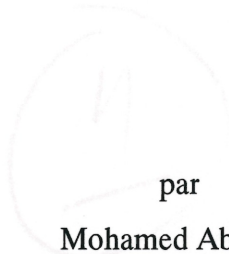


Université de Montréal

Récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes:
Surexpression et rôle fonctionnel dans la régulation de la survie
et de la prolifération des cellules activées



par

Mohamed Abdouh

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

Octobre, 2002

© Mohamed Abdouh, 2002



W
4
U58
2002
v.107

W
4
U58
2002
v.107

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes:
Surexpression et rôle fonctionnel dans la régulation de la survie
et de la prolifération des cellules activées

présentée par:

Mohamed Abdouh

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

André De Léan
président-rapporteur

Édouard Kouassi
directeur de recherche

Elliot A. Drobetsky
codirecteur

Martin G. Sirois
membre du jury

Mario Tiberi
examineur externe

représentant du doyen de la FES



SOMMAIRE

Le système immunitaire contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme en s'opposant à la pénétration d'agents extérieurs, en particulier des agents infectieux, et en éliminant les cellules malignes. L'activation des cellules du système immunitaire met en jeu plusieurs mécanismes de signalisation intracellulaire, incluant la translocation nucléaire du facteur de transcription ubiquitaire, NF- κ B. Celui-ci joue un rôle important dans les réponses immunes et inflammatoires, et particulièrement dans la prolifération et la survie des lymphocytes T et B. Le fonctionnement du système immunitaire est fortement régulé par les interactions entre les diverses cellules de ce système, et par l'action des anticorps et des cytokines. De plus, il existe des communications bidirectionnelles entre le système immunitaire et le système neuro-endocrinien par l'intermédiaire des neurotransmetteurs, hormones et cytokines qui agissent sur leurs récepteurs spécifiques. Les organes lymphoïdes primaires et secondaires sont innervés par des terminaisons nerveuses qui libèrent des neurotransmetteurs qui sont impliqués dans le contrôle de la différenciation, la prolifération et le fonctionnement des cellules immunitaires. En l'occurrence, la sérotonine est colibérée avec la noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses innervant les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les plaquettes, les mastocytes (chez les rongeurs), les monocytes et les lymphocytes T activés sont aussi des sources importantes de sérotonine au niveau des organes lymphoïdes et des sites inflammatoires. Plusieurs études suggèrent l'implication du système sérotoninergique dans la régulation de la réponse immunitaire. Cependant, les récepteurs impliqués dans ces effets ne sont pas encore bien caractérisés. Dans la présente étude, notre but était de caractériser le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes B et T, ses fonctions, et ses mécanismes de signalisation cellulaire. Les objectifs spécifiques étaient: (i) étudier et comparer l'expression du récepteur 5-HT_{1A} dans les lymphocytes T et B avant et après activation par des mitogènes; (ii) évaluer le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans la régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes; (iii) étudier le rôle du récepteur 5-HT_{1A} dans la régulation de la prolifération et la survie des lymphocytes; et (iv) évaluer l'implication du facteur de transcription NF- κ B dans les mécanismes de transduction du signal du récepteur 5-HT_{1A}

des lymphocytes. Les résultats montrent que les lymphocytes T et B expriment faiblement l'ARN messager 5-HT_{1A}, et le niveau d'expression est fortement augmenté après activation mitogénique. Les niveaux d'expression du 5-HT_{1A} sont comparables chez les deux populations de lymphocytes. Les mitogènes n'influencent pas la stabilité de l'ARN messager 5-HT_{1A}, mais son induction est bloquée par l'actinomycine D, et par les inhibiteurs du NF-κB. De plus, l'expression membranaire de la protéine 5-HT_{1A} augmente après stimulation mitogénique, en parallèle avec l'augmentation de la transcription de l'ARN messager. D'autres part, les agonistes sélectifs 5-HT_{1A} augmentent la prolifération et la survie des lymphocytes activés; ils inhibent la mort des lymphocytes par apoptose, en association avec une augmentation de la translocation du NF-κB dans le noyau. Ainsi, le facteur de transcription NF-κB joue un rôle central dans la surexpression du récepteur 5-HT_{1A} et dans la transmission des signaux de ce récepteur dans l'amélioration de la survie et l'augmentation de la prolifération des lymphocytes activés. Ces résultats suggèrent que le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes joue un rôle dans l'amplification des réponses immunes et inflammatoires, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle pour moduler l'immunité.

Mots-clés: Neuroimmunologie; sérotonine; récepteur 5-HT_{1A}; lymphocytes; prolifération; mort cellulaire; apoptose; survie cellulaire; transduction des signaux; facteur de transcription NF-κB.

SUMMARY

Inflammation and immune responses are regulated not only by immune cell interactions, antibodies, and cytokines, but also by neurotransmitters and their specific receptors expressed on B and T lymphocytes. Serotonin (5-HT) is a neuroimmunomodulator that is widely distributed in brain and peripheral tissues, and which is released by activated platelets during the course of tissue inflammation. The 5-HT_{1A} receptor, which belongs to G-protein-coupled receptor superfamily, is also widely distributed in brain and immune tissues. The aim of the present study was to further characterize the B and T lymphocyte 5-HT_{1A} receptor by evaluating its expression, functions, and signal transduction pathways using mouse splenocytes as a model system. Four specific objectives are outlined: (i) To study and compare 5-HT_{1A} receptor expression in resting and mitogen-activated B and T lymphocytes; (ii) To evaluate the role of the transcription factor NF- κ B in regulation of 5-HT_{1A} receptor expression during lymphocyte activation; (iii) To study the role of the 5-HT_{1A} receptor in regulation of lymphocyte proliferation and survival; and (iv) To evaluate the role of NF- κ B in the signaling mechanisms of lymphocyte 5-HT_{1A} receptor. Results showed that resting B and T lymphocytes express low levels of 5-HT_{1A} receptor mRNA, which is markedly increased after mitogenic stimulation. Purified B and T cells behave similarly in their basal and mitogen-induced 5-HT_{1A} mRNA expression. Mitogens did not alter 5-HT_{1A} mRNA stability, but induction of 5-HT_{1A} mRNA was blocked by the transcription inhibitor actinomycin D, and by inhibition of NF- κ B signaling. Additionally, mitogenic stimulation of transcription was paralleled by increased cell surface 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in splenocytes. Selective agonists of the 5-HT_{1A} receptor increased mitogen-induced B and T lymphocyte proliferation, cell survival, and nuclear translocation of the p50 and p65 subunits of NF- κ B. Together, these findings demonstrate that the lymphocyte 5-HT_{1A} receptor is involved in a positive regulatory loop of cell activation that critically utilizes NF- κ B signaling pathways first to increase cell surface expression of the receptor on activated lymphocytes, and then to augment lymphocyte proliferation and survival through interaction of 5-HT with the 5-HT_{1A} receptor. Thus, increased expression of the 5-HT_{1A} receptor in activated B and T lymphocytes may enhance the

immune response and provide therapeutic target for tissue inflammation and immune stimulation.

Keywords: Neuroimmunology; serotonin; 5-HT_{1A} receptor; lymphocytes; proliferation; cell death; apoptosis; cell survival; signal transduction; NF- κ B transcription factor.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiii
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1. Interactions neuro-endocrino-immunitaires	1
1.1. <i>Régulation intrinsèque de la réponse immunitaire</i>	1
1.2. <i>Liens bidirectionnels entre le système immunitaire et le système neuro-endocrinien</i>	3
1.2.1. <i>Modulation des fonctions neuro-endocriniennes par les cytokines</i>	3
1.2.2. <i>Modulation neurohormonale des réponses immunitaires</i>	6
1.2.3. <i>Bases moléculaires des interactions neuro-endocrino-immunitaires</i>	10
2. Immunorégulation par la sérotonine	13
2.1. <i>Préambule</i>	13
2.2. <i>Biosynthèse de la sérotonine</i>	13
2.3. <i>Métabolisme de la sérotonine</i>	15
2.4. <i>Distribution de la sérotonine</i>	15
2.5. <i>Récepteurs sérotoninergiques</i>	18
2.5.1. <i>Récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₁</i>	19
2.5.2. <i>Récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₂</i>	25
2.5.3. <i>Canal cationique 5-HT₃</i>	26
2.5.4. <i>Récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄</i>	27
2.5.5. <i>Récepteurs 5-HT₅</i>	28
2.5.6. <i>Récepteurs 5-HT₆</i>	28

2.5.7. Récepteurs 5-HT ₇	28
2.6. Effets de la sérotonine.....	28
2.6.1. Effets immunomodulateurs de la sérotonine.....	29
3. Le facteur de transcription NF-κB.....	34
3.1. Description du facteur de transcription NF-κB.....	34
3.2. Role du facteur de transcription NF-κB dans l'inflammation.....	40
3.3. Role du NF-κB dans la protection contre l'apoptose.....	41
3.4. Le NF-κB: Un médiateur central de la réponse immunitaire.....	44
3.5. Inhibiteurs du facteur de transcription NF-κB.....	45
3.6. Buts et objectifs spécifiques.....	49
CHAPITRE 2. Manuscrit I: Transcriptional Mechanisms for Induction of 5-HT_{1A}	
Receptor mRNA and Protein in Activated B and T Lymphocytes.....	50
SUMMARY.....	52
INTRODUCTION.....	53
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	55
Mice and Reagents.....	55
Isolation and Stimulation of Splenocytes.....	55
Purification of Resting and Activated B and T Lymphocytes.....	56
Proliferation Assay.....	56
RNA Preparation and RT-PCR.....	56
RNase Protection Assay.....	57
Immunocytofluorometry Analysis of 5-HT _{1A} Receptor Protein.....	58
Immunocytochemistry Analysis of 5-HT _{1A} Receptor Protein.....	59
Radioligand Binding Assay.....	59
RESULTS.....	60
5-HT _{1A} Receptor-Mediated Up-regulation of Mitogen-stimulated B and T.....	60
5-HT _{1A} Receptor mRNA Expression in Mitogen-Stimulated Splenocytes.....	60
5-HT _{1A} Receptor mRNA is Up-regulated in Activated B and T Lymphocytes.....	61
Transcriptional Mechanisms of Mitogen-induced 5-HT _{1A} Receptor mRNA Expression.....	62

5-HT _{1A} Receptor Protein Expression in Splenocytes and Up-regulation	63
DISCUSSION	65
Acknowledgments.....	68
REFERENCES.....	69
FIGURE LEGENDS	72
TABLE I.....	75

CHAPITRE 3. Manuscrit II: 5-HT_{1A}-Mediated Promotion of Mitogen-

Activated B and T Cell Survival and Proliferation is Associated with

Increased Translocation of NF- κ B in the Nucleus

ABSTRACT.....	85
INTRODUCTION	86
MATERIALS AND METHODS.....	88
Animals	88
Reagents	88
Spleen cell preparation and culture	88
Cell viability.....	88
Measurement of apoptotic cells and cell cycle analysis.....	89
Flow cytometric NF- κ B analysis	89
Statistical analysis	90
RESULTS	91
Serotonin decreases spleen lymphocyte cell death	91
5-HT _{1A} receptor-mediated protection against lymphocyte death.....	91
5-HT inhibits apoptosis through the 5-HT _{1A} receptor.....	91
5-HT _{1A} -mediated increase in S phase transition	92
5-HT increases NF- κ B activation through 5-HT _{1A} receptor.....	92
DISCUSSION	93
ACKNOWLEDGMENTS	95
REFERENCES.....	96
FIGURE LEGENDS	100
TABLE 1.....	101

TABLE 2.....	102
CHAPITRE 4. DISCUSSION	106
1. Caractérisation moléculaire du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes.....	106
<i>1.1. Étude de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes.....</i>	<i>106</i>
<i>1.2. Régulation de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes ...</i>	<i>107</i>
<i>1.3. Mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de l'ARNm 5-HT_{1A}</i>	<i>109</i>
<i>1.4. Augmentation de l'expression membranaire du récepteur 5-HT_{1A}.....</i>	<i>113</i>
2. Potentiel lymphotrophique et lymphoprotecteur de la sérotonine.....	115
<i>2.1. La sérotonine amplifie la prolifération des lymphocytes T et B via le 5-HT_{1A}.....</i>	<i>115</i>
<i>2.2. La sérotonine protège les lymphocytes contre la mort cellulaire par apoptose.....</i>	<i>118</i>
3. Le facteur de transcription NF-κB: un nouveau maillon dans les voies de signalisation du récepteur 5-HT_{1A}.....	121
4. Conclusion.....	124
Bibliographie	128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Récepteurs pour des neuropeptides, hormones et neurotransmetteurs exprimés par les leucocytes.....	11
Tableau II. Neuropeptides, hormones et neurotransmetteurs produits ou emmagasinés puis libérés par les cellules immunitaires.	12
Tableau III. Distribution et concentration de la sérotonine chez différents mammifères.....	18
Tableau IV. Agents activateurs et gènes régulés par le NF- κ B	42
Tableau V. Inhibiteurs du facteur de transcription NF- κ B	46
Tableau VI. Séquences du peptide synthétique inhibiteur du NF- κ B; NF- κ B SN50 et son analogue inactif SN50M.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Représentation schématique du réseau d'interaction entre le système neuroendocrinien et le système immunitaire.....	4
Figure 2.	Représentation schématique des deux axes majeurs qui régulent l'activité du système immunitaire; l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénalien et les innervations sympathiques.	7
Figure 3.	Biosynthèse de la sérotonine	14
Figure 4.	Métabolisme de la sérotonine.....	16
Figure 5.	Structure du récepteur 5-HT _{1A}	21
Figure 6.	Structure du gène du récepteur 5-HT _{1A} de la souris.....	24
Figure 7.	La sérotonine au niveau des organes lymphoïdes et des sites inflammatoires.....	30
Figure 8.	Schéma général d'activation du facteur de transcription NF-κB.	37
Figure 9.	Activation du NF-κB par l'IL-1 et le TNF.....	39
Figure 10.	Boucle d'amplification de la réponse inflammatoire	43
Figure 11.	Niveaux d'action des différents inhibiteurs des voies de signalisation NF-κB	48
Figure 12.	Modèle schématique explicatif de l'expression du récepteur 5-HT _{1A} des lymphocytes et les effets de la sérotonine sur ces cellules.	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

15-HETE	Acide 15-hydroxyeicosatétranoïque
3'UTR	Région non-traduite 3' (<i>3'-untranslated region</i>)
5-HT	5-hydroxytryptamine; sérotonine
5-HTT	Transporteur de sérotonine (<i>5-HT transporter</i>)
8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-(di-n-propyl-amino)tétraline
ACTH	<i>Adrenocorticotropin hormone</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
Bcl-xL	<i>B cell Leukemia</i> (membre de la famille des proto-oncogènes Bcl-2 ayant une activité anti-apoptotique)
BcR	Récepteur des lymphocytes B (<i>B cell receptor</i>)
Bfl1/A1	<i>Bone marrow and Fetal Liver gene</i> (membre de la famille Bcl-2 ayant une activité anti-apoptotique)
CD	Classe de différenciation (ex. CD4)
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavaleine A
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DTH	Réaction d'hypersensibilité de type retardé (<i>Delayed type hypersensitivity</i>)
DOI	1-(2,5-diméthoxy-4-iodophényl)-2-amino-propane;
ELAM	<i>Endothelial cell leucocyte adhesion molecule</i>
Fab	<i>Antigen-binding Fragment</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
Fc	Fragment cristallisable
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine

FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
GH	Hormone de croissance (<i>Growth hormone</i>)
GHRH	<i>Growth hormone-releasing hormone</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte and macrophage-colony stimulating factor</i>
GRM	Globules rouges de mouton
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IEX-1L	<i>Immediate early protein-one Large</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IκB	Sous-unité inhibitrice κB
IKK	IκB-kinase
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible (<i>inducible Nitric oxide synthase</i>)
Iono	Ionomycine
IP ₃	Inositol triphosphate
IRAK	<i>IL-1 Receptor-Associated Kinase</i>
JNK	<i>Jun N-terminal-Associated Kinase</i>
LAK	<i>Lymphokine-activated killer</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
LHRH	<i>LH-releasing hormone</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP-1α	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
NA	Noradrénaline, norépinephrine
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NIK	<i>NF-κB-Inducing Kinase</i>
NK	Cellules tueuses naturelles (<i>natural killer cells</i>)

NO	Oxyde nitrique (<i>Nitric oxide</i>)
Oct-2	<i>Octamer nuclear protein-2</i>
PCPA	Parachlorophénylalanine
PDTC	Pyrrolidinedithiocarbamate
PE	Phycoérythrine
PHA	Phytohémagglutinine
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol myristate acétate (ester de phorbol)
POMC	Pro-opio-mélanocortine (<i>Pro-opio-melanocortine</i>)
RH	<i>Releasing hormone</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
ROI	<i>Reactive oxygen intermediates</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription-Polymerase chain reaction</i>
RPA	Test de protection à la RNase (<i>RNase protection assay</i>)
TcR	Récepteur des lymphocytes T (<i>T cell receptor</i>)
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TPCK	<i>N-α-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone</i>
TRADD	<i>TNF Receptor-Associated Death Domain</i>
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TSH	<i>Thyrotropin-stimulating hormone</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humain

REMERCIEMENTS

Je désire sincèrement remercier le docteur Édouard Kouassi pour m'avoir si bien dirigé tout au long de mes travaux et pour la confiance qu'il a manifestée à mon égard.

Je tiens particulièrement à remercier le docteur Elliot Drobetsky pour m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire, pour ses judicieux conseils et ses encouragements permanents.

Également, je suis très reconnaissant au docteur Paul Albert qui m'a accueilli dans son laboratoire pour un stage, et à toute son équipe pour leur disponibilité.

Aussi, j'aimerais sincèrement remercier tous mes confrères et consœurs de laboratoire, particulièrement docteur Yves Paquette, docteur Khadija Iken, docteur Martin Loignon et Ousmane Diallo pour leurs apports techniques lors de mes expériences.

Finalement, je remercie toute ma famille pour m'avoir soutenu durant toutes mes études, et tous mes amis pour leurs encouragements et leur soutien moral.

À Sanela, Amine, Leila et Nadia

Merci pour votre patience

À ma défunte mère

À mon père, mes frères et sœurs

Zui m'ont mis sur le chemin de la science

CHAPITRE 1.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Interactions neuro-endocrino-immunitaires

La fonction du système immunitaire est de distinguer le soi du non soi, c'est-à-dire de lutter contre les agents exogènes et les tumeurs tout en restant tolérant vis-à-vis des molécules et composantes de l'organisme. Cette fonction est assurée par les lymphocytes B et T, les phagocytes et autres cellules accessoires, et par des molécules sécrétées (anticorps, facteurs du complément, cytokines et enzymes (i.e. perforines)).

La caractéristique principale de l'immunité réside dans l'activation des lymphocytes qui produisent des molécules effectrices très différentes selon qu'il s'agit de l'activation des lymphocytes B aboutissant à la synthèse d'anticorps médiateurs de l'immunité humorale, ou des lymphocytes T cytotoxiques médiateurs de l'immunité cellulaire. La mise en œuvre de ces réponses immunitaires nécessite la coopération des lymphocytes T auxiliaires via des molécules sécrétées, entre autres, les cytokines.

1.1. Régulation intrinsèque de la réponse immunitaire

Le régulation du fonctionnement du système immunitaire est basée sur la coopération directe entre les cellules immunitaires ou via des facteurs de sécrétion (cytokines et anticorps). Deux catégories de cytokines produites par deux clones de lymphocytes T auxiliaires assurent la régulation des deux types de réponses immunitaires (Vassalli, 1992; Baron, 1991; Fiorentino et coll., 1989). Les lymphocytes T_H1 produisent l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- β , et sont impliqués dans l'initiation de la réponse à médiation cellulaire. Les lymphocytes T_H2 sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13, et sont impliqués dans l'amorce de la réponse humorale. La non spécificité de l'action des cytokines par opposition à la spécificité des réponses immunitaires humorale et cellulaire est conciliée par la régulation de l'expression des récepteurs spécifiques à ces cytokines à des moments précis de la réponse immunitaire. En effet, le récepteur pour une cytokine n'est exprimé qu'à la suite de l'interaction cellule-antigène. Dans ce cas, la non-spécificité de l'action des cytokines est limitée aux lymphocytes activés par

l'antigène. Une autre façon de limiter la non-spécificité de l'action des cytokines est le fait que la réaction immunitaire nécessite des interactions cellulaires directes ce qui limite le champ d'action des cytokines. De plus, la demi-vie relativement courte des cytokines fait en sorte que leur action est limitée dans le temps. D'autre part, les anticorps régulent la réponse humorale; les IgM l'amplifient alors que les IgG la répriment (Cozenza et coll., 1976). Ceci est important vu que les IgM sont sécrétées au début de la réponse humorale, alors que les IgG ne s'expriment que plus tardivement.

De leur côté, les macrophages, en apprêtant l'antigène, stimulent la réponse immunitaire. Mais, en plus de présenter l'antigène aux lymphocytes, ils libèrent différentes cytokines qui amplifient l'activité des lymphocytes (Arai et coll., 1990). Les prostaglandines produites en particulier par les phagocytes, suite à un stimulus inflammatoire, répriment la réponse humorale et inhibent la libération d'IL-1 et IL-2 (Ignatowski et Spengler, 1995; Kunkel et coll., 1988; Goodwin et Ceuppens, 1983; Davies et coll., 1979). D'autres molécules inflammatoires (leukotriènes, histamine, acide 15-hydroxyeicosatétranoïque; 15-HETE) ont une activité immunorégulatrice négative.

Les mécanismes de contrôle dépendant des cytokines agissent également par voie indirecte via des boucles de rétrocontrôle impliquant l'axe neuro-endocrinien. C'est le cas de l'IL-1 qui régule l'activité de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale. Elle agit sur les cellules pituitaires, la surrénale ou l'hypothalamus (Bernton et coll., 1987). Les hormones sécrétées agissent par un mécanisme de rétrocontrôle sur les cellules immunitaires en se liant à des récepteurs spécifiques.

La nutrition joue un rôle essentiel dans les fonctions immunologiques (Gershwin et coll., 1985; Cerra, 1991). Une déficience cuprique est accompagnée salmonellose létale, de diarrhées sévères, de broncho-pneumonies et d'infections bactériennes (Prohaska et Lukasewycz, 1981). De plus, une déficience en zinc induit une diminution du chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes (Reinhold et Ansorge, 1999).

Il s'avère donc que le fonctionnement du système immunitaire est basé sur une coopération entre les cellules immunitaires qui est tantôt directe et tantôt assurée par des facteurs de sécrétion. En outre, d'autres systèmes physiologiques et molécules biologiques interagissent avec les composantes du système immunitaire pour produire la réponse immunitaire la plus appropriée en vue d'éliminer les corps envahisseurs sans

grand dommage pour les tissus et organes de l'hôte. Dans la prochaine section, nous allons décrire les interactions neuro-endocrino-immunitaires.

1.2. Liens bidirectionnels entre le système immunitaire et le système neuro-endocrinien

Plusieurs évidences militent en faveur de l'existence de liens bidirectionnels entre les systèmes neuro-endocrinien et immunitaire; (1) ces deux systèmes partagent des molécules et récepteurs communs, (2) le système immunitaire, par le biais des cytokines, module les fonctions neuro-endocriniennes, et (3) le système neuro-endocrinien, via des neurotransmetteurs, neuropeptides et hormones, régule les fonctions des cellules immunitaires (Khansari et coll., 1990) (Figure 1). Des études expérimentales et cliniques démontrent que les stress psychologiques (deuil, séparation) et physiques (exercice, chaleur) influencent profondément les réponses immunitaires. La prolifération des lymphocytes et la production d'anticorps et de cytokines sont réduites chez des macaques séparés de leur environnement social (Dobbs et coll., 1996; Coe, 1993).

Des études cliniques, menées chez des sujets ayant des difficultés dans leur vie conjugale et chez des étudiants en période d'examen académique, ont démontré une altération de leur immunocompétence (Glaser et Kiecolt-Glaser, 1994). Aussi, l'exercice physique affecte l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale et par conséquent les réponses immunitaires (Hoffman-Goetz et Pedersen, 1994). Celle-ci inclut une baisse de l'activité des cellules NK et T, et de la réponse lymphoproliférative.

1.2.1. Modulation des fonctions neuro-endocriniennes par les cytokines

Lors d'une infection, les taux d'hormones hypophysaires produits sont similaires à ce qui est produit au cours d'un stress. Une augmentation de la production d'ACTH, de prolactine et d'hormone de croissance (GH) est observée. Ces actions sont exercées par les cytokines qui modulent les taux d'hormones hypothalamiques qui régulent, à leur tour, ceux des hormones hypophysaires, ou directement par l'action des cytokines sur l'hypophyse en modulant son activité ou sa réponse aux hormones hypothalamiques (McCann et coll., 1994).

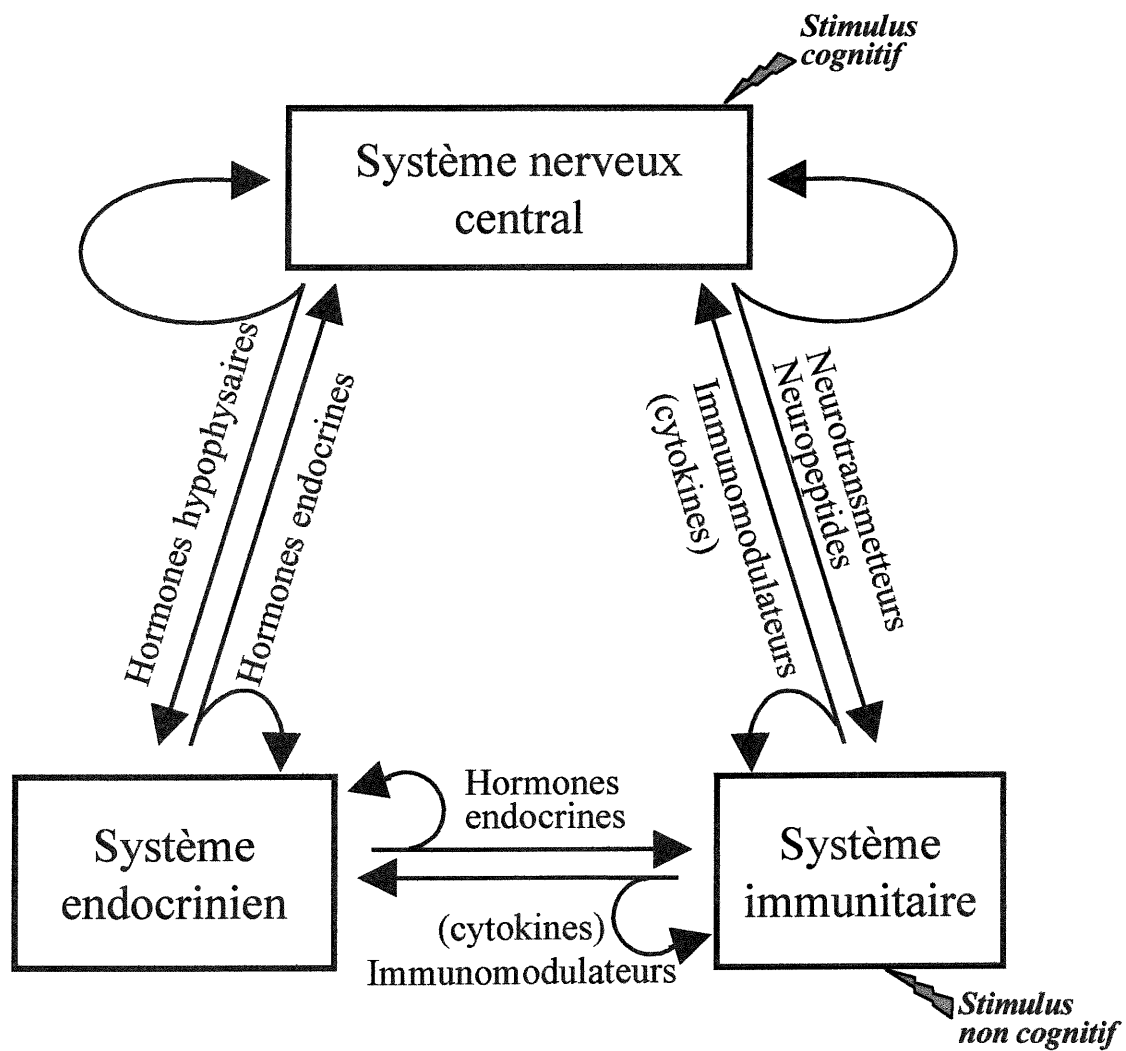


Figure 1. Représentation schématique du réseau d'interaction entre le système neuroendocrinien et le système immunitaire (lire les détails dans le texte).

1.2.1.1. Effets hypophysaires des cytokines

Différentes cytokines (IL-1, IL-2, IL-6 et thymosine α_1) stimulent la sécrétion d'ACTH et de la pro-opio-mélanocortine (POMC) en agissant directement sur les cellules hypophysaires (Denicoff et coll., 1989; Fukata et coll., 1989; Naitoh et coll., 1988; Kehrer et coll., 1988). Au contraire, le TNF- α inhibe les sécrétions d'ACTH, LH, prolactine et GH stimulées par leurs facteurs hypothalamiques hypophysiotropes respectifs, à savoir le CRH, le LHRH, le TRH et le GHRH (Gaillard et coll., 1990).

1.2.1.2. Effets hypothalamiques des cytokines

Les cytokines (IL-1, IL-2, et IL-6) induisent une augmentation rapide des concentrations plasmatiques d'ACTH due à la libération du CRH hypothalamique dans la circulation porte hypophysaire (Cambroner et coll., 1992; Navarra et coll., 1990; Sapolsky et coll., 1987). En plus, les cytokines influencent aussi la régulation hypothalamique des axes gonadotrope, somatotrope et thyroïdienne. Ainsi, l'IL-1 inhibe la synthèse et la sécrétion de LHRH, de GHRH et de TRH (Kalra et coll., 1990).

1.2.1.3. Modulation de l'activité surrénalienne par les cytokines

Les cytokines (IL-1, IL-2 et IL-6) stimulent la libération de glucocorticoïdes en agissant directement sur les surrénales ou via l'activation de la CRH hypothalamique (Tominaga et coll., 1991). La présence d'un système CRH/ACTH intrasurrénalien, qui transmet l'action stimulatrice des cytokines sur la surrénale, a été aussi rapporté (Andreis et coll., 1991).

1.2.1.4. Effets des cytokines au niveau d'autres régions du système nerveux central

Plusieurs cytokines (IL-1, IFN- α et γ) sont capables d'activer le système nerveux sympathique (Shimizu et coll., 1994; Take et coll., 1993; Vriend et coll., 1993; Brown et coll., 1991; Sundar et coll., 1990). L'activité des neurones sérotoninergiques est aussi augmentée suite à la stimulation du système immunitaire. En effet, l'immunisation avec le lipopolysaccharide (LPS) et les globules rouges de mouton (GRM) induit une

augmentation de la libération de sérotonine au niveau de l'hippocampe et du cortex frontal (Linthorst et coll., 1995; Gardier et coll., 1994). Cet effet semble s'exercer par l'intermédiaire des IL-1 β , l'IL-6 et GM-CSF (Besedovsky et Del Rey, 1992).

1.2.2. Modulation neurohormonale des réponses immunitaires

Les hormones, les neuropeptides et les neurotransmetteurs influencent les processus immunitaires (Figures 1 et 2) (Weigent et Blalock, 1987; Blalock, 1984). Selon le type d'hormones, l'effet sur la réponse immunitaire sera une immunopotentialisation ou une immunosuppression. Des structures du cerveau peuvent moduler l'activité du système immunitaire par le biais de changements dans l'activité sympathique, parasympathique et celle de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale. Par exemple, la lésion de l'hypothalamus, des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques affecte l'activité des cellules NK et la prolifération des lymphocytes (Masek et coll., 1992; Cross et coll., 1980). De plus, un dysfonctionnement de la réponses immunitaires a été décrit chez des sujets schizophréniques et parkinsoniens (De Lisi et coll., 1983; Martilla et coll., 1984), du à un désordre dans la transmission dopaminergique au niveau des systèmes limbique et nigrostriatal.

1.2.2.1. Effets immunomodulateurs de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale

Plusieurs constatations révèlent que les corticostéroïdes ont un pouvoir immunosuppresseur. En effet, le rythme circadien du cortisol est inversement proportionnel aux proportions des lymphocytes T et B, des monocytes, et des cellules NK dans le sang, et aux taux sériques d'anticorps et de cytokines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF, IFN- γ , GM-CSF) (Travaglini et coll., 1992; Boumpas et coll., 1991; Berczi, 1986).

L'ACTH et la CRH ont aussi des fonctions immunorégulatrices (Gatti et coll., 1993; Audhya et coll., 1991; Johnson et coll., 1984). La CRH a une action anti-inflammatoire en la diminuant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1) et le recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires (Casadevall et coll., 1999).

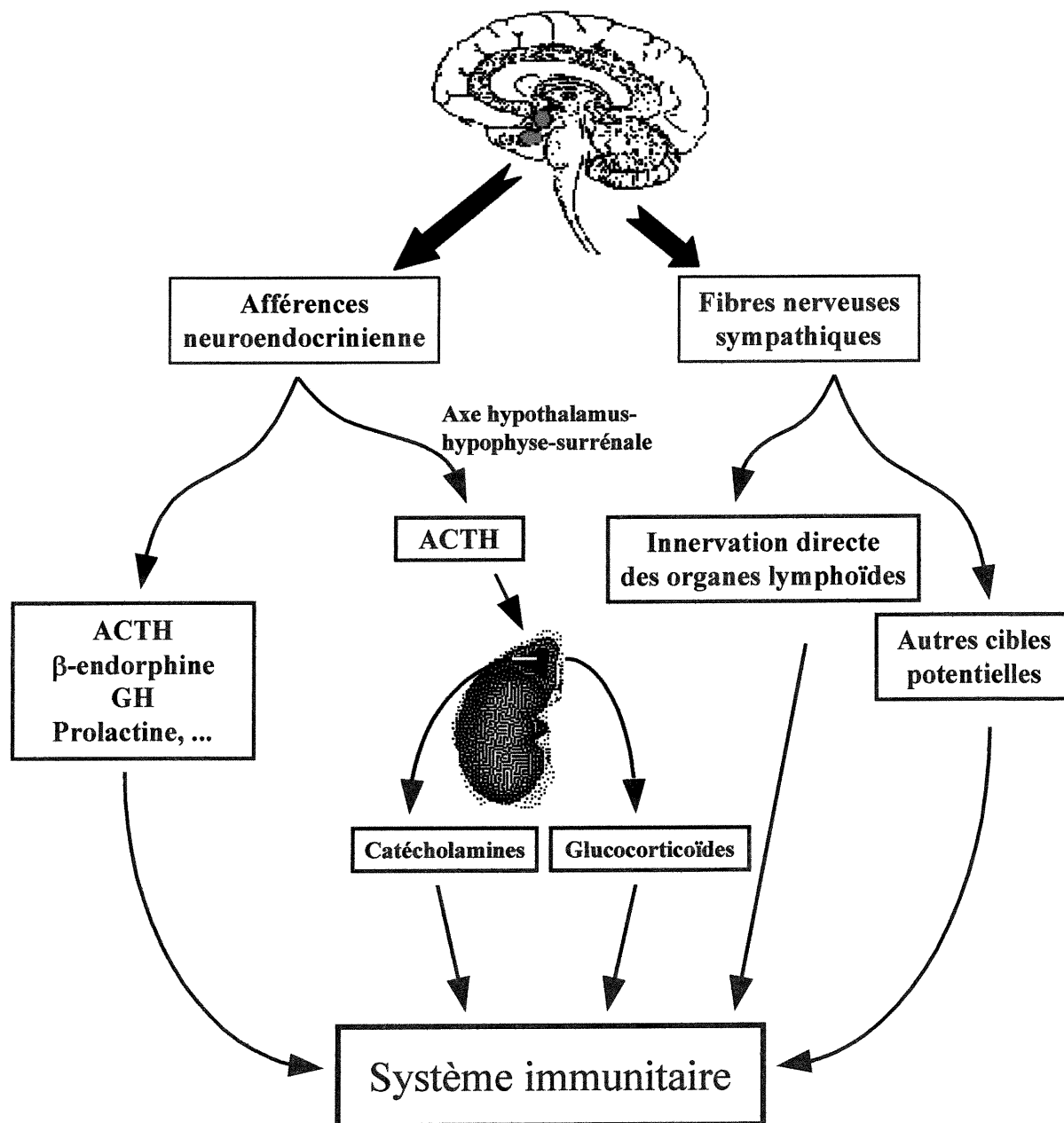


Figure 2. Représentation schématique des deux axes majeurs qui régulent l'activité du système immunitaire; l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénalien et les innervations sympathiques.

1.2.2.2. Immunomodulation par les neuropeptides et les hormones

Bien que produit principalement au niveau de l'hypothalamus, le LHRH est également produit au niveau du thymus, la rate et les lymphocytes (Azad et coll., 1993; Maier et coll., 1992; Azad et coll., 1991). À ces niveaux, il augmente la prolifération des thymocytes et les réponses immunitaires cellulaires et humorales (Jacobson et coll., 1994; Morale et coll., 1991; Marchetti et coll., 1989).

Les hormones sexuelles sont généralement immunosuppressives. L'oestradiol diminue l'activité des cellules NK (Ferguson et McDonal, 1985). Des patientes, ayant un degré sévère d'endométriose, ont un taux sérique d'oestradiol élevé et une activité NK basse en comparaison avec des sujets sains (Garzetti et coll., 1993).

De leur côté, les hormones thyroïdiennes (TSH) et thyroïdiennes influencent la différenciation et l'activité des cellules NK en augmentant leur sensibilité à l'IL-2 et à l'IFN (Provinciali et coll., 1992; Provinciali et Fabris, 1990; Stein-Streilein et coll., 1987). Aussi, la triiodothyronine augmente la production de la thymuline en agissant directement sur les cellules épithéliales thymiques (Savino et coll., 1984).

Avec les glucocorticoïdes, la prolactine joue un rôle clé dans la régulation des réponses immunitaires en cas de stress (Gala, 1991; Gala, 1990). Elle augmente la prolifération et la survie des cellules immunitaires, et les réponses à médiation cellulaire et humorale (Neidhart, 1997; Moreno et coll., 1994; Chikanza et Panayi, 1991). Quant à ses effets sur les cellules NK, les données sont controversées; des concentrations physiologiques de prolactine augmentent l'activité NK et LAK (lymphokine-activated killer), alors que des concentrations pathologiquement élevées l'inhibent (Cesario et coll., 1994). Ceci suggère que la prolactine est impliquée dans l'étiologie de l'endométriose via ses effets sur les cellules NK (Radwanska et coll., 1987). De plus, les effets de la prolactine sur les réponses immunitaires sont à l'origine de maladies auto-immunes et allergiques (Straub et coll., 1997; Buskila et coll., 1995; Halko et coll., 1995; Jara et coll., 1991; Ferrari et coll., 1983).

Parmi ses fonctions pléiotropiques, l'hormone de croissance (GH) accélère le taux de reconstitution des cellules immunitaires chez des sujets ayant une cytoréduction hématopoïétique. C'est le cas chez de patients infectés au virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Aussi, la GH augmente la croissance du thymus, le poids des organes

lymphoïdes, la prolifération et l'activité des cellules immunitaires, et la production de différentes cytokines (Chen et coll., 1998; Postel-Vinay et coll., 1997; Bidlingmaier et coll., 1997; Auernhammer et coll., 1995; Murphy et coll., 1992; Timsit et coll., 1992).

1.2.2.3. Effets immunomodulateurs des neurotransmetteurs

Quatre critères peuvent justifier qu'un neurotransmetteur est impliqué dans les interactions neuro-immunitaires (Ader et coll., 1995): (1) la présence de terminaisons nerveuses, contenant le neurotransmetteur, au contact des organes lymphoïdes, (2) la présence du neurotransmetteur dans le microenvironnement des cellules immunitaires, (3) la présence de récepteurs spécifiques à ce neurotransmetteur sur ces cellules cibles et (4) la caractérisation de fonctions immunorégulatrices de ce neurotransmetteur.

1.2.2.3.1. Régulation des réponses immunitaires par les catécholamines

Les organes lymphoïdes sont innervés par des terminaisons nerveuses sympathiques, parasympathiques et opioïdiques (Jankovic et coll., 1993; Maestroni et coll., 1986). Elles y parviennent en parallèle avec les vaisseaux sanguins et se ramifient vers le cortex et la medulla où elles forment un semblant de synapses avec les cellules immunitaires (Felten et Felten, 1991; Felten et Olschowka, 1987). Des études de localisation par histochimie et immunochimie des neurotransmetteurs dans ces fibres nerveuses stipulent que la présence de ces molécules serait due à une synthèse *de novo* par les fibres nerveuses et à un recaptage de ces médiateurs par ces fibres (Vizi et coll., 1995; Felten et coll., 1991). Dans le microenvironnement des fibres noradrénergiques innervant la rate, des concentrations aussi élevées qu'un micromolaire (1 μ M) de noradrénaline sont retrouvées au contact des lymphocytes (Felten et coll., 1986).

Ceci suggère que les catécholamines (noradrénaline, adrénaline et dopamine) sont impliquées dans la régulation de plusieurs facettes des réponses immunitaires; à savoir la différenciation des cellules immunitaires, leur migration en périphérie, leur prolifération et la production d'anticorps et de cytokines (Pastores et coll., 1996; Madden et coll., 1995; Butcher, 1990; Felten et coll., 1987; Besedovsky et coll., 1979).

Dans notre laboratoire, nous avons montré que la noradrénaline et l'isoprotérénol augmentent la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS (Kouassi et coll., 1988), et celle des lymphocytes T stimulés par la PHA et la ConA (non publié). Aussi, les catécholamines amplifient l'activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK (Benschop et coll., 1993; Felten et coll., 1987). Il jouent ainsi un rôle dans la surveillance immunologique contre les tumeurs (Bovbjerg, 1991).

1.2.2.3.2. Immunorégulation par les opioïdes et les opiacées

Les opioïdes participent à la régulation des phases initiales des réponses inflammatoires et immunitaires (Mörch et Pedersen, 1995). La β -endorphine et la Met-enképhaline augmentent l'adhérence et le chimiotactisme des neutrophiles, macrophages et lymphocytes aux sites infectieux (Shipp et coll., 1991; Heagy et coll., 1990). En revanche, les opiacés sont immunosuppresseurs. La morphine, la méthadone et l'héroïne inhibent la prolifération des lymphocytes B, la production de cytokines, l'activité phagocytaire des macrophages et l'activité cytolytique des cellules NK (Thomas et coll., 1995a; Thomas et coll., 1995b; Szabo et coll., 1993).

1.2.3. Bases moléculaires des interactions neuro-endocrino-immunitaires: signaux extracellulaires et récepteurs communs

Les mécanismes de communication entre le système immunitaire et le système neuroendocrinien impliquent l'utilisation réciproque de molécules solubles et l'expression des récepteurs appropriés par les cellules des deux systèmes. Dans le cas des cellules immunitaires, la présence de récepteurs pour différentes hormones, neuropeptides et neurotransmetteurs a été démontrée par plusieurs groupes (Tableau I).

D'autres part, des sites de liaison spécifiques pour différentes cytokines sont distribués dans le système nerveux central (Sei et coll., 1995; Koenig, 1991; Schettini, 1990).

Tableau I. Récepteurs pour des neuropeptides, hormones et neurotransmetteurs exprimés par les leucocytes.

Molécules	Récepteurs	Types de cellules	Références
* ACTH	ACTH-R	Lymphocytes Lymphocytes B	Smith, 1987 Bost, 1987
* A et NA	β_2 -adrénergique	Lymphocytes B et T Thymocytes Cellules NK Monocytes	Fuchs, 1988; Benschop, 1996 Marchetti, 1990 Jetschmann, 1997 Abrass, 1985
	α -adrénergique	Cellules NK	Jetschmann, 1997
* CGRP	CGRP-R	Lymphocytes pré-B Lymphocytes T Thymocytes Monocytes Cellules dendritiques	McGillis, 1991 Bulloch, 1991 Bulloch, 1991 Nong, 1989 Hosoi, 1993
* CRH	CRH-R	Lymphocytes T Monocytes Neutrophiles	Singh, 1988; Radulovic, 1999 Singh, 1988; Radulovic, 1999 Radulovic, 1999
* GH	GH-R	Lymphocytes Thymocytes Monocytes	Badolaro, 1994; Yang, 1999 De Mello-Coelho, 1998 Yang, 1999
* LHRH	LHRH-R	Lymphocytes Thymocytes	Standaert, 1992 Marchetti, 1989
* Opioides	μ -, δ -, κ -opioïdes δ -opioïdes δ -, κ -opioïdes μ_3 -, δ -, κ -opioïdes ?	Lymphocytes B et T T CD4 Thymocytes Monocytes Polynucléaires	Stefano, 1992; Bidlack, 1992 Miller, 1996 Lawrence, 1995; Sedqi, 1996 Carr, 1991; Dobrenis, 1995 Falke, 1985
* Prolactine	PRL-R	Lymphocytes B et T Thymocytes	Gagnerault, 1993 Gagnerault, 1993

Quant aux signaux extracellulaires, plusieurs hormones, neuropeptides et neurotransmetteurs sont drainés dans les organes lymphoïdes ou synthétisés localement

par les cellules immunitaires (Tableau II). Ces molécules peuvent donc exercer des actions endocrines, paracrines ou autocrines sur les leucocytes.

Tableau II. Neuropeptides, hormones et neurotransmetteurs produits ou emmagasinés puis libérés par les cellules immunitaires.

Molécules	Types de cellules	Références
* ACTH	Lymphocytes Lymphocytes T CD4 Macrophages	Crofford, 1992; Stephanou, 1990 Zurawski, 1986; Smith, 1986 Lolait, 1984
* Noradrénaline	Macrophages	Inoue, 1993
* Hormone de croissance	Lymphocytes B et T Thymocytes	Binder, 1994; Rohn, 1995; Yang, 1999 Binder, 1994; Yang, 1999
* LHRH	Lymphocytes Thymocytes	Azad, 1991; Azad, 1993 Maier, 1992
* Opioïdes	Lymphocytes Lymphocytes T CD4 Macrophages	Smith, 1981; Pinerai, 1991 Zurawski, 1986 Lolait, 1984
* Prolactine	Lymphocytes Thymocytes	Montgomery, 1992 Montgomery, 1992

Il ressort de cette revue de la littérature que les systèmes neuroendocrinien et immunitaire partagent des signaux extracellulaires et des récepteurs qui leur permettent de s'autoréguler et de communiquer entre eux pour maintenir le bon fonctionnement de l'organisme. Plus on comprendra la nature de ces interactions, mieux on interprétera les effets de la dérégulation de ces communications sur la susceptibilité à certaines maladies. Par exemple, comment la perturbation des réponses endocriniennes (i.e. suite à un stress) peut affecter le développement de maladies auto-immunes?

D'autres composantes nerveuses peuvent être impliquées dans la régulation du système immunitaire. Le système sérotoninergique en est un, et pour lequel peu d'études ont été effectuées pour comprendre ses effets sur le système immunitaire et les

récepteurs à la sérotonine qui seraient responsables de ces effets. Dans la prochaine section, nous discuterons du système sérotoninergique et ferons une analyse des données de la littérature rapportées sur l'implication de la sérotonine et des récepteurs sérotoninergiques dans les interactions neuro-immunitaires.

2. Immunorégulation par la sérotonine

2.1. Préambule

La sérotonine (5-hydroxytryptamine; 5-HT) est un neurotransmetteur du système nerveux central. Elle joue un rôle clé dans plusieurs fonctions cognitives telles que l'appétit, le sommeil, la douleur, l'apprentissage, la dépression et l'anxiété (Pramod, 1995; Charney et coll., 1990; Blier et coll., 1987). Ces effets s'exercent via une pléiade de récepteurs localisés dans différentes régions du cerveau principalement le système limbique (Hoyer et Martin, 1997; Pompeiano et coll., 1992; Törk, 1990) et dont le 5-HT_{1A} est le mieux caractérisé. Ce dernier est largement distribué en dehors du système nerveux central, en l'occurrence au niveau des organes lymphoïdes (Kobilka et coll., 1987). Dans les prochaines sections, nous allons discuter de la synthèse de la sérotonine, sa distribution, ses récepteurs et ses effets, spécifiquement dans l'immunorégulation.

2.2. Biosynthèse de la sérotonine

La biosynthèse de la sérotonine est un processus à deux étapes (Figure 3). Elle inclut l'hydroxylation du tryptophane en position 5 du noyau indole pour produire la 5-hydroxytryptophane. Cette réaction est catalysée par la tryptophane 5-hydroxylase, et elle représente une étape limitante dans la biosynthèse de la sérotonine (Ashcroft et coll., 1965). Cette enzyme est largement distribuée dans différents tissus et organes, ce qui témoigne du large spectre de distribution de la sérotonine (mastocytes, tumeurs carcinoïdes, muqueuse intestinale, rein, cerveau, rate, foie, moelle osseuse). Cette hydroxylation est suivie par la décarboxylation non spécifique de la 5-hydroxytryptophane en sérotonine; réaction catalysée par la L-acide aminé aromatique décarboxylase (Udenfriend et coll., 1953). Cependant, il faut noter que, même si les

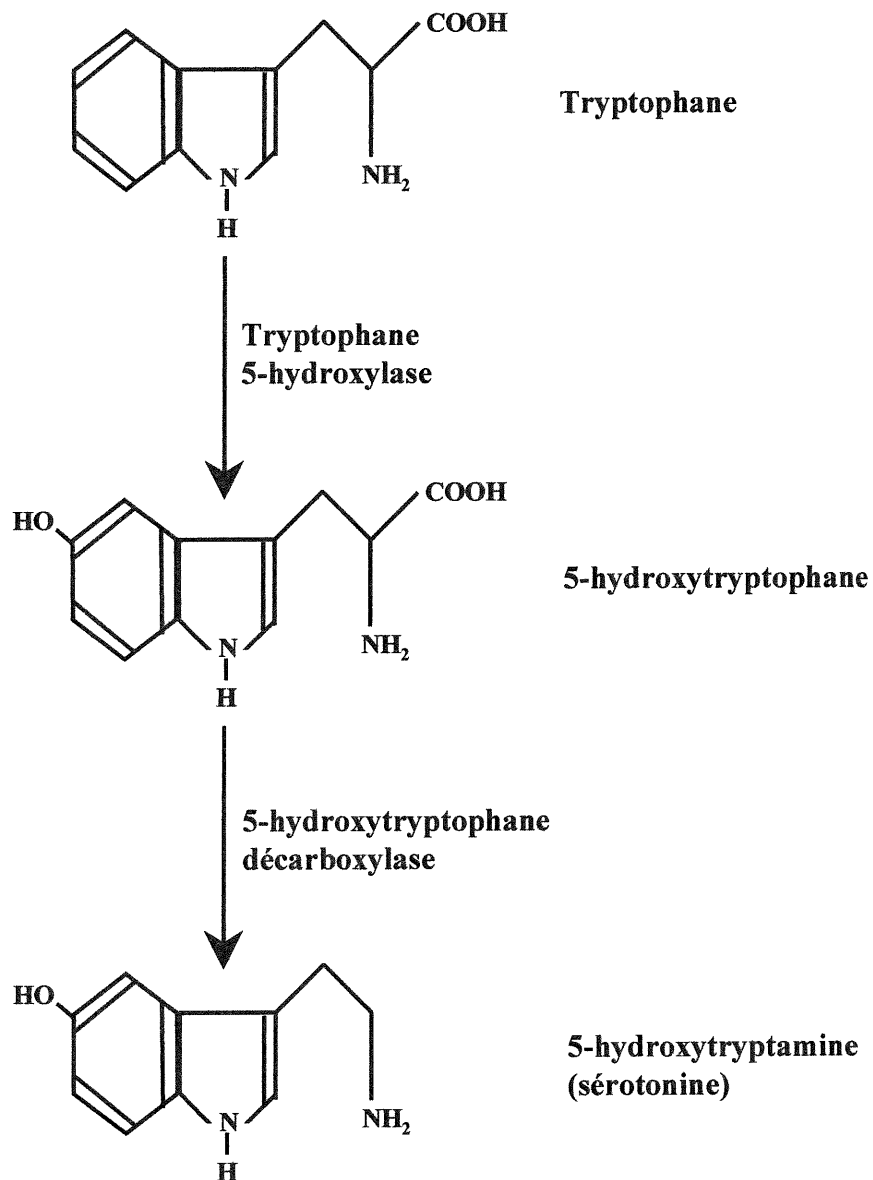


Figure 3. Biosynthèse de la sérotonine. La biosynthèse de la sérotonine inclut une hydroxylation initiale du tryptophane en position 5 du noyau indole pour produire la 5-hydroxytryptophane. Cette réaction est catalysée par la tryptophane 5-hydroxylase. Elle est suivie par la décarboxylation non spécifique de la 5-hydroxytryptophane en sérotonine; réaction catalysée par la L-acide aminé aromatique décarboxylase.

plaquettes sont un grand réservoir de sérotonine, elles ne possèdent aucune de ces deux enzymes (Udenfriend et Weissbach, 1954). Ceci stipule que toute la sérotonine plaquettaire est emmagasinée dans ces organelles par un système de transporteurs.

2.3. Métabolisme de la sérotonine

La voie principale du catabolisme de la sérotonine est la formation de l'acide 5-hydroxyindoleacétique (Udenfriend, 1958) (Figure 4). Ce processus est composé de deux étapes. Une déamination oxydative de la sérotonine en 5-hydroxyindoleacétaldéhyde et suivie par la conversion de ce dernier en acide 5-hydroxyindoleacétique. En outre, l'aldéhyde intermédiaire peut être réduit en 5-hydroxytryptophole. D'autres part, la sérotonine peut être convertie par des réactions de conjugaison impliquant son interaction avec le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate pour donner la sérotonine-O-sulfate, ou avec l'acide uridine diphosphoglucuronique pour donner la sérotonine-O-glucuronide. La sérotonine peut aussi être transformée en mélatonine par sa conversion en N-acétylsérotonine suivie par la conversion de cette dernière en mélatonine (Axelrod et Weissbach, 1960) (Figure 4).

2.4. Distribution de la sérotonine

La distribution et les concentrations respectives de la sérotonine dans certains tissus, organes et fluides sont résumées dans le Tableau III. La sérotonine est produite dans différents emplacements dans le cerveau. En dehors du système nerveux, elle est synthétisée par les cellules entérochromaffines (Newson et coll., 1979).

La sérotonine est trouvée en grandes quantités au niveau des plaquettes et des mastocytes (uniquement chez les rongeurs). Les plaquettes sont extrêmement riches en sérotonine et presque toute la sérotonine en circulation y est contenue. Ils représentent donc la fraction mobile de sérotonine, et les mastocytes sa portion stationnaire dans différents tissus (Essman, 1978). Les quantités de sérotonine peuvent être augmentées dans plusieurs endroits suite à l'agrégation plaquettaire. En l'occurrence, lors d'une réaction inflammatoire, les plaquettes adhèrent à l'endothélium où elles s'activent, s'agrègent et amorcent la libération de la sérotonine par exocytose (Essman, 1978).

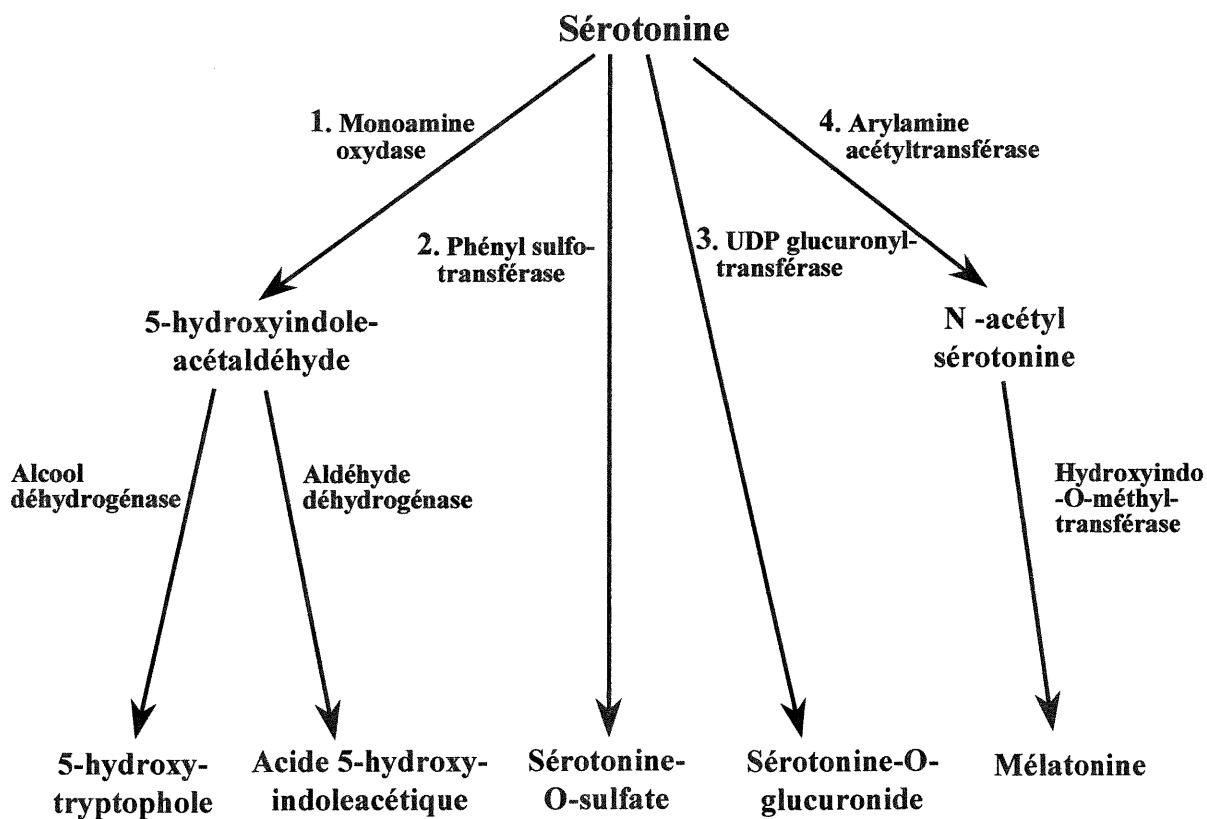


Figure 4. Métabolisme de la sérotonine. La sérotonine subit différentes réactions métaboliques impliquant des réactions d'oxydation (MAO) (1), de conjugaison (2, 3) et de conversion (4).

C'est le cas au niveau du liquide synovial chez des patients ayant l'arthrite rhumatoïde ou l'ostéoarthrite. Ceci est important vu que cette amine peut réguler la réaction inflammatoire. La sérotonine est aussi libérée par les mastocytes activés par l'antigène, les anticorps de classe IgE et les ionophores calciques (Matsuda et coll., 1995; Coleman et coll., 1991; Crivellato et coll., 1991).

La sérotonine est aussi présente au niveau des organes lymphoïdes; à savoir le thymus, la moelle osseuse hématopoïétique, la rate, les ganglions et le tissu lymphoïde associé à l'intestin, des sites inflammatoires et des cellules immunitaires. Au niveau de la rate, la sérotonine est larguée par les plaquettes (Waalkes et Coburn, 1959), et est colibérée avec la noradrénaline par les terminaisons nerveuses noradrénergiques (Felten et coll., 1985; Cohen, 1985). La sérotonine au niveau de ces fibres noradrénergiques, est accumulée par les terminaisons nerveuses au niveau des muscles lisses vasculaires suite à l'agrégation plaquettaire, fort probablement par le 5-HTT. Après son accumulation, elle est libérée suite à l'activation de la fibre noradrénergique (Verbeuren et coll., 1983). Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces terminaisons nerveuses forment des structures semblables aux synapses avec les lymphocytes et les macrophages (Felten et Olschowka, 1987). Des études de microdialyse montrent qu'au niveau des régions innervées, des concentrations de sérotonine aussi élevées que 3 μM existent aux jonctions fibres-lymphocytes (Mössner et Lesch, 1998). Cependant, dû aux limites du dosage de la sérotonine *in vivo*, ces concentrations seraient beaucoup plus élevées. Ces données révèlent que les cellules immunitaires sont exposées à des flux de sérotonine dans les organes lymphoïdes où elles prolifèrent et se différencient. Il est à noter que les voies efférentes sérotoninergiques centrales n'ont pas d'influence immunomodulatrice. En effet, l'injection intracérébrale de la 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT), qui détruit les neurones sérotoninergiques et catécholaminergiques, n'influence pas la réponse immunitaire humorale dépendante des lymphocytes T (Roszman et coll., 1985).

En outre, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T renferment de la sérotonine qu'ils libèrent suite à leur activation et qui agit de façon autocrine ou paracrine pour réguler leurs fonctions (différenciation, prolifération, cytotoxicité, production de cytokines) (Finocchiaro et coll., 1988).

Tableau III. Distribution et concentration de la sérotonine chez différents mammifères (Tirés de Essman W.B., 1978.)

Espèces	Tissus	Concentrations	Références
* Homme	Serum	0,05-1,00 ug/ml	Feldman, 1957
	Plaquettes	0,01-0,40 ug/g	Crawford, 1963
	Cerveau		
	<i>Hippocampe</i>	0,05-0,19 ug/g	Costa, 1958
	<i>Cortex</i>	0,01-0,03 ug/g	Costa, 1958
	<i>Noyau Caudé</i>	0,20-0,70 ug/g	Costa, 1958
	<i>Thalamus</i>	0,23-2,70 ug/g	Costa, 1958
	<i>Hypothalamus</i>	0,49-1,53 ug/g	Costa, 1958
	<i>Épiphyse</i>	0,36-22,82 ug/g	Giarman, 1960
	Intestin	1,00-3,70 ug/g	Resnick, 1961
Rate	1,84-3,05 ug/g	Frankland, 1962	
* Souris	Serum	1,48 ug/ml	Erspamer, 1954
	Plaquettes	0,20-0,30 ug/10 ⁹ plaquettes	Erspamer, 1954
	Cerveau		
	<i>Hippocampe</i>	0,90-2,90 ug/g	Wimer, 1973
	<i>Cortex</i>	2,20-2,90 ug/g	Wimer, 1973
	<i>Hypothalamus</i>	1,00-1,50 ug/g	Wimer, 1973
	Intestin	0,29-5,40 ug/g	Weissbach, 1958
	Mastocytes	0,01-1,30 ug/g	Green, 1960
	Rate	5,90-93,00 ug/g	Sullivan, 1961
	* Rat	Serum	0,46-1,16 ug/ml
Plaquettes		0,30-1,42 ug/g	Cass, 1962
Leucocytes		10,0-18,0 ug/10 ⁹ plaquettes	Humphrey, 1954
Cerveau			
<i>Hippocampe</i>		2,80 ug/g	Haubrich, 1973
<i>Cortex</i>		0,35-1,60 ug/g	Haubrich, 1973
<i>Noyau Caudé</i>		0,66-0,99 ug/g	Vogt, 1972
<i>Thalamus</i>		3,00 ug/g	Haubrich, 1973
<i>Hypothalamus</i>		0,31-4,90 ug/g	Haubrich, 1973
<i>Épiphyse</i>		23,30-79,70 ug/g	Quay, 1963
Intestin		0,51-1,35 ug/g	Cass, 1962
Mastocytes		0,22-5,70 ug/g	Morgan, 1962
Rate		1,20-4,00 ug/g	Sanyal, 1958

2.5. Récepteurs sérotoninergiques

La très large distribution de la sérotonine dans l'organisme (au niveau central et en périphérie) témoigne de la capacité de cette monoamine à réguler différentes

fonctions dans le corps. Ses effets sont exercés par une pléiade de récepteurs dont la classification repose sur trois critères établis par l'union internationale de pharmacologie (IUPHAR) (Hoyer et coll., 1994). (1) Les critères opérationnels permettent de définir les fonctions du récepteur (études fonctionnelles) et d'évaluer la sélectivité et l'affinité de ses ligands (études de liaison). (2) Les critères structuraux se rapportent à l'étude des séquences nucléotidiques et en acides aminés d'un récepteur. Dans ce sens, le clonage et le séquençage d'un récepteur donnent l'identité définitive de ce récepteur. Cependant, la structure du récepteur doit corrélérer avec les caractéristiques opérationnelles obtenues par des études physiologiques en utilisant les mêmes ligands. C'est le cas des récepteurs 5-HT_{1D α} et 5-HT_{1D β} qui ont des caractéristiques opérationnelles similaires, bien que leur homologie de séquences ne soit que de 70% (Weinshank et coll., 1992). D'autres part, bien que le 5-HT_{1B} ait une grande homologie de séquences avec le 5-HT_{1D β} (97%), ils représentent deux sous-types différents de récepteurs 5-HT₁ vu que leurs profils pharmacologiques sont différents. Finalement, (3) les critères transductionnels permettent de déterminer les signaux intracellulaires impliquées dans la genèse de la réponse cellulaire suite à l'activation du récepteur. L'utilisation de cette approche a permis d'identifier 16 récepteurs sérotoninergiques (Hoyer et Martin, 1997).

Hormis le récepteur 5-HT₃ qui constitue un canal ionique, les autres récepteurs font partie de la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ceux-ci incluent les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D α} , 5-HT_{1D β} , 5-ht_{1E}, 5-ht_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{4a}, 5-HT_{4b}, 5-ht_{5A}, 5-ht_{5B}, 5-ht₆, 5-HT₇. Il est à noter que dans plusieurs cas, l'absence de ligands sélectifs pour certains récepteurs a limité la détermination d'un rôle physiologique pour eux. C'est ainsi qu'il a été convenu de désigner les récepteurs sans réponses physiologiques connues à l'état natif par des lettres minuscules (5-ht_r), c'est le cas des récepteurs 5-ht_{1E}, 5-ht_{1F}, 5-ht_{5A}, 5-ht_{5B}, 5-ht₆ (Hoyer et Martin, 1997).

2.5.1. Récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₁

Les récepteurs 5-HT₁ sont groupés ensemble sur la base de leur homologie de séquences, l'absence d'introns au niveau des gènes qui codent pour eux (un seul exon), l'utilisation des mêmes voies transductionnelles (inhibition de l'adénylate cyclase, activation de canaux potassiques) et leurs caractéristiques pharmacologiques communes

(agoniste commun; 5-carboxamidotryptamine (5-CT)) (Hoyer et coll., 1994). Le plus représentatif parmi ces récepteurs est le 5-HT_{1A}. Ainsi, une attention particulière lui sera accordée, d'autant plus qu'il est l'objet de notre étude.

2.5.1.1. Récepteurs 5-HT_{1A}

Il est le premier des récepteurs sérotoninergiques à avoir été cloné (Kobilka et coll., 1987). Il suscite beaucoup d'intérêt, et il est très exploré, notamment dû au fait que nous avons pu disposer très tôt de ligands relativement spécifiques comme le 8-OH-DPAT (Gozlan et coll., 1983). De plus, les agonistes 5-HT_{1A} (buspirone) ont des propriétés antidepressives et anxiolytiques (Hamon et coll., 1990).

2.5.1.1.1. Description du récepteur 5-HT_{1A}

Comme tous les récepteurs couplés aux protéines G, le 5-HT_{1A} est un récepteur à 7 passages transmembranaires (Albert et coll., 1990; Kobilka et coll., 1987) (Figure 5). Ces derniers présentent le plus d'homologie de séquences entre les récepteurs sérotoninergiques (jusqu'à 60% d'homologie) et jouent un rôle important dans la liaison du ligand et le maintien de l'architecture du récepteur. Des résidus aromatiques très conservés au niveau des domaines transmembranaires 3 et 5 forment une "boîte aromatique" qui emmagasine la sérotonine. Aussi, d'autres résidus des domaines transmembranaires 1, 2 et 7, par des liaisons hydrogènes, maintiennent la structure tridimensionnelle du récepteur. Le 5-HT_{1A} présente une extrémité aminoterminal extracellulaire, une extrémité carboxyterminale intracytoplasmique, trois boucles extracellulaires et trois boucles intracytoplasmiques, avec possibilité d'une quatrième suite à la palmitoylation d'un résidu cystéine au niveau de la queue carboxyterminale. Ces boucles intra et extracellulaires présentent une grande diversité de séquences nucléotidiques et en acides aminés entre les récepteurs sérotoninergiques. Cette propriété est importante dans la mesure où les séquences de ces boucles peuvent être mises à profit pour caractériser un récepteur dans un tissu donné.

Chez l'Homme, le gène du récepteur 5-HT_{1A} est situé sur le chromosome 5 et code pour une protéine fonctionnelle de 421 acides aminés 5-HT_{1A} (Fargin et coll., 1988;

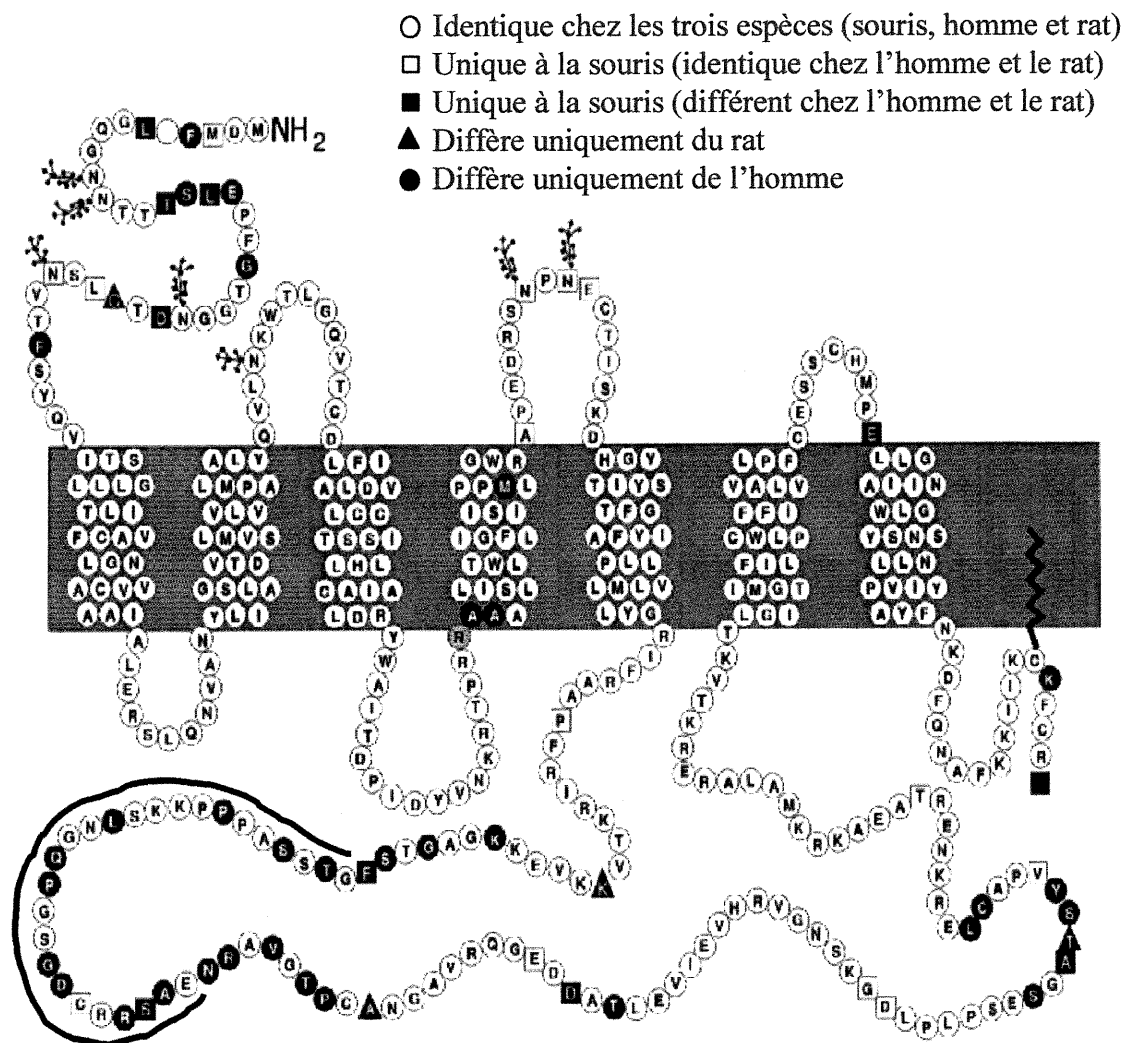


Figure 5. Structure primaire du récepteur 5-HT_{1A} de souris. Noter les différences d'acides aminés avec ses homologues humains et de rats. La séquence polypeptidique, reconnue par notre anticorps anti-5-HT_{1A}, est soulignée (G₂₄₃TSSAPPPKKSLNGQPGSGDCRRSAE₂₆₈). (modifié de Albert et coll., 1990)

Kobilka et coll., 1987). Son homologue chez le rat est une protéine de 422 acides aminés (Albert et coll., 1990), alors que chez la souris, il est formé de 421 acides aminés (Charest et coll., 1993) (Figure 5 et Figure 6).

Physiologiquement, le récepteur 5-HT_{1A} est associé à l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase par une protéine Gi/o (De Vivo et Maayani, 1986), à l'ouverture de canaux potassiques et l'induction d'hyperpolarisation (Andrade et coll., 1986). De plus, dans des systèmes de transfection, il est couplé à la stimulation d'une PLC avec la production d'IP₃ et l'activation d'une PKC (Fargin et coll., 1989; Albert et coll., 1996), la fermeture de canaux calciques (Pennington et Kelley, 1990) et l'activation d'une pompe ATPase Na⁺/K⁺ (Fargin et coll., 1989). Dans la lignée cellulaire lymphoïde T Jurkat, qui exprime le récepteur 5-HT_{1A}, la liaison des agonistes induit une augmentation intracytoplasmique d'IP₃ et de calcium (Aune et coll., 1993).

2.5.1.1.2. Distribution du récepteurs 5-HT_{1A}

Les études moléculaires (Charest et coll., 1993; Albert et coll., 1990; Kobilka et coll., 1987) sur la distribution du récepteur 5-HT_{1A} au niveau du système nerveux central, confirment celles obtenues par des études de liaison avec le ligand [³H]-8-OH-DPAT ou les anticorps anti-5-HT_{1A} (Riad et coll., 1991; El Mestikawy et coll., 1990; Gozlan et coll., 1983). Dans le système nerveux central, le récepteur 5-HT_{1A} est distribué au niveau du système limbique (septum, hippocampe, thalamus, amygdale et bulbe olfactif), de l'hypothalamus, de la substantia gelatinosa de la moelle épinière, du mésencéphale, du cortex, du noyau réticulaire, du raphé dorsal et du noyau interpedonculaire. L'implication du système limbique dans la modulation de l'émotion a fortement encouragé la recherche sur ce récepteur et poussé à la découverte de ligands qui lui sont spécifiques. En effet, une variété d'agonistes 5-HT_{1A} (ex. buspirone) comme les inhibiteurs de recapture de sérotonine (ex. fluoxétine; Prozac) ont des propriétés antidépressives et anxiolytiques. D'autre part, en dehors du système nerveux central, le 5-HT_{1A} est exprimé au niveau des muscles lisses où il induit une diminution de la pression artérielle, des intestins où il stimule le péristaltisme intestinal, des reins, des tissus lymphoïdes (rate, ganglions et thymus) (Kobilka et coll., 1987) et de la prostate (Carmena et coll., 1998). La forte localisation de l'ARN messager 5-HT_{1A} au niveau des

-1187

TTTGAGATTAGACTGTTTTTCAGATCCTGTCTCCAACCTGTCCCTTTCTAATTTCCCTCCAATACACAAGGATAATATGAAA
 AGGTCACAGGCACCAGTGAATAGGTTAATATGGTAAATGAACCTGTTTCTTAAGAAGCTGAGACCCACATTTCTCTACCTGAT
 AATGTAGAGGGTAGAGTTTAGAAGGTGGTCGACTCAGCTTCCCATCCTTCAGAGTCTCTGAGGGTTTTCCCTCGTGCCCTGAT
 AGCCACACTGTGAACCTGGCTCTATTTAAGAAGCTGACAGAAATAAAGGGGATCTGCGGTGGGAAATATATCTTTCTATC
 TCTTTCTTTTATTTTATTTTTCCTTTTGTCTTTTTCCTCCCTCTAGTTTAAATAGGTAAGAGGCGGGGTTAGTATGTAA
 AACATTGATCTGACTAGCAGATCAGAGTAGATATATGAAGTGAATTCTGAGTGTGGTGTGGACTGGAATGTAAAGACTCCT
 GGCTACAGGGAGAGAGGGCGGGACCCAGAAGAAGGAGGCACTCGGGACTAGGGAAGTGTGGATGGCGGTGGGGTTAA
 CGTGGGAGGAAGGGAGACTAGCTGTCTGAGCGACACACAGGACTAAAGAAAGAGAGGTGAGAAGGAAAGGGGAACTGGAAG
 GAAGGCCAGTGGGAGGAAGCCGGGAGAAGGAAGTGGGAAAAGAGAAGCAGACTGGAGAAGGCAGGAGAGATGGAGAGACA
 GAGACGAAGGAAC TAGGAGATGAGGGTCATCGAGTGACCCGGGAGGATGGGGTTTCTGGAATCCAGAGACTTCTGAGACTA
 TTAGTTACTCGGGAGAGTCCGGCCCCACGCAGCCAGTTGGACAGCGACAAAGTGAATGGACAGCGGAGACAGATATTA
 CAGCCATCTCTCCAGCACCCAGAGATTTGGAAGATTGCTTTTCAGCCCACTACAGTTTCTAGCTGGAGCCTCTGAGCGCT
 CAGGACCCGCGGGAGCCAAGCAAGAGAGCGCCGGTGAGTGTCTCTCAGATGCCTTCGCCAGAGCAAGTAAGAACTTCCC
 GCTCCAGTCTCTAGATCCCTCCCTTCGAAACTCCCGAGAAAGGAAGACCCTAGGGGGAGGGGCGAGGAGATCCCC
 TTGCATTTCTTTTCCCTCCCTTCCCCCACCCAGCGGGAGTGCAGGCAGC...→...ATGGATATGTTTCAGT
 CTTGGCCAGGGCAACAACACCACAACGTCCCTGGAGCCCTTCGGGACAGGCGGC
AACGATACTGGCCTCTCCAACGTGACCTTCAGCTACCAAGTGATCACCTCTCTT
TTGCTGGGGACGCTCATTTTCTGCGCGGTGCTCGGCAATGCCTGCGTGGTTGCT
GCCATCGCCCTGGAGCGCTCCCTTCAGAATGTTGCCAACTATCTCATCGGCTCC
TTGGCGGTCACCGATCTCATGGTGTCAGTGCTGGTGCTGCCATGGCTGCTCTG
TACCAGGTGCTCAACAAGTGGACTCTGGGTGAGGTCACCTGTGACCTGTTTATC
GCCCTGGATGTGCTGTGCTGCACCTTCGTCCATCCTGCACCTGTGCGCCATCGCG
CTAGACAGGTACTGGGCAATCACCGACCCTATAGACTACGTGAACAAGAGGACG
 CCCCCGGCGCGCCGCTGCGCTGATCTCGCTCACTTGGCTCATTGGCTTTCTCATC
TCCATCCCGCCTATGCTGGGCTGGCGGCCCCGGAAGACCGCTCGAACCCCAAC
GAGTGCACCATCAGCAAGGACCACGGGTACACCATCTACTCCACTTTCGGCGCT
TTCTATATTCCGCTGCTGCTCATGCTGGTCTCTATGGGCGCATCTTCAGAGCC
GCGCGCTTCCGAATCCGCAAGACGGTCAAGAAGGTGGAAAAGAAGGGAGCGGGC
ACCAGCTTCGGAACATCGTCGGCCCCGCCCCCAAGAAGAGCCTGAATGGTCA
CCAGGTAGTGGGGACTGCAGCGCAGTGTGAGAACAGGGCGGTGGGGACTCCG
 TGGCTAATGGGGCGGTGAGACAGGGTGAGGACGACGCCACCCTGGAGGTGATC
 GAGGTGCATCGAGTGGGCAACTCCAAAGGGGACCTTCCTCTGCCAGCGAATCA
 GGAGCTAC **CTCCTATGTCCCCGCTGCT**TGGAGAGAAAAAATGAGCGCACTGCT
 GAGGCAAAGCGCAAGATGGCCTTGGCCCGTGAGAGGAAGACAGTGAAGACACTG
GGCATCATCATGGGCACCTTCATCCTCTGCTGGCTGCCCTTTTTTCATTGTGGCG
CTGGTCTACCTTTCTGTGAGAGCAGTTGCCACATGCCTGAGTTGTTGGGTGCC

ATAATTA**CTGGCTAGGCTACTCCA****ACTCCCTGCTCA****ACCAGTTATTTATGCT**
TATTTCA**ACAAAGACTTTCAA****AACGCTTTTA****AGAAGATCATCA****AGTGCAAGTTC**
 TGCCGC TGATGATGATGATGGTGGTGGTAGTGGTGGTAATAGTGGTGGTGGTGGAGAAGGAAGAAGTGGAGGAAGAGT
 GTAGGGCTTACAGGACCC¹TCCTGTTCACTCAATATCCCCGCCCTGGAAGCAACACCTAAGAAA²ACTTGCTTTTCC³TAGAA
 CACGCAGCTTCTTAGCCCATGGCTTTCAGATCTTCTCTCTATCTCATTTTAAGGGGACAGTGC⁴TTTTGCAGAAATCTT
 AGAGAACCCTTAGCATCTGTTTGTAAAT⁵TATTGGCTCGGTCTTTGGCCCTAGGATCAGTTTTGATAGTTGCAATAACCTC
 CTC⁶TCTATTTCGAAATCCCAATTCTTCACGATGGAAGTTTAAACCTCGGCGATTCAAGGAAGAAA⁷ACCAACAGAAAATAT
 AAATGTATGGACATCTACCATGCCACTAGGACTGCCACCC⁸CTGCCCTATATCTGGAAC⁹TTGAGGTTCAAGACTGCTC
 TGCTCTCCCTCCCTCCTCCTCTAGAAACATCTGTTCCCTTTGGGTGCAATGTACACTGCTGATTCTGGTCTCCATGCA
 CTCACGGCTGGTCTGGGAAAGTTGGA¹⁰ACTACTTTGGGTATGGTGCCCTGGAATGTTG¹¹CCCTTGCTGAATAGCAAAGAT
 CC¹²TTCCCAATGCACAGCACCCACTTCTGTATTTGTTTGTGTTGTTTAACTCAA¹³AATCAAGTGACAAAGATGT
 CTGCTGGAGTGGACTTATAAGCAAGAAGCCAGGCCAAAAGGAAGAGCCAAGAAGGCC¹⁴TGCGGATGTTTCC¹⁵TGTCCTGGT
 GTCAGACTCACAAAGAAATTGACAATCAGACTATTTGGAAGGAAGACTTTTATTCCTGTAGTTTGTGGCTTTCTGTA
 AGT¹⁶TCTGGAAGGCCTTGTGGACTGCAGAAGGC¹⁷CCCACTGCTGGCCAGGGAGGGCTCATTGAGGGTCTGAGATGCCCGG
 GATGGCTCACCTCACCC¹⁸TCAGTTCTTTTCTAGGAGTGAGCTATGCCAGAGCAGCTCACCTTGAGTTTGCAGCCTTCGGGG

Figure 6. Structure du gène du récepteur 5-HT_{1A} de la souris. Les premières 1187 bp de la région non codante 5' sont montrées. L'amorce de la région codante (reading frame; 1263 bp) est précédée d'une flèche. Les séquences consensus κB sont soulignées en pointillé. Structure combinée des séquences publiées dans GenBank (Parks et Shenk, 1996. Nom: MMU33820, numéro d'accès: U33820; et Charest et coll., 1993. Nom: MMU39391, numéro d'accès: U39391). En gras double-souligné, les séquences des amorces sens (oligo 45: 5'-**GTGCTGGTGGCTGCCCATGG**-3') et antisens (oligo 44: 5'-**CCGATCCGATGAGGTTGAGGG**-3'). Elles amplifient un produit de PCR 921 bp. En italique souligné, les séquences des amorces sens (5'1A: 5'-*ACCCCAACGAGTG CACCATCAG*-3') et antisens (3'1A: 5'-*GAGGATACRGGGGCGGACG*-3'). Elles amplifient un produit de PCR 413 bp. En gras italique souligné, la séquence du substrat 5-HT_{1A} pour la synthèse du fragment de protection en RPA (riboprobe).

tissus lymphoïdes supposait qu'il code pour le récepteur d'une cytokine ou d'une protéine immunorégulatrice (Kobilka et coll., 1987). En effet, il est impliqué dans l'immunorégulation par la sérotonine.

2.5.1.2. Récepteurs 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}

Les récepteurs 5-HT_{1B} des rongeurs et 5-HT_{1D} humain représentent le même sous-type de récepteur 5-HT₁ (Waeber et coll., 1988; Hoyer et coll., 1986). Le 5-HT_{1B} est un récepteur à 386 acides aminés (Maroteaux et coll., 1992; Voigt et coll., 1991). Quant au 5-HT_{1D}, deux clones ont été identifiés; le 5-HT_{1D α} et le 5-HT_{1D β} formé respectivement de 377 et 390 acides aminés (Weinshank et coll., 1992). Ces récepteurs sont exprimés au niveau des régions nigro-striatales, des ganglions basaux, du raphé, du cervelet, du septum, de l'hippocampe et du noyau accumbien (Maroteaux et coll., 1992; Voigt et coll., 1991; Bruinsvels et coll., 1991). Ils participent au contrôle de l'activité locomotrice et l'érection du pénis. Aussi, leur localisation présynaptique où ils inhibent la libération de la sérotonine, permet de stipuler que des antagonistes peuvent augmenter la libération de cette dernière et par conséquent avoir des activités anxiolytiques et antidépressives.

Les récepteurs 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} sont également exprimés au niveau des cellules endothéliales où ils contrôlent la relaxation des artères (Schoeffter et Hoyer, 1990).

2.5.1.3. Récepteurs 5-ht_{1E} et 5-ht_{1F}

Le récepteur 5-ht_{1E} est composé de 365 acides aminés (McAllister et coll., 1992). Quant au 5-ht_{1F}, il est formé de 366 acides aminés chez l'Homme et le rat et de 367 acides aminés chez la souris (Adham et coll., 1993). Ils sont couplés négativement à une adénylate cyclase, à l'activation d'une PLC et une mobilisation de calcium intracellulaire. Cependant, aucune signification physiologique ne leur a été décrite.

2.5.2. Récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₂

Les récepteurs de type 5-HT₂ ont une grande homologie de séquence, présentent le même schéma introns-exons dans la structure de leurs gènes, activent les mêmes signaux intracellulaire (stimulation d'une PLC) et ont un profil opérationnel similaire

(agoniste commun; DOI) (Hoyer et coll., 1994). Dans ce groupe, on trouve trois sous-types de récepteurs. Le 5-HT_{2A}, le 5-HT_{2B} (ancien 5-HT_{2F}) et le 5-HT_{2C} (ancien 5-HT_{1C}).

2.5.2.1. Récepteurs 5-HT_{2A}

Ce récepteur est formé de 471 acides aminés. Sa caractérisation et l'étude de sa distribution ont été facilitées par la disponibilité d'antagonistes sélectifs (kétansérine et pirenpirone). Dans le cerveau, le 5-HT_{2A} est abondant au niveau du cortex et du système limbique (Pazos et coll., 1985). Il est impliqué dans la régulation de l'humeur (psychoses, anxiété, troubles du sommeil) (Bradley et coll., 1986). En périphérie, le 5-HT_{2A} est exprimé au niveau des muscles lisses vasculaires et bronchiaux, de l'utérus, de la vessie et de l'iléon (Bradley et coll., 1986). Il est aussi exprimé sur les plaquettes où il contrôle leur agrégation, et sur les cellules immunitaires où il régule différentes réponses telles que décrites plus loin (Ameisen et coll., 1989; Roszman et coll., 1994).

2.5.2.2. Récepteur 5-HT_{2B}

Le 5-HT_{2B} est formé de 479 et 504 acides aminés respectivement chez l'Homme et le rat (Kunsar et coll., 1992; Loric et coll., 1992). Aucune localisation cérébrale ne lui a été décrite. Il est exprimé au niveau du fundus où il contrôle la contraction du muscle lisse fundique, et au niveau des poumons, du cœur, des reins et de l'intestin.

2.5.2.3. Récepteur 5-HT_{2C}

Les récepteurs 5-HT_{2C} du rat et de l'Homme sont composés respectivement de 460 et 458 acides aminés (Hoffman et Mezey, 1989; Julius et coll., 1988). Le 5-HT_{2C} est exprimé au niveau du plexus choroïde, du système limbique, du globus pallidus et de la substance noire (Pazos et coll., 1987; Yagoloff et Hartig, 1985) où il est impliqué dans le contrôle de l'appétit, de l'humeur et de l'érection du pénis (Hoyer et coll., 1994).

2.5.3. Canal cationique 5-HT₃

À l'opposé des autres récepteurs sérotoninergiques, le 5-HT₃ appartient aux récepteurs/canaux ioniques (Maricq et coll., 1991). C'est un canal pentamérique (Boess

et coll., 1995). Une sous-unité de 487 acides aminés et qui contient le site de liaison de la sérotonine a été clonée. C'est une protéine à quatre passages transmembranaires qui forme un canal cationique fonctionnel. L'activation du 5-HT₃ induit une dépolarisation rapide. En effet, l'ouverture du canal permet le passage d'ions Na⁺ et K⁺ (Peters et coll., 1991). Il résulte de cette dépolarisation un influx rapide de calcium extracellulaire et, par conséquent, la régulation des différentes fonctions qui lui sont attribuées.

Les fortes densités de ce récepteur se trouvent au niveau du système limbique, impliqué dans la régulation de l'humeur, de la mémoire, et de l'appétit, et du nucleus tractus solitarius, impliqué dans le contrôle du réflexe de vomissement (Kilpatrick et coll., 1987). En effet, les antagonistes du récepteur 5-HT₃ ont des propriétés anti-émétiques (Bunce et coll., 1991) et sont utilisés dans le traitement de certains troubles psychiatriques à savoir l'anxiété et les psychoses (Costall et coll., 1990). En périphérie, le 5-HT₃ est exprimé au niveau de l'iléon, du nerf vague, du système cardio-vasculaire et des lymphocytes B et T (Khan et Poisson, 1999; Kilpatrick et coll., 1991; Saxena et Villalón, 1991; Kilpatrick et coll., 1989; Choquet et Korn, 1988).

2.5.4. Récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄

Le récepteur 5-HT₄ est représenté par deux variants résultant d'un épissage alternatif; le 5-HT_{4a} et le 5-HT_{4b} formé respectivement de 387 et 407 acides aminés (Gerald et coll., 1994). Il est couplé positivement à une adénylate cyclase, via une protéine G_s, à la fermeture d'un canal potassique et à l'augmentation des courants calciques (Fagni et coll., 1992; Quadid et coll., 1992). Il est exprimé au niveau du cortex et du système limbique d'où son implication dans les désordres affectifs, la perception visuelle, la mémoire et l'apprentissage (Dumuis et coll., 1988). En périphérie, il est exprimé au niveau du muscle lisse de la paroi intestinale, de l'iléon, de l'œsophage, du colon, de la vessie, de la surrénale, du nerf vague, des veines pulmonaires et du cœur, (Quadid et coll., 1992; Lefebvre et coll., 1992; Ford et coll., 1992; Craig et Clarke, 1991; Bieger et Triggle, 1985). Au niveau du cœur, l'augmentation de la conductance calcique explique les effets inotropes positifs des agonistes 5-HT₄.

2.5.5. Récepteurs 5-ht₅

On connaît très peu sur la pharmacologie et la signification physiologique du récepteur 5-ht₅. Deux récepteurs recombinants ont été clonés (Plassat et coll., 1992); le 5-ht_{5A} composé de 357 acides aminés et le 5-ht_{5B} composé de 370 et 371 acides aminés respectivement chez la souris et le rat. Ils seraient couplés négativement à une adénylate cyclase et sont exprimés au niveau du cortex, de l'hippocampe, de l'habénula, du bulbe olfactif, du cervelet, et des astrocytes (Carson et coll., 1996; Plassat et coll., 1992).

2.5.6. Récepteurs 5-ht₆

C'est un récepteur formé respectivement de 438 et 440 acides aminés chez le rat et l'Homme. La région codante de son gène présente au moins deux introns (Monsma et coll., 1993; Ruat et coll., 1993a). Il est couplé positivement à une adénylate cyclase via une protéine G_s et présente une distribution peu dense et très limitée au cerveau.

2.5.7. Récepteur 5-HT₇

Le gène du récepteur 5-HT₇ contient deux introns et code pour une protéine de 448 acides aminés chez le rat et la souris et 445 acides aminés chez l'Homme (Ruat et coll., 1993b). Le 5-HT₇ est couplé positivement à une adénylate cyclase. Il est localisé au niveau du système limbique, du cortex et de l'hypothalamus où il est impliqué dans la régulation du rythme circadien, propriété qu'il partage avec le 5-HT_{1A} (Lovenberg et coll., 1993). Ainsi, le profil 5-HT_{1A} non classique décrit dans l'hippocampe (activation de l'adénylate cyclase) (Shenker et coll., 1987) serait un effet ``fantôme'' 5-HT₇. En périphérie, le 5-HT₇ est exprimé au niveau des lymphocytes B, de l'iléon, et des muscles lisses vasculaires où il a des effets vasodilatateurs (Mössner et Lesch, 1998).

2.6. Effets de la sérotonine

La sérotonine est produite et/ou libérée après emmagasinage dans plusieurs sites de l'organisme. Son élimination rapide du plasma, suite à l'emmagasinage par les plaquettes et sa dégradation au niveau du foie et des poumons, stipule qu'elle agit

localement au site de libération, par un effet autocrine ou paracrine. Au niveau vasculaire, la sérotonine cause une vasoconstriction des veines et veinules avec réduction du flux sanguin tissulaire. Cependant, un effet vasodilatateur peut aussi être observé surtout au niveau des petites artères (Vanhoutte, 1982). De plus, elle a un rôle trophique et mitogénique en stimulant la prolifération des cellules endothéliales. Au niveau des poumons, la sérotonine induit une vasoconstriction et une bronchoconstriction (Comroe et coll., 1953). Dans le tractus gastro-intestinal, elle stimule la motilité intestinale et gastrique, et inhibe les sécrétions d'acide gastrique. Elle exerce aussi un effet trophique sur les muqueuses gastro-intestinales (Essman, 1978).

Au niveau du système nerveux central, la sérotonine est impliquée dans le contrôle de fonctions rythmiques ou épisodiques, tels que le sommeil et l'appétit, du à sa production suivant un rythme circadien. Elle est aussi impliquée dans la régulation de la vigilance et dans la thermorégulation. En outre, elle est impliquée dans la régulation de l'humeur à cause de ses pouvoirs antidépresseurs et anxiolytiques (Hoyer et coll., 1994).

Dans la prochaine section, nous traiterons des effets de la sérotonine sur les réponses immunitaires. Nous avons vu que les organes lymphoïdes sont innervés par des fibres noradrénergiques qui co-libèrent la sérotonine et la noradrénaline (Felten et Olschowka, 1987). De plus, les cellules immunitaires expriment certains récepteurs sérotoninergiques.

2.6.1. Effets immunomodulateurs de la sérotonine

La présence de la sérotonine au niveau des sites inflammatoires et des organes lymphoïdes stipule qu'elle régule différentes facettes des fonctions immunitaires (différenciation, prolifération, migration et activités des cellules immunitaires). La sérotonine est libérée très tôt lors des réactions immunitaires et inflammatoires, ce qui lui confère le pouvoir d'orchestrer le développement des celles-ci (Figure 7).

2.6.1.1. Rôle de la sérotonine dans l'immunité naturelle

La sérotonine augmente l'activité lytique des cellules NK, leur production d'IFN- γ , leur prolifération et l'expression du marqueur CD16/56 impliqué dans leur activité

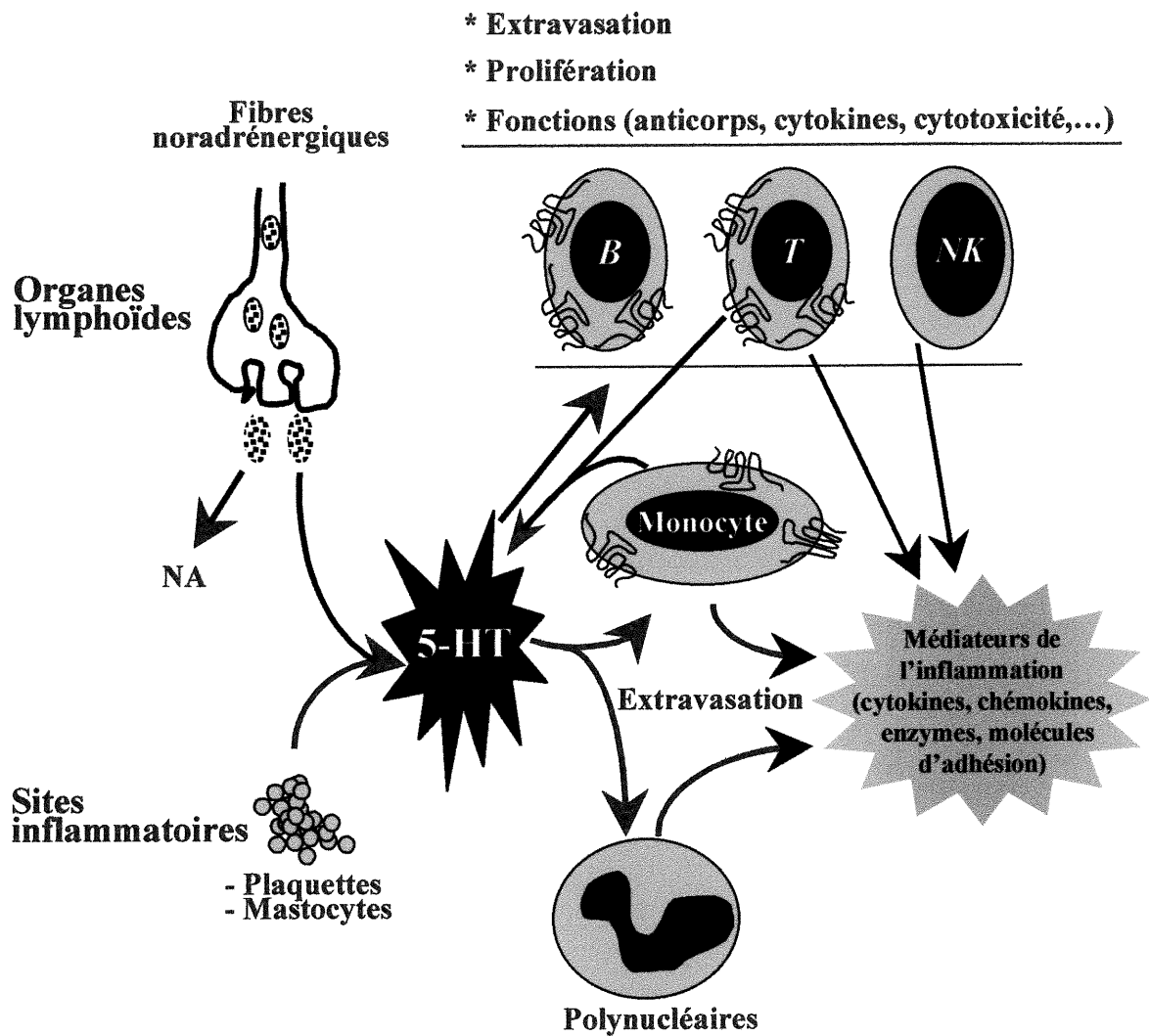


Figure 7. La sérotonine au niveau des organes lymphoïdes et des sites inflammatoires

cytotoxique (Hellstrand et Hermodsson, 1993; Hellstrand et coll., 1993; Clancy et coll., 1991; Hellstrand et Hermodsson, 1990a; Hellstrand et Hermodsson, 1990b). Ces effets sont exercés indirectement par l'intermédiaire d'une fonction accessoire des monocytes impliquant le récepteur 5-HT_{1A} sur ces cellules vu qu'ils sont reproduits par l'agoniste sélectif 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (Hellstrand et Hermodsson, 1993; Hellstrand et Hermodsson, 1990a; Hellstrand et Hermodsson, 1987). Récemment, il a été rapporté que les monocytes expriment le récepteur 5-HT_{1A} à leur surface (Frank et coll., 2001). Ce groupe a caractérisé le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme étant facteur impliqué dans les interactions entre les cellules NK et les monocytes. En effet, la catalase, qui dégrade le H₂O₂ reproduit les effets de la sérotonine sur les fonctions des cellules NK et en plus, bloque l'effet inhibiteur exercé par les monocytes sur ces cellules.

Au niveau des sites inflammatoires, la sérotonine augmente l'activité phagocytaire des macrophages (Sternberg et coll., 1987). Cet effet s'exerce via le 5-HT₂ vu qu'il est inhibé par la spipérone et la kétansérine. En effet, le 5-HT₂ a été caractérisé au niveau des monocytes/macrophages (Roszman, 1984).

D'autre part, la sérotonine inhibe la production de TNF- α par les monocytes et l'expression du CMH de classe Ia sur les macrophages. Ces effets sont renversés par les antagonistes 5-HT₁ et 5-HT₂ indiquant l'implication de ces récepteurs dans les effets immunomodulateurs de la sérotonine sur la fonction des macrophages (Arzt et coll., 1991; Sternberg et coll., 1986).

2.6.1.2. Rôle de la sérotonine dans l'immunité spécifique

2.6.1.2.1. La sérotonine dans la réaction d'hypersensibilité de type retardé

La sérotonine est un médiateur important des réactions anaphylactiques (Gershon et Ross, 1961; Fink, 1956). En effet, la réserpine qui induit une déplétion des monoamines, bloque ces réactions, alors que les inhibiteurs de la monoamine oxydase les reproduisent. L'implication de la noradrénaline et de l'histamine est écartée car la 6-hydroxydopamine (détruit les terminaisons noradrénergiques) et le burimamide (antagoniste histaminergique H₂) restent sans effet sur ces réactions (Gershon et coll., 1975). Dès lors, il a été suggéré que la sérotonine joue un rôle important dans l'initiation

et la production de la réaction d'hypersensibilité de type retardé (DTH). En agissant sur les cellules endothéliales des veinules post-capillaires, elle permet l'extravasation des monocytes et des lymphocytes du sang vers les foyers inflammatoires (Ameisen et coll., 1989). Les polymorphonucléaires basophiles, les plaquettes et les mastocytes sont les sources de sérotonine au niveau de ces sites inflammatoires.

La sérotonine est parmi les premiers médiateurs à être libérés au niveau des sites inflammatoires où elle induit la production de différents facteurs chimiotactiques (IL-16, lymphocyte chemoattractant factor, monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1, et endothelial cell-derived lymphocyte chemoattractant activity) par les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les lymphocytes T CD8. Ainsi, elle stimule l'attraction des lymphocytes T CD4, T CD8, des monocytes et des granulocytes vers le foyer infectieux (Laberge et coll., 1996; Goppelt-Struebe et Stroebel, 1995; Katz et coll., 1994; Farber et Beer, 1991; Paegelow et coll., 1985; Foon et coll., 1976). Suite à leur recrutement au niveau des sites inflammatoires, les lymphocytes T CD4 effecteurs de la DTH sont activés, via leurs récepteurs 5-HT₂ et 5-HT_{1A} à produire des cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IFN- γ (Hinze-Selch et coll., 2000; Aune et coll., 1994; Askenase et coll., 1991; Ptak et coll., 1991; Ameisen et coll., 1989). Ces constatations peuvent avoir des applications thérapeutiques très importantes. Il est rapporté que le blocage des récepteurs 5-HT₂ prévient le développement des réactions allergiques, telles que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Waxman et coll., 1984). De plus, la zimeldine; un inhibiteur sélectif du recapture de la sérotonine, induit un effet secondaire chez certains patients; en l'occurrence, le syndrome de Guillain-Barre (polyradiculoneurite démyélinisante aiguë) (Mössner et Lesch, 1998).

2.6.1.2.2. Effets de la sérotonine sur les lymphocytes T

La parachlorophénylalanine (PCPA; inhibiteur de la tryptophane 5-hydroxylase), réduit les niveaux de sérotonine produite dans l'organisme. Ce traitement entraîne inhibe la capacité des macrophages à activer les lymphocytes T. Bien la PCPA n'affecte pas les proportions des lymphocytes T CD4 et CD8, elle induit une baisse de l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (IL-2R α) au niveau des lymphocytes T CD4, ce qui

perturbe l'activation de ces derniers (Young et Matthews, 1995). Aussi, la prolifération des lymphocytes T de souris traitées au PCPA est réduite comparativement à celle des lymphocytes T issus de souris contrôles (Young et coll., 1993).

Ces résultats sont en accord avec ceux décrivant une augmentation de la réponse lymphoblastique des lymphocytes T de souris traitées au fenfluramine, qui stimule la libération de sérotonine, ou suite à l'addition de 5-hydroxytryptophane, un précurseur de la sérotonine (Kut et coll., 1992; Clancy et coll., 1991). Aussi, le traitement de lymphocytes T de souris traitées au PCPA avec la sérotonine ou leur incubation avec des macrophages de souris non traitées au PCPA augmentent ou rétablissent complètement leur activation (Young et Matthews, 1995). La sérotonine augmente aussi la prolifération des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et la PHA, ainsi que la production de l'IL-2 et d'IFN- γ en réponse à la ConA. Ces effets impliquent des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₂ (Aune et coll., 1994; Aune et coll., 1993; Young et coll., 1993).

La sérotonine serait aussi impliquée dans la surveillance antitumorale par les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages. Elle induit l'infiltration tumorale par ces cellules (Los et coll., 1988). En effet, son injection au niveau d'une masse tumorale augmente le nombre de macrophages et de lymphocytes T.

2.6.1.2.3. Effets de la sérotonine sur les lymphocytes B

Une revue de la littérature sur les effets de la sérotonine sur les lymphocytes B montre un déficit dans les données concernant cet aspect de l'immunorégulation sérotoninergique. Et même le peu de résultats publiés montre des effets contradictoires. Chez la souris, on rapporte une inhibition de la production d'IgM et IgG anti-GRM par la sérotonine ou son précurseur 5-hydroxytryptophane, et que le PCPA augmente la production de ces anticorps (Jackson et coll., 1985). Par contre, chez le poulet, on observe une augmentation de la production des IgM anti-GRM (Gray et coll., 1991).

D'autre part, la réponse humorale secondaire anti-oxazolone n'est pas affectée par l'antagoniste 5-HT_{1A} Pindobind-5-HT_{1A} du à l'absence d'effet sur la production d'IL-4 (Aune et coll., 1994). En revanche, le d-fenfluramine induit une augmentation de la réponse proliférative des lymphocytes B au LPS (Clancy et coll., 1991). Dans notre laboratoire, nous avons montré que la sérotonine, via le récepteur 5-HT_{1A}, augmente la

prolifération des lymphocytes B activés par le LPS (Iken et coll., 1995). L'utilisation du radioligand [³H]8-OH-DAPT a montré la présence de sites 5-HT_{1A} sur ces cellules (Iken et coll., 1995). Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux (Liu et Wolfe, 1996).

La sérotonine est aussi capable de réguler l'activité des canaux potassiques au niveau des lymphocytes B par l'activation de récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₃ (Choquet et Korn, 1988). Le rôle que joue les canaux potassiques dans la physiologie des lymphocytes B (mitogénèse) stipule que la sérotonine agit sur les cellules immunitaires, en partie, par la régulation de la perméabilité ionique.

D'un point de vue moléculaire, l'activation des lymphocytes B et T aboutit à l'induction de différentes voies de signalisation et la stimulation de différents facteurs de transcription (c-Fos, c-Jun, NF-AT, NF-IL-6, NF-κB). Ces derniers régulent l'expression de gènes codant pour différentes molécules effectrices et régulatrices. Dans la prochaine section, nous allons décrire spécifiquement le facteur de transcription NF-κB, et son rôle dans le développement des réponses immunitaires et inflammatoires.

3. Le facteur de transcription NF-κB

3.1. Description du facteur de transcription NF-κB

L'interaction des lymphocytes avec leurs antigènes active différents facteurs de transcription, dont le NF-κB, qui sont impliqués dans la transcription de gènes pour différentes cytokines et molécules inflammatoires.

Le NF-κB désigne une collection de dimères composés des membres de la famille des protéines Rel. On distingue les protéines cRel, RelA (ou p65), RelB, p105 (précurseur de p50), p100 (précurseur de p52) (Karin, 1999). Toutes ces protéines contiennent un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison de la sous-unité inhibitrice IκB et un domaine de dimérisation très conservés, l'ensemble formant un domaine d'homologie Rel (RHD: Rel homology domain). En plus, elles contiennent un signal de localisation nucléaire (Siebenlist et coll., 1994). Les homodimères et hétérodimères de protéines NF-κB se lient à des séquences consensus décamériques, dites sites κB, très conservées au niveau d'`enhancers` et de promoteurs de différents

gènes (Chen et Gosh, 1999; Siebenlist et coll., 1994). Parmi ces dimères, le plus souvent exprimé est la forme inductible d'hétérodimère p50/p65, communément appelée NF- κ B. Cet hétérodimère est composé de la forme active de la protéine p105 (p50) et de la protéine RelA (Gilmore, 1999). Dans la suite du texte, l'appellation NF- κ B désignera l'hétérodimère p50/p65.

La régulation du NF- κ B est maintenant connue avec beaucoup de détails (Karin, 1999). Au niveau des cellules non activées, hormis les lymphocytes B, certains neurones, les thymocytes humains, les cellules de Sertolli, les cellules photo-réceptrices et plusieurs cellules tumorales (Rayet et Gélinas, 1999), les dimères de NF- κ B sont séquestrés au niveau du cytoplasme sous la forme d'un complexe inactif et latent via l'interaction avec des protéines inhibitrices I κ B. Celle-ci comprennent I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , p105, p100 et Bcl-3 (Beg et Baldwin, 1993; Karin, 1999) dont les deux premières sont les plus étudiées. Ces protéines inhibitrices contiennent cinq à huit domaines "ankyrin repeats", de trente-trois (33) acides aminés chacun, qui leur permettent de se lier au RHD et au signal de localisation nucléaire du NF- κ B. Cette interaction masque ces deux domaines et inhibe la translocation nucléaire des dimères NF- κ B et leur liaison à l'ADN. Les protéines inhibitrices I κ B α et I κ B β contiennent aussi au niveau de leurs extrémités N-terminales un domaine régulateur impliqué dans leur phosphorylation et leur dégradation. Certaines protéines I κ B, telles que I κ B α , dont l'expression est aussi régulée par le facteur de transcription NF- κ B, contiennent aussi une séquence d'exportation du noyau (NES: Nuclear Export Sequence) (Wen et al., 1995). Ainsi, nouvellement synthétisées, elles passent dans le noyau, détachent le dimère NF- κ B de l'ADN et le transportent vers le cytoplasme mettant fin à son activité (Arenzana-Seisdedos et coll., 1997).

L'activation des cellules par des cytokines pro-inflammatoires, des esters de phorbol, des mitogènes (LPS, ConA, PHA), suite à des infections virales ou bactériennes, l'exposition à des agents oxydants ou des radiations induit la phosphorylation rapide de I κ B α (Barnes et Karin, 1997). La phosphorylation a lieu spécifiquement au niveau de deux résidus sérines (S32 et S36) du domaine régulateur (Li et Karin, 1999). L'activation cellulaire induit aussi la phosphorylation de I κ B β au

niveau des sérines (S19 et S23) et de I κ B ϵ au niveau des sérines (S157 et S161) du domaine régulateur (Li et Karin, 1999). Une fois phosphorylées, les protéines I κ B seront les cibles du système d'ubiquitine (Figure 8). La poly-ubiquitination a lieu sur des résidus lysines (K21 et K22) localisés au niveau du domaine régulateur (Didonato et coll., 1996). Cette dernière va ensuite catalyser la dégradation de I κ B par le protéasome 26S (Chen et coll., 1995). La protéolyse de I κ B induit la libération du signal de localisation nucléaire et le site de liaison à l'ADN du NF- κ B qui va transloquer dans le noyau et activer la transcription des gènes contenant des séquences consensus κ B au niveau de leurs régions promotrices et ``enhancers``.

Dans ce cheminement, la seule étape qui est régulée est la phosphorylation de I κ B, étant donné que l'ubiquitination et la dégradation dépendantes du protéasome sont des processus constitutivement actifs dans les cellules (Yaron et coll., 1997).

Tous les activateurs qui stimulent le NF- κ B agissent en induisant la phosphorylation et la dégradation des I κ B. Il semblerait donc que pratiquement tous les activateurs du NF- κ B utilisent la même kinase. Il s'agit au fait d'un complexe de protéines kinases ou I κ B-kinases (IKK) spécifiques de résidus sérines.

Trois sous-unités étroitement liées du complexe IKK ont été caractérisées. Il s'agit de deux protéines kinases; IKK α ou IKK1 et IKK β ou IKK2 qui sont toutes les deux nécessaires pour la formation du complexe catalytique IKK fonctionnel (Zandi et coll., 1997). Elles participent toutes les deux à la phosphorylation des I κ B et à l'activation des dimères NF- κ B. La troisième sous-unité a une activité régulatrice; c'est la sous-unité IKK γ dite aussi NEMO ou IKKAP1 (Rothwarf et coll., 1998). IKK α et IKK β forment des homodimères ou des hétérodimères puis interagissent avec IKK γ qui permet la formation d'un dimère de dimères et le recrutement des kinases responsables de la phosphorylation de IKK α et IKK β (Karin, 1999). L'activation des kinases IKK α et IKK β fait suite à leur phosphorylation, qui a lieu exclusivement sur deux résidus sérines (S176 et S180 pour IKK α , et S177 et S181 pour IKK β), et celle d'IKK γ sur des résidus sérines et thréonines (Delhase et coll., 1999).

Les étapes précoces dans les voies de signalisation menant à l'activation des IKK et du NF- κ B dépendent strictement de l'agent activateur de la cellule. Les activateurs du

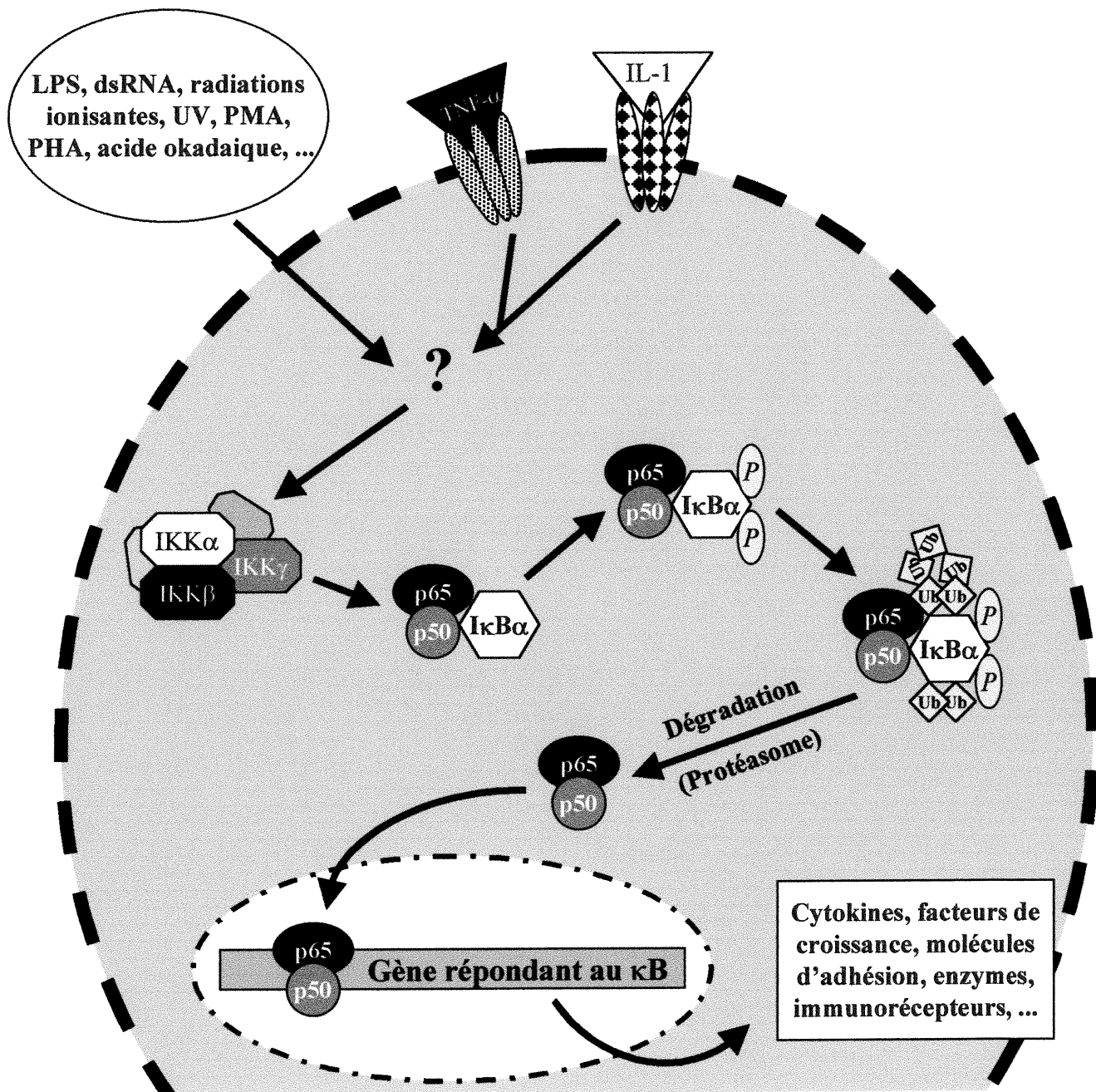


Figure 8. Schéma général d'activation du facteur de transcription NF-κB (p50/p65). L'exposition d'une cellule à un stimulus induit l'activation de protéines kinases (IKK) qui phosphorylent la sous-unité inhibitrice IκB-α (ou IκB-β). Cette dernière sera ubiquitinée et dégradée via le protéasome. Le NF-κB transloque dans le noyau où il active la transcription d'une pléiade de gènes. (modifiée de Barnes et Karin, 1997).

NF- κ B les plus étudiés sont les cytokines pro-inflammatoires; TNF et IL-1. Les mécanismes par lesquels elles activent le NF- κ B sont bien élucidés. L'activation du NF- κ B par le TNF s'exerce principalement via le récepteur de type 1 (TNF-R1). La liaison du TNF au TNF-R1 induit la trimérisation du récepteur et le recrutement des protéines TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) et FADD (Fas-Associated Death Domain) (Hsu et coll., 1995) (Figure 9). À son tour, TRADD sert de substrat pour le recrutement d'autres protéines impliquées dans la voie de signalisation; telles que TRAF-2 (TNF Receptor-Associated Factor) et RIP (Hsu et coll., 1996a). Alors que FADD amorce l'activation de la cascade des caspases menant à la mort cellulaire par apoptose, TRAF-2 en association avec la kinase Akt ou la protéine kinase B mène à l'activation du NF- κ B et du JNK (Jun N-terminal-Associated Kinase) (Hsu et coll., 1996a; Romashkova et Makarov, 1999). Une troisième protéine recrutée suite à l'activation de ce complexe, est la protéine kinase RIP (Hsu et coll., 1996b). Contrairement à FADD et TRAF-2, RIP mène à l'activation aussi bien de la voie des caspases que du NF- κ B.

D'autre part, l'IL-1 emprunte une voie de signalisation similaire à celle du TNF pour l'activation du NF- κ B. Elle débute par l'interaction de l'IL-1 avec un hétérodimère formé du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) et une protéine accessoire (IL-1-RAC). Il en résulte le recrutement d'une protéine kinase, IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase) (Cao et coll., 1996a). IRAK serait le substrat pour le recrutement d'autres protéines impliquées dans les voies de signalisation. Parmi celles-ci, TRAF-6. Comme TRAF-2, TRAF-6 conduit aussi à l'activation du NF- κ B et de JNK (Cao et coll., 1996b) (Figure 9).

Une autre protéine kinase, NIK (NF- κ B-Inducing Kinase) intervient en aval de TRAF-2, RIP et TRAF-6, avec quoi elle interagit, et qui serait responsable de l'activation des IKK α et IKK β menant à l'activation du NF- κ B (Malinin et coll., 1997).

Pratiquement tous les stimuli qui activent le NF- κ B agiraient en induisant la phosphorylation et la dégradation des I κ B. Ceci suggère que tous ces stimuli utilisent le même mécanisme basé sur l'activation du complexe des IKK α -IKK β . Cependant, il est possible que d'autres activateurs utilisent différentes I κ B kinase (PKC, PKR ``double-stranded RNA activated kinase'', Raf-1, caséine kinase II, PKA) similaires d'un point de

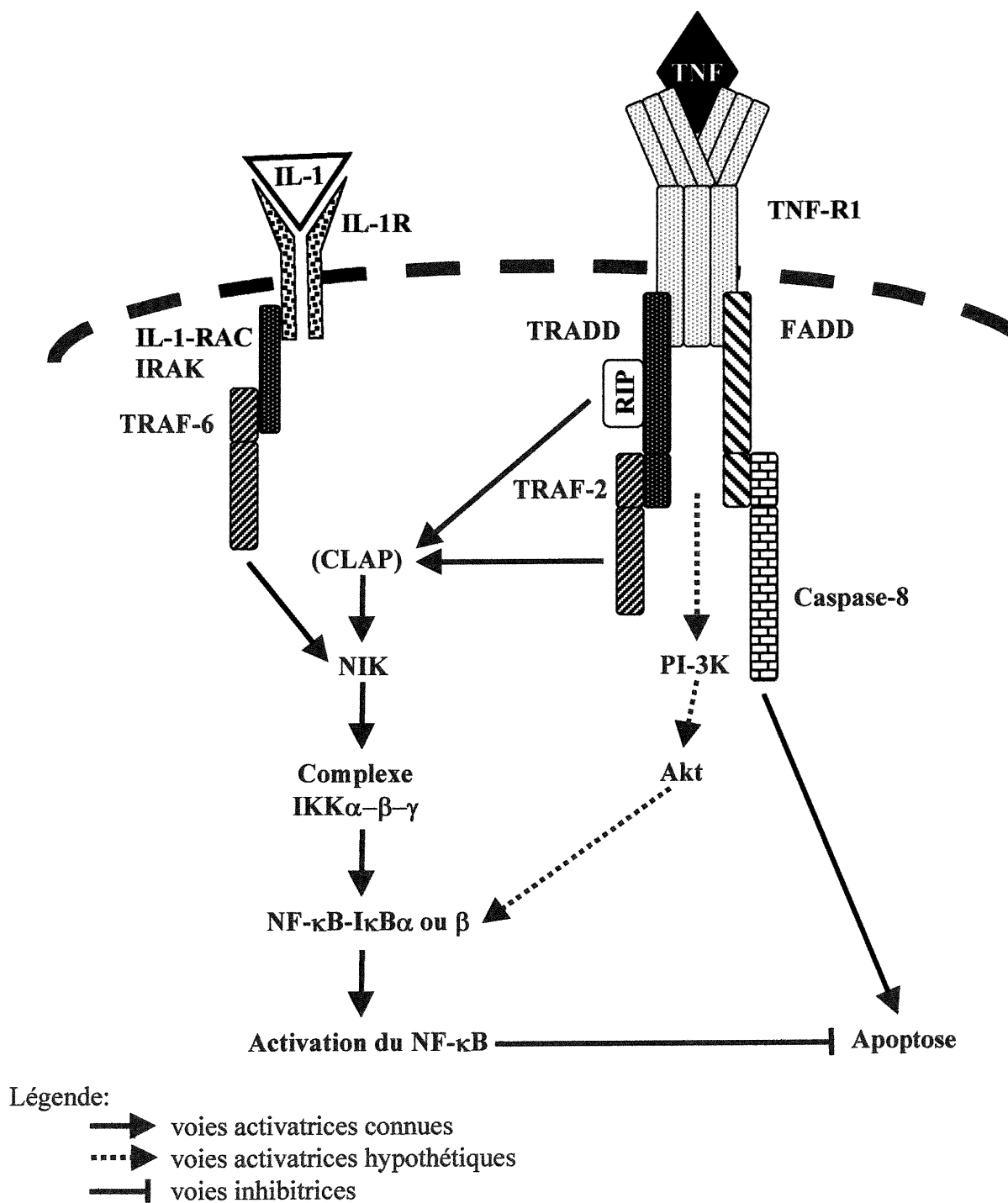


Figure 9. Activation du NF- κ B par l'IL-1 et le TNF. L'activation du récepteur TNF-R1 stimule deux voies opposées; une voie pro-apoptotique et une voie anti-apoptotique, par le recrutement de différentes sortes de molécules adaptatrices (FADD vs. TRADD) et effectrices (caspases vs. RIP et TRAF).

vu spécificité vis à vis de I κ B (Karin, 1998; Shirakawa et Mizel, 1989; Kumar et coll., 1994; Li et Sedivy, 1993).

Certaines exceptions à cette règle universelle dans l'activation du NF- κ B existent; c'est le cas des radiations ultraviolettes (UV), l'anoxie et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROI). L'activation du NF- κ B en réponse aux radiations UV, bien que dépendante de la dégradation de la protéine I κ B, ne requiert pas la phosphorylation de cette dernière (Bender et coll., 1998). D'autre part, en cas d'anoxie, la phosphorylation d'I κ B a lieu sur un résidu tyrosine 42. Dans ce cas, la phosphorylation d'I κ B la rend averse pour le domaine SH2 de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-kinase), qui la libère du dimère NF- κ B (Beraud et coll., 1999). Quant aux ROI, ils activent le NF- κ B d'une façon post-traductionnelle (Schreck et coll., 1991). Ce rôle des ROI serait dû au fait qu'ils sont des intermédiaires communs à différents agents qui activent le facteur NF- κ B (TNF, IL-1, PMA, LPS, radiations UV et ionisantes) (Li et Karin, 1999).

3.2. Rôle du facteur de transcription NF- κ B dans l'inflammation

Les cytokines pro-inflammatoires (i.e TNF et IL-1), celles impliquées dans la genèse et le développement des réactions immunitaires, et les infections virales et bactériennes sont de puissants activateurs du NF- κ B (Baeuerle et Henkel, 1994). De plus, les activateurs du NF- κ B sont des inducteurs des gènes codant pour différentes molécules inflammatoires. En l'occurrence, des cytokines (IL-1 β , TNF, IL-2, IL-6 et GM-CSF), des chémokines (IL-8, Macrophage inflammatory protein ou MIP-1 α , Macrophage chemoattractant protein ou MCP-1, eotaxine et Rantes), des molécules du CMH de classe I, des molécules d'adhésion cellulaire (E-Selectine, VCAM et ICAM-1) et des enzymes (iNOS et COX-2) qui jouent un rôle important dans l'inflammation (Barnes et Karin, 1997; Yamamoto et coll., 1995; Xie et coll., 1994). Les cytokines et chémokines amplifient le processus inflammatoire en activant les lymphocytes, les macrophages et les polynucléaires, et en les recrutant au niveau des sites inflammatoires. Ce phénomène est facilité par les molécules d'adhésion cellulaire exprimées sur les cellules endothéliales et les cellules épithéliales.

Il s'avère donc que le NF- κ B est activé par les produits des gènes qu'il induit (Tableau IV), d'où son rôle dans l'amplification des réponses immunitaires et inflammatoires (Figure 10) (Barnes et Karin, 1997). Aussi, la production des chémokines et l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, par les cellules activées par le stimulus inflammatoire initial, aident au recrutement plus efficace d'autres leucocytes au site inflammatoire. Là encore, le NF- κ B aura servi à l'amplification et à la propagation de la réponse inflammatoire.

3.3. Role du NF- κ B dans la protection contre l'apoptose

Le NF- κ B induit l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose. Il peut être impliqué dans l'induction de l'apoptose, mais il est généralement connu comme un facteur anti-apoptotique, ce dont nous allons traiter dans cette revue de littérature, étant donné que beaucoup de gènes impliqués dans cette voie sont caractérisés. L'apoptose est un processus physiologique très bien régulé et critique pour le développement des différents organes, l'homéostasie des tissus et l'élimination des cellules défectueuses telles que les cellules T auto-réactives au niveau du thymus, ou potentiellement dangereuses telles que les cellules cancéreuses. L'apoptose est déclenchée par une pléiade de stimuli (Fas-ligand, TNF) qui activent un programme de suicide cellulaire présent d'une façon constitutive dans pratiquement toutes les cellules. En effet, le programme apoptotique est exécuté des cystéines-protéases dites caspases qui clivent leurs substrats au niveau d'un résidu aspartate du côté C-terminal (Nunez et coll., 1998). Les substrats des caspases sont des protéines structurales (actine, laminine) dont le clivage induit une désagrégation de la cellule, et des protéines régulatrices de l'apoptose (i.e. Bcl-2) dont le clivage conduit à leur inactivation et à la mort cellulaire.

Le mécanisme par lequel le NF- κ B bloque l'apoptose est, dans la majeure partie des cas, la régulation positive de l'expression des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques dont les IAP (inhibitor of apoptosis proteins) et certains membres de la famille de protéines Bcl-2. Les protéines Bcl-2 sont très impliquées dans la régulation de l'apoptose. Bien que le gène *bcl-2* ne soit pas une cible du NF- κ B, plusieurs gènes de cette famille sont régulés par ce dernier. Il s'agit des protéines Bcl-2-like (A1/Bfl1, Bcl-

Tableau IV. Agents activateurs et gènes régulés par le NF- κ B*

Activateurs du NF-κB	Gènes régulés par le NF-κB
Bactéries <i>Helicobacter pylori</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Cytokines IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 TNF- α , TNF- β IFN- γ GM-CSF, G-CSF, M-CSF...
Composantes bactériennes Lipide A Lipopolysaccharide (LPS)	Molécules d'adhésion cellulaire ELAM (endothelial cell leucocyte adhesion molecule) ICAM (intercellular adhesion molecule) VCAM (vascular cell adhesion molecule)
Virus Virus de l'hépatite B Virus de l'immunodéficience (HIV-1) Virus de l'influenza	Enzymes Cyclooxygénase-2 (COX-2) NO-synthase inducible (iNOS) Lysozymes
Cytokines IL-1 IL-2 TNF- α TNF- β GM-CSF	Immunorécepteurs Chaîne α du récepteur à l'IL-2 Chaîne lourde ϵ des immunoglobulines Chaîne légère κ des immunoglobulines CMH de classe I Chaîne β du récepteur des cellules T Récepteur au TNF
Stimuli physiques Rayons UV-A, UV-B et UV-C Radiations γ	Facteurs de transcription c-Rel I κ B α p98/102 (precuteur de p52) p105 (precuteur de p50)
Mitogènes Ionophores calciques Concanavaline A (ConA) Phytohémagglutinine (PHA) Esters de phorbol (PMA) Antigènes	Régulateurs de l'apoptose Bfl1/A1 Bcl-xL Nr13 IAP IEX-1L
Dérivés Oxygénés	

* Tirés de Pahl H.L. 1999.

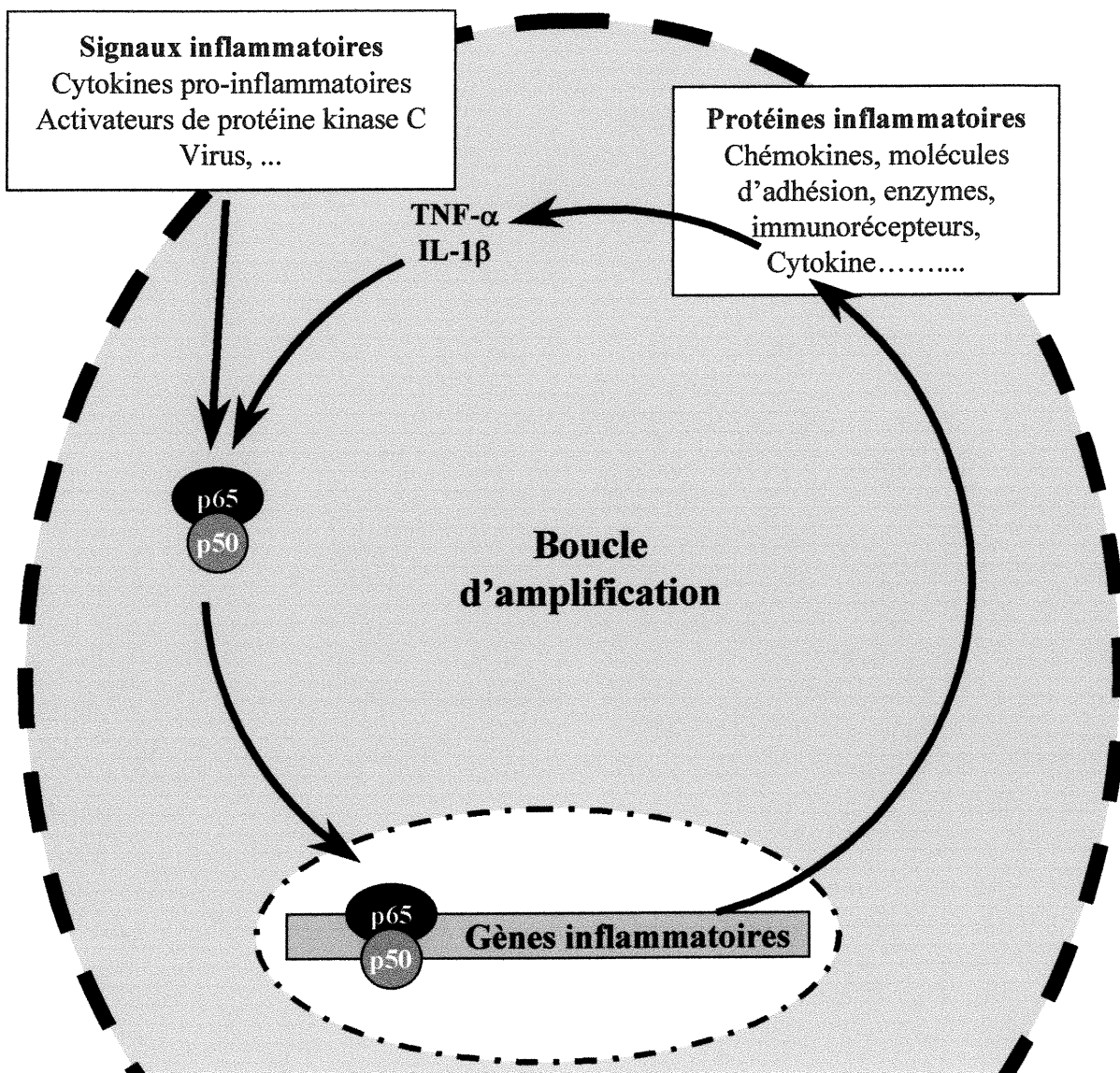


Figure 10. Boucle d'amplification de la réponse inflammatoire impliquant le facteur de transcription NF- κ B. Le NF- κ B est activé par une variété de stimuli inflammatoires; ceci aboutit à l'expression de gènes pour des cytokines, chémokines, enzymes et molécules d'adhésion cellulaire. Les cytokines (TNF- α et IL-1 β) exprimées en réponse à l'activation du NF- κ B augmentent l'activité de ce dernier. Il en résulte l'amplification et le prolongement de la réponse inflammatoire. (Modifiée de Barnes et Karin, 1997).

X_L et Nr13) dont les gènes contiennent tous des sites κ B fonctionnels (Lee et coll., 1999a; Lee et coll., 1999b). Par exemple, la sur-expression de A1/Bfl1 protège les lymphocytes B de l'apoptose induite par l'interaction antigène-BcR. Dans ce cas, l'inhibition de l'apoptose est due au blocage du relargage du cytochrome C et à l'inhibition de l'activation de la caspase-3 (Wang et coll., 1999).

D'autres protéines anti-apoptotiques dont l'expression est régulée par le NF- κ B comprennent les protéines TRAF-1 et 2, et c-IAP-1 et 2 (Wang et coll., 1998). Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines TRAF jouent un rôle de molécules adaptatrices en recrutant et en activant NIK menant ainsi à l'activation du dimère NF- κ B. Les protéines c-IAP, qui sont des protéines inhibitrices de l'apoptose par action directe ou indirecte sur les caspases (Lacasse et coll., 1998), seraient par contre impliquées dans le blocage de l'activation de la caspase-8. En outre, IEX-1L, dont l'expression est régulée par le NF- κ B, joue un rôle protecteur contre la mort cellulaire par apoptose induite par le TNF- α et Fas (Wu et coll., 1998).

D'autre part, le NF- κ B est impliqué dans la régulation des phases du cycle cellulaire. En effet, il active l'expression de la cycline D1 qui est impliquée dans la régulation positive de la transition des phases G1 à S (Guttridge et coll., 1999; Kontgen et coll., 1995). Le NF- κ B participe aussi à cette régulation, via des interactions protéine-protéine avec des complexes régulateurs du cycle cellulaire, tel que le complexe cycline E-Cdk 2 (cycline-dependent kinase 2) par l'intermédiaire de son association avec les protéines CBP/p300 et p16INK4 (Wolff et Naumann, 1999; Perkins et coll., 1997).

3.4. Le NF- κ B: Un médiateur central de la réponse immunitaire

Le NF- κ B est souvent appelé "médiateur central de la réponse immunitaire" vu le nombre impressionnant des stimuli qui l'activent et des gènes qu'ils régulent (Tableau 4). Une variété de bactéries et de virus l'activent. Aussi, la majorité des protéines dont l'expression est régulée par ce facteur participent à l'élaboration de la réponse immunitaire. Elles incluent vingt-sept cytokines et chémokines, des immunorécepteurs tels que les molécules du CMH et les molécules d'adhésion cellulaire (Pahl, 1999).

Le NF- κ B est un régulateur de la réponse immunitaire au niveau des cellules présentatrices de l'antigène et des lymphocytes (Sha, 1998). Il est impliqué dans le maintien de l'architecture de la zone marginale (réseau de cellules dendritiques folliculaires) et la formation du centre germinale en réponse aux antigènes T-dépendants (Franzoso et coll., 1998). Aussi, il joue un rôle critique dans l'activation et la prolifération des lymphocytes B et T, et la régulation des réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire (Kontgen et coll., 1995). Il est à noter que l'activation du NF- κ B au niveau des lymphocytes nécessite l'action combinée d'une mobilisation du calcium intracellulaire, et l'activation d'une PKC. Les stimuli qui augmentent les concentrations de calcium intracellulaire seules (ionophores calciques) ou l'activation de la PKC seule (esters de phorbol PMA) activent peu ou pas le NF- κ B (Tong-Starksen et coll., 1989). Cependant, la combinaison des deux stimuli induit une activation du NF- κ B à un niveau semblable à celui en réponse au TNF. D'autres part, le NF- κ B est impliqué dans le phénomène de commutation d'isotype (isotype switching) des immunoglobulines (Snapper et coll., 1996) et dans la transition des lymphocytes double-positifs CD4⁺/CD8⁺ aux lymphocytes simple-positifs CD4⁺ ou CD8⁺ (Sen et coll., 1995).

3.5. Inhibiteurs du facteur de transcription NF- κ B

Les inhibiteurs du NF- κ B comprennent une variété de molécules naturelles ou de synthèse, incluant les anti-oxydants, les inhibiteurs du protéasome et des peptides qui miment l'action de la sous-unité inhibitrice I κ B (Tableau V).

D'un point de vue clinique, ces molécules présentent beaucoup d'intérêt en tant que traitement pour certains cancers, des maladies neurodégénératives ou troubles inflammatoires. En revanche, en recherche fondamentale, leur utilisation est de grand intérêt pour justifier l'implication du NF- κ B dans la régulation transcriptionnelle d'une protéine ou en tant que maillon dans les voies de transduction d'un récepteur donné. Dans ce cadre, une attention particulière sera accordée à certains inhibiteurs que nous avons utilisés dans notre travail.

Le NF- κ B est activé par des agents oxydants et cette activité est inhibée par des anti-oxydants (Pahl, 1999). En l'occurrence, le pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)

Tableau V. Inhibiteurs du facteur de transcription NF- κ B

Classes	Molécules
* Anti-oxydants	Glutathione N-acétyl-L-cystéine (NAC) <i>Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)</i> Vitamine C
* Inhibiteurs du protéasome	Cyclosporine A Tacrolimus (FK506) Tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)
* Inhibiteurs de la phosphorylation et la dégradation d'I κ B	Aspirine <i>Gliotoxine</i> Inhibiteurs des tyrosines kinases (i.e. genestéine)
* Inhibiteurs du transport nucléaire de NF- κ B	<i>NF-κB SN50</i>
* Régulateurs de l'expression d'I κ B	Glucocorticoïdes IL-10 IL-11 IL-13

Tiré de Epinat et Gilmore, 1999.

N.B. les molécules en italique gras sont utilisées dans notre étude.

inhibe l'activation du NF- κ B vraisemblablement en chélatant des ROI (Sen et coll., 1996) (Figure 11). En général, l'effet des agents anti-oxydants s'exercent en bloquant la production des ROI, ce qui diminue la dégradation d'I κ B, ou en réduisant l'état oxydé du NF- κ B ce qui inhibe son interaction avec l'ADN (Shumilla et coll., 1998).

La dernière étape dans l'activation du NF- κ B est la dégradation du I κ B par le protéasome 26S. Ainsi, les inhibiteurs du protéasome forment une classe d'inhibiteur du NF- κ B (Palombella et coll., 1994) (Figure 11). Ces molécules incluent la cyclosporine, le Tacrolimus (FK506) et le N- α -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK). Dans cette catégorie, on peut aussi inclure la gliotoxine. Bien que son mode d'action soit peu connu, elle agirait en inhibant la dégradation d'I κ B (Pahl et coll., 1996).

Certains inhibiteurs de NF- κ B bloquent son transport nucléaire. Une approche innovatrice, que nous avons utilisée dans notre étude, est l'utilisation d'un peptide qui pénètre dans la cellule et qui contient la séquence de localisation nucléaire de la sous-

unité p50. Ce peptide inhibe la translocation nucléaire des dimères contenant la sous-unité p50 en saturant la machinerie responsable du transport nucléaire du NF- κ B (Lin et coll., 1995) (Figure 11). Une autre façon d'inhiber le transport nucléaire du NF- κ B est l'expression de formes mutées compétitrices d'I κ B. Ces dernières sont résistantes à la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation. Il en résulte la séquestration perpétuelle du NF- κ B dans le cytoplasme (Wang et coll., 1996).

Finalement, les agents anti-inflammatoires s'avèrent être de puissants inhibiteurs du NF- κ B. Les glucocorticoïdes, tel que le dexamétasone, agissent principalement à deux niveaux, en interagissant avec la machinerie transcriptionnelle au niveau des sites κ B (Ray et Préfontaine, 1994), ou en augmentant l'expression d'I κ B α qui induit une inhibition soutenue de NF- κ B (Scheinman et coll., 1995) (Figure 11).

Le NF- κ B et les autres facteurs de transcription agissent en synergie pour la transduction de signaux cellulaires qui permettent l'expression des fonctions des cellules immunitaires. Ces signaux proviennent de l'interaction des cellules immunitaires, via leurs récepteurs membranaires ou cytoplasmiques, avec des molécules propres au système immunitaire ou des autres systèmes physiologiques de l'organisme. L'immunorégulation par la sérotonine implique le transporteur 5-HTT et les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃ et 5-HT₇. La caractérisation de ces derniers sur les lymphocytes T et les macrophages est pratiquement achevée, en accord avec les critères de classification de l'IUPHAR (Hoyer et coll., 1994). Quant aux cellules NK et lymphocytes B, le schéma n'est pas encore complet. Dans le cas des lymphocytes B, nous avons caractérisé une régulation fonctionnelle de ces cellules par la sérotonine via le 5-HT_{1A}. Cependant, aucune étude moléculaire n'a été effectuée pour caractériser ce récepteur sur ces cellules. Ainsi, nous avons entamé ce projet de recherche pour investiguer l'expression et la fonction du récepteur 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes. Dans la prochaine section, nous exposerons nos buts et objectifs spécifiques.

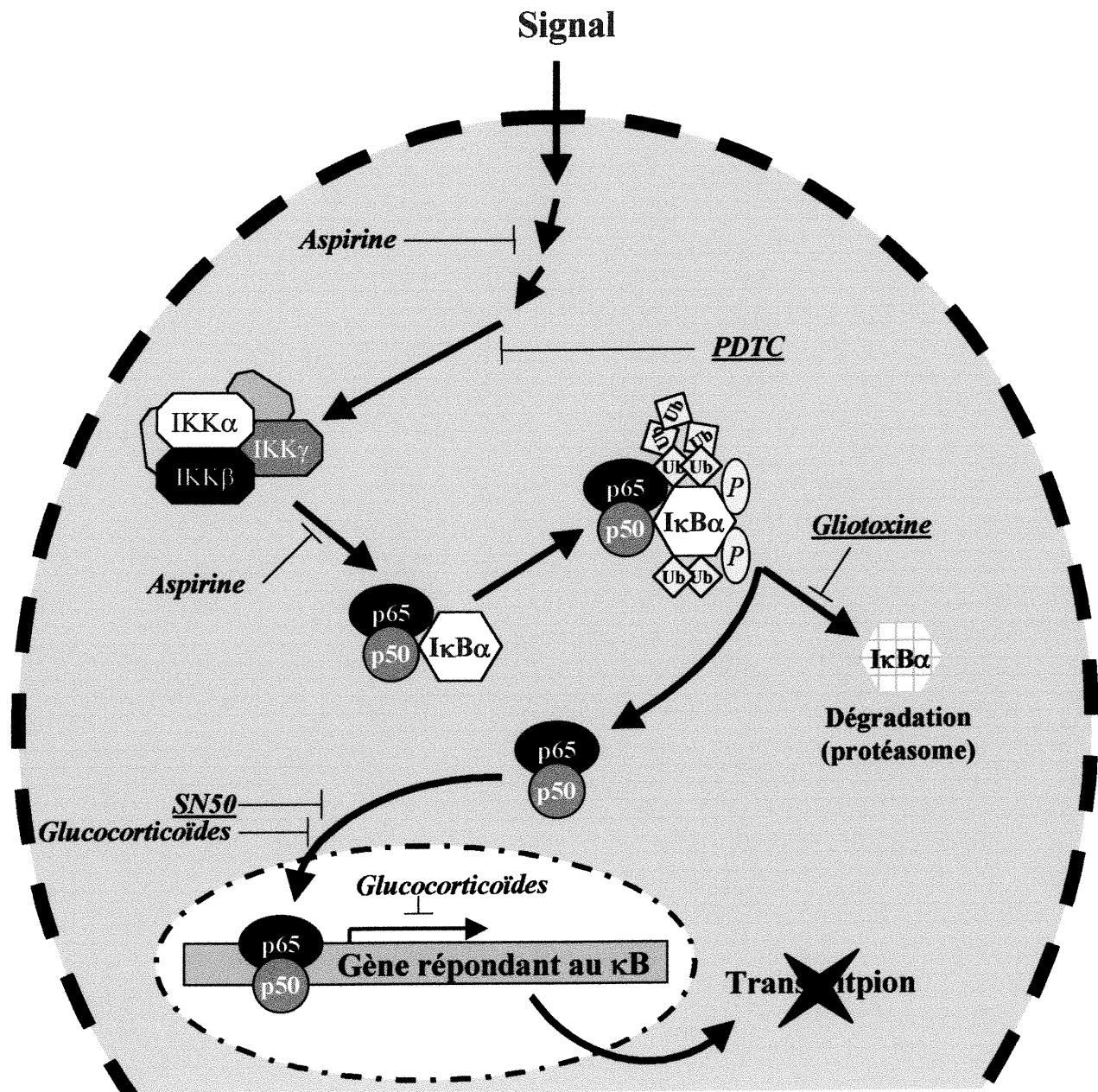


Figure 11. Niveaux d'action des différents inhibiteurs des voies de signalisation NF- κ B. (N.B. ceux utilisés dans cette étude sont soulignés)

3.6. Buts et objectifs spécifiques

Le premier but de notre étude était de caractériser de façon moléculaire le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes. Aussi, nous avons trois objectifs spécifiques:

1. Étudier l'expression de l'ARN messager et de la protéine 5-HT_{1A} des lymphocytes B et T,
2. Évaluer la régulation de l'ARN messager et de la protéine 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes B et T activés,
3. Déterminer les mécanismes moléculaires qui régissent la régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} et le rôle du NF-κB.

Notre deuxième but était d'étudier le potentiel lymphotrophique et lymphoprotecteur de la sérotonine, avec trois objectifs spécifiques:

1. Étudier l'implication du récepteur 5-HT_{1A} dans les effets amplificateurs de la sérotonine sur la prolifération des lymphocytes T.
2. Étudier l'implication du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes dans les effets de la sérotonine sur la protection contre la mort cellulaire par apoptose.
3. Étudier la mobilisation du facteur de transcription NF-κB par la sérotonine au niveau des lymphocytes activés.

Les résultats de ces travaux sont présentés sous forme de manuscrits dans les chapitres suivants.

CHAPITRE 2.

MANUSCRIT I:

**TRANSCRIPTIONAL MECHANISMS FOR INDUCTION OF 5-HT_{1A}
RECEPTOR mRNA AND PROTEIN IN ACTIVATED B AND T
LYMPHOCYTES**

Journal of Biological Chemistry 276: 4382-4388, 2001

TRANSCRIPTIONAL MECHANISMS FOR INDUCTION OF 5-HT_{1A} RECEPTOR mRNA AND PROTEIN IN ACTIVATED B AND T LYMPHOCYTES*

Mohamed Abdouh‡, John M. Storrings§, Mustapha Riad¶, Yves Paquette||, Paul R. Albert, Elliot Drobetsky||, and Edouard Kouassi‡‡**

From the Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, P.Q. H9R 1G6, Canada, the Departments of ‡Pharmacology and ¶Pathology and Cellular Biology, University of Montreal, the §Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, the ||Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, and the **Neuroscience Research Institute, University of Ottawa

*This research was supported by Medical Research Council (MRC) of Canada Grant MT-13259 (to E.K.), and by AstraZeneca/FRSQ Grant 981120 (to E.K.).

‡‡To whom all correspondence should be addressed:

Edouard Kouassi

Tel.: 514-630-8851; Fax: 514-630-8850

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

SUMMARY

Serotonin up-regulates B and T lymphocyte proliferation by activating mitogen-induced cell surface 5-HT_{1A} receptors. The mechanism of 5-HT_{1A} receptor induction by B and T cell mitogens at the mRNA and protein levels in mouse splenocytes was addressed. Quantitation by RNase protection assay showed maximal increases of 3.4-, 3.0-, 3.8-, and 4.9-fold in relative 5-HT_{1A} mRNA levels after 48 h of stimulation of splenocytes with LPS, PHA, Con A, or PMA plus ionomycin, respectively, as compared to unstimulated cells. Mitogens did not alter 5-HT_{1A} mRNA stability ($T_{1/2}$ =26 h), but induction of 5-HT_{1A} mRNA was blocked by the transcriptional inhibitor actinomycin D (10 μ g/ml) and by inhibition of nuclear factor (NF)- κ B signaling. Additionally, mitogenic stimulation of transcription was paralleled by increased cell surface 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in splenocytes. Thus mitogen-induced 5-HT_{1A} receptor expression appears to involve transcriptional regulation by the NF- κ B signaling cascade. Increased expression of the 5-HT_{1A} receptor in activated B and T lymphocytes may enhance the immune response and provide therapeutic target for tissue inflammation and immune stimulation.

INTRODUCTION

Serotonin (5-HT)¹ is a neuroimmunomodulator that is widely distributed in brain and peripheral tissues, and which is released by activated platelets during the course of tissue inflammation [1]. 5-HT is also accumulated by and released from noradrenergic nerve terminals that are in close contact with lymphocytes in lymphoid organs [2-4]. Rodent mast cells are another important source which release their stored 5-HT following exposure to antigen and IgE sensitizing Ab, or to neuropeptides such as somatostatin, substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide, the latter being released from peripheral nerves [5].

Among the numerous 5-HT receptors, 5-HT_{1A} belongs to G-protein-coupled receptor superfamily, and is also widely distributed in brain and immune tissues [6, 7]. The 5-HT_{1A} gene has been cloned previously in human [8, 9], rat [10], and mouse [11], manifesting very high nucleotide and amino acid sequence homology in their respective putative transmembrane regions. 5-HT_{1A} mRNA has been detected in various human tissues including lymph nodes, spleen, and thymus [8], as well as in human peripheral blood mononuclear cells [12] and activated T lymphocytes [13]. In functional studies using selective agonists and antagonists, it has been shown that the 5-HT_{1A} receptor is implicated in the regulation of T cell responses including human T-cell proliferation [13-16], production of Th1 cytokines such as IL-2 and IFN- γ both in mice [17] and in human [15, 16], and contact sensitivity reactions in mice [17]. We have shown previously that mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation in rodents is up-regulated by 5-HT via specific interaction with the 5-HT_{1A} receptor [18]. Thus, immune and inflammatory responses may be regulated in part through 5-HT_{1A} receptor expression in B and T lymphocytes.

A recent review of the role of 5-HT in the immune system and in neuroimmune interactions has underscored the necessity of characterizing the distribution of the various 5-HT receptors in different immune cell populations, preferably by using

¹ The abbreviations used are : 5-HT, 5-Hydroxytryptamine or serotonin; Ig, immunoglobulin; Ab, antibody; NF- κ B, Nuclear factor- κ B; LPS, lipopolysaccharide; PHA, phytohemagglutinin; PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate; PBS, phosphate-buffered saline; Con A, concanavalin A; PE, phycoerythrin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, Reverse transcriptase-PCR; bp, base pairs.

molecular biological methods [7]. The previous studies cited above using essentially functional and radioligand binding criteria suggest that 5-HT_{1A} receptor expression is increased following mitogenic stimulation of both murine B cells [18] and human T cells [13], but little is known about the molecular mechanisms underlying this effect. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) is a ubiquitous and inducible transcription factor involved in many immune and inflammatory responses, including activation and proliferation of B and T lymphocytes stimulated by mitogens such as LPS, PHA, and PMA [19-21]. NF- κ B is mainly composed of p50 and p65 subunits which are normally retained in the cytosol of non-stimulated cells by inhibitory molecules, I κ B. In response to stimuli, I κ B are rapidly phosphorylated and degraded, allowing translocation of NF- κ B complexes into the nucleus and activation of NF- κ B elements [22].

In this report, we used RNase protection assay to quantitate the expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA in unstimulated vs. mitogen-stimulated mouse splenocytes. In addition, we took advantage of the availability of pharmacological inhibitors of NF- κ B [23-25] to explore its role in regulation of 5-HT_{1A} receptor mRNA expression following mitogenic stimulation. Also, we used an affinity-purified anti-5-HT_{1A} antiserum [26] to evaluate the expression of the 5-HT_{1A} receptor protein in the splenocytes. Our data demonstrate that 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein are markedly increased following mitogenic stimulation of B and T lymphocytes with similar quantitative variation in these lymphocyte populations. Furthermore our data indicate that up-regulation of mitogen-stimulated B and T lymphocyte 5-HT_{1A} receptor occurs at the transcriptional level, and that mitogen-induced nuclear translocation of NF- κ B may be one of the important signaling mechanisms involved.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice and Reagents

Female BALB/c mice, 6-12 weeks of age, were purchased from Charles River (St-Constant, Canada) and maintained in our animal facilities until use. All culture media were purchased from Gibco BRL (Burlington, Canada). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Hyclone (Logan, UT), and dialysed against PBS to remove molecules of molecular weight <12-14 kD. Escherichia coli LPS (serotype 0111:B4), PHA, Con A, PMA, and 5-HT hydrochloride were from Sigma (St-Louis, MO), R(+)-8-OH-DPAT hydrobromide (R-DPAT) and WAY100635 maleate from RBI (Natick, MA), and ionomycin from Calbiochem (La Jolla, CA). [³H]thymidine (specific activity 2 Ci/mmol) was obtained from Du Pont NEN (Mississauga, Canada), and [³H]WAY100635 (specific activity 81 Ci/mmol) from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, England). Anti-5-HT_{1A} antiserum was produced as described previously [26], and all other Ab were from Pharmingen (San Diego, CA).

Isolation and Stimulation of Splenocytes

BALB/c mice were killed by cervical dislocation. Spleens were then aseptically harvested and gently teased into a single-cell suspension in Hanks' balanced salt solution. Red blood cells were removed by osmotic shock with NH₄Cl, and splenocytes were resuspended in a culture medium consisting of RPMI-1640 medium supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM), and 10% decomplemented FBS. Cells were cultured in flat-bottomed 96-well culture plates (Gibco BRL) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C at a density of 4 x 10⁵ cells/well in a total volume of 200 µl. Cells were stimulated by incubation for different periods of time in the presence or absence of LPS (10 µg/ml), PHA (20 µg/ml), Con A (5 µg/ml), or a combination of PMA (1 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml). In some experiments, splenocytes were incubated with 10 µg/ml actinomycin D (ICN, Saint-Laurent, Canada), to distinguish between existing and newly transcribed mRNA. To prevent the activation of the transcription factor NF-κB, splenocytes were incubated for 48 h with mitogens in the presence of 10-50 µg/ml SN50 (Calbiochem), 5-50 µM pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC, Sigma), or 0.01-10 µg/ml gliotoxin (Sigma). As

controls for SN50 and gliotoxin specificity, their respective inactive analogues SN50M (50 µg/ml) and methylthiogliotoxin (1-10 µg/ml) were also used. Cell counting and viability were assessed by trypan blue exclusion, and all chemicals were used at noncytotoxic concentrations.

Purification of Resting and Activated B and T Lymphocytes

Purification of B and T lymphocytes was achieved by negative selection of splenocytes using flow cytometry sorting with Ab directed against granulocytes and macrophages (anti-CD11b-PE), NK cells (anti-Ly49C, 5E6-PE), and T lymphocytes (anti-Thy-1.2-PE), or B lymphocytes (anti-CD19-FITC), as described previously [27]. Dead cells were stained with the vital dye propidium iodide (1 µg/ml, Molecular probes, Eugene, OR). Resting and activated lymphocytes were gated appropriately and separated in two different regions using forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles. Cells that were negative for the indicated cell surface markers and for propidium iodide staining were sorted on a FACStar-Plus cell sorter (Becton Dickinson, San Jose, CA). The purity of the resulting B or T cells was assessed by FCM with anti-Thy-1.2-PE and anti-CD19-FITC, and it ranged between 93 and 97%.

Proliferation Assay

Splenocytes were incubated for 30 min with or without 5×10^{-5} M WAY100635 before stimulation for 72 h with mitogens in the presence or absence of 10^{-4} M 5-HT or 5×10^{-5} M R-DPAT, and cultures were pulsed with 1 µCi of [³H]thymidine for the last 6 hours of incubation. Cell nuclei were harvested, and radioactivity was counted with a Wallac System 1409 scintillation counter (Wallac Oy, Turku, Finland). Determinations of [³H]thymidine uptake were made in triplicate wells and results were expressed as arithmetic means of counts per minute (cpm) ± SEM.

RNA Preparation and RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from cell suspensions by the TRIZOL Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer instruction. For RT-PCR, 1 µg of total RNA was treated for 15 min at 37 °C with 2 U amplification grade DNase I (Gibco BRL) to remove genomic DNA. After denaturation for 10 min at 75 °C,

cDNA was synthesized for 1 h at 42 °C by adding Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL) and 1 µM random hexamer primers (Boehringer-Mannheim). 1/8 volume of the resulting first strand cDNA was used as template during the subsequent PCR amplification in a PCR machine (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Montreal, Canada) using 1.25 U Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Laval, Canada) in the buffer provided with 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂, in the presence of 200 µM dNTP's, and 250 nM of the primers (synthesized by Gibco BRL) in a total volume of 25 µl. The thermocycle conditions were 22 cycles of 94°C, 60 s, 62°C, 60 s, 72°C, 60 s. There was also an initial denaturation step at 94°C for 5 min, and a terminal extension step at 72°C for 10 min. The sense primer for 5-HT_{1A} was 5'-ACCCCGACGCGTGCACCATCAG-3', and the antisense primer was 5'-GCAGGCGGGRCATAGGAG-3' derived respectively, from the second extracellular loop, and the third intracytoplasmic loop of the rat and mouse 5-HT_{1A} genes, which gave a 413-bp PCR product. This set of primers allowed detection of 5-HT_{1A} mRNA in several positive controls including the cell lines LZD-7 and LM1A which are derived from the mouse fibroblasts Ltk- cells transfected with the rat and mouse 5-HT_{1A} cDNA, respectively, and in RNA extracts from rat and mouse brain. The sense primer for GAPDH was 5'-CAACGACCCCTTCATTGACCTC-3', and the antisense primer was 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3', which gave a 602-bp PCR product. The PCR products were separated on a 1.5 % agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized with UV light.

RNase Protection Assay

Detection and quantitation of 5-HT_{1A} mRNA expression was carried out using an RNase protection assay (Direct Protect Lysate Ribonuclease Protection Assay Kit from Ambion) with 18S ribosomal RNA as an internal standard. To prepare the template for 5-HT_{1A} riboprobes the first 860 bp of the mouse 5-HT_{1A} cDNA were cut from the M1A-KS+ vector [11] using the Pst I enzyme. This cDNA fragment was subsequently inserted in the antisense orientation with respect to the T3 RNA polymerase promoter found in the pBluescript II KS+ plasmid (Promega). To synthesize radiolabeled 5-HT_{1A} antisense cRNA, the plasmid was linearized with the enzyme BssH II and transcribed with T3 RNA polymerase (Ambion) and 50 µCi of 800 Ci/mmol [α -³²P]UTP (Mandel, Guelph,

Canada) using the MAXIscript In vitro Transcription Kit (Ambion) at 37°C for 1 h. The resulting transcripts were then treated with 2 U RNase-free DNase I at 37°C for 15 min. The 18S ribosomal RNA antisense probe was synthesized using a 18S cDNA template (Ambion) which was transcribed with T3 RNA polymerase in the presence of 30 µCi of [α -³²P]UTP. Total RNA was extracted from samples of 10⁶ cells in 50 µl of Lysis/Denaturing solution (Ambion) and coprecipitated with the freshly radiolabeled 5-HT_{1A} (0.25 µCi) and 18S (0.015 µCi) riboprobes, and incubated overnight at 37°C. A volume of 500 µl of a RNase mix containing 5 U RNase A and 200 U RNase T1 (Ambion) was then added to the samples and incubated at 37°C for 1 h to digest the unprotected riboprobes and RNA. The reaction was stopped by adding proteinase K and sodium sarkosyl, and by re-incubating at 37°C for 30 min. The protected fragments were precipitated with 500 µl isopropanol, resuspended in a gel loading buffer, and resolved on a 8 M urea, 5% acrylamide gel. The sizes of the expected protected fragments were 124-bp and 80-bp for 5-HT_{1A} and 18S, respectively. Radiolabeled RNA transcripts from Century Marker Template set (Ambion) were used as size markers. The results were quantitated on a PhosphorImager (GS-525 Molecular Imager System, BioRad Laboratories, Hercules, CA). Relative 5-HT_{1A} levels were calculated by normalizing the 5-HT_{1A} mRNA band to that of the 18S ribosomal RNA.

Immunocytofluorometry Analysis of 5-HT_{1A} Receptor Protein

A rabbit polyclonal anti-rat 5-HT_{1A} receptor antiserum was used for this study. It is directed against a synthetic antigenic polypeptide that is derived from the third intracytoplasmic loop of the rat 5-HT_{1A} receptor, with 92% homology with the corresponding region of mouse 5-HT_{1A} protein. Extensive characterization of this antiserum has been reported elsewhere [26], and it cross-reacts with mouse 5-HT_{1A} receptor. Samples of 10⁶ cells were permeabilized with absolute ethanol (95%) at 4°C for 30 min, and fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 30 min at 4°C. Cells were then incubated overnight with anti-rat 5-HT_{1A} receptor antiserum (1:1000) in Ab buffer consisting of PBS containing 1% (v/v) normal goat serum (Cederlane, Hornby, Canada). After several washings in PBS (3 x 10 min), cells were incubated in PE-labeled goat anti-rabbit Ig (1:250) for 1 h, and washed again in PBS (3 x 10 min). Cells were

analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using the LYSIS program provided by the manufacturer. For double staining of B or T lymphocytes, cells were stained first with FITC-conjugated anti-CD19 Ab or FITC-conjugated anti-Thy-1.2 Ab, and then with the anti-5-HT_{1A} receptor antiserum followed by goat anti-rabbit-Ig-PE as described above.

Immunocytochemistry Analysis of 5-HT_{1A} Receptor Protein

Cells (10^6) were layered 1 h at room temperature on microscope slides pretreated with 50 µg/ml poly-D-lysine. Slides were rinsed with PBS (50 mM, pH 7.4), fixed for 1 h at room temperature with 2% paraformaldehyde in PBS, and washed in PBS. Cells were then preincubated for 1 h in a blocking solution of PBS containing 5% normal goat serum, 0.2% Triton X-100, and 0.5% gelatin to saturate non-specific sites, and incubated for 2 h with a 1/1000 dilution of rabbit anti-5-HT_{1A} antiserum. After washes in PBS (3 x 10 minutes), the slides were incubated for 1 hour with biotinylated goat anti-rabbit IgGs diluted 1/1000 in blocking solution, rinsed in PBS (3 x 10 min), and incubated for 1 h with a 1/1000 dilution of horseradish peroxidase conjugated streptavidin. This was followed by successive washes in PBS (2 x 10 min) and in Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.4; 2 x 10 min), and then incubated in hydrogen peroxide (0.01%) in the presence of 3,3'-diaminobenzidine (0.05%) in Tris-HCl buffer. The reaction was stopped by several washes in the same buffer. The slides were then dehydrated in a graded series of ethanol, followed by toluene, and coverslipped with DPX mountant (Fluka, Oakville, Canada). Immunocytochemical control consisted of processing slides as above, except for replacement of the anti-5-HT_{1A} antiserum by preimmune rabbit serum at the same dilutions. Staining was examined by light microscopy at 400X final magnification.

Radioligand Binding Assay

Binding studies of [³H]WAY100635 were performed on unstimulated and mitogen-stimulated lymphocytes, following the procedures previously described by us for [³H]8-OH-DPAT [18], except that [³H]WAY100635 was used at 0.5-15 nM, and that the Whatman GF/B filters through which cell suspensions were filtered were presoaked in a 0.5% aqueous solution of polyethylenimine for 30 min to limit nonspecific binding of the radioligand [28].

RESULTS

5-HT_{1A} Receptor-mediated Up-regulation of Mitogen-stimulated B and T Lymphocyte Proliferation

Previously we demonstrated that 5-HT increases mitogen-stimulated murine B lymphocyte proliferation through a 5-HT_{1A} receptor-mediated mechanism [18]. Here, we used mouse splenocytes stimulated by the T cell mitogen PHA to determine whether T lymphocyte proliferation is influenced by 5-HT_{1A} receptor ligands. Preliminary dose response studies indicated that 5-HT (10^{-11} - 10^{-4} M) and the selective 5-HT_{1A} receptor agonist R(+)-8-OH-DPAT (R-DPAT, 10^{-11} - 10^{-4} M) increased PHA-stimulated T lymphocyte proliferation in a dose-dependent manner with optimal concentrations of 10^{-4} M and 5×10^{-5} M, respectively. Those maximally effective concentrations were used in combination with the relatively selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 to evaluate receptor specificity of 5-HT and R-DPAT action. Fig. 1A shows that 5×10^{-5} M WAY100635 effectively abrogated 5-HT- and R-DPAT-mediated enhancement of activated T lymphocyte proliferation, thus implicating the 5-HT_{1A} receptor in the control of T cell proliferation. The combination of PMA plus ionomycin is known to bypass antigen receptor signaling in both B and T lymphocytes, engendering a potent activation and proliferation of these cells [29-31]. To test whether 5-HT_{1A} ligands can influence B and T cell proliferation in this model, splenocytes were stimulated with a mitogenic combination of PMA (1 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml), in the presence of 5-HT or R-DPAT, with or without WAY100635. Fig. 1B shows that 5-HT and R-DPAT increased splenocyte proliferation induced by PMA plus ionomycin, and that WAY100635 reversed agonist-induced mitogenic potentiation, further indicating a role for 5-HT_{1A} receptor activation. Thus, we chose the model of mouse splenocytes incubated in the presence or absence of PMA plus ionomycin for most of the following experiments in order to further characterize the 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein which are expressed in B and T lymphocytes.

5-HT_{1A} Receptor mRNA Expression in Mitogen-stimulated Splenocytes

The 5-HT_{1A} receptor belongs to the family of G-protein coupled receptors. These receptors are characterized by the presence of seven putative transmembrane domains

showing a high degree of similarity between members of this family, whereas most sequence differences are seen in the extracellular and intracellular loops [6]. We used primers derived from the second extracellular loop, and from the third cytoplasmic loop, to carry out PCR assays for 5-HT_{1A} receptor on cDNA generated by RT of total RNA isolated from splenocytes before and after mitogenic stimulation with PMA (1 ng/ml) plus ionomycin (500 ng/ml). RNA samples from the mouse Ltk⁻ and LM1A cell lines were used as negative and positive controls, respectively. Fig. 2 shows the presence of a 5-HT_{1A} transcript in mitogen-stimulated splenocytes that was identical in size to the signal obtained in LM1A cells. Among a total of 6 experiments, 5-HT_{1A} mRNA was expressed in all splenocyte samples stimulated by PMA plus ionomycin. In marked contrast, 5-HT_{1A} mRNA was not detectable (n=4) or only barely detectable (n=2), in samples of unstimulated splenocytes, and in the latter case only if the amount of cDNA introduced in the PCR reaction was increased by a factor of at least 4-fold. Each of the RNA samples were also subjected to PCR assays without RT, and no DNA fragment was obtained, indicating that the product observed represented amplification of 5-HT_{1A} cDNA, and did not result from amplification of contaminating genomic DNA.

5-HT_{1A} Receptor mRNA is Up-regulated in Activated B and T Lymphocytes

A quantitative analysis of 5-HT_{1A} up-regulation following treatment with various B and T cell mitogens was performed using the RNase protection assay. Splenocytes were incubated for different periods of time in the presence of culture medium (unstimulated control), LPS, PHA, Con A, or a combination of PMA plus ionomycin, and 5-HT_{1A} mRNA levels were determined and normalized to 18S ribosomal RNA expression. Fig. 3 shows that 5-HT_{1A} mRNA was expressed in unstimulated splenocytes and was increased by all four mitogens in a time-dependent manner. The level of 5-HT_{1A} receptor mRNA was significantly enhanced after 24 h incubation, reached a maximum at 48 h, and declined towards the level in unstimulated cells after 72 h of culture. As shown in Table I, relative to 5-HT_{1A} mRNA level in freshly isolated splenocytes, the level of increase in 5-HT_{1A} mRNA in splenocytes treated for 48 h with mitogens was 3.4-, 3.0-, 3.8-, and 4.9-fold with LPS, PHA, ConA, or PMA plus ionomycin, respectively. There was no increase in 5-HT_{1A} expression in cells incubated for 48 h in the absence of mitogen. The level of 5-HT_{1A} expression correlated positively with the frequency of

mitogen-induced blast transformation which averaged 41%, 47%, 83%, and 88% in splenocytes stimulated for 48 h with LPS, PHA, Con A, and PMA plus ionomycin, respectively (Table I).

Since mitogen-stimulated splenocytes contain mixtures of different cell types in different activation states, a more rigorous approach was required to distinguish between B and T lymphocytes, and between resting and activated lymphocytes. To this end, resting and activated cells were separated by flow cytometry on the basis of their light scatter properties, while CD19-positive B cells and Thy-1.2-positive T cells were sorted by negative selection to 93-97 percent purity. 5-HT_{1A} mRNA and 18S rRNA expressions were measured in unsorted as well as in sorted B and T lymphocyte populations by the RNase protection assay. As shown in Fig. 4, 5-HT_{1A} mRNA was detected in both resting B and T cells purified from freshly isolated splenocytes, and its level was increased in both activated B and activated T cells purified from PMA plus ionomycin-stimulated lymphocyte populations. Quantitation by PhosphorImager analysis or densitometry indicated that the increase in the relative level of 5-HT_{1A} mRNA after stimulation with PMA plus ionomycin was similar in RNA samples from unsorted lymphocytes, purified B lymphocytes, or purified T lymphocytes (Fig. 4), suggesting similar regulation of 5-HT_{1A} mRNA expression in the two cell types.

Transcriptional Mechanisms of Mitogen-induced 5-HT_{1A} Receptor mRNA Expression

Since 5-HT_{1A} receptor mRNA accumulation in activated lymphocytes could be attributed to enhanced stabilization of existing mRNA and/or to enhanced transcription of new mRNA, studies were performed to distinguish between these two possibilities. Splenocytes were incubated or not with a combination of PMA and ionomycin for 36 h prior to inhibition of *de novo* mRNA transcription by addition of 10 µg/ml actinomycin D. Total RNA was then extracted at fixed time intervals for quantitation by RNase protection assay. As shown in Fig. 5A-C, the profiles of mRNA degradation were superimposable in PMA-ionomycin-treated and untreated cells with a similar half-life of 26 h, indicating an absence of stabilization of 5-HT_{1A} transcripts upon mitogenic stimulation. Additional experiments using splenocytes pretreated for 15 min with actinomycin D (10 µg/ml) and subsequently stimulated with PMA-ionomycin for 36-48

h, showed that 5-HT_{1A} mRNA expression did not increase over the level in unstimulated cells (data not shown), indicating that induction of 5-HT_{1A} mRNA is dependent on enhanced RNA transcription in mitogen-stimulated cells.

To determine the potential role of the transcription factor NF- κ B in mitogen-stimulated 5-HT_{1A} mRNA expression, splenocytes were pretreated with SN50, a cell-permeable peptide that specifically inhibits nuclear translocation of NF- κ B [23]. Fig. 6 shows that SN50 dose-dependently blocked the increase in 5-HT_{1A} mRNA expression induced by PMA plus ionomycin. In contrast, SN50M (50 μ g/ml), an inactive analogue of SN50, was devoid of any effect on 5-HT_{1A} mRNA expression (Fig. 6), indicating the specificity of the inhibitory action of SN50 on NF- κ B activation. The effect of other NF- κ B inhibitors acting through mechanisms different to SN50 were tested. These include PDTC that acts as both a radical scavenger and inhibitor of NF- κ B activation [24]. Results showed that PDTC (5-50 μ M) caused a dose-dependent inhibition of mitogen-induced up-regulation of lymphocyte 5-HT_{1A} mRNA (Fig. 6). The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin (0.01-10 μ g/ml) that appears to prevent degradation of I κ B- α [25], also caused a significant dose-dependent inhibition of mitogen-induced 5-HT_{1A} up-regulation, while its inactive derivative methylthiogliotoxin (1-10 μ g/ml) had no significant effect (data not shown).

5-HT_{1A} Receptor Protein Expression in Splenocytes and Up-regulation by B and T Cell Mitogens

To evaluate the expression of 5-HT_{1A} receptor protein in unstimulated and mitogen-stimulated lymphocytes, cells were permeabilized, fixed, and subsequently analyzed by indirect immunofluorescence and flow cytometry using a specific anti-peptide antiserum directed against the third intracellular loop of the 5-HT_{1A} receptor [26]. Unstimulated splenocytes constitutively expressed the 5-HT_{1A} protein, since greater than 90% of the cells were positive (Fig. 7A). After stimulation with PMA plus ionomycin, the mean fluorescence intensity of 5-HT_{1A} immunoreactivity was 4 times greater (Fig. 7B) as compared to unstimulated cells, indicating an increased expression of 5-HT_{1A} receptor protein. Cell incubation with buffer or with preimmune serum yielded a much lower, non-specific fluorescence signal compared with the anti-5HT_{1A}

antiserum, without any variation between unstimulated (Fig. 7A) and mitogen-stimulated cells (Fig. 7B). Moreover, binding of the antiserum to an intracellular epitope was revealed by the absence of any consistent signal above background, unless the cells were permeabilized (Figs. 7C and 7D). Double staining with anti-CD19 or anti-Thy1.2 and the anti-5HT_{1A} receptor antiserum showed similar levels of 5-HT_{1A} receptor protein expression in activated B and T cells (not shown), consistent with the similar level of induction of 5-HT_{1A} receptor RNA in the cells.

To visualize the localization of the 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity, unstimulated and PMA plus ionomycin-stimulated cells were permeabilized and incubated with the anti-5-HT_{1A} antiserum whose binding was revealed by immunocytochemistry using the horseradish peroxidase system. Labeling with the anti-5-HT_{1A} receptor antiserum yielded a little staining in the unstimulated cells (Fig. 7E), while labeling of mitogen-stimulated cells showed a marked and uniform staining of the cell membrane (Fig. 7E), without any consistent staining of the cytoplasm (Fig. 7F). Labeling with the preimmune serum manifested no detectable signal in unstimulated and mitogen-stimulated lymphocytes (data not shown).

DISCUSSION

We showed previously that rat and mouse B lymphocyte *in vitro* proliferation in response to mitogens is up-regulated by 5-HT and 5-HT_{1A} agonists, and that selective 5-HT_{1A} antagonists reverse the effect [18]. Others have shown that exposure to 5-HT_{1A} agonists potentiates mitogenic responses in human T cells, both *in vivo* [14] and *in vitro* [13, 15, 16]. Conversely, exposure to inhibitors of 5-HT synthesis or to 5-HT_{1A} antagonists, leads to inhibition of mouse T cell responses *in vivo* and human T cell responses *in vitro* [17]. Additionally, previous radioligand binding studies using ³H-8-OH-DPAT, a relatively selective 5-HT_{1A} agonist, have shown an increased level of specific binding sites on murine B lymphocytes [18], and human T lymphocytes [13] after mitogenic stimulation. To further characterize the mechanisms of 5-HT_{1A} receptor regulation in lymphocytes, we used a quantitative RNase protection assay to assess mRNA expression in mouse splenocytes. Our results demonstrate that unstimulated B and T lymphocytes express low levels of 5-HT_{1A} receptor mRNA that is markedly increased after mitogenic stimulation *in vitro*, in accord with the previous operational studies cited above. The results also show that purified B and T lymphocytes behave similarly in their basal and mitogen-induced 5-HT_{1A} mRNA expression. The increased expression of 5-HT_{1A} in mitogen-stimulated B and T cells is detectable at 24 h, and reaches a maximum after 48 h. This delayed induction of 5-HT_{1A} mRNA correlates with the delayed augmentation of mitogen-induced B and T lymphocyte proliferation, which peaks at 72 h of cell incubation in the presence of 5-HT_{1A} agonists. The late induction of 5-HT_{1A} mRNA by mitogens also suggests an indirect action including, e.g., mitogen-induced cytokine synthesis that may in turn regulate expression of the mRNA for 5-HT_{1A} in target B and T cells. Our studies further elucidate the possible mechanism of mitogen-stimulated increase in 5-HT_{1A} mRNA. In particular, 5-HT_{1A} mRNA stability was not altered by mitogen treatment, indicating that increased RNA stabilization plays no detectable role in the induction. In contrast, the RNA synthesis inhibitor actinomycin D completely blocked the mitogen-induced over-expression of lymphocyte 5-HT_{1A} mRNA, indicating that induction is due to transcriptional stimulation, as opposed to post-transcriptional mRNA stabilization. Moreover, we show that exposure to several NF- κ B inhibitors including SN50, PDTC, and gliotoxin prevents any increase in 5-HT_{1A}

mRNA expression in mitogen-treated cells, suggesting a role for nuclear translocation of NF- κ B in the up-regulation of lymphocyte 5-HT_{1A} mRNA. Treatment of transfected Chinese hamster ovary cells with 5-HT_{1A} agonists has been shown previously to increase 5-HT_{1A} receptor density via activation of the NF- κ B pathway, by stimulating the degradation of the inhibitory subunit, I- κ B [32]. Two consensus NF- κ B binding sites (at -64 and -365 bp upstream from the initiation ATG) are located in a region with strong enhancer activity that is highly conserved in rat and mouse [33-35]. In addition, recent studies have shown that the p50/p65 subunits of NF- κ B are positive regulators of the rat 5-HT_{1A} receptor promoter activity [36]. Both a proximal NF- κ B site (at -64) and a distal NF- κ B site (at -365) contribute to this activity, whereas corticosteroids can repress it via their glucocorticoid receptor. A variety of immune and inflammatory stimuli are well known activators of nuclear translocation of NF- κ B in lymphocytes [19-21]. Thus, we hypothesize that like 5-HT_{1A} agonists, immune stimulation may increase nuclear translocation of NF- κ B to enhance transcription of the 5-HT_{1A} receptor gene in B and T lymphocytes. Conversely, part of the immunosuppressive and anti-inflammatory action of drugs such as glucocorticoids may be explained by repression of NF- κ B-mediated induction of 5-HT_{1A} receptor gene transcription in immune cells. Immunostaining with the anti-5-HT_{1A} antiserum followed by flow cytometry or by immunocytochemistry analysis demonstrate that the expression of the receptor is low in unstimulated lymphocytes, while it increased markedly upon mitogenic stimulation. This is consistent with previous binding studies with radiolabeled agonists as performed by us on murine B lymphocytes [18], and by others on human T cells [13]. Additional binding studies with the 5-HT_{1A} antagonist [³H]WAY100635 also indicate the existence of few specific binding sites on unstimulated murine splenocytes, and greater binding on PMA plus ionomycin-stimulated cells (data not shown). Moreover, the immunocytochemical studies show clearly that the receptor is localized to the plasma membrane both in unstimulated and in mitogen-treated cells, and not in intracellular compartment. Similar plasma membrane localization of 5-HT_{1A} receptor was demonstrated in neuronal cell bodies and dendrites in adult rat brain [37], using immunocytochemistry with the same anti-5-HT_{1A} antiserum as in this study. Together, the findings suggest that mitogenic stimulation of transcription is paralleled by increased cell surface 5-HT_{1A} receptor

immunoreactivity in lymphocytes. The role of the 5-HT_{1A} receptor in the immune response suggests that pharmacological manipulations which alter levels of 5-HT (eg. reuptake blockers, or depletion) or directly modulate the 5-HT_{1A} receptor (eg. agonists, antagonists) may constitute important strategies for immunomodulation. It is likely that, in the course of tissue inflammation or immune response, the activation of B and T cells may trigger a recurrent enhancement of proliferation that is supported, in part, by induction and signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Blockage of this enhancement in 5-HT_{1A} receptor transcription or signaling may provide a useful clinical approach to modulate immune and inflammatory responses. On the other hand, enhancement of 5-HT_{1A} induction or signaling may augment the immune response under conditions (such as immunodeficiency diseases) where an enhanced immune response is desirable. This hypothesis is consistent with previous reports showing that *in vivo* administration of the partial 5-HT_{1A} agonist and anxiolytic/antidepressant drug buspirone, increases CD4 T-cell counts and *in vitro* T-cell proliferation in HIV-seropositive patients [14].

Acknowledgments

We thank Sylvie Arbour for technical assistance with the RNase protection assay and the immunocytochemical studies, Sophie Ouellet for sorting of B and T lymphocytes by flow cytometry, Louis Sénécal and Francine Leclerc for computer work.

REFERENCES

1. Essman, W.B. (1978) in *Serotonin in health and disease, Volume I: Availability, localization and disposition*, pp. 15-179, Spectrum publications, NewYork
2. Paiva, M. Q., Caramona, M., and Osswald, W. (1984) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **325**, 62-68
3. Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., and Livnat, S. (1985) *J. Immunol.* **135**, 755s-765s
4. Fuchs, B. A., Campbell, K. S., and Munson, A. E. (1988) *Cell. Immunol.* **117**, 339-351
5. Crivellato, E., Damiani, D., Mallardi, F., and Travan, L. (1991) *Acta Anat.* **141**, 127-131
6. Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.A. (1994) *Pharmacol. Rev.* **46**, 157-203
7. Mossner, R., and Lesch, K. P. (1998) *Brain Behav. Immun.* **12**, 249-271
8. Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1987) *Nature* **329**, 75-79
9. Fargin, A., Raymond, J.R., Regan, J.W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14848-14852
10. Albert, P.R., Zhou, Q.Y., VanTol, H.H.M., Bunsow, J.R., and Civelli, O. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5825-5832
11. Charest, A., Bruce, H.W., and Albert, P.R. (1993) *J. Neurosci.* **13**, 5164-5171
12. Marazziti, D., Palego, L., Canto, B.D., Rotondo, A., Pasqualetti, M., Gino, G., Lucacchini, A., Ladinsky, H., Nardi, I., and Cassano, G.B. (1995) *Life Sci.* **57**, 2197-2203
13. Aune, T.M., McGrath, K.M., Sarr, T, Bombara, M.P., and Kelley, K.A. (1993) *J. Immunol.* **151**, 1175-1183
14. Hofmann, B., Afzelius, P., Iversen, J., Kronborg, G., Aabech, P., Benfield, T., Dybkjaer, E., and Nielsen, J. O. (1996) *AIDS* **10**, 1339-1347
15. Eugen-Olsen, J., Afzelius, P., Andresen, L., Iversen, J., Kronborg, G., Aabech, P., Nielsen, J. O., and Hofmann, B. (1997) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **84**, 115-121

16. Afzelius, P., Nielsen, S. D., Hofmann, B., and Nielsen, J. O. (1997) *Scand. J. Infect. Dis.* **29**, 117-120
17. Aune, T.M., Golden, H.W., and McGrath, K.M. (1994) *J. Immunol.* **153**, 489-498
18. Iken, K., Chheng, S., Fargin, A., Goulet, A.C., and Kouassi, E. (1995) *Cell. Immunol.* **163**, 1-9
19. Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179
20. Barnes, P. J., and Karin, M. (1997) *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066-1071
21. Sha, W. C. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 143-146
22. Baldwin, A. S. Jr. (1996) *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683
23. Lin, Y. Z., Yao, S. Y., Veach, R. A., Torgerson, T. R., and Hawiger, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14255-14258
24. Schreck, R., Meier, B., Mannel, D. N., Droge, W., and Baueuerle, P. A. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1181-1194
25. Pahl, H. L., Kraub, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E. B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Mühlbacher, A., Czernilofsky, A-P., and Baeuerle, P. A. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 1829-1840
26. El Mestikawy, S., Riad, M., Laporte, A.M., Vergé, D., Duval, G., Gozlan, H., and Hamon, M. (1990) *Neurosci. Lett.* **118**, 189-192
27. Grumont, R.J., Rourke, I.J., O'Reilly, L.A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., and Gerondakis, S. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 663-674
28. Gozlan, H., Thibault, S., Laporte, A-M., Lima, L., and Hamon, M. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* **288**, 173-186
29. Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., and Schmitt-Verhulst, A. M. (1985) *Nature* **313**, 318-320
30. Klaus, G. G., O'Garra, A., Bijsterbosch, M. K., and Holman, M. (1986) *Eur. J. Immunol.* **16**, 92-97
31. Li, Y. S., Kouassi, E., and Revillard, J. P. (1989) *Eur. J. Immunol.* **19**, 1721-1725
32. Cowen, D. S., Molinoff, P. B., and Manning, D. R. (1997) *Mol. Pharmacol.* **52**, 221-226
33. Unlap, T., and Jope, R. S. (1995) *Neurosci. Lett.* **198**, 41-44

34. Storrington, J. M., Charest, A., Cheng, P., and Albert, P. R. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 2238-2247
35. Ou, X. M., Jafar-Nejad, H., Storrington, J. M., Meng, J. H., Lemonde, S., and Albert, P. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8161-8168
36. Wissink, S., Meijer, O., Pearce, D., van Der Burg, B., and van Der Saag, P. T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1321-1326
37. Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., El Mestikawy, S., Hamon, M., and Descarries, L. (2000) *J. Comp. Neurol.* **417**, 181-194

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. 5-HT_{1A}-mediated up-regulation of mitogen-stimulated mouse T and B lymphocyte proliferation. Mouse splenocytes were pre-incubated for 30 min at 37 °C in the presence or absence of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (5×10^{-5} M), and then cells were stimulated with 20 µg/ml PHA (A) or 1 ng/ml PMA plus 500 ng/ml ionomycin (B) in the presence or absence of 10^{-4} M 5-HT or 5×10^{-5} M R(+)-8-OH-DPAT (R-DPAT) as indicated. Cells were incubated for 72 h and proliferation was measured by [³H]thymidine uptake during the last 6 h of culture. Student's t test was performed: mitogen-stimulated splenocytes vs. mitogen-stimulated splenocytes in the presence of WAY100635: p value not statistically significant; mitogen-stimulated splenocytes vs. mitogen-stimulated splenocytes in the presence of 5-HT or R-DPAT: § = p<0.05; mitogen-stimulated splenocytes + 5-HT or R-DPAT vs mitogen-stimulated splenocytes + WAY100635 + 5-HT or R-DPAT: * = p<0.05.

FIG. 2. Mitogen-stimulated mouse splenocytes express 5-HT_{1A} receptor mRNA as determined by RT-PCR. RNA samples were reverse transcribed (+RT) or not (-RT) and subjected to PCR for 5-HT_{1A} and GAPDH. No PCR products were present if these RNA samples were not reverse transcribed (-RT). Total RNA was extracted from freshly-isolated splenocytes (*lane 1*), splenocytes cultured during 48 h in the presence of culture media (*lane 2*) or in the presence of 1 ng/ml PMA plus 500 ng/ml ionomycin (*lane 3*), Ltk⁻ mouse fibroblast cells (*lane 4*), and LM1A cells (*lane 5*). Ltk⁻ and LM1A cells were used as negative and positive controls, respectively, for 5-HT_{1A} mRNA expression. *Lane 6* corresponds to a PCR with neither cDNA nor RNA, which were replaced by H₂O, in order to ensure the specificity of the PCR reactions. *Lane M* was loaded with the GIBCO BRL DNA size marker, with sizes as indicated.

FIG. 3. Time-dependent up-regulation of 5-HT_{1A} mRNA expression in mitogen-activated B and T lymphocytes. Total RNA from splenocytes incubated for different periods of time in the presence or absence of mitogens was hybridized with radiolabeled 5-HT_{1A} and 18S riboprobes. The protected RNA fragments were separated on a 5% polyacrylamide-urea gel and quantitated by PhosphorImager analysis. Mitogens used: medium control (*lanes 4, 5, 10, 15*), LPS (*lanes 6, 11, 16*), PHA (*lanes 7, 12, 17*), Con A

(lanes 8, 13, 18), and PMA plus ionomycin (lanes 9, 14, 19). The incubation times were: 0 h (lane 4), 24 h (lanes 5-9), 48 h (lanes 10-14), and 72 h (lanes 15-19), as indicated. Lane 1 was loaded with the RNA size marker, lane 2 with the undigested 5-HT_{1A} and 18S antisense probes which migrate at 180 and 99 bp, respectively, and lane 3 with RNase-digested 5-HT_{1A} and 18S antisense probes. Relative 5-HT_{1A} levels were calculated by normalizing the 5-HT_{1A} mRNA band to that of the 18S rRNA, and fold increases in 5-HT_{1A} expression induced by mitogens were calculated by using the relative 5-HT_{1A} level in freshly isolated splenocytes (incubation time: 0 h) as a reference.

FIG. 4. 5-HT_{1A} mRNA expression in purified B and T lymphocytes. Freshly isolated splenocytes were used for sorting of resting B and T lymphocytes, while cells treated with PMA plus ionomycin during 36-48 h were used for sorting of activated B and T lymphocytes. Resting and activated cells were gated on the basis of their FSC-SSC profiles in flow cytometry, and B and T lymphocytes were sorted in the desired region by negative selection. The purity of the sorting was verified by immunophenotyping, and it was 93-97%. Total RNA isolated from resting lymphocytes (lanes 1-3) and activated lymphocytes (lanes 4-6) was analyzed by RNase protection assay. Lanes 1 and 4 represent unsorted lymphocytes, lanes 2 and 5 are purified B lymphocytes, and lanes 3 and 6 are purified T lymphocytes.

FIG. 5. Time course of 5-HT_{1A} mRNA degradation in splenocytes. Freshly isolated splenocytes were let unstimulated (A) or were stimulated with PMA-ionomycin (PMA-Iono) for 36 hours (B). Actinomycin D (Act. D, 10 µg/ml) was then added to stop all *de novo* RNA transcription. Cells were harvested at the indicated times post-actinomycin D-treatment and analyzed for 5-HT_{1A} mRNA and 18S rRNA by an RNase protection assay. Plots in C show the linear regression of the percentage of remaining 5-HT_{1A} mRNA relative to time 0 and after normalization to the 18S rRNA. The coefficient of regression (r^2) is shown for unstimulated cells and for PMA-ionomycin-stimulated cells; the calculated half-life was the same (26 h).

FIG. 6. Blockage of mitogen-induced 5-HT_{1A} mRNA up-regulation by NF- κ B inhibitors. Total RNA was extracted from freshly isolated splenocytes or from splenocytes stimulated with PMA plus ionomycin for 48 h and analyzed by RNase protection assay for 5-HT_{1A} mRNA and 18 S rRNA expression. PMA plus ionomycin stimulation was performed in the presence or absence of the indicated NF- κ B inhibitors used at the indicated concentrations. Shown are the bands corresponding to the protected 5-HT_{1A} and 18S fragments, and the values of fold increase in the relative amount of 5-HT_{1A} expression in PMA-ionomycin-treated cells compared to freshly isolated cells.

FIG. 7. 5-HT_{1A} protein expression in splenocytes as detected by immunocytofluorometry and immunocytochemistry. *A-D*, immunocytofluorometry analysis. Freshly isolated splenocytes (*A, C*) and splenocytes stimulated during 48 h with PMA plus ionomycin (*B, D*) were incubated with a rabbit anti-5-HT_{1A} antiserum followed by a second step PE-labeled goat anti-rabbit Ig Ab. Cells were permeabilised and fixed before incubation with the antiserum (*A, B*). As a control for intracellular labeling with anti-5-HT_{1A} antiserum, cells were stained with the antiserum without prior permeabilisation and fixation (*C, D*). Histograms of fluorescence of cells incubated with the anti-5-HT_{1A} antiserum (*bold line*), or with buffer (*dashed line*), or preimmune serum (*thin line*) are shown, as well as the values of the mean fluorescence intensity corresponding to cells positive for anti-5-HT_{1A} antiserum. *E, F*, immunocytochemistry analysis. Unstimulated lymphocytes that were in the resting state of cell activation and exhibited a small size (*E*), and lymphocytes treated with PMA plus ionomycin for 48 h that underwent blast transformation and exhibited higher cell size (*F*) were subsequently permeabilized and incubated with the anti-5-HT_{1A} receptor antiserum. Staining was revealed by the horseradish peroxidase system, and visualized under photonic microscope. The intensity of the staining was low (*open arrowheads*) and high (*filled arrowheads*) in unstimulated and mitogen-stimulated lymphocytes, respectively, and it was localized at the plasma membrane in both cell types. Results are representative of three separate experiments.

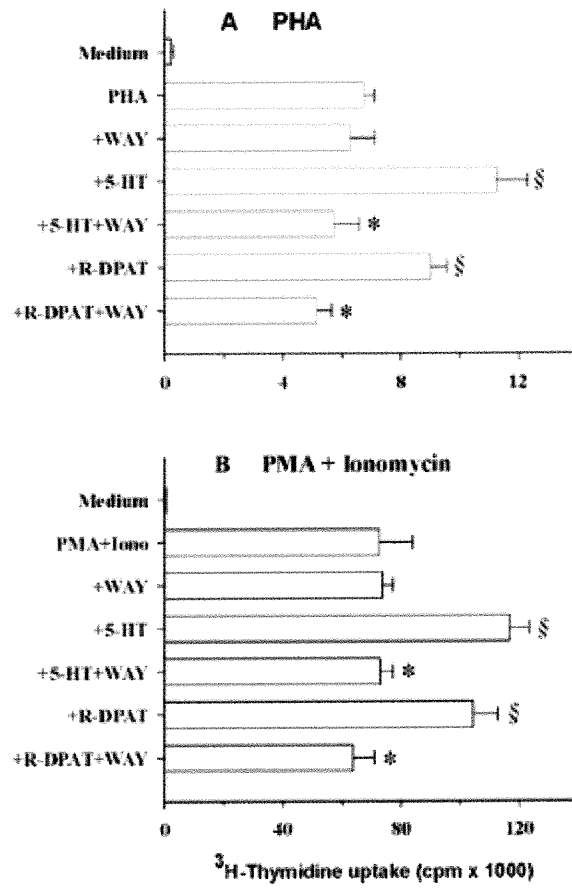
TABLE I. *Blast transformation and up-regulation of 5-HT_{1A} mRNA expression in mitogen-stimulated mouse splenocytes*

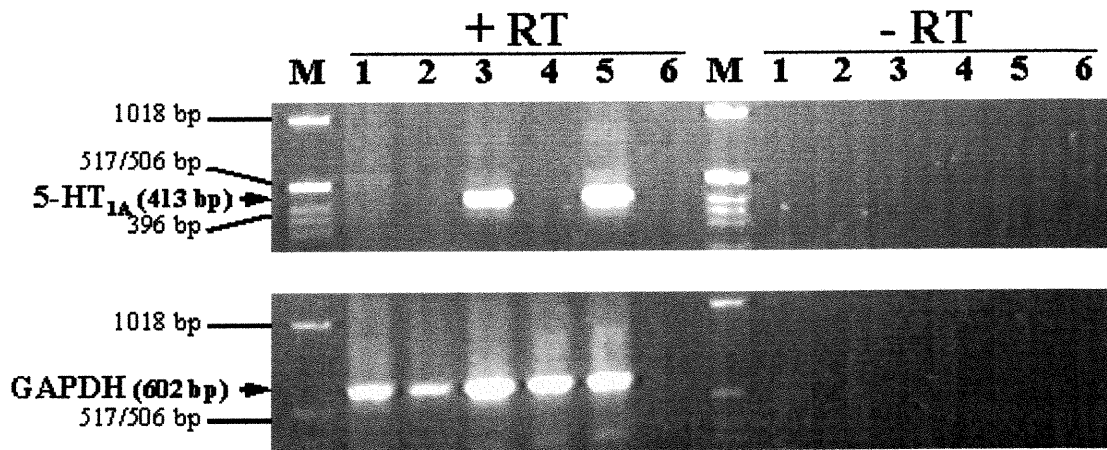
Freshly isolated mouse spleen cells were incubated for 48 h in the presence of culture medium or mitogen: LPS (10 µg/ml), PHA (20 µg/ml), Con A (5 µg/ml), or a combination of PMA (1 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml). All values represent the mean ± SD of at least 4 separate experiments.

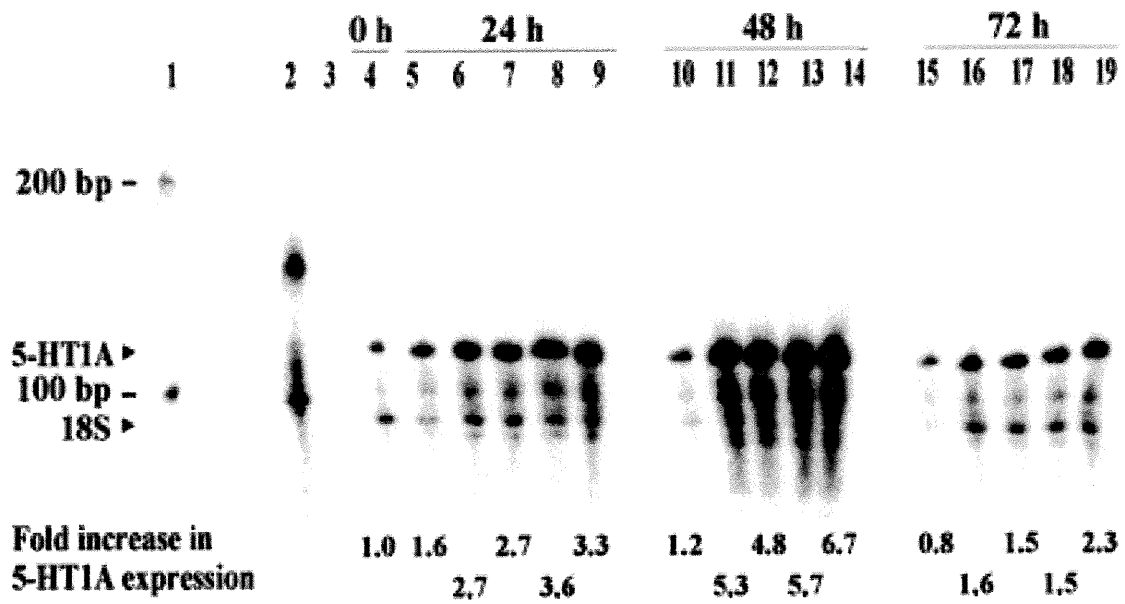
Mitogen	Number of replicated experiments	Blast transformation (%) ^a	Fold increase in 5-HT _{1A} mRNA expression ^b
No mitogen	7	5 ± 2	0.98 ± 0.17
LPS	4	41 ± 6	3.43 ± 1.41
PHA	4	47 ± 13	3.03 ± 1.26
Con A	4	83 ± 16	3.76 ± 1.42
PMA-Ionomycin	7	88 ± 11	4.90 ± 1.90

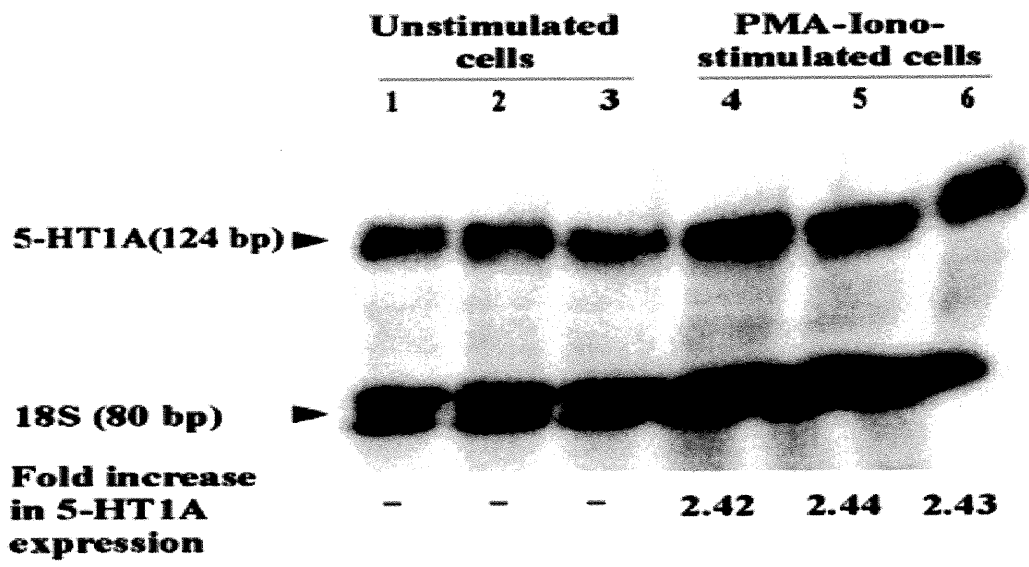
^a Resting and blast cells were distinguished by flow cytometry based on their FSC-SSC profiles, and the values indicated represent the percentage of blast cells within the total cell population.

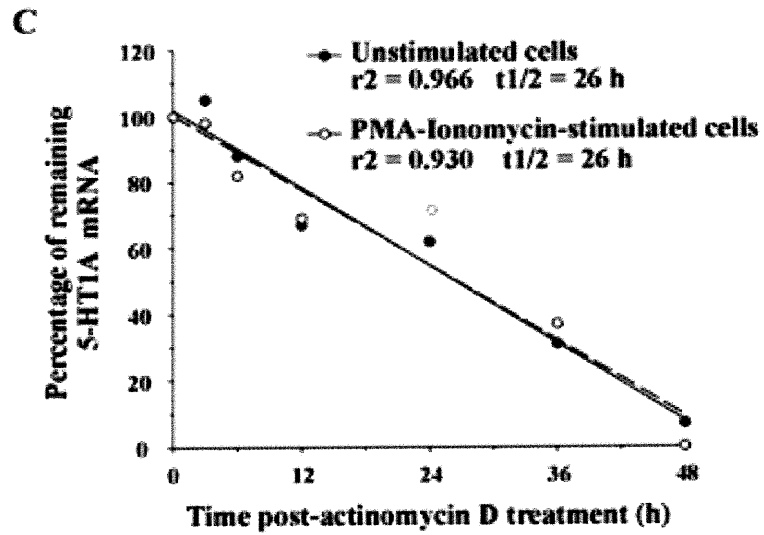
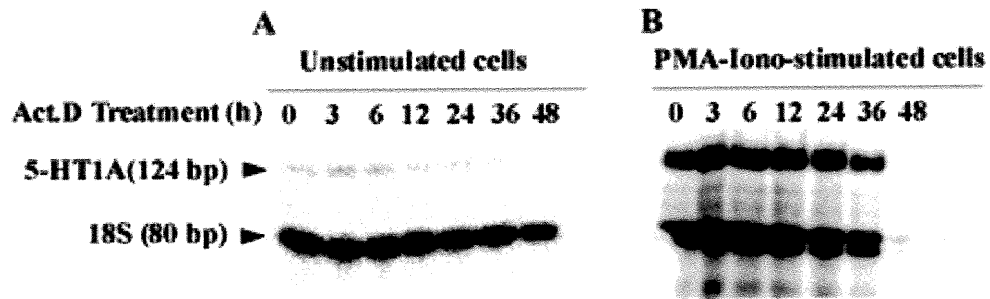
^b Relative levels of 5-HT_{1A} mRNA were determined by RNase protection assay using 18S rRNA as an internal standard. Fold increase in 5-HT_{1A} expression induced by mitogens was calculated by using the relative 5-HT_{1A} level in freshly isolated splenocytes as a reference.

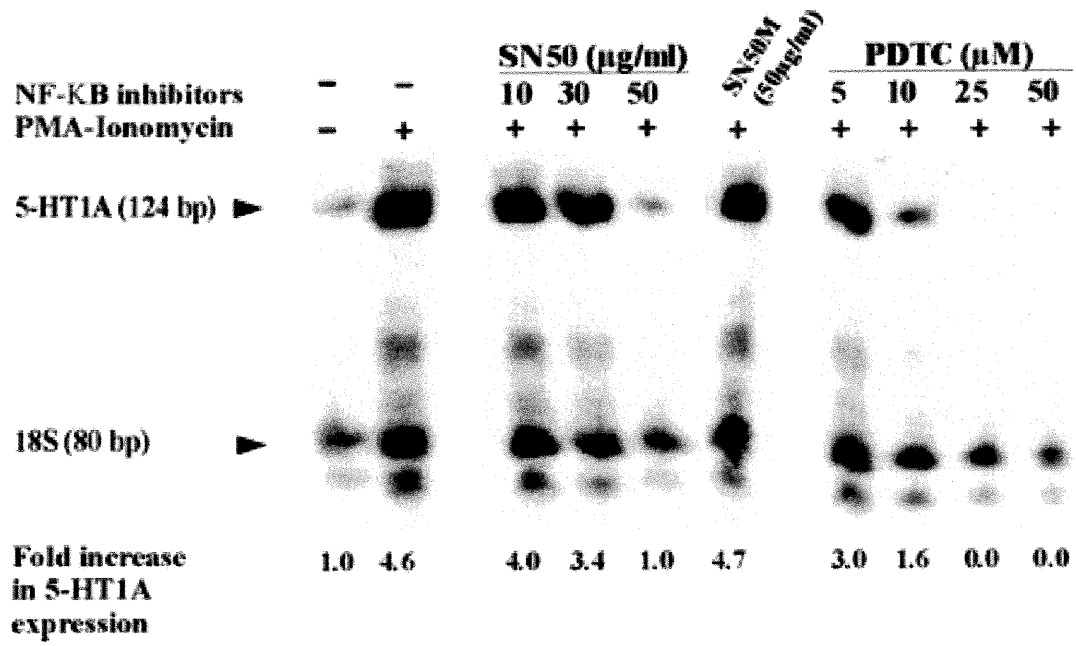


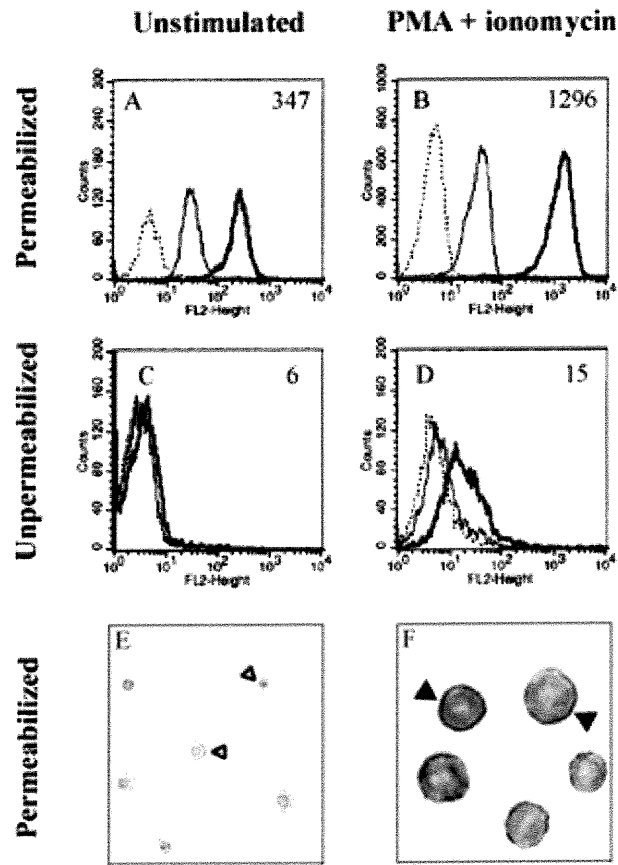












CHAPITRE 3.**MANUSCRIT II:****5-HT_{1A}-MEDIATED PROMOTION OF MITOGEN-ACTIVATED B AND T
CELL SURVIVAL AND PROLIFERATION IS ASSOCIATED WITH
INCREASED TRANSLOCATION OF NF- κ B IN THE NUCLEUS**

Brain, Behavior, and Immunity (*Soumis*)

**5-HT_{1A}-MEDIATED PROMOTION OF MITOGEN-ACTIVATED B AND T
CELL SURVIVAL AND PROLIFERATION IS ASSOCIATED WITH
INCREASED TRANSLOCATION OF NF- κ B IN THE NUCLEUS**

Mohamed Abdouh^{*,†}, Elliot Drobetsky^{*}, and Edouard Kouassi^{*,†}

^{*}Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec,
Canada; and [†]INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Quebec H9R 1G6,
Canada, and Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec
H3C 3J7, Canada

Running title: 5-HT_{1A}-mediated NF- κ B signaling in B and T lymphocytes

Corresponding author:

Edouard Kouassi

Guy-Bernier Research Center

Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 boulevard l'Assomption

Montreal (Quebec) H1T 2M4, Canada

████████████████████

██

████████████████████████████████

ABSTRACT

Serotonin (5-HT), a well-known neurotransmitter of the central nervous system, has also been implicated in regulation of immune cells. Mitogen-activated B and T lymphocytes overexpress the 5-HT_{1A} receptor through NF- κ B-dependent signaling pathways, leading to 5-HT_{1A}-mediated augmentation of lymphocyte proliferation. In the present study, we investigated whether 5-HT influences the survival of mitogen-activated mouse splenocytes, whether nuclear translocation of NF- κ B is affected by 5-HT in activated lymphocytes, and the role of the 5-HT_{1A} receptor in these effects. We found that 5-HT and R-DPAT, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, increased cell survival and S phase transition in splenocytes stimulated by LPS, PHA, ConA, or a combination of PMA and ionomycin. The mechanisms of increased cell survival were further examined in splenocytes stimulated with PMA and ionomycin. The results showed that 5-HT and R-DPAT inhibited cell death by apoptosis in mitogen-activated splenocytes. Additionally, 5-HT and R-DPAT induced augmentation of nuclear translocation of the p50 and p65 subunits of NF- κ B in mitogen-activated splenocytes. The increasing effects of 5-HT and R-DPAT on mitogen-activated cell survival, S phase transition, and nuclear localization of NF- κ B were all reversed by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. These results indicate that 5-HT_{1A}-mediated promotion of survival and proliferation of mitogen-activated B and T lymphocytes is associated with increased translocation of NF- κ B in the nucleus.

Key words: neuroimmunology; serotonin; 5-HT_{1A} receptor; cell growth and survival; apoptosis; NF- κ B

INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is a neurotransmitter of the central nervous system (CNS) that plays a key role in various cognitive functions such as feeding, sleep, pain, depression, learning, and anxiety (Blier, de Montigny, & Chaput, 1987; Charney, Krystal, Delgado, & Heninger, 1990; Pramod, & Saxena, 1995). Some of these processes are mediated by the 5-HT_{1A} receptor, and the diversity of 5-HT actions can be related to the localization of this receptor in some brain regions especially the limbic system (Törk, 1990; Pompeiano, Palacios, & Mengod, 1992). Outside the CNS, 5-HT is released in lymphoid organs by noradrenergic nerves and at sites of inflammation by platelets and rodent mast cells. We recently showed that 5-HT increases mitogen-activated murine B and T lymphocyte proliferation by acting on the 5-HT_{1A} receptor that is overexpressed on these cells through the nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent signaling pathways (Iken, Chheng, Fargin, Goulet, & Kouassi, 1995; Abdouh, Storrington, Riad, Paquette, Albert, Drobetsky, & Kouassi, 2001).

NF- κ B is mainly composed of p50 and p65 subunits, which are normally retained in the cytosol of non-stimulated cells by inhibitory molecules, I κ B. In response to several stimuli, I κ B are rapidly phosphorylated and degraded, allowing translocation of NF- κ B complexes into the nucleus and activation of NF- κ B elements (Barnes, & Karin, 1997). This transcription factor is involved in regulation of many immune and inflammatory responses. Other important functions of NF- κ B are activation of genes that increase cell survival and protect cells from apoptosis, and regulation of cell cycle progression (Karin, 1999; Barkett, & Gilmore, 1999). One previous study has shown that the 5-HT_{1A} receptor is positively coupled with activation of NF- κ B in transfected CHO cells (Cowen, Molinoff, & Manning, 1997), but it is still unknown whether such coupling exists in primary cell cultures of lymphocytes.

The aim of the present study was to evaluate the effects of 5-HT on the survival of mitogen-activated mouse spleen lymphocytes, and on mitogen-induced NF- κ B translocation into the nucleus, and to determine the role of 5-HT_{1A} in these effects. The results indicate that 5-HT promotes the survival and cell cycle progression of mitogen-

activated lymphocytes in association with increased nuclear translocation of NF- κ B through interaction with the 5-HT_{1A} receptor.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female, Balb/c mice, 6-12 weeks of age, were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada) and maintained in our animal facilities until use.

Reagents

All culture media were purchased from Gibco (Burlington, Ontario, Canada). Escherichia coli Lipopolysaccharide; LPS (serotype 0111:B4), Phytohemagglutinine; PHA (P-Lectine from Phaseolus vulgaris), Concanavalin A; ConA (Lectine from Phaseolus vulgaris), Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA, serotonin hydrochloride; and S-(-)-propranolol hydrochloride were from Sigma (St-Louis, MO). R(+/-)8-OH-DPAT and WAY-100635 were from RBI (Natick, MA). Ionomycin was from Calbiochem (La Jolla, CA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from hyclone (Logan, UT). [³H] thymidine ([³H] TdR; specific activity 2 Ci/mmol) was obtained from Du Pont NEN (Mississauga, Ontario). Other reagent are purchased as indicated elsewhere.

Spleen cell preparation and culture

Balb/c mice were killed by cervical dislocation. Spleens were then aseptically harvested and gently teased into a single-cell suspension in Hank's balanced salt solution (HBSS). Red blood cells were removed by an osmotic shock (NH₄Cl), and cells resuspended in a culture medium consisting of RPMI-1640 medium supplemented with penicillin (100U/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM), and 10% FBS. Cells were used immediately (fresh spleen cell preparation) or alternatively, were activated by culture in the presence of optimal mitogen concentrations; LPS (10 µg/ml), or PHA (20 µg/ml), or ConA (5 µg/ml), or PMA (1 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for different periods of time, for blast recovery. Cells were cultured in flat-bottomed 96-well culture plates (Gibco) at a density $4 \cdot 10^5$ cells/well in a total volume of 200 µl at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Cell counting and viability were assessed by trypan blue exclusion.

Cell viability

Cell viability was determined by trypan blue staining. The number of stained (non-viable) and unstained (viable) cells were counted and the level of cell viability was expressed as percentage of unstained versus total (stained + unstained) cells.

Measurement of apoptotic cells and cell cycle analysis

Levels of apoptotic cells and cell cycle phases were determined by propidium iodide-stained nuclei. Staining of nuclei was performed using the CycleTEST PLUS DNA reagent kit (Becton Dickinson) according to the manufacturer instructions. Briefly, 10^6 cells were resuspended and washed two times at 300 g for 5 min in 1 ml citrate buffered solution into a 12 x 75 mm tubes. The pellet was gently resuspended in 250 μ l solution A (trypsin in a spermine tetrahydrochloride detergent buffer) for 10 min at room temperature. This is followed by addition of 200 μ l solution B (trypsin inhibitor and ribonuclease A in citrate stabilizing buffer with spermine tetrahydrochloride) and incubation for 10 min at room temperature. 200 μ l of cold solution C (propidium iodide [PI] and spermine tetrahydrochloride in citrate stabilizing buffer) was then added to the nuclei and the preparation was incubated for a further 10 min in the dark at 4°C. The nuclei were filtered through 40 μ m nylon mesh. Acquisition of nuclei preparations was performed employing a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) and Lysis II acquisition software with the electronic doublet-discrimination module (DDM) activated. 20.000 events were recorded for each sample. Analysis of cells undergoing apoptosis was carried out using the ModFit software and the percentage of events at Ao (sub-Go) was recorded. To determine the percentage of cells in G0/G1, S, and G2/M phases, analysis was made by CellFit software provided by the manufacturer.

Flow cytometric NF- κ B analysis

Preparation of nuclei for NF- κ B activation study was performed as for apoptosis study with some modifications. Briefly, 10^6 cells were resuspended and washed two times at 300 g for 5 min in 1 ml citrate buffered solution into a 12 x 75 mm tubes. The pellet was gently resuspended in a mixture 250 μ l solution A and 200 μ l solution B for 10 min at room temperature. 40 μ l of rabbit polyclonal NF- κ B antibodies (anti-RelA and anti-p50) or control antibody (Santa Cruz) was then added for a 10 min incubation at room temperature, followed by a further 10 min incubation with 2,5 μ l of FITC-conjugated anti-rabbit monoclonal antibody (Santa Cruz). 200 μ l of cold solution C was

then added to the nuclei and the preparation was incubated for a further 10 min in the dark at 4°C. The nuclei were filtered through 40 µm nylon mesh. Acquisition of nuclei preparations was performed employing a FACScan flow cytometer and Lysis II acquisition software with the DDM activated. 20,000 events were recorded for each sample and analysis was carried out using Lysis II analysis software (Foulds, 1997). Analysis of double-stained nuclei needs two different detection filters. FL2 detector for PI staining, and FL1 detector for FITC labeled NF-κB subunits.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM and results are representative of at least three independent experiments. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's t-test was used for multiple comparisons with one control group. Statistical differences between drugs-treated and respective untreated control cells were set at $p < .05$.

RESULTS

5-HT decreases spleen lymphocyte cell death

Spleen lymphocytes were cultured in the presence or absence of different mitogens for different periods of time ranging from 24 to 72 h. Cell death was assessed by trypan blue exclusion staining. As shown in Table 1, cell viability of mitogen-activated and control lymphocytes decreased with incubation time, although mitogen stimulation yielded better viability. In the presence of 5-HT (10^{-4} M), cell viability of mitogen-activated lymphocytes was increased. Optimal effects were observed at 48-72 h, reaching 16, 21, 11, and 20% increases by 5-HT in lymphocytes stimulated with LPS, PHA, ConA, and PMA-Iono, respectively. 5-HT did not affect the viability of unstimulated control cells (not shown).

5-HT_{1A} receptor-mediated protection against lymphocyte death

Spleen lymphocytes were stimulated for 48 or 72 h by a combination of PMA and ionomycin in the presence or absence of 5-HT (10^{-4} M) and the 5-HT_{1A} receptor agonist R-DPAT (10^{-5} M). 5-HT and R-DPAT increased cell viability by 13% to 14% and 12% to 9% after 48 and 72 h of culture, respectively (Fig. 1). The 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635 dose-dependently inhibited the lymphoprotective effects of 5-HT and R-DPAT, while it was ineffective by itself (Fig. 1). This indicated that the effect of 5-HT on lymphocyte viability was mediated by the 5-HT_{1A} receptor.

5-HT inhibits apoptosis through the 5-HT_{1A} receptor

Thereafter, we assessed whether the lymphoprotective effect of 5-HT was mediated by inhibition of cell death by apoptosis. Nuclei from the same cell cultures as above were analysed by flow cytometry to evaluate the percentage of aneuploid sub-G0 apoptotic cells. As shown in Fig. 2A, the percentage of apoptotic cells increased with time in mitogen-activated cells reaching a maximum of about 40% after 48-72 h. 5-HT and R-DPAT significantly lowered the percentage of apoptotic cells in mitogen-activated cells down to 26%. In order to prove whether the protective effects of 5-HT and R-DPAT against apoptotic cell death were mediated by the specific stimulation of the 5-HT_{1A} receptor, we evaluated whether WAY-100635 could antagonize these effects. Indeed, WAY-100635 was able to reverse in a dose-dependent manner agonist-induced decrease in the percentage of apoptotic cells, in conditions where WAY-100635

was ineffective by itself (Fig. 2B). The reversal by WAY-100635 was statistically significant after 48 h of culture, but not after 72 h. Lack of significance at 72 h was probably related to the large variations, as reflected by the SEM values (Fig. 2B).

5-HT_{1A}-mediated increase in mitogen-activated lymphocyte S phase transition

To determine whether 5-HT_{1A} receptors are involved in lymphocyte cell cycle progression, analysis was performed on mouse spleen cells cultured for 48 and 72 h in the presence or absence PMA and ionomycin, with or without 5-HT_{1A} ligands. As shown in Table 2, the percentage of cells in the S phase increased at 72 h, while those in G0/G1 decreased in mitogen-stimulated cells as compared to unstimulated cells. A few amounts of G2/M phase cells (about 7%) were also induced by the mitogen, against virtually no cell in this phase in unstimulated cells. Treatment with 5-HT or R-DPAT resulted in further increases in the proportion of cells in S phase over the level induced by mitogen stimulation, and this was to the detriment of G0/G1 cells. The effects of 5-HT and R-DPAT were dose-dependently inhibited by WAY-100635 indicating involvement of the 5-HT_{1A} receptor. Similar results were obtained after 48 h of culture (data not shown).

5-HT increases NF-κB activation through the 5-HT_{1A} receptor

Since NF-κB is a pivotal transcription factor in the regulation of apoptosis and cell cycle progression, we studied the effects of 5-HT and 5-HT_{1A} ligands on activation of this transcription factor in mitogen-stimulated lymphocytes stimulated. Cell nuclei from spleen lymphocytes stimulated by PMA and ionomycin in the presence or absence of 5-HT and R-DPAT were detected by indirect immunofluorescence with antibodies directed against the p50 and the p65 subunits of NF-κB, and analysed by flow cytometry for measurement of mean fluorescence intensities. Mitogenic stimulation induced only a slight and non-significant increase of translocation of p50 and 65 subunits as compared to medium controls. However, in the presence of 5-HT or R-DPAT, nuclear translocation of both subunits of NF-κB was significantly increased over the level induced by the mitogen, and the effect was inhibited by the antagonist WAY-100635 (Fig. 3).

DISCUSSION

5-HT has been found to affect the functions of NK cells, macrophages, and T and B lymphocytes (Sternberg, Trial, & Parker, 1986; Hellstrand, & Hermodsson, 1987; Sternberg, Wedner, Leung, & Parker, 1987; Choquet, & Korn, 1988; Hellstrand, & Hermodsson, 1993; Aune, Golden, & McGrath, 1994). Recently, we have shown that 5-HT increases mitogen-induced lymphoproliferation by acting upon the 5-HT_{1A} receptor (Blier, de Montigny, & Chaput, 1987; Charney, Krystal, Delgado, & Heninger, 1990). In the present study, we demonstrate that 5-HT interacts with the 5-HT_{1A} receptor to prevent apoptotic cell death of activated spleen lymphocytes. This is consistent with previous reports showing that 5-HT possesses a potent neuroprotective potential against focal ischemia- or glutamate-induced toxicity of hippocampal cells and astrocytes (Liu, & Lauder, 1991; Prehn, Welsch, Backhaus, Nuglisch, Ausmeier, Karkoutly, & Kriegstein, 1993). Moreover, it has been shown that stimulation of the 5-HT_{1A} receptor inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons from chick embryo (Ahlemeyer, & Kriegstein, 1997). Thus, our own observations on the lymphotropic and lymphoprotective effects of 5-HT are well in accordance with its neurotrophic and neuroprotective potential. This further supports the parallelism between the nervous and immune systems.

NF- κ B is known as an anti-apoptosis mediating factor (Neiman, Thomas, & Loring, 1991). We asked if this transcription factor is activated by 5-HT in lymphocyte cultures, in parallel with its protective effects against lymphocyte cell death by apoptosis. Our results show that 5-HT and R-DPAT increase nuclear localisation of both p50 and p65 subunits of NF- κ B. This activation was inhibited by WAY-100635 indicating the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in this process. A previous report has shown that activation of the 5-HT_{1A} receptor triggers activation of NF- κ B in transfected CHO cells (Cowen, Molinoff, & Manning, 1997). Hence, the results of the present study provide for the first time evidence for 5-HT_{1A} coupling to NF- κ B in primary cultures of lymphocytes. Since increased translocation of NF- κ B by 5-HT is associated with increased survival and proliferation of lymphocytes, it is tempting to speculate that these effects are strictly correlated. Future studies are required to elucidate the role of NF- κ B

activation in the anti-apoptotic and proliferative effects of 5-HT and 5-HT_{1A} agonists in activated lymphocytes.

Regulation of NF- κ B activation may involve several steps. Dimers are sequestered in the cytosol in latent form by I κ B. Several stimuli trigger phosphorylation and ubiquitination of I κ B followed by its degradation allowing the freeing of the dimers and their translocation into the nucleus. I κ B kinases (IKK) are the main mediators of this activation. However, other pathways such as ras, raf, MAPKK and PI-3-K are also involved (Finco, & Baldwin, 1993; Ozes, Mayo, Gustin, Pfeffer, Pfeffer, & Donner, 1999), some of which are known as potential transducers of 5-HT_{1A} signaling in other cell systems (Cowen, Sowers, & Manning, 1996; Garnovskaya, Mukhin, & Raymond, 1998; Della Rocca, Mukhin, Garnovskaya, Daaka, Clark, Luttrell, Lefkowitz, & Raymond, 1999). The specific kinases that are potentially involved in 5-HT_{1A}-mediated NF- κ B activation remain to be determined in further studies. Some studies have shown that 5-HT decreases the production of reactive oxygen intermediates (ROI) (Schuff-Werner, Splettstösser, Shmidt, & Huether, 1995; Huether, Fettkötter, Keilhoff, & Wolf, 1997). ROI are potent cytotoxic and pro-apoptotic molecules, and their elimination is thought to protect against apoptosis (Seaton, Cooper, & Schapira, 1997). Thus, it is likely that the antioxidant activity of 5-HT could contribute in its anti-apoptotic effects on lymphocytes (Schuff-Werner, Splettstösser, Shmidt, & Huether, 1995).

In summary, the data of this study provide evidence that lymphocyte apoptosis is prevented by stimulation of 5-HT_{1A} receptors. This suggests that 5-HT and its specific 5-HT_{1A} receptor may be involved in prolongation of lymphocyte survival in the course of immune stimulation and inflammation. Thus, the 5-HT_{1A} receptor of activated lymphocytes may contribute to a positive regulatory loop in which NF- κ B signaling plays a pivotal role, leading to overexpression of the receptor, and then to prolongation of lymphocyte survival and proliferation upon binding of the receptor to its physiological ligand.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Medical Research Council of Canada Grant MT-13259 (to E.K.) and by AstraZeneca/Fonds de la recherche en santé du Québec Grant 005086 (to E.K.).

REFERENCES

- Abdouh, M., Storrington, J. M., Riad, M., Paquette, Y., Albert, P. R., Drobetsky, E., & Kouassi, E. (2001). Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT_{1A} receptor mRNA and Protein in activated B and T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 4382-4388.
- Ahlemeyer, B., & Krieglstein, J. (1997). Stimulation of 5-HT_{1A} receptor inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons from chick embryo. *Brain Res.* **777**, 179-186.
- Aune, T.M., Golden, H.W., & McGrath, K.M. (1994). Inhibitors of 5-HT synthesis and antagonists of serotonin_{1A} receptors inhibit T lymphocyte function in vitro and cell-mediated immunity in vivo. *J. Immunol.* **153**, 489-498.
- Barkett, M., & Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* **18**, 6910-6924.
- Barnes, P.J., & Karin, M. (1997). Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Eng. J. Med.* **336**, 1066-1071.
- Blier, P., de Montigny, C., & Chaput, Y. 1987. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments; implication for the therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* **7**, 24S-35S.
- Bode-Greuel, K. M., Klisch, J., Glaser, T., & Traber, J. (1990). Serotonin (5-HT)_{1A} receptor agonists as neuroprotective agents in cerebral ischemia. In J. Krieglstein, & H. Oberpichler (Eds.), *Pharmacology of cerebral ischemia*, pp. 485-491. Wissenschaft. Verlag: Stuttgart.
- Charney, D.S., Krystal, J.H., Delgado, P.L., & Heninger, G.R. (1990). Serotonin-specific drugs for anxiety and depressive disorders. *Annu. Rev. Med.* **41**, 437-446.
- Choquet, D., & Korn, H. (1988). Dual effect of serotonin on a voltage-gated conductance in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4557-4561.
- Cowen, D.S., Molinoff, P.B., & Manning, D.R. (1997). 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated increase in receptor expression and activation of nuclear factor- κ B in transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* **52**, 221-226.
- Cowen, D.S., Sowers, R.S., & Manning, D.R. (1996). Activation of a mitogen-activated protein kinase (ERK2) by the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor is sensitive not only to

- inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, but to an inhibitor of phosphatidylcholine hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 22297-22300.
- Della Rocca, G.J., Mukhin, Y.V., Garnovskaya, M.N., Daaka, Y., Clark, G.J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., & Raymond, J.R. (1999). Serotonin 5-HT_{1A} receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 4749-4753.
- Finco, T.S., & Baldwin, A.S. (1993). κ B site-dependent induction of gene expression by diverse inducers of nuclear factor κ B requires raf-1. *J. Biol. Chem.* **268**, 17676-17679.
- Foulds, S. (1997). Novel flow cytometric method for quantifying nuclear binding of the transcription factor nuclear factor kappa B in unseparated human monocytes and polymorphonuclear cells. *Cytometry*. **29**, 182-186.
- Garnovskaya, M.N., Mukhin, Y., & Raymond, J.R. (1998). Rapid activation of sodium-proton exchange and extracellular signal-regulated protein kinase in fibroblasts by G protein-coupled 5-HT_{1A} receptor involves distinct signalling cascades. *Biochem. J.* **330**, 489-495;.
- Hellstrand, K., & Hermodsson, S. (1987). Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *J. Immunol.* **139**, 869-875.
- Hellstrand, K., & Hermodsson, S. (1993). Serotonergic 5-HT_{1A} receptors regulate a cell contact -mediated interaction between natural killer cells and monocytes. *Scand. J. Immunol.* **37**, 7-18.
- Huether, G., Fettkötter, I., Keilhoff, G., & Wolf, G. (1997). Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of activated microglia. *J. Neurochem.* **69**, 2096-2101.
- Iken, K., Chheng, S., Fargin, A., Goulet, A.C., & Kouassi, E. (1995). Serotonin regulates mitogen -stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. *Cell. Immunol.* **163**, 1-9.
- Karin, M. (1994). The NF- κ B activation pathways: its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J.* **4** (suppl. 1), S92-S99.
- Liu, J., & Lauder, J. M. (1991). Serotonin and nialamide differentially regulate survival and growth of cultured serotonin and catecholamine neurons. *Dev. Brain Res.* **60**, 59-67.

- Neiman, P.E., Thomas, S.J., & Loring, G. (1991). Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 5857-5861.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., & Donner, D.B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. **401**, 82-85.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M., & Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosciences*. **12**, 440-453.
- Pramod, R. S. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol. Therap.* **66**, 339-368.
- Prehn, J.H.M., Welsch, M., Backhauf, C., Nuglisch, J., Ausmeier, F., Karkoutly, C., & Kriegstein, J. (1993). Effects of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain Res.* **630**, 110-120.
- Riad, M., Emerit, M. B., & Hamon, M. (1994). Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT_{1A} receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Dev. Brain Res.* **82**, 245-258.
- Schuff-Werner, P., Spletstösser, W., Schmidt, F., & Huether, G. (1995). 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.
- Seaton, T.A., Cooper, J.M., & Schapira, A.H.V. (1997). Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res.* **777**, 110-118.
- Sternberg, E.M., Trial, J., & Parker, C.W. (1986). Effect of serotonin on murine macrophages: Suppression of Ia Expression by Serotonin and its Reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists. *J. Immunol.* **137**, 276-282.
- Sternberg, E.M., Wedner, H.J., Leung, M.K., & Parker, C.W. (1987). Effect of serotonin (5-HT) and other monoamines on murine macrophages: modulation of interferon- γ induced phagocytosis. *J. Immunol.* **138**, 4360-4365.

Törk, I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Am. NY. Acad. Science.* **600**, 9-35.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. 5-HT_{1A}-mediated increase in lymphocyte viability. Spleen lymphocytes were incubated for 48 or 72 h in the presence of 1 ng/ml PMA plus 500 ng/ml ionomycin with or without 5-HT (10^{-4} M), R-DPAT (10^{-5} M), and WAY-100635 (10^{-5} - 5×10^{-5} M), and cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion. Values are given as mean \pm S.E.M. of at least 4 experiments. * shows differences between agonist-treated and agonist-untreated cultures, and @ shows differences between antagonist-treated and antagonist-untreated cultures.

FIG. 2. 5-HT_{1A}-mediated inhibition of mitogen-activated lymphocyte apoptosis. Spleen lymphocytes were incubated for 24-72 h with or without PMA and ionomycin, in combination with 5-HT, R-DPAT, and WAY-100635, and the percentage of apoptotic cells was determined by analysing the sub-G₀ population. (A) Time course of the effect of 5-HT and R-DPAT on the percentage of apoptotic cells in mitogen-stimulated cells. (B) Reversal of the protective effects of 5-HT and R-DPAT by WAY-100635 on lymphocyte apoptosis. Values are given as mean \pm S.E.M. of at least 4 experiments. * shows differences between agonist-treated and agonist-untreated cultures, and @ shows differences between antagonist-treated and antagonist-untreated cultures.

FIG. 3. 5-HT_{1A}-mediated augmentation of nuclear translocation of NF- κ B in lymphocytes. Spleen lymphocytes were treated or not with 5-HT or R-DPAT in the presence or absence of WAY-100635 and the nuclear localisation of p50 and p65 subunits of NF- κ B was determined by immunofluorescence and flow cytometry analysis. Values are given as mean \pm S.E.M. of 2 to 5 experiments. * shows differences between agonist-treated and agonist-untreated cultures, and @ shows differences between antagonist-treated and antagonist-untreated cultures.

TABLE 1
Time course of 5-HT effects on the percentage of viable cells in mitogen-activated lymphocytes

Treatment	Incubation time		
	24 h	48 h	72 h
Medium	78.2 ± 1.6	54.0 ± 7.8	51.9 ± 10.0
LPS	79.2 ± 2.7	75.5 ± 3.2	64.3 ± 4.8
LPS + 5-HT	87.2 ± 6.3	81.8 ± 2.4*	74.8 ± 4.9*
PHA	69.6 ± 2.2	63.9 ± 5.8	62.5 ± 4.8
PHA + 5-HT	77.7 ± 7.7	81.7 ± 7.5*	75.9 ± 8.0*
ConA	84.9 ± 6.6	75.9 ± 6.9	76.1 ± 2.5
ConA + 5-HT	91.3 ± 2.5	88.2 ± 4.6*	84.1 ± 4.5*
PMA-Iono	83.8 ± 4.3	76.2 ± 6.2	67.6 ± 6.4
PMA-Iono + 5-HT	92.9 ± 2.3*	88.8 ± 5.3*	81.0 ± 5.6*

Cells were incubated for the indicated times with or without mitogens, in the presence or absence of 5-HT (10^{-4} M), and cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion. Values are given as mean ± S.E.M. of at least 3 experiments. The viability of freshly isolated cells was $96.3 \pm 1.5\%$. * shows difference from corresponding controls without 5-HT.

TABLE 2

5-HT_{1A}-mediated augmentation of S phase transition in mitogen-stimulated lymphocytes

Treatment	Cell DNA content		
	G0/G1	S	G2/M
Medium	74 ± 2	26 ± 2	0 ± 0
PMA-Iono	63 ± 3*	30 ± 2*	7 ± 1*
+ WAY (10 ⁻⁵ M)	64 ± 4	31 ± 3	5 ± 3
+ WAY (5x10 ⁻⁵ M)	63 ± 3	29 ± 2	9 ± 2
PMA-Iono + 5-HT (10 ⁻⁴ M)	55 ± 1**	37 ± 1**	8 ± 1
+ WAY (10 ⁻⁵ M)	55 ± 1	37 ± 2	8 ± 1
+ WAY (5x10 ⁻⁵ M)	63 ± 4 [#]	32 ± 5 [#]	5 ± 3
PMA-Iono + R-DPAT (10 ⁻⁵ M)	55 ± 1**	41 ± 4**	4 ± 4
+ WAY (10 ⁻⁵ M)	59 ± 3	36 ± 2	5 ± 2
+ WAY (5x10 ⁻⁵ M)	63 ± 2 [#]	32 ± 2 [#]	6 ± 2

Cells were incubated for 72 h with or without PMA and ionomycin, in combination with

5-HT, R-DPAT and WAY-100635. Cell cycle progression was analysed as described under Materials and Methods. Values are given as mean ± S.E.M. of 3-4 experiments.

The proportions of freshly isolated cells in G0/G1, S, and G2/M were 98 ± 2, 1 ± 0, and 2 ± 2%, respectively. * shows differences between medium and PMA-Iono-treated cells.

** shows differences between PMA-Iono-treated cells and PMA-Iono + 5-HT_{1A} agonist-treated cells. # shows differences between PMA-Iono + 5-HT_{1A} agonist-treated cells and PMA-Iono + 5-HT_{1A} agonist and 5-HT_{1A} antagonist-treated cells.

Figure 1

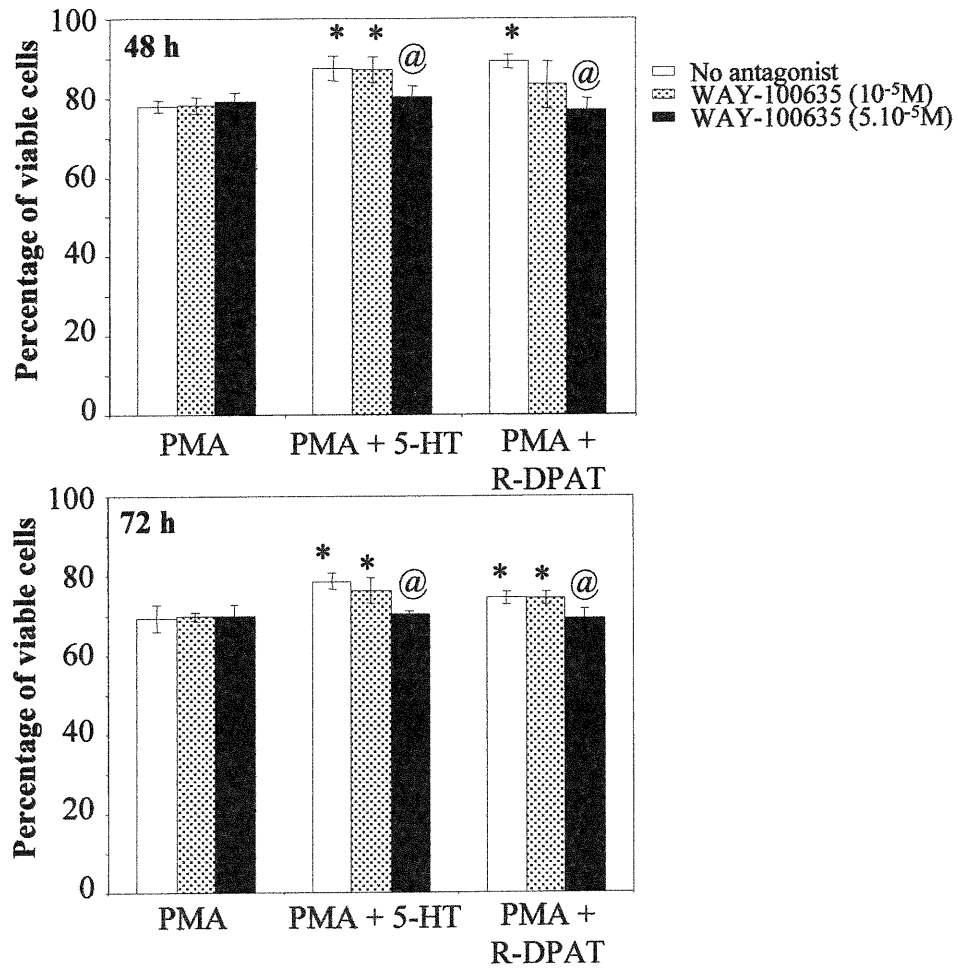


Figure 2

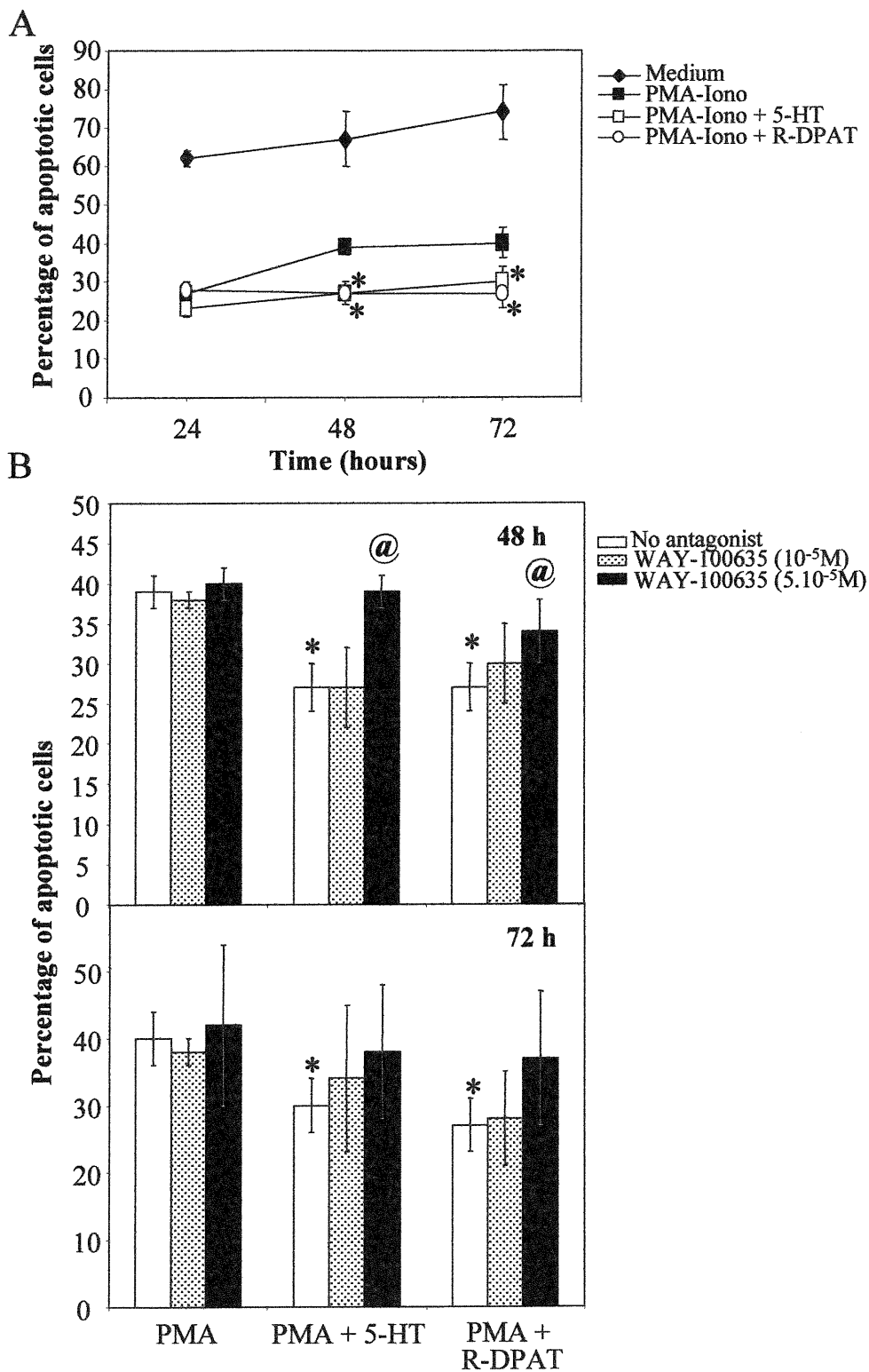
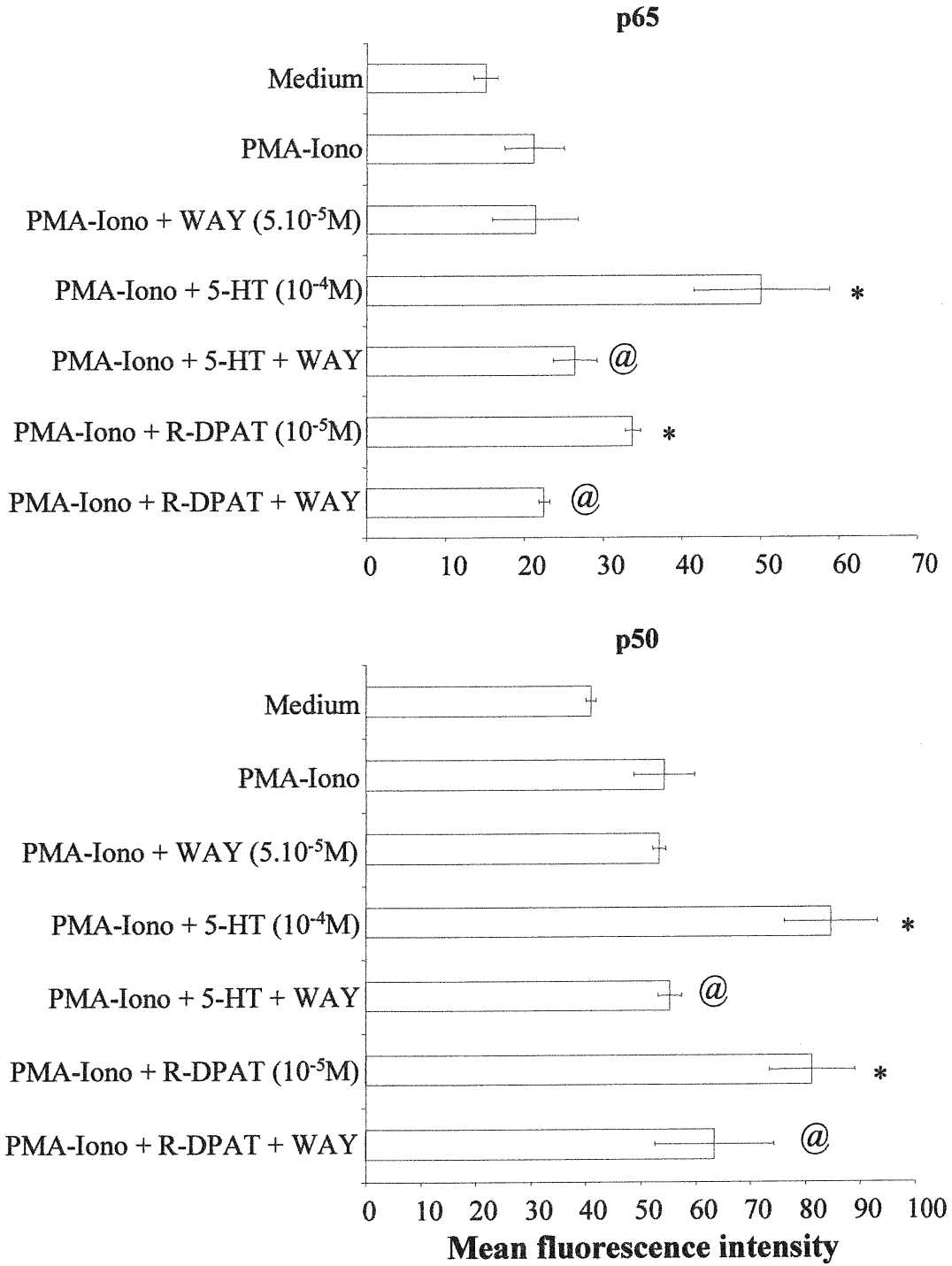


Figure 3



CHAPITRE 4. DISCUSSION

Des interactions fonctionnelles entre les systèmes nerveux et immunitaire ont lieu à travers un réseau complexe impliquant les neurotransmetteurs, les neuropeptides, les hormones et les cytokines. En l'occurrence, la sérotonine a une place prédominante dans ces interactions. Il est rapporté que la sérotonine régule plusieurs facettes des réponses immunitaires. Cependant, les récepteurs impliqués sont peu caractérisés. Une revue récente sur l'implication de la sérotonine dans la régulation des réponses immunitaires a conclu en la nécessité d'étudier la distribution des récepteurs sérotoninergiques au niveau des cellules immunitaires en utilisant préférentiellement des techniques de biologie moléculaire (Mössner et Lesch, 1998). Sur le plan moléculaire, le but de cette étude était de caractériser le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes B et T en évaluant l'expression de son ARN messager et de sa protéine membranaire. Par la suite, nous avons étudié les mécanismes moléculaires qui régissent la régulation de son expression. Sur le plan fonctionnel, notre but était d'évaluer l'implication du récepteur 5-HT_{1A} dans la régulation de la prolifération et la survie des lymphocytes T et B. Ces études ont été complétées par l'évaluation du rôle du NF-κB dans la signalisation du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes.

1. Caractérisation moléculaire du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes

1.1. Étude de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes

Le récepteur 5-HT_{1A} est un récepteur à sept domaines transmembranaires. Ces derniers présentent une grande homologie de séquence avec les autres récepteurs couplés aux protéines G. Cependant, des différences remarquables existent au niveau des boucles extracellulaires et intracytoplasmiques (Hoyer et coll., 1994). Nous avons utilisé des amorces sens et antisens dérivés, respectivement, de la deuxième boucle extracellulaire et de la troisième boucle intracytoplasmique du gène du récepteur 5-HT_{1A} pour faire une RT-PCR spécifique du 5-HT_{1A} (Figure 6). Ce test nous a confirmé la présence de l'ARN

messenger 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes. Le produit de PCR a exactement le poids moléculaire attendu; soit 413 bp. Le même produit de PCR a été observé dans tous les contrôles positifs que nous avons utilisés, à savoir le cerveau de rat et les lignées cellulaires LZD-7 et LM1A qui sont des fibroblastes Ltk(-) transfectés, respectivement, avec de l'ADN complémentaire (ADNc) 5-HT_{1A} de rats ou de souris (Albert et coll., 1990; Charest et coll., 1993). Par contre, aucun produit de PCR n'a été révélé dans le contrôle négatif qui consiste en la lignée Ltk(-) non transfectée.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Aune et ses collaborateurs. En effet, en utilisant une paire d'amorces dérivées, respectivement, des séquences des cinquième et sixième régions transmembranaires du gène 5-HT_{1A} humain, ils ont obtenu un produit de PCR de 500 bp à partir de l'ARN messagers de lymphocytes T humains et de la lignée Jurkat (Aune et coll., 1993). En revanche, les lymphocytes de rat ne semblent pas exprimer l'ARN messenger 5-HT_{1A} (Stefulj et coll., 2000). Ceci peut-être expliqué par une différence inter-espèces. Mais, il faut noter qu'en utilisant une autre paire d'amorce dérivées des séquences des deuxième et septième domaines transmembranaires (Charest et coll., 1993), nous n'étions capables d'amplifier le signal 5-HT_{1A} que très rarement au niveau des lymphocytes et des contrôles positifs (lignées cellulaires LM1A et LZD-7, et dans des échantillons de cerveau). Donc, le choix des amorces peut aussi expliquer l'absence de signal dans le modèle de Stefulj et coll. (2000). Malheureusement, ces auteurs n'ont pas publié les séquences de paires d'amorces qu'ils ont utilisées.

1.2. Régulation de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes

B et T

Pour étudier la régulation de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A}, nous avons utilisé un test de protection à la RNase. Cette technique présente l'avantage d'être quantitative. En effet, l'évaluation quantitative de l'ARN messenger 5-HT_{1A} est plus aisée avec la RPA qu'avec une RT-PCR quantitative. Nous avons tiré profit de la spécificité de la séquence de la troisième boucle intracytoplasmique pour préparer un substrat d'ADNc qui correspond aux nucléotides (n659-n785) du 5-HT_{1A} de souris (Figure 6). Nous avons détecté un signal au niveau des lymphocytes non stimulés. Le même signal a

été trouvé dans la lignée cellulaire LM1A (contrôle positif), et non au niveau de la lignée cellulaire Ltk (-) (contrôle négatif), ce qui témoigne de la spécificité du test. De plus, l'activation des lymphocytes par différents mitogènes de lymphocytes T (PHA et ConA) ou de lymphocytes B (LPS) ou non spécifique (combinaison PMA-Iono) induit une augmentation temps dépendante du niveau d'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A}. Le maximum d'augmentation est atteint après 48 heures de stimulation par les mitogènes. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres laboratoires. En effet, il est rapporté que les lymphocytes T humains du sang périphérique expriment l'ARN messager 5-HT_{1A} et que son expression est augmentée au niveau des lymphocytes activés par la PHA après 48 heures d'incubation (Aune et coll., 1993; Marazziti et coll., 1995).

Ces données s'accordent avec ceux que nous avons déjà obtenus quant à l'amplification de la prolifération mitogénique des lymphocytes par la sérotonine via le récepteur 5-HT_{1A}. En effet, le maximum d'amplification est atteint après 72 heures d'incubation, ce qui est subséquent à l'augmentation de l'expression du récepteur. En revanche, les lymphocytes non activés n'expriment pas suffisamment de récepteur 5-HT_{1A} pour permettre à la sérotonine de réguler la prolifération de ces cellules.

L'augmentation de la réponse lymphoproliférative par la sérotonine via le récepteur 5-HT_{1A} s'observe aussi bien au niveau des lymphocytes B (Iken et coll., 1995) que des lymphocytes T (Aune et coll., 1994; cette étude). Aussi, nous avons étudié la régulation de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} au niveau de ces deux populations lymphocytaires. Nos résultats montrent qu'aussi bien les lymphocytes B que les lymphocytes T expriment l'ARN messager 5-HT_{1A}. Les niveaux d'expression de ces transcrits sont similaires au niveau de ces deux types de lymphocytes.

Si dans le cas des lymphocytes T, nous confirmons le résultat de Aune et ses collaborateurs (Aune et coll., 1993), nous démontrons pour la première fois que les lymphocytes B aussi expriment cet ARN messager.

1.3. Mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} des lymphocytes B et T activés

L'accumulation des ARN messagers est régi par deux mécanismes, (i) une stabilisation de ces ARN messagers en augmentant leurs demi-vies par des processus post-transcriptionnels, et (ii) la synthèse *de novo* de nouveaux transcrits. L'actinomycine D est un inhibiteur transcriptionnel qui bloque la transcription génique. Le traitement des lymphocytes activés ou non avec ce produit ne montre pas qu'il y a stabilisation des transcrits 5-HT_{1A} au niveau de ces derniers. En effet, le patron de dégradation des ARN messagers 5-HT_{1A} est similaire au niveau des lymphocytes activés et des lymphocytes au repos. En d'autres termes, la demi-vie des transcrits 5-HT_{1A} est la même dans les deux pools de cellules. De plus, l'actinomycine D bloque la surexpression de l'ARN messager 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes activés. Ces données suggèrent que la régulation de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} est due principalement à des mécanismes transcriptionnels plutôt qu'à des processus de stabilisation post-transcriptionnels.

L'ARN messager 5-HT_{1A} des lymphocytes semble être plus stable ($t_{1/2} = 26$ heures) comparativement à d'autres ARN messagers tels que ceux codant pour les cytokines ($t_{1/2}$ de l'ordre de quelques minutes seulement). Plusieurs études ont démontré que la région non-traduite 3' (3'UTR) des ARN messagers joue un rôle important dans la stabilisation de ces derniers. En effet, la présence de séquences répétitives AUUUA au niveau de la 3'UTR d'une variété d'ARN messagers corrèle avec leur dégradation rapide (Bohjanen et coll., 1991; Cleveland et Yen, 1989). Par exemple, la déplétion d'une séquence riche en AU de la 3'UTR de l'ARN messager *c-fos* confère une stabilité accrue aux transcrits produits de construits transfectés (Wilson et Treisman, 1988). À l'inverse, l'insertion d'une séquence de 51 nucléotides riche en AU dérivée de la 3'UTR de l'ARN messager du GM-CSF, dans la région 3'UTR de l'ARN messager de la β -globine augmente l'instabilité de ce dernier (Shaw et Kamen, 1986). Ainsi, la présence de séquences AU ou AUUUA semble jouer un rôle déterminant dans l'instabilité des ARN messager, probablement parce que ces séquences représentent des cibles dans les voies de dégradation des ARN messager. Or, l'analyse de la structure de l'ARN messager 5-

HT_{1A} révèle que ce dernier n'a pas de motifs AUUUA dans sa séquence 3'UTR (Charest et coll., 1993). Ceci pourrait donc expliquer sa relative stabilité.

Nous avons alors étudié les mécanismes transcriptionnels qui seraient responsables de la régulation de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A}.

Comme nous l'avons mentionné dans des sections précédentes, le facteur nucléaire NF-κB est un facteur de transcription ubiquitaire et inductible par différents stimuli (Tableau 4). Il est impliqué dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires, incluant l'activation (i.e. cytotoxicité, production de cytokines inflammatoires) et la prolifération des lymphocytes B et T stimulés par différents mitogènes tels que le LPS, la PHA et la ConA (Bauerle et Henkel, 1994; Barnes et Karin, 1997; Sha, 1998). Nous avons testé l'implication de ce facteur de transcription comme un candidat potentiel dans la régulation transcriptionnelle de l'ARN messenger 5-HT_{1A}. Nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques du NF-κB qui agissent à différents niveaux de la cascade de son activation; à savoir le NF-κB-SN50, le PDTC et la gliotoxine (Figure 11) (Epinat et Gilmore, 1999).

Le SN50 est formé de la région hydrophobe de la séquence-sigale du K-FGF (Kaposi fibroblast growth-factor) et le signal de localisation nucléaire du NF-κB (Tableau VI) (Lin et coll., 1995). Ainsi, il est capable de diffuser dans le cytoplasme pour entrer en compétition avec le NF-κB lors du transport nucléaire.

Tableau VI. Séquences du peptide synthétique inhibiteur du NF-κB; NF-κB SN50 et son analogue inactif SN50M.

SN50	<u>AAVALLPAVLLALLAPVQRKRQKLMP</u>
SN50M	<u>AAVALLPAVLLALLAPVQRNGQKLMP</u>

La séquence-sigale hydrophobe qui permet l'entrée dans la cellule est soulignée. La séquence de localisation nucléaire du NF-κB p50 est en **gras** et les résidus mutés dans SN50M sont en *italique*. Tirée de Lin et coll., 1997.

Le traitement des lymphocytes activés par la combinaison de PMA et ionomycine, avec le SN50, bloque de façon dose dépendante l'augmentation de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A}. En revanche, l'analogue inactif du SN50, SN50M qui contient une mutation dans le signal de localisation nucléaire du NF-κB (Tableau 6) (Lin et coll., 1995), n'affecte nullement l'expression de cet ARN messager, indiquant la spécificité de l'action inhibitrice du SN50.

D'autres inhibiteurs du NF-κB, qui agissent par des mécanismes différents de ceux du SN-50, ont les mêmes effets sur l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A}. C'est le cas du PDTC et de la gliotoxine. Le PDTC, qui est un antioxydant et inhibiteur du NF-κB (Figure 11) (Schreck et coll., 1992), inhibe aussi de façon dose dépendante l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} des lymphocytes activés. De son côté, la gliotoxine, qui est un métabolite secondaire de champignons tel que *aspergillus fumigatus* bloque l'activation du NF-κB en inhibant la phosphorylation et la dégradation de la sous-unité inhibitrice IκB (Figure 11) (Pahl et coll., 1996). Cet agent cause aussi une inhibition dose dépendante de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A}. Par contre, son dérivé inactif, la méthylthiogliotoxine, reste sans effet. Donc, l'ensemble de ces résultats suggère un rôle de la translocation nucléaire du NF-κB dans la régulation transcriptionnelle de l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} des lymphocytes.

Des travaux antérieurs ont montré que le traitement de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) avec des agonistes 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) augmente la densité des récepteurs 5-HT_{1A} via l'activation du facteur NF-κB, mesurée par l'augmentation de la dégradation de la sous-unité IκB-α, et l'activation d'un gène rapporteur chloramphénicol acétyltransférase (CAT) sous contrôle de séquences consensus κB (Cowen et coll, 1997). Deux séquences consensus κB pour la liaison du NF-κB ont été localisées au niveau du promoteur 5-HT_{1A} avec une grande activité enhancer. Ces séquences sont situées à -64 et -365 bp en amont du site d'amorce de la transcription ATG. Cette région est très conservée chez le rat et la souris (Figure 6) (Meijer et coll., 1998; Storrington et coll., 1999; Ou et coll., 2000). Ces séquences consensus IκB sont fonctionnelles. En effet, des études récentes ont montré que l'hétérodimère p50/p65 régule de façon positive l'activité de la région promotrice du récepteur 5-HT_{1A}, et aussi

bien la séquence proximale (-64 bp) que la distale (-365 bp) contribuent à cette activité (Wissink et coll, 2000).

Les corticostéroïdes, qui sont de forts inhibiteurs du NF- κ B (Barnes et Karin, 1997), bloquent l'expression de l'ARN messager 5-HT_{1A} au niveau de l'hippocampe et des lignées cellulaires transfectées avec 5-HT_{1A} (i.e. COS-1) (Meijer et Kloet, 1994; Wissink et coll., 2000). Les glucocorticoïdes diminuent la transcription de gènes de protéines impliquées dans l'inflammation telles que les cytokines pro-inflammatoires (Epinat et Gilmore, 1999). Cependant, ces gènes ne contiennent pas dans leurs régions promotrices des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (glucocorticoid-responsive elements; GRE). Ceci suggère que d'autres mécanismes expliquent les effets inhibiteurs de ces hormones. En effet, dans le cytoplasme, les glucocorticoïdes activent leurs récepteurs qui passent dans le noyau, s'homodimérisent et se lient aux GRE de la région promotrice de plusieurs gènes. Néanmoins, il pourrait y avoir une interaction directe protéine-protéine entre le récepteur des glucocorticoïdes et certains facteurs de transcription. En effet, il est rapporté qu'il y a une interaction directe protéine-protéine entre le récepteur des glucocorticoïdes et le NF- κ B dans le cytoplasme ou le noyau (Ray et Prefontaine, 1994). Ainsi, le récepteur des glucocorticoïdes séquestre le NF- κ B dans le cytoplasme ou bloque sa liaison aux sites κ B dans le noyau. De plus, les glucocorticoïdes augmentent la transcription du gène de la sous-unité I κ B qui se lie et bloque l'activité du NF- κ B dans le noyau (Pahl, 1999). Ainsi, les glucocorticoïdes inhibent l'expression des gènes qui jouent un rôle dans le processus inflammatoire, et ils pourraient donc représenter des régulateurs négatifs du gène du récepteur 5-HT_{1A} dans les lymphocytes et dans d'autres tissus qui expriment ce récepteur (Wissink et coll., 2000).

Il serait important d'étudier le rôle d'autres facteurs de transcription dans la régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}. En effet, des sites de liaison pour différents facteurs de transcription (TNF-RE, SP1, AP-1) ont été caractérisés au niveau de la région 5' du gène 5-HT_{1A} (Storring et coll., 1999). L'utilisation de stratégies semblables à celles que nous avons utilisé dans notre étude (inhibiteurs de ces facteurs de transcription) serait convenables.

Nous avons observé que l'augmentation de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes B et T est relativement tardive par rapport à d'autres ARN messagers codant par exemple pour des cytokines. Ce retard dans l'induction de l'ARN messenger 5-HT_{1A} par les mitogènes suggère aussi un effet indirect par l'intermédiaire de ces cytokines. Le schéma serait que les mitogènes induisent la sécrétion de cytokines qui, à leur tour, régulent l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes B et T. Le NF-κB jouerait aussi un rôle pivot dans cette cascade vu que les cytokines en sont de bons activateurs (Tableau 4) (Pahl, 1999). Des études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. L'utilisation de bloqueurs pour les récepteurs de certaines cytokines (antagonistes), de récepteurs de cytokines recombinants solubles, ou d'anticorps neutralisants dirigés contre les cytokines constituerait une stratégie pour vérifier si l'effet des mitogènes sur la surexpression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} est direct, ou s'il implique un effet des cytokines de façon autocrine/paracrine.

1.4. Augmentation de l'expression membranaire du récepteur 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes

L'étude de l'expression membranaire de la protéine 5-HT_{1A} a été faite par cytofluorométrie à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-5-HT_{1A} (El Mestikawy et coll., 1990; Riad et coll., 1991). Cet anticorps ne reconnaît pas les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} ou 5-HT_{2A}. Ceci écarte la possibilité de réactions croisées.

Nos résultats montrent que 100% des cellules expriment le récepteur 5-HT_{1A}, aussi bien au repos qu'après activation. De plus, l'activation des lymphocytes avec la combinaison PMA-Iono augmente significativement l'expression du récepteur. Le patron de la surexpression de la protéine 5-HT_{1A}, évalué par l'intensité moyenne de fluorescence des cellules positives, est identique au niveau des lymphocytes B et des lymphocytes T. Des résultats semblables sont obtenus avec des lymphocytes activés avec le LPS et la ConA. Ces données montrent que l'augmentation de l'expression de l'ARN messenger 5-HT_{1A} des lymphocytes est accompagnée de la surexpression de la protéine 5-HT_{1A}.

Nous avons ensuite analysé la localisation cellulaire de la protéine 5-HT_{1A} par immunocytochimie. Le marquage des cellules non stimulées révèle une faible expression de ce récepteur. En revanche, les lymphocytes activés montrent une expression membranaire plus dense et uniforme du récepteur, sans marquage décelable dans le cytoplasme. Le marquage des cellules avec un sérum non-immun de lapin ne montre aucune liaison spécifique.

Les travaux antérieurs de notre laboratoire avaient montré que les lymphocytes B activés par le LPS lient de façon spécifique le radioligand [³H]-8-OH-DPAT (Iken et coll., 1995). Aussi, il a été rapporté que ce radioligand se lie spécifiquement aux lymphocytes T (Aune et coll., 1993), la liaison étant plus importante sur les lymphocytes T activés. Ceci va de pair avec nos résultats de cytofluorométrie et d'immunocytochimie. Cependant, la présence d'une faible liaison du [³H]-8-OH-DPAT sur les lymphocytes B et T non activés (Iken et coll., 1995; Aune et coll., 1993), ou même l'absence d'une telle liaison sur les cellules mononucléées du sang périphérique (Marazziti et coll., 1995) diffèrent de ce que nous avons observé avec l'anticorps anti-5-HT_{1A}. Nos données de cytofluorométrie et d'immunocytochimie montrent que pratiquement toutes les cellules non activées expriment la protéine membranaire 5-HT_{1A}, certes à une densité moindre par rapport aux cellules activées, mais qui est néanmoins visible et quantifiable, comme indiqué plus haut. Cette discordance dans les résultats entre le radioligand et l'anticorps s'explique par le fait que seuls les récepteurs couplés aux protéines G et ayant donc une haute affinité pour l'agoniste sont marqués par le radioligand [³H]-8-OH-DPAT (Emerit et coll., 1990). En revanche, les anticorps anti-5-HT_{1A} reconnaissent toutes les molécules 5-HT_{1A} couplées ou non aux protéines G, et permettent donc la visualisation et la quantification de la totalité des sites 5-HT_{1A}. Les antagonistes se comportent comme les anticorps, dans la mesure où eux aussi reconnaissent le récepteur indépendamment de son état de couplage à la protéine G (Gozlan et coll., 1995). Nous avons alors évalué la liaison de l'antagoniste radioactif spécifique du récepteur 5-HT_{1A}, [³H]-WAY-100635 (Gozlan et coll., 1995), sur les lymphocytes au repos et ceux activés. Ces études montrent aussi que les lymphocytes non stimulés expriment des sites de liaison spécifiques pour le [³H]-WAY-100635 et que la densité de ces sites est plus importante sur les lymphocytes activés.

En somme, nos résultats montrent que la régulation transcriptionnelle de l'ARN messager 5-HT_{1A} des lymphocytes B et T activés est suivie par l'augmentation de l'expression membranaire de la protéine 5-HT_{1A} sur ces cellules.

2. Potentiel lymphotrophique et lymphoprotecteur de la sérotonine

2.1. La sérotonine amplifie la prolifération des lymphocytes T et B via le récepteur 5-HT_{1A}

Pendant longtemps, la sérotonine a été connue pour son pouvoir vasoactif et sa participation dans la neurotransmission. Une autre faculté qu'on commence à découvrir à cette amine biogène est son pouvoir mitogénique sur la prolifération d'une variété de types cellulaires. Conventionnellement, un "vrai" facteur de croissance est toute molécule capable de stimuler la prolifération de cultures cellulaires en absence de tout autre stimulus (Rudland et Jimenez de Asua, 1979). Dans ce sens, la sérotonine ne représente pas un "vrai" facteur de croissance. Cependant, elle augmente la prolifération de cellules en croissance. Elle agirait ainsi en écourtant le cycle cellulaire ou en recrutant des cellules au repos dans le cycle cellulaire.

La sérotonine augmente la prolifération de différents types cellulaires. Au niveau du système nerveux central, elle est connue pour son potentiel neurotrophique. En effet, cette monoamine est exprimée très précocement dans la vie embryonnaire et elle a une distribution très grande au niveau des compartiments du système nerveux central (Lauder, 1990; Lauder et Krebs, 1978). La sérotonine influence la division cellulaire des neurones (Chubakov et coll., 1986; Lauder et Krebs, 1978). Par exemple, elle agit sur le développement des aires visuelles du cortex cérébral des rats nouveau-nés. De plus, l'addition de la sérotonine, à des concentrations physiologiques, à des cultures neuronales stimule la prolifération des cellules gliales (Chubakov et coll., 1986). Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré que la croissance des neurones sérotoninergiques eux-mêmes est modulée par la sérotonine (Liu et Lauder, 1991; Whitaker-Azmitia et Azmitia, 1989). En effet, la sérotonine augmente la croissance des neurones sérotoninergiques du stade embryonnaire 14 jours (E14) suite à des traitements

de 1 à 3 jours *in vitro* (Liu et Lauder, 1991). Ces effets impliqueraient différents récepteurs sérotoninergiques, dont le 5-HT_{1A} dans la mesure où le 8-OH-DPAT aussi exerce des effets trophiques sur des cultures primaires de cellules hypothalamiques (De Vitry et coll., 1988). En l'occurrence, le traitement de cultures de cellules hypothalamiques avec la sérotonine et le 8-OH-DPAT augmente le nombre de ces cellules. En revanche, cette augmentation est inhibée par l'antagoniste metergoline. Aussi, la sérotonine et le 8-OH-DPAT augmentent la croissance des cellules microgliales (Whitaker-Azmitia, 1989) stipulant que le système sérotoninergique régule la croissance de ses propres neurones en agissant sur les cellules gliales.

À part ses effets sur les cellules nerveuses, la sérotonine augmente aussi la prolifération d'autres types cellulaires. L'agrégation plaquettaire lors d'accidents vasculaires induit la libération de facteurs de croissance et de molécules vasoactives. Entre autres, la sérotonine est connue comme un mitogène pour les cellules endothéliales vasculaires. L'addition de sérotonine ($2 \cdot 10^{-4}M$ à $10^{-3}M$) à des cultures de cellules endothéliales en croissance induit une augmentation du nombre de ces cellules et de leur incorporation de thymidine tritiée (D'Amore et Shepro, 1982; Pakala et Benedict, 1998). Dans ce cas, la sérotonine écourte le cycle cellulaire des cellules endothéliales. En effet, après neuf jours de traitement avec la sérotonine, les cellules atteignent leur confluence et cessent de se diviser. En revanche, les cultures contrôles requièrent trois jours additionnels pour atteindre leur confluence. Ces effets opèrent via les récepteurs 5-HT_{2A} parce que la pré-incubation des cellules endothéliales avec les antagonistes des récepteurs 5-HT₂, LY281067 et kétansérine, bloque l'effet mitogénique de la sérotonine (Pakala et Benedict, 1998, Marcondes et coll., 2000). En agissant à ce niveau, la sérotonine facilite la guérison de l'intima subséquente à un accident vasculaire.

La sérotonine stimule aussi la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire. En effet, la sérotonine ($10^{-5}M$ à $10^{-3}M$) augmente la prolifération de ces cellules de façon dose-dépendente. La sérotonine agit seule ou en synergie avec d'autres facteurs de croissance (la thrombine; le facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF; la thromboxane A₂; le facteur activateur des plaquettes, PAF) (Pakala et Benedict, 1999; Cirillo et coll., 1999). Cet effet est accompagné de l'augmentation du nombre de cellules. Les effets mitogéniques de la sérotonine sont abolis par

l'antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (LY281067), stipulant l'implication de ce récepteur dans ces phénomènes. Des études moléculaires (Northern blot) ont montré que ces cellules expriment l'ARN messager 5-HT_{2A} (Corson et coll., 1992). Ces effets passeraient via l'activation d'une PLC, entraînant subséquemment la stimulation du métabolisme des phosphatidylinositols (Corson et coll., 1992), et via l'induction du proto-oncogène *c-fos* (Cirillo et coll., 1999). Dans ce sens, les antagonistes 5-HT_{2A} peuvent être utiles pour atténuer la sténose suite à une perturbation du lit vasculaire (angioplastie).

Dans notre étude, nous montrons que la sérotonine est capable d'augmenter la prolifération des lymphocytes T tout comme celle des lymphocytes B. La sérotonine par elle-même n'a pas d'effet sur ces cellules, mais elle agit en amplifiant l'activation lymphoblastique des mitogènes. Cet effet est reproduit avec l'agoniste 5-HT_{1A} sélectif R(+)-8-OH-DPAT et inhibé par l'antagoniste 5-HT_{1A} sélectif WAY-100635. Ceci suggère que le récepteur 5-HT_{1A} est impliqué dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T.

Aussi, d'autres travaux ont montré que la sérotonine et les agonistes 5-HT_{1A} augmentent la réponse lymphoblastiques des lymphocytes T humains *in vivo* (Hofmann et coll., 1996) et *in vitro* (Eugen-Olsen et coll., 1997; Afzelius et coll., 1997; Aune et coll., 1993). En revanche, les antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A}, et les inhibiteurs de la synthèse de la sérotonine inhibent la prolifération des lymphocytes T murins *in vivo*, et celle des lymphocytes T humains *in vitro* (Aune et coll., 1994).

Récemment, on a décrit que l'agoniste 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT possède aussi une affinité pour le récepteur 5-HT₇ (Wood et coll., 2000), ce qui suggère que ce dernier peut être aussi impliqué dans les effets amplificateurs de la prolifération des lymphocytes. Cependant, dans notre étude, nous avons utilisé un agoniste beaucoup plus sélectif pour le 5-HT_{1A}, R(+)-8-OH-DPAT, et l'antagoniste sélectif 5-HT_{1A} WAY-100635 qui, tous les deux, ne démontrent pas d'affinité pour le récepteur 5-HT₇. Ceci supporte l'implication spécifique du récepteur 5-HT_{1A} dans l'amplification de la prolifération des lymphocytes B et T par la sérotonine.

La sérotonine pourrait agir en écourtant le cycle cellulaire des lymphocytes, ou en recrutant des cellules au repos dans le cycle cellulaire. Ainsi, nous avons analysé ces

deux hypothèses. L'analyse du cycle cellulaire montre que la sérotonine et les agonistes 5-HT_{1A} augmentent les proportions des lymphocytes en phase S avec des pourcentages respectifs de 30 et 29% après 48 h de culture cellulaire. Ce pourcentage n'est atteint que 24 h plus tard, soit après 72 h de culture, au niveau des lymphocytes activés en l'absence des agonistes 5-HT_{1A}. L'effet des agonistes est inhibé par l'antagoniste WAY-100635, ce qui implique que les effets observés sont exercés via le récepteur 5-HT_{1A}. De plus, nos résultats montrent aussi que la sérotonine et le 8-OH-DPAT augmentent le recrutement de cellules au repos dans le cycle cellulaire. En effet, les proportions de lymphocytes en phase G₀/G₁ sont plus faibles au niveau des cultures cellulaires en présence des agonistes comparativement à celles en leur absence. Là encore les antagonistes bloquent l'effet des agonistes confirmant le rôle du récepteur 5-HT_{1A}. En outre, l'évaluation des proportions des cellules blastiques dans ces cultures lymphocytaires montre que la sérotonine augmente les pourcentages de ces cellules activées par les mitogènes. Nous concluons alors que la sérotonine amplifie la prolifération des lymphocytes B et T en écourtant le cycle cellulaire ou en recrutant des cellules au repos en stade blastique.

2.2. La sérotonine protège les lymphocytes contre la mort cellulaire par apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus finement régulé. Elle est essentielle pour le développement normal de différents tissus. Elle joue aussi un rôle important dans plusieurs phénomènes pathologiques. La mort cellulaire par apoptose est caractérisée par un rétrécissement de la cellule, l'apparition de corps apoptotiques, ballonnement de la membrane cytoplasmique, condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN. Ce processus est à la base de plusieurs maladies dégénératives. Par exemple, elle est impliquée dans des maladies cérébrales telles que l'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (Bredesen, 1995), si bien que les stratégies thérapeutiques potentielles seraient de prévenir la perte cellulaire en inhibant l'apoptose chez les patients. La sérotonine possède un potentiel neuroprotecteur démontré suite à une ischémie focale ou à une toxicité au glutamate des cellules hippocampales et astrocytaires (Prehn et coll., 1993; Liu et Lauder, 1991).

Nous avons testé le rôle de la sérotonine dans la survie des lymphocytes. Nos résultats montrent que la sérotonine augmente la survie des lymphocytes activés en diminuant la mort cellulaire par apoptose. En effet, le pourcentage des cellules apoptotiques est réduit de façon significative par la sérotonine et l'agoniste 8-OH-DPAT. Cet effet est renversé par l'antagoniste WAY-100635 suggérant l'implication du récepteur 5-HT_{1A} dans l'activité lymphoprotectrice de la sérotonine. Des résultats semblables ont été obtenus sur des cultures primaires de neurones du télencéphale d'embryons d'oiseaux (Ehlemeyer et Krieglstein, 1997). En effet, les auteurs ont montré que la stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} inhibe l'apoptose induite chez ces neurones suite à une privation de sérum. D'autres travaux ont aussi décrit l'implication des récepteurs 5-HT₂ (Dooley et coll., 1997). Dans ces études, les auteurs ont observé que la sérotonine préserve les neurones glutamatergiques corticaux contre la mort cellulaire. Ces effets sont mimés par l'agoniste des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}, α -méthyl-5-HT, et inhibés par l'antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, cinansérine.

Au total, les effets de la sérotonine sur la croissance et la survie des lymphocytes tels que démontrés dans nos travaux sont donc comparables à ses effets neurotrophiques et neuroprotecteurs décrits par d'autres auteurs (Riad et coll., 1994; Liu et Lauder, 1991; Bode-Greuel et coll., 1990).

La stimulation du récepteur 5-HT_{1A} active différentes voies de signalisation. La plus classique est l'activation d'une protéine Gi/o qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et baisse les niveaux cytosoliques d'AMPc (Aune et coll., 1993; De vivo et Maayani, 1986). Le récepteur 5-HT_{1A} est aussi couplé à l'ouverture de canaux potassiques et l'induction d'hyperpolarisation de la cellule (Choquet et Korn., 1988, Andrade et coll., 1986), et à la fermeture de canaux calciques avec baisse des taux de calcium intracellulaire (Pennington et Kelley, 1990). L'hyperpolarisation cellulaire est impliquée dans la neuroprotection (Jakob et Krieglstein, 1997; Rupalla et coll., 1994). De même, plusieurs inducteurs de l'apoptose augmentent les concentrations cytosoliques de calcium (Trump et Berezsky, 1995). Ce dernier active plusieurs endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN. Ainsi, l'inhibition de l'augmentation des concentrations calciques serait capable de prévenir l'induction de l'apoptose (Trump et Berezsky, 1995). Cependant, laquelle de l'hyperpolarisation ou la diminution des

concentrations calciques intracellulaires serait impliquée dans les effets anti-apoptotiques exercés par le récepteur 5-HT_{1A} dans les lymphocytes mérite d'être clarifiée par d'autres travaux.

Dans notre laboratoire, l'étude des mouvements calciques au niveau des lymphocytes n'a pas montré un effet de la sérotonine ni sur les lymphocytes au repos, ni sur ceux activés par le LPS (Iken, Thèse de doctorat). Néanmoins, il est rapporté que la sérotonine et des agonistes et antagonistes des récepteurs sérotoninergiques régulent l'activité des canaux potassiques dans une lignée cellulaire pré-B murine par le biais de récepteurs 5-HT₃ et 5-HT_{1-like} (Choquet et Korn, 1988). D'autre part, il est démontré que la phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-K) est une enzyme essentielle dans les voies anti-apoptotiques du facteur de croissance neuronal, NGF (Crowder et Freeman, 1998). Ces auteurs ont montré que la PI-3-K est nécessaire et suffisante pour assurer la survie des neurones par le NGF. D'autres molécules qui activent la PI-3-K auraient les mêmes effets sur différents types cellulaires. Le 8-OH-DPAT active la PI-3-K dans les cellules ovariennes du hamster chinois (CHO) transfectées avec le récepteur 5-HT_{1A} (Cowen et coll., 1996). Ceci pourrait expliquer le rôle du récepteur 5-HT_{1A} dans les effets anti-apoptotiques de la sérotonine. D'autres études sont donc nécessaires pour élucider si le récepteur 5-HT_{1A} est effectivement couplé à cette voie de signalisation et si l'activation de cette dernière est liée à la prévention de la mort cellulaire des lymphocytes.

Des études récentes dans notre laboratoire et par d'autres équipes démontrent que la sérotonine diminue la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROI) (Iken, 2001; Huether et coll., 1997; Schuff-Werner et coll., 1995). Ces molécules sont connues pour leur pouvoir cytotoxique et leur élimination est importante dans la protection contre l'apoptose (Seaton et coll., 1997). En effet, la sérotonine est rapidement oxydée par les ROI et joue donc le rôle de piègeur pour ces molécules en formant un dimère; 5,5'-dihydroxy-4,4'-bitryptamine (Schuff-Werner et coll., 1995). Ainsi, elle jouerait un rôle dans la protection contre la mort cellulaire.

3. Le facteur de transcription NF- κ B: un nouveau maillon dans les voies de signalisation du récepteur 5-HT_{1A}

Le facteur de transcription NF- κ B désigne un ensemble de dimères composés des membres de la famille des protéines Rel. Parmi ces dimères, le plus souvent exprimé est la forme inductible d'hétérodimère p50/p65. Cet hétérodimère est composé de la forme active de la protéine p105 (p50) et de la protéine RelA (Gilmore, 1999). Nous avons utilisé l'immunofluorescence suivie d'une analyse par cytofluorométrie pour étudier la translocation nucléaire de ces deux sous-unités suite à l'activation du récepteur 5-HT_{1A}. Cette méthodologie donne des résultats comparables à ceux de la technique classique de retardement de migration (*mobilité shift assay*) (Foulds, 1997). Nos résultats montrent que la sérotonine et le R(+)-8-OH-DPAT augmentent la translocation nucléaire des deux sous-unités p50 et p65 au niveau des lymphocytes activés. Cette translocation est inhibée par l'antagoniste WAY-100635, suggérant l'implication du récepteur 5-HT_{1A} dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Ce résultat démontre pour la première fois le couplage du récepteur 5-HT_{1A} à un facteur de transcription dans des cellules primaires. En effet, un autre groupe avait rapporté l'implication du NF- κ B dans la transduction du signal du récepteur 5-HT_{1A} mais dans la lignée de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) transfectée avec le 5-HT_{1A} humain (Cowen et coll., 1997). Dans cette étude, l'activation du facteur NF- κ B a été mesurée par l'augmentation de la dégradation de la sous-unité inhibitrice I κ B- α , et l'activation d'un gène rapporteur chloramphénicol acétyltransférase (CAT) sous contrôle de séquences consensus κ B.

La régulation du NF- κ B est maintenant connue avec beaucoup de détails (Karin, 1999). Les dimères de NF- κ B sont normalement séquestrés au niveau du cytoplasme sous la forme d'un complexe inactif et latent via l'interaction avec des protéines inhibitrices I κ B. L'activation des cellules induit la phosphorylation rapide et la polyubiquitination de la protéine inhibitrice I κ B, suivies de la dégradation par le protéasome de cette dernière. Les I κ B kinases (IKK) qui phosphorylent I κ B jouent donc un rôle prépondérant dans l'activation du NF- κ B. Les voies de signalisation en amont des IKK ne sont pas encore totalement élucidées, mais celles-ci sont probablement

variées et multiples, compte tenu de la très grande diversité des stimuli qui activent NF- κ B. Ainsi, l'activité NF- κ B est augmentée par des formes constitutivement actives de ras, raf ou MAP-kinase-kinase (Finco et Baldwin, 1993). La voie PI-3-K – Akt serait aussi impliquée dans l'activation du NF- κ B (Ozes et coll., 1999). Par ailleurs, on sait que ces kinases (MAP-kinase-kinase, PI-3-K) sont impliquées dans la transduction du signal du récepteur 5-HT_{1A} (Della Rocca, 1999; Garnovskaya et coll., 1998; Garnovskaya et coll., 1996; Cowen et coll., 1996). Il est donc fortement plausible que l'activation de ces voies de signalisation, subséquente à la stimulation du récepteur 5-HT_{1A}, soient à la base de l'activation de la translocation nucléaire des sous-unités p50 et p65 du NF- κ B que nous avons observée au niveau des lymphocytes activés. Des travaux ultérieurs devront évaluer cette hypothèse.

L'activation du NF- κ B suite à la stimulation du récepteur 5-HT_{1A} au niveau des lymphocytes pourrait expliquer l'implication de ce récepteur dans les effets lymphoprotecteurs et lymphoblastiques de la sérotonine. En effet, à côté de son rôle dans l'activation des gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires, le NF- κ B exerce une fonction importante dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire. Le rôle du NF- κ B dans l'inhibition de l'apoptose remonte aux travaux sur l'oncoprotéine rétrovirale v-Rel (Neiman et coll., 1991). Il a été démontré que cette protéine inhibe directement l'apoptose induite par les radiations et le dexaméthasone. Le mécanisme par lequel le NF- κ B bloque l'apoptose est, dans la majeure partie des cas, la régulation positive de l'expression des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques telles que les IAP et certains membres de la famille des protéines Bcl-2. Les protéines Bcl-2 sont très impliquées dans la régulation de l'apoptose. Il s'agit des protéines Bcl-2-like (A1/Bfl1, Bcl-X_L et Nr13) dont les gènes contiennent tous des sites κ B fonctionnels (Lee et coll., 1999a; Lee et coll., 1999b). Par exemple, la surexpression de A1/Bfl1 protège les lymphocytes B de l'apoptose induite par l'interaction antigène-BcR. Dans ce cas, l'inhibition de l'apoptose est due au blocage du relargage du cytochrome c et à l'inhibition de la caspase-3 (Wang et coll., 1999). Par contre, les IAP (i.e. IAP-1 et IAP-2) seraient impliquées dans le blocage de l'activation de la caspase-8 (Lacasse et coll., 1998; Wang et coll., 1998). D'autres protéines impliquées dans l'inhibition de

l'apoptose et dont l'expression est régulée par le NF- κ B sont les facteurs TRAF-1 et TRAF-2. Ces protéines jouent le rôle de molécules adaptatrices en recrutant et en activant NIK menant à l'inhibition de l'apoptose (Wang et coll., 1998). Finalement, une autre protéine IEX-1L, dont l'expression est régulée par le NF- κ B, joue un rôle protecteur contre la mort cellulaire par apoptose induite par le TNF- α et Fas (Wu et coll., 1998).

D'autre part, plusieurs observations suggèrent que l'activation du NF- κ B est impliquée dans la régulation des phases du cycle cellulaire. En effet, le NF- κ B peut activer l'expression de la cycline D1, qui est impliquée dans la régulation positive de la transition des phases G1 à S du cycle cellulaire (Kontgen et coll., 1995; Guttridge et coll., 1999). Aussi, le NF- κ B participe à cette régulation, via des interactions protéine-protéine avec des complexes régulateurs du cycle cellulaire, tel que le complexe cycline E-Cdk 2 (cycline-dependent kinase 2) par l'intermédiaire de son association avec les protéines CBP/p300 et p16INK4 (Perkins et coll., 1997; Wolff et Naumann, 1999). Il est donc vraisemblable que l'activation du NF- κ B subséquente à l'activation du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes est le médiateur des effets de la sérotonine sur les réponses lymphoblastiques et anti-apoptotiques que nous avons observées dans notre étude.

Nos résultats confirment l'appartenance de la sérotonine à la pléiade d'agents immunomodulateurs. Sans être indispensable dans un tel processus, la sérotonine y jouerait un rôle important. Les agents qui modulent les fonctions hématopoïétiques et immunitaires sont redondants dans leurs effets. Ainsi, L'IL-2, longtemps considérée comme une cytokine centrale dans les fonctions des lymphocytes T, n'est pas pour autant indispensable. En effet, des souris déficientes en IL-2 ont des réponses T et B normales (Kundig et coll., 1993). De plus, des souris déficientes pour les gènes à l'IL-2 et à l'IL-4 gardent leur pouvoir de rejet de greffes allogéniques (Li et coll., 1998). Donc, les signaux critiques pour le maintien d'une réponse immunitaire adéquate sont nécessairement redondants. Ainsi, plusieurs cytokines, hormones et neurotransmetteurs peuvent exercer des effets complémentaires dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Ceci ouvre de nouvelles issues pour le développement de nouveaux médicaments sur la base d'agents neuroendocriniens dans le traitement de maladies inflammatoires, auto-immunes ou d'immunodéficience. Dans ce contexte, il est

rapporté que les molécules qui diminuent les niveaux d'AMPc augmentent la prolifération et l'activité cytotoxique des lymphocytes T prélevés de patients séropositifs (Hoffmann et coll., 1993). Il est intéressant de noter que l'administration du buspirone, un agoniste 5-HT_{1A} qui agit comme antidépresseur et anxiolytique, entraîne une augmentation des proportions de lymphocytes T CD4 chez les patients VIH-positifs. Cet effet est associé à une diminution des niveaux d'AMPc intracellulaire et à une augmentation de la prolifération et de l'activité cytotoxique des lymphocytes T (Hofmann et coll., 1996).

4. Conclusion

Notre étude a été amorcée sur la base de données fonctionnelles obtenues dans notre laboratoire et par d'autres équipes suggérant que la sérotonine régule l'activité des lymphocytes B et T via le récepteur 5-HT_{1A}. Cependant, des études moléculaires étaient nécessaires pour caractériser définitivement la nature de ce récepteur. Notre but était donc de caractériser le récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes B et T.

Nos résultats démontrent que ces cellules expriment l'ARN messager et la protéine 5-HT_{1A}. L'expression de ces derniers est augmentée de façon temps-dépendant et à des niveaux comparables dans les deux populations lymphocytaires suite à leur activation par différents mitogènes. L'analyse des mécanismes moléculaires qui régissent la régulation de l'expression de ce récepteur montre qu'elle se fait de façon transcriptionnelle et qu'elle implique le facteur de transcription NF-κB. Des études opérationnelles utilisant des agonistes et antagonistes sélectifs du récepteur 5-HT_{1A} ont montré que ce dernier est impliqué dans les effets anti-apoptotiques et amplificateurs de la prolifération des lymphocytes par la sérotonine. De plus, nos études sur les voies transductionnelles du récepteur 5-HT_{1A}, ont permis de montrer que le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans la transduction des signaux de ce récepteur au niveau des lymphocytes activés. Aussi, des études supplémentaires sont requises pour identifier les chaînons sous-jacents qui couplent l'activation du récepteur 5-HT_{1A} à la mobilisation du NF-κB.

Les résultats de nos travaux apportent une base rationnelle pour d'éventuelles applications thérapeutiques d'agents sérotoninergiques. Le rôle du récepteur 5-HT_{1A} dans les réponses immunitaire et inflammatoire suggère que des interventions pharmacologiques qui modifieraient les niveaux de sérotonine, tels que les inhibiteurs de recapture, ou qui affecteraient directement le récepteur 5-HT_{1A}, tels que des agonistes et des antagonistes, pourraient représenter d'importantes stratégies pour l'immunomodulation. Lors d'une réaction inflammatoire, l'activation du récepteur 5-HT_{1A} est centrale dans le recrutement des cellules immunitaires dans le foyer inflammatoire, et l'augmentation de la prolifération de ces cellules. L'inhibition de l'expression du récepteur ou de son activation serait donc une bonne approche thérapeutique anti-inflammatoire. À l'inverse, l'augmentation de l'expression du récepteur ou de son activité serait profitable dans des situations d'immunodéficience comme chez des patients séropositifs pour le VIH.

L'ensemble de nos résultats et ceux de la littérature permet de proposer un modèle qui intègre les connaissances sur (i) la surexpression du récepteur 5-HT_{1A} sur les lymphocytes activés, (ii) la libération de la sérotonine dans les organes lymphoïdes et aux sites inflammatoires, et (iii) la régulation de la survie et de la prolifération des lymphocytes par la sérotonine agissant sur le récepteur 5-HT_{1A} (Figure 12). Ainsi, l'activation des lymphocytes par des antigènes ou des cytokines active le facteur de transcription NF- κ B qui transloque dans le noyau et régule l'expression de plusieurs gènes, en l'occurrence celui codant pour le récepteur 5-HT_{1A} (Cowen et coll., 1997; notre étude). La sérotonine libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques au niveau des organes lymphoïdes, et par les plaquettes, les monocytes, les lymphocytes T et les neutrophiles au niveau des sites inflammatoires agit sur les récepteurs 5-HT_{1A} nouvellement exprimés. Cette action induit une amplification de l'activation du NF- κ B dans les lymphocytes (notre étude). En plus d'augmenter l'expression membranaire du 5-HT_{1A}, le NF- κ B régule l'expression d'autres protéines, parmi lesquelles, des médiateurs de l'inflammation (i.e. cytokines, enzymes, immunorécepteurs) (Barnes et Karin, 1997; Askenase et coll., 1991), des régulateurs du cycles cellulaires (Guttridge et coll., 1999; Wolff et Naumann, 1999; Perkins et coll., 1997; Kontgen et coll., 1995) et des inhibiteurs de l'apoptose (Wang et coll., 1999; Lee et coll., 1999a; Lee et coll.,

1999b; Lacasse et coll., 1998; Wang et coll., 1998; Wu et coll., 1998;). La sérotonine est aussi un piègeur des ROI (Schuff-Werner et coll., 1995; Huether et coll., 1997). Elle agirait donc en diminuant les concentrations de ces ROI dans les milieux intra- et extracellulaire et empêcherait par le fait même les dommages cellulaires (peroxydation lipidique, oxydation des protéines et des acides nucléiques) qui sont à la base de leurs effets cytotoxiques.

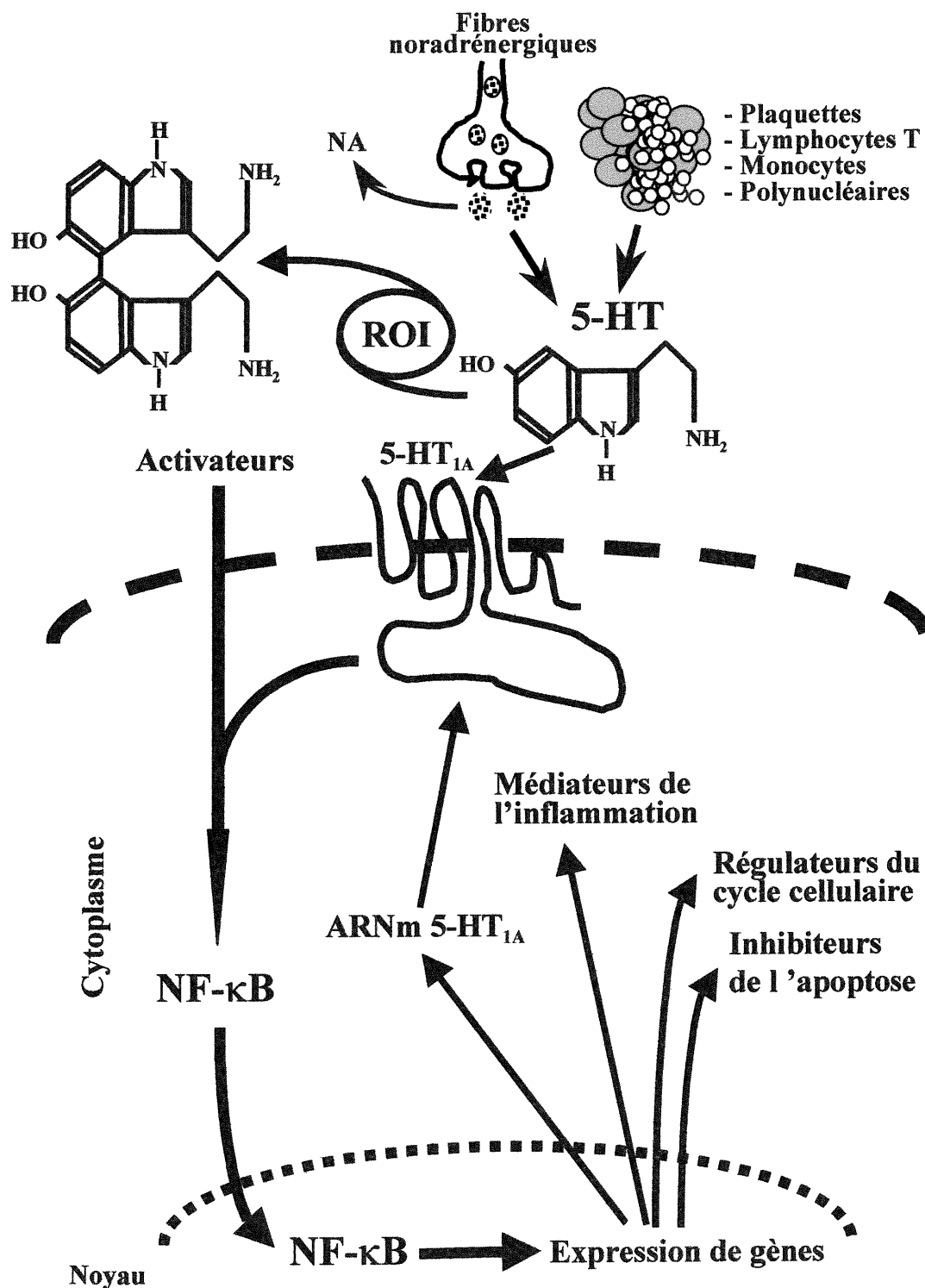


Figure 12. Modèle schématisé explicatif de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} des lymphocytes et les effets de la sérotonine sur ces cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrass C.K., O'Connor S.W., Scarpace P.J. et Abrass I.B. Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. J. Immunol. 135: 1338-1341; 1985.
- Ader R. et Cohen N. Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. Ann. Rev. Psychol. 44: 53-85; 1993.
- Ader R., Cohen N. et Felten D. Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system. Lancet. 345: 99-103; 1995.
- Ader R., Felten D. et Cohen N. Interactions between the brain and the immune system. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 561-602; 1990.
- Adham N., Borden L.A., Schechter L.E., Gustafson E.L., Cochran T.L., Vaysse P.J.-J., Weinshank R.L. et Branshek T.A. Cell-specific coupling of the cloned human 5-HT_{1F} receptor to multiple signal transduction pathways. Arch. Pharmacol. 348: 566-575; 1993.
- Ahlemeyer B. et Kriegstein J. Stimulation of 5-HT_{1A} receptor inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons from chick embryo. Brain Res. 777: 179-186; 1997.
- Albert P.R., Lembo P., Storing J.M., Charest A., Saucier C. The 5-HT_{1A} receptor: signaling, desensitization and gene transcription. Neuropsychopharmacol. 14: 19-25; 1996.
- Albert P.R., Zhou Q.y., Van Tol H.H.M., Bunzow J.R. et Civelli O. Cloning, functional expression and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. J. Biol. Chem. 265: 5825-5832; 1990.
- Ameisen J.C., Meade R. et Askenase P.W. A new interpretation of the involvement of serotonin in delayed-type hypersensitivity. Serotonin-2 receptor antagonists inhibits contact sensitivity by an effect on T cells. J. Immunol. 142: 3171-3179; 1989.
- Andrade R., Malenka R.C. et Nicoll R.A. A G-protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. Science. 234: 1261-1265; 1986.

- Andreis P.G., Neri G. et Nussdorfer G.G. Corticotropin-releasing hormone (CRH) directly stimulates corticosterone secretion by the adrenal gland. Endocrinol. 128: 1198-1200; 1991.
- Arai S., Lee F., Miyajima A. et coll. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Ann. Rev. Biochem. 59:783-836; 1990.
- Arenzana-Seisdedos F., Turpin P., Rodriguez M., Thomas D., Hay R.T., Virelizier J.L. et Dargemont C. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. J. Cell Sci. 110: 369-378; 1997.
- Arzt E., Costas M., Finkielman S. et Nahmod V.E. Serotonin inhibition of tumor necrosis factor-alpha synthesis by human monocytes. Life Sci. 48: 2557-2562; 1991.
- Ashcroft G.W., Eccleston D. et Crawford T.B.B. 5-hydroxyindole metabolism in rat brain. A study of intermediate metabolism using the technique of tryptophan loading. J. Neurochem. 12: 483-492; 1965.
- Askenase P.W., Herzog W.R., Millet I., Paliwal V., Ramabhadran R., Rochester C., Geba G.P. et Ptak W. Serotonin initiation of delayed-type hypersensitivity: mediation by a primitive Thy-1+ antigen-specific clone or by specific monoclonal IgE antibody. Skin Pharmacol. 4 (Suppl 1): 25-42; 1991.
- Atcherd C., Bernard H. et Gagneux C. Action de la morphine sur les propriétés leucocytaires. Leucodiagnostic du morphinisme. Bulletin des membres de la société médicale de hopitaux de Paris. 28: 958; 1909.
- Audhya T., Brand H. et Hollander C.S. Suppression of natural killer cytotoxicity in human peripheral T lymphocytes by corticotropin-releasing factor. An in vitro model of in vivo effects. Clin. Res. 38: 595A; 1990.
- Audhya T., Jain R. et Hollander C.S. Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. Cell. Immunol. 134: 77-84; 1991.
- Audhya T., Nabriski D., Saperstein A., Ranson J. et Hollander C.S. Corticotropin-releasing factor suppresses interleukin-2 induced lymphocyte proliferation and increases cAMP production in human splenocytes. Clin. Res. 38: 461A; 1991.
- Auernhammer C.J. et Strasburger C.J. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. Eur. J. Endocrinol. 133: 635-645; 1995.

- Aune T.M., Golden H.W. et 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., Kelley K.A., Ranges G.E. et Bombara M.P. Serotonin-activated signal transduction via serotonin receptors on Jurkat cells. J. Immunol. 145: 1826-1831; 1990.
- Aune T.M., McGrath K.M., Sarr T., Bombara M.P. et Kelley K.A. Expression of 5-HT_{1a} receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. J. Immunol. 151: 1175-1183; 1993.
- Axelrod J. et Weissback H. Enzymatic o-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science. 131: 1312; 1960.
- Azad N., Emanuele N.V., Halloran M.M., Tentler J. et Kelley M.R. Presence of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) mRNA in rat spleen lymphocytes. Endocrinol. 128: 1679-1681; 1991.
- Azad N., La Paglia N., Abel K., Jurgens J., Kirsteins L., Emanuele N.V., Kelley M., Lawrence A.M. et Mohagheghpour N. Immunoactivation enhances the concentration of luteinizing hormone-releasing hormone peptide and its gene expression in human peripheral T-lymphocytes. Endocrinol. 133: 215-223; 1993.
- Badolaro R., Bound H.M., Valerio G. et coll., Differential expression of surface membrane growth receptors on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. J. Clin. Endocrinol. Met. 79: 984-990; 1994.
- Baeuerle P.A. et Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. Ann. Rev. Immunol. 12: 141-179; 1994.
- Barnes P.J. et Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N. Eng. J. Med. 336: 1066-1071; 1997.
- Baron S., Tying S.K., Fleischmann W.R.Jr., Coppenhaver D.H., Niesel D.W., Klimpel G.R., Stanton G.J. et Hughes T.K. The interferons: mechanism of action and clinical applications. JAMA. 266: 1375-1383; 1991.
- Bartlett S.E. et Hendry I.A. Identifying the G protein, G α , and its associated proteins in nervous tissue using mass spectrometry and microsequencing techniques. Int. J. Dev. Neurosci. 15: 267-274; 1997.

- Batchelor J.R., Lombardi G. et Lechler R.I. Speculations on the specificity of suppression. Immunol. Today. 10: 37-40; 1989.
- Beg A.A. et Baldwin A.S. Jr. The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/ NF- κ B transcription factors. Gen. Dev. 7: 2064-2070; 1993.
- Belin D. The Rnase protection assay. Methods. Mol. Biol. 58: 131-136; 1996.
- Bender K., Gottlicher M., Whiteside S., Rahmsdorf H.J. et Herrlich P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. Embo J. 17: 5170-5181; 1998.
- Benschop R.J., Oostveen F.G., Heijnen C.J. et Ballieux R.E. Beta 2-adrenergic stimulation causes detachment of natural killer cells from cultured endothelium. Eur. J. Immunol. 23: 3242-3247; 1993.
- Benschop R.J., Rodriguez-Reuerhahn M. et Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: Early observations, current research, and future directions. Brain Behav. Immun. 10: 77-91; 1996.
- Beraud C., Henzel W.J. et Baeuerle P.A. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 429-434; 1999.
- Berczi I. The influence of pituitary-adrenal axis on the immune system. In Berczi I. Pituitary function and immunity. CRC Press, Boca Raton, Fl. p. 49-132; 1986.
- Bernton E.W., Beach J.E., Holaday J.W., Smallridge R.D. et Ein H.G. Release of multiple hormones by direct action of interleukine-1 on pituitary cells. Science. 238: 519-521; 1987.
- Besedovsky H.O. Del Rey A.E., Sorkin E., DaPrada M. et Keller H.H. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. Cell. Immunol. 48: 346-355; 1979.
- Besedovsky H.O. et Del Rey A. Immune-Neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. In: Frontiers in Neuroendocrinology. Raven Press, NewYork. 13: 61-94; 1992.
- Bidlack J.M., Saripalli L.D. et Lawrence D.M.P. K-opioid binding sites on a murine lymphoma cell line. Eur. J. Pharmacol. 227: 257-265; 1992.

- Bidlingmaier M., Auernhammer C.J. Feldmeier H et Strasburger C.J. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I binding to natural killer cells. Acta Paediat. 423: 80-81; 1997.
- Bieger D. et Triggle C. Pharmacological properties of mechanical responses of the rat oesophageal muscularis mucosae to vagal and field stimulation. Br. J. Pharmacol. 84: 93-160; 1985.
- Binder G., Revskoy S. et Gupta D. In vitro growth hormone gene expression in neonatal rat thymus and bone marrow. J. Endocrinol. 140: 137-143; 1994.
- Blalock J.E. Relationship between neuroendocrine hormones and lymphokines. Lymphokine. 8: 1-16; 1984.
- Blalock J.E. Production of neuroendocrine peptide hormones by the immune system. Prog. Allerg. 43: 1-13; 1988.
- Blier P., Montigny C. et Chaput Y. Modification of the serotonin system by antidepressant treatments; implication for the therapeutic response in major depression. J. Clin. Psychopharmacol. 7: 24S-35S; 1987.
- Bode-Greuel K. M., Klisch J., Glaser T. et Traber J. Serotonin (5-HT)_{1A} receptor agonists as neuroprotective agents in cerebral ischemia. In Kriegstein J. et Oberpichler H. Pharmacology of cerebral ischemia. Wissenschaft. Verlag, Stuttgart. p. 485-491; 1990.
- Boess F.G., Beroukhim R. et Martin I.L. Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. J. Neurochem. 64: 1401-1405; 1995.
- Boess F.G. et Martin I.L. Molecular biology of 5-HT receptors. Neuropharmacol. 33: 275-317; 1994.
- Bohjanen P.R., Betyniak B., June C.H., Thompson C.B. et Lindsten T. An inducible cytoplasmic factor (AU-B) binds selectively to AUUUA multimers in 3' untranslated region of lymphokine mRNA. Mol. Cell. Biol. 11: 3288-3295; 1991.
- Bost K.L., Smith E.M., Wear L.B. et Blalock J.E. Presence of ACTH and its receptor on a B lymphocytic cell line: A possible autocrine function for a neuroendocrine hormone. J. Biol. Reg. Homeost. Agents. 1:23-27; 1987.
- Boumpas D.T., Paliogianni F., Anastassiou E.D. et Balow J.E. Glucocorticoid action on the immune system: Molecular and cellular aspects. Clin. Exp. Rheumatol. 9: 413-423; 1991.

- Bovbjerg D.H. Psychoneuroimmunology: implications for oncology. Cancer. 67: 828-832; 1991.
- Bradley P.B., Engel G., Feniuk W., Fozard J.R., Humphrey P.P.A., Middlemiss D.N., Mylecharane E.J., Richardson B.P. et Saxena P.R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. Neuropharmacol. 25: 563-576; 1986.
- Bredesen D.E. Neuronal apoptosis. Ann. Neurol. 38: 839-851; 1995.
- Brown R., Li Z., Vriend C.Y., Nirula R., Janz L., Falk J., Nance D.M., Dyck D.G. et Greenberg A.H. Suppression of splenic macrophage interleukin-1 secretion following intracerebroventricular injection of interleukin-1 β : Evidence for pituitary-adrenal and sympathetic control. Cell. Immunol. 132: 84-93; 1991.
- Bruinvels A.T., Landwehrmeyer B., Waeber C., Palacios J.M. et Hoyer D. Homogeneous 5-HT_{1D} recognition sites in the human substantia nigra identified with a new iodinated radioligand. Eur. J. Pharmacol. 202: 89-91; 1991.
- Bunce K., Tyers M.B. et Beranek P.. Clinical evaluation of 5-HT₃ receptor antagonists as anti-emetics. Trends Pharmacol. Sci. 12: 46-48; 1991
- Buskila D., Berezin M., Gur H., Lin H.C., Alosachie I., Terryberry J.W., Barka N., Shen B., Peter J.B. et Shoenfeld Y. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. J. autoimmun. 8: 415-525; 1995.
- Butcher E.C. Cellular and molecular mechanisms that direct lymphocyte traffic. Am. J. Pathol. 136: 3-11; 1990.
- Cao Z., Henzel W.J. et Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. Science. 271:1128-1131; 1996a.
- Cao Z., Xiong J., Takeuchi M., Kurama T. et Goeddel D.V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. Nature. 383: 443-446; 1996b.
- Carmena M.J., Carmacho A., Solano R.M., Montalvo L., Garcia-Lopez E., Arias A. et 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.
- Carr D.J.J. The role of endogenous opioids and their receptors in the immune system. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 198: 710-720; 1991.

- Carson M.J., Thomas E.A., Danielson P.E. et Sutcliffe J.G. The 5-HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly in astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism of reactive astrocytes. Glia. 17: 317-326; 1996.
- Casadevall M., Saperas E., Panés J., Salas A., Anderson D.C., Malagelada J.R. et Piqué J.M. Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of central corticotropin-releasing factor. Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liv. Physiol. 39). 276: G1016-G1026; 1999.
- Cerra F.B. Nutrient modulation of inflammatory and immune function. Am. J. Surg. 161: 230-234; 1991.
- Cesario T.C., Yousefi S., Carandang G., Sadati N., Le J. et Vaziri N. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 205: 89-95; 1994.
- Charest A., Wainer B.H. et 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.
- Charney D.S., Krystal J.H., Delgado P.L. et Heninger G.R. Serotonin-specific drugs for anxiety and depressive disorders. Ann. Rev. Med. 41: 437-446; 1990.
- Chen F.E. et Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/ NF- κ B transcription factors: Structural views. Oncogene. 18: 845-852; 1999.
- Chen H., Schuler L.A. et Schultz R.D. Growth hormone receptor and regulation of gene expression in fetal lymphoid cells. Mol. Cell. Endocrinol. 137: 21-29; 1998.
- Chen Z., Hagler J., Palombella V.J., Melandri F., Scherer D., Ballard D. et Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B to the ubiquitin-proteasome pathway. Gen. Dev. 9: 1586-1597; 1995.
- Chikanza I.C. et Panayi G.S. Hypothalamic-pituitary mediated modulation of immune function: Prolactin as a neuroimmune peptide. Br. J. Rheumatol. 30: 203-207; 1991.
- Choquet D. et Korn H. Dual effects of serotonin on a voltage-gated conductance in lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4557-4561; 1988.
- Chubakov A.R., Gromova E.A., Konovalov G.V., Sarkisova E.F. et Chumasov E.I. The effects of serotonin on the morphofunctional development of rat cerebral neocortex in tissue culture. Brain Res. 369: 285-297; 1986.

- Cirillo P., Golino P., Ragni M., Battaglia C., Pacifico F., Formisano S., Buono C., Condorelli M. et Chiariello M. Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. Cardiovasc. Res. 43: 210-218; 1999.
- Clancy J. Jr., Petrovic L.M., Gordon B.H., Handa R.J., Campbell D.B. et Lorens S.A. Effects of subchronic d-fenfluramine on splenic immune functions in young and old male and female Fischer 344 rats. Int. J. Immunopharmacol. 13: 1203-1212; 1991.
- Cleveland D.W. et Yen T.J. Multiple determinants of eucaryotic mRNA stability. New Biol. 1:121-126; 1989.
- Coe C.L. Psychosocial factors and immunity and nonhuman primates. A review. Psychosomat. Med. 55: 298-308; 1993.
- Coleman J. W., Buckley M. G., Holliday M. R. et Morris A. G. Interferon-g inhibits serotonin release from mouse peritoneal mast cells. Eur. J. Immunol. 21: 2559-2564; 1991.
- Combrone J.C., Rivas F.J., Borrell J. et Guaza C. Interleukin-2 induces corticotropin-releasing-hormone release from superfused rat hypothalami: Influence of glucocorticoids. Endocrinol. 131: 677-683; 1992.
- Comroe J.H., VanLingen B., Stroud R.C. et Roncoroni A. Reflex and direct cardiopulmonary effects of 5-HO-tryptamine (serotonin). Am. J. Physiol. 173: 379-389; 1953.
- Corson M.A., Alexander R.W. et Berk B.C. 5-HT₂ receptor mRNA is overexpressed in cultured rat aortic smooth muscle cells relative to normal aorta. Am. J. Physiol. 262: Pt 1 C309-C315; 1992.
- Costall B., Naylor R.J. et Tyers M.B. The psychopharmacology of 5-HT₃ receptors. Pharmac. Ther. 47: 181-202; 1990.
- Cowen D.S., Molinoff P.B. et Manning D.R. 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated increase in receptor expression and activation of nuclear factor-κB in transfected Chinese hamster ovary cells. Mol. Pharmacol. 52: 221-226; 1997.
- Cowen D.S., Sowers R.S. et Manning D.R. Activation of a mitogen-activated protein kinase (ERK2) by the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor is sensitive not only to inhibitors

- of phosphatidylinositol 3-kinase, but to an inhibitor of phosphatidylcholine hydrolysis. J. Biol. Chem. 271: 22297-22300; 1996.
- Cosenza H. Detection of anti-idiotypic reactive cells in the response to phosphorylcholine. Eur. J. Immunol. 6:114-116; 1976.
- Craig D.A. et Clark D.E. Peristalsis evoked by 5-HT and renzapride: evidence for putative 5-HT₄ receptor activation. Br. J. Pharmacol. 102: 563-564; 1991.
- Crivellato E., Damiani D., Mallardi F. et Travan L. Suggestive evidence for a microanatomical relationship between mast cells and nerve fibres containing substance P, calcitonin gene related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and somatostatin in the rat mesentery. Acta Anat. 141: 127-131; 1991.
- Crofford L.J., Sano H. et Karalis K. Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. J. Clin. Invest. 90: 2555-2564; 1992.
- Cross R.J., Markesbery W.R., Brooks W.H. et Rozman T.L. Hypothalamic-immune interactions. I. The acute effects of anterior hypothalamic lesions on the immune response. Brain Res. 196: 79-86; 1980.
- Crowder R.J. et Freeman R.S. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. J. Neurosci. 18: 2933-2943; 1998.
- D'Amore P. et Shepro D. Captation of 5-hydroxytryptamine and effects on endothelial cell metabolism. In De Clerck F. et Vanhoutte P.M. 5-hydroxytryptamine in peripheral reactions. Raven Press, New York. p. 37-47; 1982.
- Davies P., Bonney R.J., Humes J.L. et Kuehl F.A.Jr. Macrophages responding to inflammatory stimuli synthesize increased amounts of prostaglandins. Agents Actions. 6: 143-149; 1979.
- Delhase M., Hayakawa M., Chen Y. et Karin M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. Science. 284: 309-313; 1999.
- De Lisi L.E., Ortaldo J.R., Malwish A.E. et Wyath R.J. Deficient natural killer activity and macrophage functioning in schizophrenic patients. J. neural Transmission. 58: 99-106; 1983.

- Della Rocca G.J., Mukhin Y.V., Garnovskaya M.N., Daaka Y., Clark G.J., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. et Raymond J.R. Serotonin 5-HT_{1A} receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. J. Biol. Chem. 274: 4749-4753; 1999.
- De Mello-Coelho V., Gagnerault M.C., Souberbielle J.C., Strasburger C.J., Savino W., Dardenne M. et Postel-Vinay M.C. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. Endocrinol. 139: 3837-3842; 1998.
- Denicoff K.D., Durkin T.M. et Lotze M.T. The neuroendocrine effects of interleukin-2 treatment. J. Clin. Endocrinol. Met. 69: 402-410; 1989.
- De Vitry F., Catelon J., Thibault J., Bourgoin S. et Hamon M. Serotonin as a growth factor for the differentiation of monoaminergic neurons. In Dahlström A., Belmaker R.H. et Sandler M. Progress in catecholamine research, basic aspect and peripheral mechanisms. Neurol. Neurobiol. 42A: 585-590; 1988.
- De Vivo M. et Maayani S. Characterisation of 5-hydroxytryptamine_{1A}-receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea-pig and rat hippocampal membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 238: 248-252; 1986.
- DiDonato J.A., Mercurio F., Rosette C., Wu-Li J., Suyang H., Ghosh S. et Karin M. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. Mol. Cell. Biol. 16: 1295-1304; 1996.
- Dobbs C.M., Feng N., Beck F.M. et Sheridan J.F. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection. Effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. J. Immunol. 157: 1870-1877; 1996.
- Dobrenis K., Makman M.H. et Stefano G.B. Occurrence of the opiate alkaloid-selective μ_3 receptor in mammalian microglia, astrocytes and kupffer cell. Brain Res. 686: 239-248; 1995.
- Dooley A.E., Pappas I.S. et Parnavelas J.G. Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro. Exp. Neurol. 148:205-214; 1997.
- Dumuis A., Bouhelal R., Sebben M. et Bockaert J. A 5-HT receptor in the central nervous system, positively coupled with adenylate cyclase, is antagonized by ICS 205930. Eur. J. Pharmacol. 146: 187-188; 1988.

- El Mestikawy S., Riad M., Laporte A.-M., Vergé D., Daval G., Gozlan H. et Hamon M. Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. Neurosci. Lett. 118: 189-192; 1990.
- Emerit M.B., El Mestikawy S., Gozlan H., Ranot B. and Hamon M. Physical evidence of the coupling of solubilized 5-HT_{1A} binding sites with G regulatory proteins. Biochem. Pharmacol. 39: 7-18; 1990.
- Epinat J.-C. et Gilmore T.D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/ NF- κ B signal transduction pathway. Oncogene. 18: 6896-6909; 1999.
- Essman W.B. Serotonin distribution in tissues and fluids. In: Serotonin in health and disease. Volume I: Availability, localization and disposition. Spectrum Publications, NewYork. p. 15-179; 1978.
- Fagni L., Dumius A., Sebben M. et Bockaert J. The 5-HT₄ receptor subtype inhibits K⁺ current in colliculi neurones via activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. Br. J. Pharmacol. 105: 973-979; 1992.
- Falke N.E., Fischer E.G. et Martin R. Stereospecific opiate binding in living human polymorphonuclear leukocytes. Cell Biol. Int. Reports. 9: 1041-1047; 1985.
- Farber H.W. et Beer D.J. Restricted secretion of a T-lymphocyte chemotactic cytokine by serotonin-stimulated cultures aortic endothelial cells. Circul. Res. 69: 257-265; 1991.
- Fargin A., Raymond J.R., Lohse M.J., Kobilka B.K., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. The genomic clone G-21 which resembles a b-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. Nature. 335: 358-360; 1988.
- Fargin A., Raymond J.R., Regan J.W., Cotecchia S., Lefkowitz R.J. et Caron M.G. Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. J. Biol. Chem. 264: 14848-14852; 1989.
- Felten D.L., Cohen N., Ader R., Felten S.Y., Carlson S.L. et Roszman T.L. Neurochemical links between the nervous and immune systems. In Ader R., Felten D.L. et Cohen N. Psychoneuroimmunology. Academic Press, San Diego. p. 1-26; 1991.
- Felten S.Y. et Felten D.L. Innervation of lymphoid tissue. In Ader R., Felten D.L. et Cohen N. Psychoneuroimmunology. Academic Press, San Diego. p. 27-70; 1991.

- Felten D.L., Felten S.Y., Bellinger D.L., Carlson S.L., Ackerman K.D., Madden K.S., Olschowski J.A. et Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: Structure and function. Immunol. Rev. 100: 225-260; 1987.
- Felten D.L., Felten S.Y., Carlson S.L., Olschowka J.A. et Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. J. Immunol. 135: 755s-765s; 1985.
- Felten S.Y., Housel J. et Felten D.L. Use of in vivo dialysis for evaluation of splenic norepinephrine and serotonin. Soc. Neurosci. (Abstr.). 12, 1065; 1986.
- Felten S.Y. et Olschowka J.A. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen. II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synaptic-like contacts on lymphocytes in the splenic white pulp. J. Neurosci. Res. 18: 37-48; 1987.
- Ferguson M.M. et McDonal F.G. Estrogen as an inhibitor of human NK cytotoxicity. FEBS Lett. 191: 145-148; 1985.
- Ferrari C., Bighen M., Paracchi A., Rampini P., Raiteri F., Benco R., Romussi M., Codecasa F., Mucci M. et Bianco M. Thyroid autoimmunity in hyperprolactinaemic disorders. Acta Endocrinol. 104: 35-41; 1983.
- Finco T.S. et Baldwin A.S. κ B site-dependent induction of gene expression by diverse inducers of nuclear factor κ B requires raf-1. J. Biol. Chem. 268: 17676-17679; 1993.
- Fink M.A. Anaphylaxis in the mouse: possible relation of the Schultz-Dale reaction to serotonin release. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92: 673; 1956.
- Finocchiaro L.M.E., Arzt E.S., Fernandez-Castelo S., Criscuolo M., Finkielman S. et Nahmod V.E. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. J. Interferon Res. 8: 705-715; 1988.
- Fiorentino D.F., Bond M.W. et Mosmann T.R. Two types of mouse T helper cells: T_H2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by T_H1 clones. J. Exp. Med. 170: 2081-2095; 1989.
- 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.D.W., Waikar M.V. et Clarke D.E. 5-HT₄ receptor agonism inhibits neuronally-mediated responses in monkey urinary bladder. 2nd international

- symposium on serotonin from cell biology to pharmacology and therapeutics. (Abst.). p. 53; 1992.
- Frank M.G., Johnson D.R., Hendricks S.E. et Frank J.L. Monocyte 5-HT_{1A} receptors mediate pindobind suppressio of natural killer cell activity. Modulation by catalase. Int. Immunopharmacol. 1: 247-253; 2001.
- Franzoso G., Carlson L., Poljak L., Shores E.W., Epstein S., Leonardi A., Grinberg A., Tran T., Scharton-Kersten T., Anver M., Love P., Brown K. et Siebenlist U. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. J. Exp. Med. 187: 147-159; 1998.
- Fuchs B.A., Albright J.W. et Albright J.F. Adrenergic receptors on murine lymphocytes: density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. Cell. Immunol. 114: 231-245; 1988.
- Fukata J., Usui T., Naitoh Y., Makai Y. et Imura H. Effect of recombinant human interleukin-1 alpha, -1 beta, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumor cell line AtT-20. Endocrinol. 122: 33-39; 1989.
- Gagnerault M.C., Touraine P., Savino W., Kelly P.A. et Dardenne M. Expression of prolactin receptors in immune lymphoid cells in normal and autoimmune situations. J. Immunol. 150: 5673-5681; 1993.
- Gaillard R.C. Interactions immunoendocriniennes au niveau hypothalamo-hypophysaire. Ann. Endocrinol. Paris. 59: 561-566; 1995.
- Gaillard R.C., Turnill D., Sappino P. et Muller A.F. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. Endocrinol. 127:101-106; 1990.
- Gala R.R. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. Life Sci. 46: 1407-1420; 1990.
- Gala R.R. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 198: 513-527; 1991.
- Gardier A.M., Kachaner S., Shaghghi E.K., Blot C., Bohuon C., Jacquot C. et Pallardy M.J. Effects of a primary immune response to T-cell dependent antigen on serotonin

- metabolism in frontal cortex. In vivo microdialysis study in freely moving Fischer 344 rat. Brain Res. 645: 150-156; 1994.
- Garnovskaya M.N., Mukhin Y. et Raymond J.R. Rapid activation of sodium-proton exchange and extracellular signal-regulated protein kinase in fibroblasts by G protein-coupled 5-HT_{1A} receptor involves distinct signalling cascades. Biochem. J. 330: 489-495; 1998.
- Garnovskaya M.N., van Biesen T., Hawe B., Casañas Ramos S., Lefkowitz R.J. et Raymond J.R. Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT_{1A} receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway. Biochemistry. 35: 13716-13722; 1996.
- Garzetti G.G., Ciavattini A., Provinciali M., Fabris N., Cignitti M. et Romanini C. Natural killer cell activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. Obst. Gynecol. 81: 665-668; 1993.
- Gatti G., Masera R. et Pallavicini L. Interplay in vitro between ACTH, b-endorphin and glucocorticoids in the modulation of spontaneous and lymphokine-inducible human natural killer (NK) activity. Brain Behav. immun. 7: 16-28; 1993.
- Gerald C., Adham N., Kao H.T., Schechter L.E., Olsen M.A., Bard J.A., Laz T.M., Vaysse P.J.J., Branchek T.A. et Weinshank R.L. The 5-HT₄ receptor: molecular cloning of two splice variants. In: third IUPHAR satellite symposium on serotonin, Abstracts. Chicago. p. 82; 1994.
- Gershon M.D. et Ross L.L. Studies on the relationship of 5-hydroxytryptamine and enterochromaffin cell to anaphylactic shock in mice. J. Exp. Med. 115: 367; 1961.
- Gershon R.K., Askenase P.W. et Gershon M.D. Requirement for vasoactive amines for production of delayed-type hypersensitivity skin reactions. J. Exp. Med. 142: 732-747; 1975.
- Gershwin M.E., Beach R. et Hurlley L.S. Nutrition and immunity. Academic Press, Orlando. 1985.
- Gilmore T.D. The Rel/ NF- κ B signal transduction pathway: introduction. Oncogene. 18: 6842-6844; 1999.
- Glaser R. et Kiecolt-Glaser J. Handbook of human stress and immunity. Academic Press. SanDiego. 1994

- Goodwin J.S. et Ceuppens J. Regulation of immune response by prostaglandins. J. Clin. Immunol. 3: 295-315; 1983.
- Goppelt-Struebe M. et 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.
- Gozlan H., Thibeault S., Laporte A.-M., Lima L. et Hamon M. The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-proteincoupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. Eur. J. Pharmacol. 288: 173-186; 1995.
- Gozlan H., El Mestikawy S., Pichat L., Glowinski J. et Hamon M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. Nature. 305: 140-142; 1983.
- Gray R.S., McCorkle F.M., Denno K.M. et Taylor R.L., Jr. Modulation of chicken plaque-forming cells by serotonin and dopamine. Poult. Sci. 70: 1521-1526; 1991.
- Guttridge D.C., Albanese C., Reuther J.Y., Pestell R.G. et Baldwin Jr A.S. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. Mol. Cell. Biol. 19: 5785-5799; 1999.
- Halko G. Serum prolactin levels and disease activity in RA. Arth. Rheum. 38: S289; 1995.
- Hamon M., Gozlan H., El Mestikawy S., Emerit M.B., Bolanos F. et Schechter L. The central 5-HT receptors: Pharmacological, biochemical, functional and regulatory properties. Ann. NY. Acad. Sci. 600: 114-131; 1990.
- Heagy W., Laurence M., Cohen E. et finberg R. Neurohormones regulate T-cell function. J. Exp. Med. 171: 1625; 1990.
- Hellstrand K., Czirkinski C., Ricksten A., Jansson B., Asea A., Kylefjord H. et Hermodsson S. Role of serotonin in the regulation of interferon-gamma production by human natural killer cells. J. Interferon Res. 13: 33-38; 1993.
- Hellstrand K. et Hermodsson S. Role of Serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. J. Immunol. 139: 869-875; 1987.
- Hellstrand K. et 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. et Hermodsson S. Enhancement of human natural killer cell cytotoxicity by serotonin: role of non-T/CD16+ NK cells, accessory monocytes, and 5-HT_{1A} receptors. Cell. Immunol. 127: 199-214; 1990.
- Hellstrand K. et Hellstrand S. Monocyte-mediated suppression of IL-2-induced NK-cell activation. Scand. J. Immunol. 32: 183-192; 1990.
- Henriksen O. et Frey J.R. Control of the expression of IL-2 activity. Cell. Immunol. 73: 106-110; 1982.
- Hinze-Selch D., Deuschle M., Weber B., Heuser I. et Pollmächer T. Effect of coadministration of clozapine and fluvoxamine versus clozapine monotherapy on blood cell counts, plasma levels of cytokines and body weight. Psychopharmacol. 149: 163-169; 2000.
- Hofmann B., Nishanian P., Nguyen T., Liu M. et Fahey J.L. Restoration of T cell function in HIV infection by reduction of intracellular cAMP levels with adenosine analogues. AIDS. 7: 659-664; 1993.
- Hofmann B., Afzelius P., Iverson J., Kroborg G., Aabech P., Benfield T., Dybkjaer E. et Nielsen J.O. Buspirone, a serotonin receptor agonist, increases CD4 T-cell counts and modulates the immune system in HIV-seropositive subjects. AIDS. 10: 1339-1347; 1996.
- Hoffman B.J. et Mezey E. Distribution of serotonin 5-HT_{1C} receptor mRNA in adult rat brain. FEBS Lett. 247: 453-462; 1989.
- Hoffman-Goetz L. et Pedersen B.K. Exercise and the immune system: a model of stress response? Immunol. Today. 15: 382-387; 1994.
- Hosoi J., Murphy G.F., Egan C.L., Lerner E.A., Grabbe S., Asahina A. et Granstein R.D. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. Nature. 363: 159-163; 1993.
- Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig R.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R. et Humphrey P.P.A. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). Pharmacol. Rev. 46: 157-203; 1994.
- Hoyer D. et Martin G.R. 5-HT receptors classification and nomenclature: towards a harmonization with human genome. Neuropharmacol. 36: 419-428; 1997.

- Hoyer D., Pazos A., Probst A. et Palacios J.M. Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1D} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. Brain Res. 376: 85-96; 1986.
- Hsu H., Xiong J. et Goeddel D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cells death and NF- κ B activation. Cell. 81: 495-504; 1995.
- Hsu H., Shu H., Pan M.G. et Goeddel D.V.. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathway. Cell. 84: 299-308; 1996a
- Hsu H., Huang J., Shu H.B., Baichwal V. et Goeddel D.V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. Immunity. 4: 387-396; 1996b.
- Huether G., Fettkötter I., Keilhoff G. et 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.
- Ignatowski T.A. et Spengler R.N. Regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor production by modification of adrenergic receptor sensitivity. J. Neuroimmunol. 61: 61-70; 1995.
- Iken K., Chheng S., Fargin A., Goulet A.C. et Kouassi E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. Cell. Immunol. 163: 1-9; 1995.
- Iken K., et Kouassi E. Relationship between antioxidant and promotion of B cell proliferation by serotonin and catecholamines. Life Science. Soumis.
- Inoue K. et Creveling C.R. The macrophage as a site of extraneuronal uptake and O-methylation of norepinephrine. Biog. Amines. 9: 291-294; 1993.
- Jackson J.C., Cross R.J., Walker R.F., Markesbery W.R., Brooks W.H. et Roszman T.L. Influence of serotonin on the immune response. Immunology. 54: 505-512; 1985.
- Jacobson J.D., Nisula B.C. et Steinberg A.D. Modulation of the expression of murine lupus by gonadotropin-releasing hormone analogs. Endocrinol. 134: 2516; 1994.
- Jakob R. et Krieglstein J. Influence of flupirtine on a G-protein coupled inwardly rectifying potassium current in hippocampal neurones. Br. J. Pharmacol. 122: 1333-1338; 1997.

- Jankovic B.D., Jovanova-Nesic K. et Nikolic V. Locus ceruleus and immunity. III. Compromised immune function (antibody production, hypersensitivity skin reaction and experimental allergic encephalomyelitis) in rats with lesioned locus ceruleus is restored by magnetic field applied to the brain. Int. J. Neurosci. 69: 251-269; 1993.
- Jara L.J., Lavallo C., Fraga A., Gómez-Sánchez C., Silveira L.H., Martínez-Osuna P., Germain B.F. et Espinoza LR. Prolactin, immunoregulation, and autoimmune diseases. Semin. Arthritis. Rheum. 20 273-284; 1991.
- Jetschmann J.-U., Benschop R.J., Jacobs R., Oberbeck R., Schmidt R.E., Schedlowski M. Expression and in-vivo modulation of α - and β -adrenoceptors on human natural killer (CD16+) cell. J. of Neuroimmunol. 74: 159-164; 1997.
- Johnson H.M., Torres B.A., Smith E.M., Dion L.D. et Blalock J.E. Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin. J. Immunol. 132: 246; 1984.
- Julius D., MacDermot A.B., Axel R. et Jessel T.M. Molecular characterisation of functional cDNA encoding the serotonin_{1C} receptor. Science. 214: 558-564; 1988.
- Kalra P.S., Sahu A. et Kalra S.P. Interleukin-1 inhibits the ovary steroid induced luteinizing hormone surge and release of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in rats. Endocrinol. 126: 2145-2152; 1990.
- Karin M. The NF- κ B activation pathways: Its regulation and role in inflammation and cell survival. Cancer J. 4: S92-S99; 1998.
- Karin M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. Oncogene. 18:6867-6874; 1999.
- Katz M.F., Farber H.W., Dodds-Stitt Z., Cruikshank W.W. et Beer D.J. Serotonin-stimulated aortic endothelial cells secrete a novel T lymphocyte chemotactic and growth factor. J. Leukoc. Biol. 55: 567-573; 1994.
- Kehrer P., Turnill D., Dayer J.M., Muller A.F. et Gaillard R.C. Human recombinant interleukin-1 beta and alpha, but not recombinant tumor necrosis factor alpha stimulate ACTH release from rat anterior pituitary cells in vitro in a prostaglandin E2 and cAMP independent manner. Neuroendocrinol. 48: 160-166; 1988.
- Khan N.A. et Poisson J.P. 5-HT₃ receptor-channels coupled with Na⁺ influx in human T cells: role in T cell activation. J. Neuroimmunol. 99: 53-60; 1999.

- Kilpatrick G.J., Barnes N.M., Cheng C.H.K., Costall B., Naylor R.J. et Tyers M.B. The pharmacological characterization of 5-HT₃ receptor binding sites in rabbit ileum: comparison with those in rat ileum and brain. Neurochem. Int. 19: 389-396; 1991.
- Kilpatrick G.J., Jones B.J. et Tyers M.B. Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. Nature. 330: 746-748; 1987.
- Kilpatrick G.J., Jones B.J. et Tyers M.B. Binding of the 5-HT₃ ligand, [3H] GR65630, to rat area postrema, vagus nerve and the brains of several species. Eur. J. Pharmacol. 159: 157-164; 1989.
- Kobilka B.K., Frielle T., Collins S., Yang-Feng T., Kobilka T.S., Francke U., Lefkowitz R.J. et 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.
- Koenig J.I. Presence of cytokines in the hypothalamic-pituitary axis. Prog. Neuroendocrinol. Immunol. 4: 143-153; 1991.
- Kontgen F., Grumont R.J., Strasser A., Metcalf D., Li R., Tarlinton D. et Gerondakis S. Mice lacking the c-rel proto-oncogen exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. Gen. Dev. 9: 1965-1977; 1995.
- Kouassi E., Li Y.S., Boukhris W., Millet I. et Revillard J.P. Opposite effects of the catecholamines dopamine and norepinephrine on murine polyclonal B-cell activation. Immunopharmacol. 16: 125; 1988.
- Krawietz W.K., Werdan K., Schober M., Erdmann E., Rindfleisch G.E. et Hannig K. Different numbers of β receptors in human lymphocytes subpopulations. Biochem. Pharmacol. 31: 133-136; 1982.
- Kumar A., Haque J., Lacoste J., Hiscott J. et Williams B. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- κ B by phosphorylating I κ B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 6228-6292; 1994.
- Kundig T.M., Schorle H., Bachmann M.F., Hengartner H., Zinkernagel R.M. et Horak I. Immune responses in interleukin-2 deficient mice. Science. 262: 1059-1061; 1993.
- Kunkel S.L., Scales W.E., Strieter R.M., Chensue S.W., Spengler R.N. et Renick D.G. Modulation of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 gene expression. In: Otterness, I. The therapeutic control of inflammatory disease. Elsevier, New York; 1988.

- Kursar J.D., Nielson D.L., Wainscott D.B., Cohen M.L. et Baez M. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterisation of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine_{2F}) from rat stomach fundus. Mol. Pharmacol. 42: 549-557; 1992.
- Kut J.L., Young M.R.I., Crayton J.W., Wright M.A. et Young M.E. Regulation of murine T-lymphocyte function by spleen cell-derived and exogenous serotonin. Immunopharmacol. and Immunotoxicol. 14: 783-796; 1992.
- Laberge S., Cruikshank W.W., Beer D.J. et Center D.M. Secretion of IL-16 (lymphocyte Chemoattractant Factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. J. Immunol. 156: 310-315; 1996.
- LaCasse E.C., Baird S., Korneluk R.G. et MacKenzie A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene. 17: 3247-3259; 1998.
- Lauder J.M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a development signal. Ann. NY. Acad. Sci. 600: 297-313; 1990.
- Lauder J.M. et Krebs H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. Dev. Neurosc. 1: 15-30; 1978.
- Lawrence D.P.M., El-Hamouly W., Archer S., Leary J.F. et Bidlack J.M. Identification of κ -opioid receptors in the immune system by indirect immunofluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 1062-1066; 1995.
- Le P.T., Lazorich S., Whichard L.P., Yang Y.C., Clarck S.C., Haynes B.F. et Singer K.H. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte CSF and leukemia inhibitory factor. J. Immunol. 145: 3310-3315; 1990.
- Lee H.H., Dadgostar H., Cheng Q., Shu J. et Cheng G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 9136-9141; 1999.
- Lee K.Y., Chang W.-T., Qiu D., Kao P.N. et Rosen G.D. PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor-alpha to induce apoptosis in tumor cells.. J. Biol. Chem. 274: 13451-13455; 1999.
- Lefebvre H., Contesse V., Delarve C., Fevilloley M., Hery F., Grise P., Raynaud G., Verhofstad A.A.J., Wolfe L.M. et Vaudry H. Serotonin-induced stimulation of cortisol

- secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin-4 receptor subtype. Neurosci. 47: 999-1007; 1992.
- Li N. et Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?. FASEB J. 13: 1137-1143; 1999.
- Li S. et Sedivy J. Raf-1 protein kinase activates the NF- κ B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF- κ B-I κ B complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 9247-9251; 1993.
- Li X.C., Roy-Chaudhury P., Hancock W.W. et coll., IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection. J. Immunol. 161: 890-896; 1998.
- Lin Y.-Z., Yao S.Y., Veach R.A., Torgerson T.S. et Hawiger J. Inhibitor of nuclear transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. J. Biol. Chem. 270: 14255-14258; 1995.
- Linthorst A.C.E., Flachskamm C., Müller-Preuss P., Holsboer F. et Reul J.M.H.M. Effects of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. J. Neurosci. 15: 2920-2934; 1995.
- Liu J.P. et Lauder J.M. Serotonin and nialamide differentially regulate survival and growth of cultured serotonin and catecholamine neurons. Brain Res. 62: 297-305; 1991.
- Liu Y. et Wolfe Jr. S.A. Haloperidol and spiperone potentiate murine splenic B cell proliferation. Immunopharmacol. 34: 147-159; 1996.
- Lolait S.J., Lim A.T.W., Toh B.H. et Funder J.W. Immunoreactive endorphin in a subpopulation of mouse spleen macrophages. J. Clin. Invest. 73: 277-280; 1984.
- Loric S., Launay J.M., Colas J.F. et Maroteaux L. New mouse 5-HT₂-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. FEBS Lett. 312: 203-207; 1992.
- Los G., De Weger R.A., Van den Berg D.T., Sakkers R. et Den Otter W. Macrophage infiltration in tumors and tumor-surrounding tissue: influence of serotonin and sensitized lymphocytes. Cancer Immunol. Immunother. 26: 145-152; 1988.

- Lovenberg T.W., Baron B.M., De Lecea L., Miller J.D., Prosser R.A., Rea M.A., Foye P.E., Racke M., Slone A.L., Siegel B.W., Danielson P.E., Sutcliffe J.G. et Erlander M.G. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. Neuron. 11: 449-458; 1993.
- Madden K.S., Sanders V.M. et Felten D.L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35: 417-448; 1995.
- Maestroni G.J.M., Conti A. et Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effects of corticosterone. J. Neuroimmunol. 13: 19-30; 1986.
- Maier C.C., Marchetti B., LeBoeuf R.D. et Blalock J.E. Thymocytes express a mRNA that is identical to hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone mRNA. Cell. Mol. Neurobiol. 12: 447; 1992.
- Malinin N.L., Boldin M.P., Kovalenko A.V. et coll., MAP3K-related kinase involved in NF-kappa B induction by TNF, CD95 and IL-1. Nature. 385: 540-544; 1997.
- Marchetti B., Guarcello V., Morale M.C., Bartoloni G., Farinella Z., Cordaro S. et Scapagnini U. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) binding sites in the rat thymus: Characteristic and biological function. Endocrinol. 125: 1025; 1989.
- Marchetti B., Guarcello V., Morale M.C., Bartoloni G., Raiti F., Palumbo Jr. G., Farinella Z., Cordaro S. et Scapagnini U. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist reversion of age associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity. Endocrinol. 125: 1037; 1989.
- Marchetti B., Morale M.C. et Pelletier G. The thymus gland as a major target for the central nervous system and the neuroendocrine system: Neuroendocrine modulation of thymic beta₂-adrenergic receptor distribution as revealed by in vitro autoradiography. Mol. Cell. Neurosci. 1: 10; 1990.
- Marcondes S., Lafay M., Brohard-Bohn B., De Nucci G. et Rendu F. Platelets induce human umbilical vein endothelial cell proliferation through P-selectin. Life Sci. 66: 1817-1826; 2000.

- Maricq A.V., Peterson A.S., Brake A.J., Myers R.M. et Julius D. Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. Science. 254: 432-437; 1991.
- Maroteaux K., Saudou F., Amlaiky N., Boschert U., Plassat J.L. et Hen R. The mouse 5-HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression and localisation in motor contrôle centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 3020-3024; 1992.
- Martilla R.J., Eskola J., Paivarinta M. et Renne U.K. Immune functions in parkinson's disease. Adv. Neurol. 40 : 315-323; 1984.
- Masek K., Petrovicky P. et Seifert J. An introduction to the possible role of central nervous system structures in neuroendocrine-immune systems interaction. Int. J. immunopharmacol. 14: 317-322; 1992.
- Matsuda H., Ushio H., Paliwal V., Ptak W. et Askenase P. W. Adoptive cell transfer of contact sensitivity-initiation mediated by nonimmune cells sensitized with monoclonal IgE antibodies. Dependence on host skin mast cells. J. Immunol. 154: 5080-5092; 1995.
- McAllister G., Charlesworth A., Snodin C., Beer M.S., Noble A.J., Middlemiss D.N., Iversen L.L., et Whiting P. Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5-HT_{1E}): a fifth 5-HT₁-like subtype. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 5517-5521; 1992.
- McCann S.M., Lyson K., Karath S., Gimeno M., Belova N., Kamat A. et Rettori V. Role of cytokines in the endocrine system. Ann. NY. Acad. Sci. 741: 50-63; 1994.
- McGills J.P., Humphreys S. et Reid S. Characterization of functional calcitonin gene-related peptide receptors on rat lymphocytes. J. Immunol. 147: 3482-2489; 1991.
- Meijer O.C., Dallman M.F. et Pearce D. NF-kB (p65) and NGF1-C stimulate reporter activity that is controlled by the rat 5-HT_{1A} receptor promoter. Soc. Neurosci. (Abst. 308.3). 24: 772; 1998.
- Meijer O.C. et Kloet E.R. Corticosterone suppresses the expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA in rat dentate gyrus. Eur. J. Pharmacol. 266: 255-261; 1994.
- Miller B. δ -opioid receptor expression is induced by concanavalin A in CD4+ T cells. J. Immunol. 157: 5324; 1996.

- Monsma F.J., Jr., Shen Y., Ward R.P., Hamblin M.W. et Sibley D.R. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. Mol. Pharmacol. 43: 320-327; 1993.
- Montgomery D.W., Shen G.K., Ulrich E.D., Steiner L.L., Parrish P.R. et Zukoski C.F. Human thymocytes express prolactin-like mRNA and synthesise bioactive prolactin-like proteins. Endocrinol. 131: 3019-3026. 1992.
- Morale M.C., Batticane N., Bartoloni G., Guarcello V., Farinella Z., Galasso M.G. et Marchetti B. Blockade of centrale and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of cell-mediated and humoral immune responses. Endocrinol. 128: 1073-1085; 1991.
- Mörch H. et Pedersen B.K. β -endorphin and the immune system-Possible role in autoimmune diseases. Autoimmunity. 21:161-171; 1995.
- Moreno J., Vicente A., Heijen I. et Zapata A.G. Prolactin and early T-cell development in embryonic chicken. Immunol. Today. 15: 524-526; 1994.
- Mössner R., Heils A., Stöber G., Okladnova O., Daniel S. et Lesch K.P. Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. Neurochem. Int. 33: 251-254; 1998.
- Mössner R. et Lesch K.-P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. Brain Behav. Immun. 12: 249-271; 1998.
- Murphy W.J., Durum S.K. et Longo D.L. Role of neuroendocrine hormones in murine T cell development. Growth hormone exerts thymopoietic effects in vivo. J. Immunol. 149: 3851-3857; 1992.
- Naitoh Y., Fukata J. et Tominaga T. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155: 1459-1463; 1988.
- Navarra P., Tsagarakis S., Faria M.S., Rees L.H., Besser G.M. et Grossman A.B. Interleukin-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. Endocrinol. 128: 37-44; 1990.

- Neidhart M. The serum levels of IL-1 β , LH and prolactin correlate with the expression of CD45 isoforms of CD4+ve peripheral blood T lymphocytes in healthy women. Ann. hematol. 75: 155-160; 1997.
- Newson B., Ahlman H., Dahlström A., Das Gupta T.K. et Nyhus L.M. On the innervation of the ileal mucosa in the rat - a synapse. Acta Physiol. Scand. 105: 387-389; 1979.
- Nong Y.H., Titus R.G., Ribeiro J.M. et Renold H.G. Peptides encoded by calcitonin gene inhibit macrophage function. J. Immunol. 143: 45-49; 1989.
- Nunez G., Benedict M.A., hu Y. et Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. Oncogene. 17: 3237-3245; 1998.
- Ou X.M., Jafar-Nejad H., Storing J.M., Meng J.H., Lemonde S. et Albert P.R. Novel dual repressor elements for neuronal cell-specific transcription of the rat 5-HT_{1A} receptor gene. J. Biol. Chem. 275: 8161-8168; 2000.
- Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M. et Donner D.B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature. 401: 82-85; 1999.
- Paegelow I., Werner H., Hagen M., Wartner U et Lange P. Influence of serotonin on lymphokine secretion in vitro. Int. J. Immunopharmacol. 7: 889-896; 1985.
- Pahl H.L., Krauss B., Schulze-Osthoff K., Decker T., Traenckner E.B., Vogt M., Myers C., Warring P., Mulbacher A., Czernilofsky A.P. et Baeuerle P.A. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. J. Exp. Med. 183: 1829-1840; 1996.
- Pahl H.L. Activators and target genes of Rel/ NF- κ B transcription factors. Oncogene. 18: 6853-6866; 1999.
- Pakala R. et Benedict C.R. Effect of serotonin and thromboxane A₂ on endothelial cell proliferation: effect of specific receptor antagonists. J. Lab. Clin. Med. 131: 527-537; 1998.
- Pakala R. et Benedict C.R. Synergy between thrombin and serotonin in inducing vascular smooth muscle cell proliferation. J. Lab. Clin. Med. 134: 659-667; 1999.

- Palombella V.J., Rando A.L., Goldberg A.L. et Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. Cell. 78: 773-785; 1994.
- Pastores S.M., Haskò G., Vizi E.S. et Kvetan V. Cytokine production and its manipulation by vasoactive drugs. New Horizon. 4: 252-264; 1996.
- Pazos A., Cortes R. et Palacios J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res. 346: 231-249; 1985.
- Pazos A., Probst A. et Palacios J.M. Serotonin receptors in the human brain. III. autoradiographic mapping of serotonin-1 receptor. Neurosci. 21: 97-122; 1987.
- Pennington N.J. et Kelley J.S. Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron. Neuron. 4: 751-758; 1990.
- Perkins N.D., Felzien L.K., Betts J.C., Leung K., Beach D.H. et Nabel G.J. Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. Science. 275: 523-527; 1997.
- Peters J.A., Malone H.M. et Lambert J.J. Characterisation of 5-HT₃ receptor-mediated electrical responses in nodose ganglion neurones and clonal neuroblastoma cells maintained in culture. In: Serotonin: molecular biology, receptors and functional effects. Fozard J.R. et Saxena P.R. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 84-94; 1991.
- Pinerai A. Endorphins and immunity. National Symposium on Clinical Neuroimmunomodulation. Monza. Abst. , p. 9; 1991.
- Plassat J.L., Boschert U., Amlaiki N. et Hen R. The mouse 5-HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity with the 5-HT_{1D} receptor family. EMBO J. 11: 4779-4786; 1992.
- Pompeiano M., Palacios J.M. et Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in rat brain: correlation with receptor binding. J. Neurosci. 12: 440-453; 1992.
- Postel-Vinay M.C., De Mello-Coelho V., Gagnerault M.C. et Dardeaux M. Growth hormone stimulate the proliferation of activated mouse T lymphocytes. Endocrinol. 138: 1816-1820; 1997.

- Pramod R.S. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. Pharmacol. therapy. 66: 339-368; 1995.
- Prehn J.H.M., Welsch M., Backhauf C., Nuglisch J., Ausmeier F., Karkoutly C. et Krieglstein J. Effects of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. Brain Res. 630: 110-120; 1993.
- Pritchett D.B., Bach A.W.J., Wozny M., Taleb O., Dal Taso R., Shih J.C. et Seeburg P.H. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5-HT₂ receptor. EMBO J. 7: 4135-4140; 1988.
- Prohaska J.R. et Lukasewycz O.A. Copper deficiency suppresses the immune responses of mice. Science. 213: 559-561; 1981.
- Provinciale M., DiStefano G. et Fabris N. Improvement in the proliferative capacity and natural killer cell activity of murine spleen lymphocytes by thyrotropin. Int. J. Immunopharmacol. 5: 865-870; 1992.
- Provinciali M. et Fabris N. Modulation of lymphoid cell sensitivity to interferon thyroid hormones. J. Endocrinol. Invest. 13: 187-191; 1990.
- Ptak W., Geba G.P. et Askenase P.W. Initiation of delayed-type hypersensitivity by low doses of monoclonal IgE antibody. Mediation by serotonin and inhibition by histamine. J. Immunol. 146: 3929-3936; 1991.
- Quadid H., Sequin J., Dumuis A., Bockaert J. et Nargeot J. Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. Mol. Pharmacol. 41: 346-351; 1992.
- Radulovic M., Dautzenberg F.M., Sydow S., Radulovic J. et Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptor 1 in mouse spleen: Expression after immune stimulation and identification of receptor-bearing cells. J. Immunol. 162: 3013-3021; 1999.
- Radwanska E., Henig I. et Dnowski W.P. Nocturnal prolactin levels in infertile women with endometriosis. J. Rep. Med. 32: 605-608; 1987.
- Ray A. et Prefontaine K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 752-756; 1994.
- Rayet B. et Gelinas C. Aberrant rel/ nfb genes and activity in human cancer. Oncogene. 18: 6938-6947; 1999.

- Reinhold D. et Ansorge S. Immunobiology of zinc and zinc therapy. Immunol. Today. 20: 102; 1999.
- Riad M., El Mestikawy S., Vergé D., Gozlan H. et Hamon M. Visualization and quantification of central 5-HT receptors with specific antibodies. Neurochem. Int. 19: 413-423; 1991.
- Rivest S., Torres G. et Rivier C. Differential effects of central and peripheral injection of interleukin-1 β on brain c-fos expression and neuroendocrine functions. Brain Res. 587: 13-23; 1992.
- Rohn W.M. et Weigent D.A. Cloning and nucleotide sequencing of rat lymphocyte growth hormone cDNA. Neuroimmunomodulation. 2: 104-108; 1995.
- Romashkova J.A. et Makarov S.S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. Nature. 401: 86-90; 1999.
- Roszman T.L., Jackson J.C., Cross R.J., Titus M.J., Markesbery W.R. et Brooks W.H. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. J. Immunol. 135: 769s-772s; 1985.
- Roszman T.L., Sparks D.L. Slevin J.T., Markesbery W.R., Jackson J.C. et cross R.J. The presence of serotonin receptors on murines lymphocytes and macrophages (Abstr.). Soc. Neurosci. 10: 726; 1984.
- Rothwarf D.M., Zandi E., Natoli G. et Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. Nature. 395: 297-300; 1998.
- Ruat M., Traiffort E., Arrang J.M., Tardivel-Lacombe J., Diaz J., Leurs R. et Schwartz J.C. A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor-molecular cloning, localisation and stimulation of cAMP accumulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 268-276; 1993a.
- Ruat M., Traiffort E., Leurs R., Tardivel-Lacombe J., Diaz J., Arrang J.M. et Schwartz J.C. Molecular cloning, characterisation and localisation of a high affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 8547-8551; 1993b.
- Rudland P.S. et Jimenez de Asua L. Action of growth factors in the cell cycle. Biochem. Biophys. Acta. 56: 91-133; 1979.

- Rupalla K., Jakob R. et Krieglstein J. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on the glutamate-induced rise in cytosolic calcium concentration as well as on calcium and potassium currents in hippocampal neurons. In J. Krieglstein, H. Oberpichler-Schwenk. Pharmacology of cerebral ischemia. Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart. p. 89-94; 1994.
- Russell D.H., Kibler R., Matrisian L., Larson D.F., Poulos B. et Magun B.E. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporine. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: Antagonism of prolactin binding by cyclosporin. J. Immunol. 134: 3027-3031; 1985.
- Sapolsky R., River C., Yamamoto G., Plotsky P. et Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin releasing factor. Science. 238: 522-524; 1987.
- Savino W., Wolff B., Aratan-Spire S. et Dardenne M. Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels in vivo can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. Clin. Exp. Immunol. 55: 629-635; 1984.
- Saxena P.R. et Villalòn C.M. 5-hydroxytryptamine: a chameleon in the heart. Trends Pharmacol. sci. 12: 223-227; 1991.
- Scheinman R.I., Cogswell P.C., Lofquist A.K. et Baldwin Jr A.S. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science. 270: 283-286; 1995.
- Schettini G. Interleukin 1 in the neuroendocrine system: From gene to function. Prog. Neuroendocrinoimmunol. 3: 157-166; 1990.
- Schoeffter P. et Hoyer D. 5-hydroxytryptamine (5-HT) induced endothelium-dependent relaxation of pig coronary arteries is mediated by 5-HT receptors similar to the 5-HT_{1D} receptor subtype. J. Pharmacol. Exp. Ther. 252: 387-395; 1990.
- Schreck R., Rieber P. et Baeuerle P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. EMBO J. 10: 2247-2258, 1991.
- Schreck R., Meier B., Mannel D.N., Droge W. et Baeuerle P.A. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. J. Exp. Med. 175: 1181-1194; 1992.

- Schulze-Osthoff K., Los M. et Baeuerle P.A. Redox signaling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in lymphocytes. Biochem. Pharmacol. 50: 735-741; 1995.
- Seaman W.E., Merigan T.C. et Talal N. Natural killing in estrogen-treatment mice responds poorly to poly:IC despite normal stimulation of circulating interferon. J. Immunol. 123: 2903-2905; 1979.
- Seaton T.A., Cooper J.M. et Schapira A.H.V. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. Brain Res. 777: 110-118.
- Sedqi M., Roy S., Ramakrishnan S. et Loh H.H. Expression cloning of a full-length cDNA encoding delta opioid receptor from mouse thymocytes. J. neuroimmunol. 65: 167; 1996.
- Sei Y., Vitkovic L. Yokoyama M.M. Cytokines in the central nervous system: Regulatory roles in neuronal function, cell death and repair. Neuroimmunomodulation. 2: 121-133; 1995.
- Sen C.K., Roy S. et Packer L. FASEB Lett. 85: 58-62; 1996.
- Sen J., Vankataraman L., Shinkai Y., Pierce J., Alt F., Burakoff S. et Sen R. Expression and induction of NF- κ B-related proteins in thymocytes. J. Immunol. 154: 3213-3121; 1995.
- Sha W.C. Regulation of immune response by NF- κ B/Rel transcription factors. J. Exp. Med. 187: 143-146; 1998.
- Shaw G. et Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell. 46: 659; 1986.
- Shenker A., Maayani S., Weinstein H. et Green J.P. Enhanced serotonin-stimulated adenylate cyclase activity in membranes from adult guinea-pig hippocampus. Life Sci. 32: 2335-2342; 1983.
- Shimizu N., Hori T. et Nakane H. An interleukin-1 β -induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: an in vivo microdialysis study in conscious rats. Brain Behav. Immun. 7: 14-23; 1994.
- Shipp M.A., Stefano G.B., Switzer S.N., Griffin J.D. et Reinherz E. CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced

- changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. Blood. 78: 1834; 1991.
- Shirakawa F. et Mizel S.B. In vitro activation and nuclear translocation of NF- κ B catalysed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Mol. Cell. Biol. 9: 2424-2430; 1989.
- Shumilla J.A., Wetterhahn K.E. et Barckowski A. Inhibition of NF-kappa B binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. Arch. Biochem. Biophys. 349: 356-362; 1998.
- Siebenlist U., Franzoso G. et Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. Ann. Rev. Cell. Biol. 10: 495-455; 1994.
- Singh V.K. et Fudenberg H.H. Binding of [¹²⁵I] corticotropin releasing factor to blood immunocytes and its reduction in alzheimer's disease. Immunol. Lett. 18: 5-8; 1988.
- Smith E.M. et Blalock J.E. Human lymphocyte production of ACTH and endorphin-like substances: Association with leukocyte interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 7530-7534; 1981.
- Smith E.M., Morrill A.C., Meyer W.J. et Blalock J.E. Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins. Nature. 321: 881-882; 1986.
- Smith E.M., Brosman P., Meyer W.J. et Blalock J.E. A corticotropin receptor on human mononuclear lymphocytes: Correlation with adrenal ACTH receptor activity. N. Engl. J. Med. 317: 1266-1269; 1987.
- Snapper C.M., Zelazowski P., Rosas F.R., Kehry M.R., Tian M., Baltimore D. et Sha W.C. B cells from p50/ NF- κ B knock out mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class-switching. J. Immunol. 156: 183-191; 1996.
- Standaert F.E., Chew B.P., De Avila D. et Reeves J.J. Presence of Luteinizing hormone-releasing hormone binding sites in cultured porcine lymphocytes. Biol. Reprod. 46: 997; 1992.
- Stefano G.B., Melchiorri P., Negri L., Hughes T.K.J. et Scharrer B. (D-ala²)-Deltorphin I binding and pharmacological evidence for a special subtype of delta opioid receptor on human and invertebrate immune cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 9316; 1992.

- Stefulj J., Jernej B., Cicin-Sain L., Rinner I. et Schauenstein K. mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. Brain Behav. Immun. 14: 219-224; 2000.
- Stein-Streilein J., Zakarija M., Papic M. et McKenzie J.M. Hyperthyroxinemic mice have reduced natural killer cell activity. Evidence for a defective trigger mechanism. J. Immunol. 139: 2502-2507; 1987.
- Stephanou A., Jessop D.S., Knight R.A. et Lightman S.L. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. Brain Behav. immun. 4: 67-73; 1990.
- Sternberg E.M., Wedner H.J., Leung M.K. et 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.
- Sternberg E.M., Trial J. et Parker C.W. Effect of on murine macrophages: suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists. J. Immunol. 137: 276-282; 1986.
- Storring J.M., Charest A., Cheng P. et Albert P.R. TATA-driven transcriptional initiation and regulation of the rat 5-HT_{1A} receptor gene. J. Neurochem. 72: 2238-2247; 1999.
- Straub R.H., Zeuner M., Lock G., Schölmerich J. et Lang B. High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulphate levels in the serum in patients with severe multiple sclerosis. Br. J. Rheumatol. 36: 426-432; 1997.
- Sundar S.K., Cierpal M.A., Kilts C., Ritchie J.C. et Weiss J.M. Brain IL-1-induced immunosuppression occurs through activation of both pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor. J. Neurosci. 10: 3701-3706; 1990.
- Szabo I., Rojavin M., Bussièrè J.L., Eisenstein T.K., Adler M.W. et Rogers T.J. Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of candida albicans by opioids. J. pharmacol. Exp. Ther. 267: 703; 1993.
- Take S., Mori T., Katafuchi T. et Hori T. Central interferon- α inhibits natural killer cytotoxicity through sympathetic innervation. Am. J. Physiol. 265 (Regulatory, Integrative and Comprehensive Physiology. 34): R453-R459; 1993.

- Thomas P.T., Bhargava H.N. et House R.V. Immunomodulatory effects of in vitro exposure to morphine and its metabolites. Pharmacol. 50: 51. 1995a.
- Thomas P.T., House R.V. et Bhargava H.N. Direct cellular immunomodulation produced by diacetylmorphine (heroin) or methadone. General Pharmacol. 26: 123; 1995b.
- Timsit J., Savino W., Safieh B. et coll., Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cell. J. Clin. Endocrinol. Met. 75: 183-188; 1992.
- Tominaga T., Fukata J. et Naitoh Y. Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. Endocrinol. 128: 526-531; 1991.
- Tong-Starksen S.E., Lukiw P.A. et Peterlin B.M. Signaling through T-lymphocyte surface proteins, TcR/CD3 and CD28, activates the HIV-1 long terminal repeat. J. Immunol. 42: 702-707; 1989.
- Törk I. Anatomy of the serotonergic system. Ann. NY. Acad. Sci. 600: 9-35; 1990.
- Travaglini P., DeMin C., Mocchegiani E., Re E., Colombo P. et Fabris N. Thymulin and zinc circulating levels in hypercortisolemic patients: Preliminary observations. J. Endocrinol. Invest. 15: 187; 1992.
- Trump B.F. et Berezsky I.K. Calcium-mediated cell injury and cell death. FASEB J. 9: 219-228; 1995.
- Udenfriend S., Clark C.T. et Titus E. 5-hydroxytryptophan decarboxylase: a new route of metabolism of tryptophan. J. Am. Chem. Soc. 75: 501-502; 1953.
- Udenfriend S. et Weissbach H. Studies on serotonin (5-hydroxytryptamine) in platelets. Fed. Proc. 13: 412; 1954.
- Udenfriend S. Metabolism of 5-hydroxytryptamine. In: 5-hydroxytryptamine. G. Lewis. Pergamon Press, London. p. 43-49; 1958.
- Van Houtte P.M. 5-hydroxytryptamine, vasospasm, and hypertension. In: 5-hydroxytryptamine in peripheral reactions. Declerck F. et Van Houtte P.M., Raven Press, New York. p. 163-174; 1982.
- Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Ann. Rev. Immunol. 10: 411; 1992.

- Verbeuren T.J., Jordaens F.H. et herman A.G. Accumulation and release of (3H)-5-hydroxytryptamine in sephaneous veins and cerebral arteries of the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226: 579-588; 1983.
- Vizi E.S., Orsò E., Osipenko O.N., Haskò G. et Elenkov I.J. Neurochemical, electrophysiological and immunocytochemical evidence for a noradrenergic link between the sympathetic nervous system and thymocytes. Neurosci. 68: 1263-1276; 1995.
- Voigt M.M., Laurie D.J., Seeburg P.H. et Bach A. Molecular cloning and characterisation of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor. EMBO J. 10: 4017-4023; 1991.
- Vriend C.Y., Zuo L., Dyck D.G., Nance D.M. et Greenberg A.H. Central administration of interleukin-1 β increases norepinephrine turnover in the spleen. Brain Res. Bull. 31: 39-42; 1993.
- Waalkes T.P. et Coburn H. The role of platelets and the release of serotonin and histamine during anaphylaxis in tha rabbit. J. Allerg. 30: 394-407; 1959.
- Waeber C., Dielt M.M., Hoyer D., Probst A. et Palacios J.M. Visualization of a novel serotonin site (5-HT_{1D}) in the human brain by autoradiography. Neurosc. Lett. 88: 11-16; 1988.
- Wan W., Janz L., Vriend C.Y., Sorensen C.M., Greenberg A.H. et Nance D.M. Differential induction of c-fos immunoreactivity in hypothalamus and brain stem nuclei following central and peripheriral administration of endotoxin. Brain res. Bull. 32: 581-587; 1993.
- Wang C-Y., Guttridge D.C., Mayo M.W. et Baldwin Jr A.S. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. Mol. Cell. Biol. 19: 5923-5929; 1999.
- Wang C-Y., Mayo M.W. et Baldwin Jr A.S. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. Science. 274: 784-787; 1996.
- Wang C-Y., Mayo M.W., Korneluk R.G., Goeddel D.V. et Baldwin Jr A.S. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science. 281: 1680-1683; 1998.

- Waxman F., Taguian J. et Whitacre C. Modification of the clinical and histopathological expression of experimental allergic encephalomyelitis by the vasoactive amine antagonist cyproheptadine. Cell. Immunol. 85: 82-93; 1984.
- Webster E.L., Tracey D.E., Jutila M.A., Wolfe S.A.Jr. et De Souza E.B. Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: Identification of receptor-bearing cells as resident macrophages. Endocrinol. 127: 440-452; 1990.
- Weinshank R.L., Zgombick J.M., Macchi M.J., Branchek T.A. et Hartig P.R. Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT_{1D α} and 5-HT_{1D β} . Proc. Natl. Acad. Sc. USA. 89: 3630-3634; 1992.
- Weigent D.A. et Blalock J.E. Interactions between the neuro-endocrine and immune systems: common hormones and receptors. Immunol. Rev. 100: 79-180; 1987.
- Wen W., Meinkoth J., Tsien R. et Taylor S. Identification of a signal for rapid export of protein from the nucleus. Cell. 82: 463-473; 1995.
- Whitaker-Azmita P.M. et Azmita E.C. Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulated growth of serotonergic neurons. Brain Res. 497: 80-85; 1989.
- Wilson T. et Treisman R. Removal of poly (A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3'AU-rich sequences. Nature. 336: 396-399; 1988.
- Wissink S., Meijer O., Pearce D., Van der Burg B. et Van der Saag P.T. Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids. J. Biol. chem. 275: 1321-1326; 2000.
- Wolff B. et Naumann M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. Oncogene. 18: 2663-2666; 1999.
- Wood M., Chaubey M., Atkinson P. et Thomas D.R. Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT(7) receptor. Eur. J. Pharmacol. 396: 1-8; 2000.
- Wu M.X., Ao Z., Prasad K.V.S., Wu R. et Schlossman S.F. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. Science. 281: 998-1001; 1998.
- Xie Q., Kashiwarbara Y., Nathan C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J. Biol. Chem. 269: 4705-4708; 1994.

- Yagaloff K.A. et Hartig P.R. [¹²⁵I] lysergic acid diethylamide binds to a novel serotonin site on rat choroid plexus epithelial cells. *J. Neurosc.* 5: 3178-3183; 1985.
- Yamamoto K., Arakawa T., Ueda N. et coll., Transcriptional role of nuclear factor- κ B and nuclear factor-interleukin 6 in the tumor necrosis- α dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 270: 31315-31320; 1995.
- Yang Y., Guo L., Ma L. et Liu X. Expression of growth hormone and insulin-like growth factor in the immune system of children. *Hor. Met. Res.* 31: 380-384; 1999.
- Yaron A., Gonen H., Alkalay I., Hatzubai A., Jung S., Beyth S., Mercurio F., Manning A.M., Ciechanover A. et Ben-Neriah Y. Inhibition of NF- κ B cellular function via specific targeting of the I- κ B-ubiquitin ligase. *EMBO J.* 16: 6486-6494; 1997.
- Young M.R.I., Kut J.L., Coogan M.P., Wright M.A., Young M.E. et Matthews J.P. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. *Immunology.* 80: 395-400; 1993.
- Young M.R.I. et Matthews J.P. Serotonin regulation of T-cell subpopulation and macrophage accessory function. *Immunology.* 84: 148-152; 1995.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M. et coll., The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell.* 91: 243-252; 1997.
- Zurawski G., Benedik M., Kamb B.J., Abrams J.S., Zurawski S.M. et Lee F.D. Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science.* 232: 772; 1986.