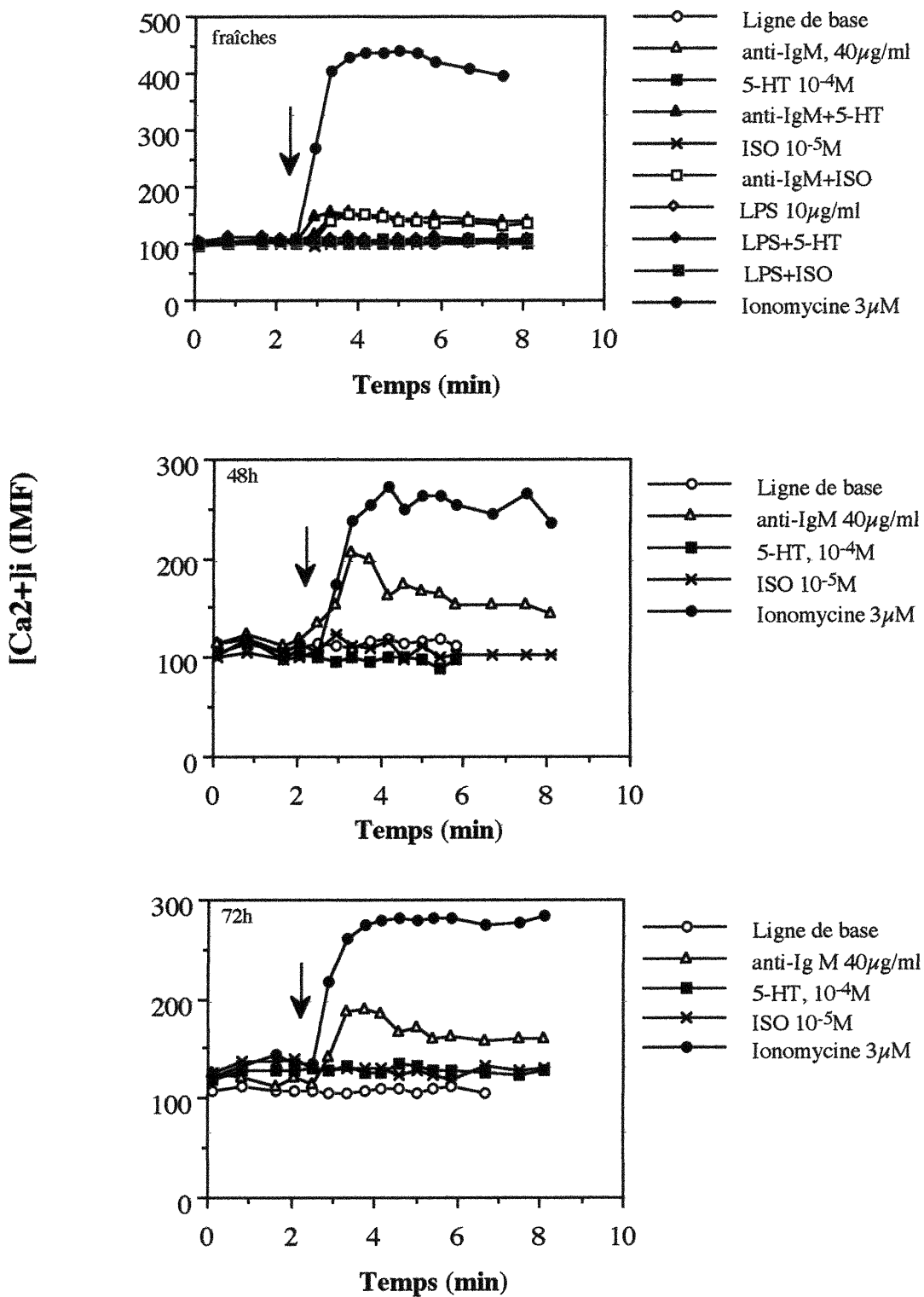


Figure 6: Effets de 5-HT et ISO sur la mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules spléniques fraîches et en culture pendant 48 ou 72h