

Université de Montréal

**Comparaison des mécanismes de régulation des
isoformes a et b des récepteurs 5-HT₄**

par

Benmbarek Saoussane

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Mai, 2009

© Benmbarek Saoussane, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Comparaison des mécanismes de régulation des
isoformes a et b des récepteurs 5-HT₄

présentée par :

Benmbarek Saoussane

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guillaume Lucas, président-rapporteur

Dr. Graciela Pineyro, directeur de recherche

Dr. Sandra Boye, co-directeur

Dr. Nikolaux Heveker, membre du jury

Résumé

Les actions thérapeutiques des antidépresseurs, disponibles actuellement, requièrent plusieurs semaines de traitement. Ce délai est dû aux adaptations des sites pré et post-synaptiques qui, respectivement, augmentent la disponibilité synaptique des monoamines sérotonine et noradrénaline (5-HT et NA), et entraînent les changements neuroplastiques modifiant la fonction neuronales dans les régions limbiques. Il a été récemment observé, chez un modèle animal de dépression, que l'agoniste RS67333 des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₄ produisait des changements comportementaux, électrophysiologiques, cellulaires et biochimiques, tel qu'observé chez les antidépresseurs. Ces changements apparaissent seulement après 3 jours de traitement tandis que les antidépresseurs nécessitent souvent plusieurs semaines. De plus, l'activation des récepteurs 5-HT₄ ne générerait pas de tolérance, et cela pendant 21 jours de traitement.

Seulement, les propriétés de signalisation et de régulation de ces récepteurs sont très loin d'être établies. Nous avons alors voulu mieux caractériser ces deux aspects de leur fonction, en se concentrant d'avantage sur les isoformes a et b, fortement exprimés dans le système limbique. Pour cela, nous avons voulu évaluer d'abord leur capacité de production d'AMPc dans un système hétérologue. Les essais d'accumulation d'AMPc démontrent que les deux isoformes sont capables de moduler positivement et négativement des niveaux d'AMPc en présence de 5-HT. Par contre, la stimulation au RS67333 induit seulement une augmentation du niveau d'AMPc dans les deux cas. Ensemble, ces observations indiquent que les deux isoformes sont capables de coupler à l'adénylate cyclase à travers les protéines Gas et Gai. La quantification des récepteurs internalisés a montré que l'isoforme b internalisait plus efficacement que l'isoforme a suite à l'incubation à la 5-HT (61 ± 3 % pour le b vs 40 ± 2 % pour le a). Les protéines kinases PKA et PKC n'étaient pas impliquées dans cette différence, toutefois, la PKC a été trouvée essentielle à l'internalisation des deux isoformes. L'internalisation de l'isoforme b par 5-HT n'a pas été affecté par la surexpression de forme inactive de GRK2 (GRK2- K220R) et a été partiellement inhibé par un mutant négative de la β -arrestine (β arr(319-418)),

tandis que l'internalisation de l'isoforme a a été bloquée par les deux. Ces observations indiquent que les mécanismes d'internalisation des deux isoformes du récepteur 5-HT₄ les plus abondants dans le système nerveux central sont distincts. Des comportements spécifiques à chaque isoforme ont aussi été constatés au niveau de la régulation fonctionnelle suite à l'exposition au RS67333, qui désensibilise seulement l'isoforme b. D'après nos observations, nous avons conclu que les isoformes a et b diffèrent dans leur propriétés de signalisation et de régulation. L'incapacité du RS67333 à désensibiliser l'isoforme a fournit un substrat moléculaire pour les effets antidépressifs prolongés de cet agoniste dans les études pré-cliniques.

Mots-clés : récepteurs 5-HT₄; isoforme a; isoforme b; dépression; tolérance; longue latence; signalisation; régulation; désensibilisation; internalisation; 5-HT; RS67333.

Abstract

The therapeutic actions of antidepressants, currently available, require several weeks of treatment. This delay is due to pre- and post-synaptic sites adjustments, which, respectively, increase the availability of synaptic monoamines 5-HT and NA, and induce neuroplastic changes amending neuronal function in the limbic regions. We have recently observed in animal model of depression that serotonergic 4 receptor agonist RS67333 produces behavioural, electrophysiological, cellular and biochemical changes, as seen in antidepressants. More importantly, these changes appear only after 3 days of treatment while antidepressants often require several weeks. Moreover, activation of 5-HT₄ receptors does not generate tolerance and that for 21 days of treatment.

However, the signalling and regulation properties of these receptors haven't been established yet. Here, we wanted to better characterize these two aspects of their function, and in particular for isoforms a and b, strongly expressed in the limbic system. First, we assessed their ability to produce cAMP in a heterologous system. Functional assays revealed that both isoforms were capable of positive and negative modulation of cAMP levels by 5-HT. Stimulation by RS67333 induced cAMP stimulation. Together, these observations indicate that both isoforms are able to couple adenylate cyclase through G_{αs} and G_{αi} proteins. Moreover, quantification of receptors sequestration showed that isoform b internalised more efficiently than the isoform a, following incubation with 5-HT ($61 \pm 3\%$ for b, $40 \pm 2\%$ for a). PKA and PKC proteins, two second messenger kinases activated by these receptors, are not involved in producing this difference. However, PKC is essential to the internalization of both isoforms. Isoform b internalization was not affected by an inactive GRK2 mutant (GRK2-K220R) and was partially inhibited by dominant negative β -arrestin (β arr(319-418)), while isoform a internalization was dependant on both. These observations indicate that internalization mechanisms of the two isoforms, most abundantly expressed in the central nervous system, are different.

Functional desensitization studies showed that RS67333 selectively desensitizes the isoform b, but not isoforme a. Based on these observations, we conclude that isoform a and b differ in their signalling and regulatory properties. Isoform a incapacity to desensitization by RS67333 provides a molecular substrate for prolonged antidepressant affects of this agonist in pre-clinical studies.

Keywords : 5-HT₄ receptors; isoform a; isoform b; depression, tolerance; long latency; signalisation, regulation; desensitization; internalization; 5-HT; RS67333.

Table des matières

Introduction	16
I. Dépression, la maladie du siècle	17
1. Désordre dépressif majeur.....	17
2. Prévalence	18
a. Selon le sexe.....	19
b. Selon le groupe d'âge.....	19
3. Fardeau économique	20
II. Les différents types d'antidépresseurs.....	22
1. Neurotransmission des monoamines NA et 5-HT	22
2. Les groupes d'antidépresseurs	25
a. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO).....	25
b. Les antidépresseurs tricycliques (ATC).....	26
c. Les inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine (ISRS).....	26
d. Les inhibiteurs de recapture de noradrénaline (IRN).....	29
e. Les inhibiteurs de recapture de sérotonine et noradrénaline (IRSN)	29
f. Les antidépresseurs atypiques.....	30
3. Neuroadaptations et effets à long terme des antidépresseurs.....	31
a. L'hypothèse monoaminergique.....	31
b. L'hypothèse neurotrophique	32
4. Mécanisme diminuant la latence.....	36
a. La combinaison des ISRS et des antagonistes de 5-HT _{1A}	36
b. Les agonistes des récepteurs 5-HT ₄	38
III. Les récepteurs à 5-HT	39
1. Les récepteurs 5-HT couplés à G α i.....	42
a. Les récepteurs 5-HT _{1A}	42
b. Les récepteurs 5-HT _{1B}	43
c. Les récepteurs 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} et 5-HT _{1F}	43

d. Les récepteurs 5-HT ₅	44
2. Les récepteurs 5-HT couplés à Gαq.....	44
a. Les récepteurs 5-HT _{2A}	45
b. Les récepteurs 5-HT _{2B}	45
c. Les récepteurs 5-HT _{2C}	46
3. Les récepteurs 5-HT couplés à Gαs	46
a. Les récepteurs 5-HT ₆	46
b. Les récepteurs 5-HT ₇	47
4. Les récepteurs 5-HT ₃	47
IV. Les récepteurs 5-HT₄.....	49
1. Distribution	49
2. Isoformes.....	51
3. Activité constitutive	54
4. Signalisation.....	56
V. Régulation des récepteurs couplés aux protéines G	60
1. La désensibilisation.....	60
a. La désensibilisation homologue.....	61
b. La désensibilisation hétérologue.....	64
c. La palmylation	68
2. Distribution post-endocytaire et triage.....	71
a. Stabilité du complexe récepteur- β-arrestine.....	71
b. Interaction avec des complexes de protéines	72
3. La resensibilisation des récepteurs.....	73
VI. L'intérêt de cette étude	76
Matériel et méthodes	77
1. Réactifs.....	77
2. Constructions d'ADN.....	77
3. Culture cellulaire et transfection	78
4. Essai d'accumulation d'AMPc.....	79

5. Internalisation.....	80
6. Immunofluorescence et microscopie confocale	82
7. Analyse statistique	82
Résultats	84
1. Modulation de la production d'AMPc par les isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b}	84
2. Régulation de la signalisation des isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b}	86
a. Internalisation	86
b. Rôle des kinases PKA et PKC	89
b. Rôle de la protéine GRK2	91
c. Rôle de la β -arrestine.....	91
d. Désensibilisation soutenue des isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b} par le RS67333	94
Discussion	96
Conclusion	107
Bibliographie	109

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du processus de neurotransmission sérotoninergique	24
Figure 2 : Neurotransmission et synapse sérotoninergique	27
Figure 3 : Niveaux de BDNF associés à la dépression et à la plasticité de l'hippocampe.....	34
Figure 4 : Voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G	41
Figure 5 : Classification des différents récepteurs à 5-HT.....	48
Figure 6 : Les 9 différents isoformes humains et la structure de leur gène	53
Figure 7 : Représentation de l'équilibre entre la forme inactive R et active R* des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -AR) (à gauche) et des récepteurs 5-HT ₄ (à droite).....	55
Figure 8 : Modèle spéculatif du mécanisme de signalisation de transduction impliqué dans l'inhibition des isoformes NHE2 et NHE3 de l'échangeur Na ⁺ /H ⁺ dans les cellules Caco.....	59
Figure 9 : La région de phosphorylation commune à tous les isoformes 5-HT ₄ entre les résidus 346 et 358	67
Figure 10 : La palmytylation des isoformes 5-HT ₄ a et b sur les résidus Cys328, Cys 329 et Cys386.....	69
Figure 11 : La séquence C-terminale des isoformes a, b et e des récepteurs 5-HT ₄ de la souris, ave domaine PDZ présent seulement dans les isoformes a (classe I) et e (classe II)	73
Figure 12 : Le mécanisme de désensibilisation, d'endocytose et de resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G après activation par agoniste.....	75
Figure 13 : Les isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b} diffèrent dans leur modulation de production d'AMPc induite par la 5-HT	85
Figure 14 : La 5-HT et le RS67333 modulent différemment l'internalisation des 2 isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b}	87

Figure 15 : La 5-HT, et non le RS67333, induit l'internalisation des isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b} dans les cellules HEK 293 et leur distribution post-endocytaire est spécifique à chacun d'eux.....	88
Figure 16 : La PKC, et non la PKA, est essentielle à la séquestration des isoformes 5-HT _{4a} et 5-HT _{4b}	90
Figure 17 : L'internalisation de l'isoforme a, et non de l'isoforme b, est sensible à l'inactivation de GRK2	92
Figure 18 : L'internalisation de l'isoforme a est dépendante largement de la β -arrestine, tandis que l'internalisation de l'isoforme b en est partiellement dépendante.....	93
Figure 19 : Exposition soutenue au RS67333 abolit seulement la capacité de 5-HT de réguler la production d'AMPC de l'isoforme b.	95
Figure 20 : Expérience d'immunofluorescence dans des cultures primaires de neurones corticaux transfectés avec les isoformes a et b aux différents temps d'incubation à la 5-HT	103

À ma famille

*Et à tous ceux qui ont cru arriver au
bout leur rêve*

Remerciements

Je voudrai profiter dans cette partie de mon mémoire pour remercier plusieurs personnes, sans qui l'aboutissement n'aurait pas été réalisable.

Tout d'abord, je voudrai remercier ma directrice de laboratoire Madame Graciela Piñeyro et ma codirectrice Madame Sandra Boye pour m'avoir suivie et soutenue tout le long de ma formation, par leur critique, leur compréhension, les nombreuses heures qu'elles m'ont consacrées particulièrement à la correction de ce mémoire, et auxquelles je souhaite énormément de succès dans leurs entreprises futures. Je voudrai également remercier les membres du laboratoire qui m'ont aidé et permis d'améliorer mes connaissances : Elodie Archer-Lahlou, Nicolas Audet, Thomas Romeas, comme je remercie mon collègue et ami Mohammad Gholi Amraei qui n'a pas manqué d'apporter le dynamisme nécessaire au laboratoire avec ses blagues et ses propos « souvent machistes ». Je lui souhaite tout le bonheur du monde avec sa femme et ses enfants. Ces deux années m'ont aussi permis de tisser des liens d'amitié très forts avec ma collègue Ouissame Mnie-Filali, qui est devenue une de mes amies les plus intimes, comme je n'oublierai pas son énorme aide et son appui inconditionnels. Je tiens à remercier aussi Jean François Dupont pour son aide en informatique.

Par la suite, je voudrai remercier de tout cœur mon père, ma mère, mes frères Adib et Aniss ainsi que ma sœur Narjiss et Mourad son mari pour leur soutien moral, leurs encouragements, leur forte implication dans mes choix, et leur amour infini. Sans eux, je ne serais probablement pas la personne que je suis aujourd'hui. Et je ne pourrais jamais les remercier assez.

Aussi, je voudrai remercier mes amies (Lamya, Soumiya, Hind, Zineb et Lilia) pour m'avoir endurée durant ces trois années et qui m'ont permises d'en garder un si bon souvenir. Et en dernier et non le moindre, je voudrai remercier Karim pour son soutien moral et sa présence dans ma vie.

Liste d'abréviations

- 5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
- NA : noradrénaline
- RCPG : récepteur couplé aux protéines G
- AD : antidépresseur
- MAO : monoamine oxydase
- IMAO : inhibiteur de monoamine oxydase
- ATC : antidépresseur tricyclique
- ISRS : inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine
- IRS : inhibiteurs de recapture de noradrénaline
- IRSN : inhibiteurs de recapture de sérotonine et de noradrénaline
- BDNF : brain-derived neurotrophic factor
- CREB : cAMP-response-element-binding
- NRD : noyau raphé dorsal
- AC : adénylate cyclase
- AMP : adénosine monophosphate
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- ATP : adénosine triphosphate
- GTP : guanosine triphosphate
- PKA : protéine kinase A
- PKC : protéine kinase C
- PLC : phospholipase C
- PTX : pertussis toxin
- MAPK : mitogen-activated protein kinase
- NHE : Na⁺/H⁺ exchanger
- IP3 : inositol triphosphate
- DAG : diacylglycérol
- SNC : système nerveux central

- Ca⁺⁺ : calcium
- Na⁺ : sodium
- K⁺ : potassium
- ERK : extracellular signal-regulated kinase
- Leu358 : leucine 358
- R : récepteur
- 5-HT₄R : récepteur 5-HT₄
- β₂-AR : récepteur β₂-adrénergique
- HEK293 : Human Embryonic Kidney 293
- GRK : G protein coupled receptor kinase
- NHERF : Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor
- Che : chélerythine

Introduction

Depuis l'Antiquité, les pensées dépressives sont abordées dans les écrits philosophiques et littéraires non seulement de manière médicale, mais aussi de manière religieuse et mystique. Depuis toujours, manie et mélancolie, crainte et tristesse persistantes telles que l'on a connu avec les écrits d'Hippocrate (Aphorisme, VI, 23)) se sont opposés. Mais c'est seulement au 20^{ième} siècle que la mélancolie laisse la place à la dépression telle que l'on connaît actuellement et qui sera décrite dans les pages suivantes.

I. Dépression, la maladie du siècle

Il nous arrive tous d'être malheureux et attristé à une période de notre vie ! Certains de nos échecs ou mauvaises expériences peuvent provoquer des sentiments temporaires de déception, d'inutilité et de tristesse, mais finissent généralement par disparaître. Ce n'est cependant pas le cas de la dépression. C'est une maladie mentale où ces sentiments provisoires deviennent plus sévères et durent plusieurs semaines, nuisant ainsi au bien être en tant social que professionnel ou scolaire de la personne. Elle est aussi appelée « dépression clinique » ou « dépression majeure » et ou « désordre dépressif majeur ».

1. Désordre dépressif majeur

La dépression est maintenant diagnostiquée de façon fiable, et cela au moment de la prestation de soins primaires. C'est à la fois un état d'humeur psychique et passager, ressenti différemment selon les individus, et est également un syndrome clinique. Le désordre dépressif majeur (DDM) inclut des perturbations d'humeur comprenant des sentiments d'inutilité, de culpabilité, de repliement sur soi, de manque d'intérêt et de manque de confiance, accompagnés de perte de plaisir dans les activités normalement plaisantes ou d'anhédonie. Le désordre entraîne des troubles de la fonction neurovégétative, dont l'appétit, le poids, le sommeil, le désir sexuel, des troubles de la cognition, ainsi que des troubles de l'activité psychomotrice (autant les agitations que le retard psychomoteur), et les idées suicidaires (Fava & Kendler, 2000). Le diagnostic du DDM nécessite au moins 5 des symptômes. Bien que les conventions du diagnostic soient arbitraires, les symptômes et signes sont bien établis et sont retrouvés dans le *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DMS-IV) (Association, 2000).

La plupart des experts s'entendent sur le fait que la dépression devrait être vue en tant que syndrome et non une maladie (Berton & Nestler, 2006). Les hypothèses modernes de la dépression reconnaissent que les facteurs génétiques (5 %) et environnementaux contribuent tous deux à la vulnérabilité d'un individu (Ansorge, Hen, & Gingrich, 2007). Certaines personnes sont en effet plus susceptibles que d'autres face aux événements pénibles de la vie, aux facteurs psychologiques et aux facteurs biologiques. La dépression peut aussi découler d'une maladie, telle que l'hypothyroïdie, ou survenir à la suite d'une maladie, telle qu'un cancer ou une crise cardiaque.

2. Prévalence

La dépression touche 120 millions de personnes dans le monde, et ce nombre ne cesse d'augmenter constamment. Selon l'Association Canadienne pour la Santé Mentale, près de trois millions de Canadiens éprouveront la dépression à un certain moment de leur vie et qu'à chaque année environ 4 % à 5 % des Canadiens sombrent dans une dépression majeure. Selon une étude effectuée par l'Organisation Mondiale de la Santé et l'école de santé publique de Harvard, la dépression est actuellement la cinquième cause de mortalité et de handicap dans le monde et devrait atteindre la deuxième place d'ici 2020 (Mathers & Loncar, 2006; Murray & Lopez, 1996). L'Organisation Mondiale de la Santé spécule que 7 % des personnes atteintes sombrent dans un épisode dépressif d'un an, 5 % sombrent dans un épisode de 6 mois et 15 % sont affectés par un épisode chronique qui dure toute la vie. Toutefois, c'est une maladie récurrente, et les épisodes risquent très fort de se répéter. Chaque année, on compte plus de 850 000 morts, relié au suicide, au niveau mondial.

a. Selon le sexe

La dépression peut affecter aussi bien les hommes que les femmes, mais avec différentes fréquences. Entre 10 à 25 % des femmes en sont touchées, soit environ deux fois le pourcentage d'hommes (1 homme sur 10 contre 1 femme sur 5) (Kessler, Merikangas, & Wang, 2007). Cette incidence élevée chez les femmes peut s'expliquer par de nombreux facteurs psychologiques et environnementaux que les femmes ne perçoivent pas comme les hommes, tels que les abus physiques et sexuels, certains événements stressants de la vie, les relations de couple, les maladies, les morts, les discriminations, la pauvreté. Les femmes perçoivent aussi des changements que les hommes ne connaissent pas, tels que les dérèglements hormonaux lors des menstruations, des grossesses, du postpartum, de la préménopause et ménopause, ainsi qu'à la suite d'une fausse-couche (Keita, 2007). Les expériences de tomographie par émission de positrons (TEP) ont reporté que le taux de synthèse de sérotonine chez les hommes est plus élevé de 52 % de celui des femmes (Nishizawa et al., 1997), ce qui peut être un facteur pertinent de l'incidence moins élevée de dépression majeure unipolaire. Par conséquent, les femmes sont plus susceptibles à vivre une phase de dépression au cours de leur vie. Selon Statistique Canada, le taux élevé de dépression est associé significativement à l'accroissement de risque de maladie cardiaque chez la femme. En ce qui concerne les hommes, les symptômes de dépression sont souvent masqués par des sentiments de colère et de découragement.

b. Selon le groupe d'âge

La dépression peut affecter aussi bien les adolescents (15-24 ans) les adultes (25-44) que les personnes âgées. Les enfants sont de plus en plus touchés, et ces sentiments se manifesteront par des signes de tristesse, de culpabilité, de colère, de rejet, de dévalorisation ainsi qu'un manque d'énergie, de sommeil et des problèmes

d'alimentation. Ces enfants sont alors susceptibles à expérimenter d'autres épisodes dépressifs durant leur adolescence et notamment plus tard.

Toutefois, la dépression clinique atteint en plus grand nombre le groupe 25-44 ans. Selon « Mental Health », elle représentait, en 1990, la 4^{ième} maladie avec le plus d'années d'handicap vécues (DALY : Disability Adjusted Life Years) et figurerait au 2^{ième} rang d'ici 2020, après les ischémies cardiaques, quelque soit le sexe (Holden, 2000). En effet, la dépression est très pénalisante et représente un fardeau économique important, en touchant largement la classe de la population active. En 2000, selon l'Organisation mondiale de la Santé, la dépression était la principale cause d'incapacité dans le monde.

3. Fardeau économique

Non seulement elle atteint l'individu personnellement mais elle a un impact direct et indirect sur les coûts financiers. Selon l'Association Canadienne Pour la Santé Mondiale, 1 employé sur 20 est atteint de dépression, bien qu'elle ne soit pas diagnostiquée.

Les coûts directs sont représentés par les frais médicaux, comprenant toute intervention médicale que ce soit les visites médicales ou les médications, et les frais non médicaux, comprenant les services sociaux, de soutien et de transport pour les malades et leur famille. Les dépenses médicales comprennent les consultations chez les généralistes et spécialistes, les médicaments, les hospitalisations, les analyses de laboratoire et tout le suivi des patients. Quant aux traitements pharmaceutiques, ils s'élèvent de 1000 à 2500 dollars US par patient. Cet écart dépend des pays.

Les coûts indirects sont liés considérablement aux pertes et baisses de productivité des employés, ainsi qu'à l'augmentation des jours de congés de maladie. Les changements se manifestent par une difficulté à prendre des décisions, une baisse de productivité, une incapacité de concentration, une baisse de fiabilité, une

prédisposition aux accidents et aux erreurs, et certainement un manque d'enthousiasme pour le travail. Selon la méta-analyse effectuée par le chercheur Luppá et ses collègues (Luppá, Heinrich, Angermeyer, König, & Riedel-Heller, 2007), regroupant plusieurs études effectuées en 2003, les coûts indirects de la dépression s'élèvent de 1200 à 2200 dollars US par patient, dépendant des pays. Santé Canada spécule, qu'en 2001, la dépression et la détresse auraient coûté au moins 14,4 milliards de dollars par année en traitements, en médicaments, en productivité perdue et en décès prématurés.

La prise d'antidépresseurs a significativement augmenté. En 2002, environ 6 % de la population canadienne avait recours aux antidépresseurs. Entre la période de 1994 à 2000, la proportion de personnes diagnostiquées avec un désordre dépressif majeur ayant recours aux médicaments a plus que doublé (Patten & Beck, 2004). L'apparition du Prozac vers les années 80, dont les effets secondaires sont largement réduits, est responsable de l'augmentation de la prise des ADs à cette époque. Ce n'est sans étonnement que le Center for Disease Control (CDC) des États-Unis a affirmé, dans son dernier rapport pour l'année 2005, que les ADs soient les médicaments les plus prescrits suivis en ordre des antihypertenseurs, des anti-inflammatoires, et des médicaments anti-hypercholestérol (Burt, McCaig, & Rechtsteiner, 2007). Malgré ceci, l'Organisation mondiale de la Santé déclare que moins de 25 % de personnes souffrant de dépression dans le monde à chaque année ont accès à un traitement efficace, et seulement 60 à 80 % de celles-ci répondront au traitement de psychothérapie et d'antidépresseurs. De plus, il faut attendre plusieurs mois de traitement pour voir les effets complets d'un AD. Les prescriptions sont souvent modifiées par la suite, car le premier choix est la plupart du temps inefficace et peu toléré par les patients (Thase & Denko, 2008). Ceci dit, le manque d'efficacité d'antidépresseurs observé dans plusieurs cas explique d'une part qu'ils soient accompagnés de dépenses coûteuses et d'autre part que le fardeau économique est bel et bien un problème mondial inévitable.

II. Les différents types d'antidépresseurs

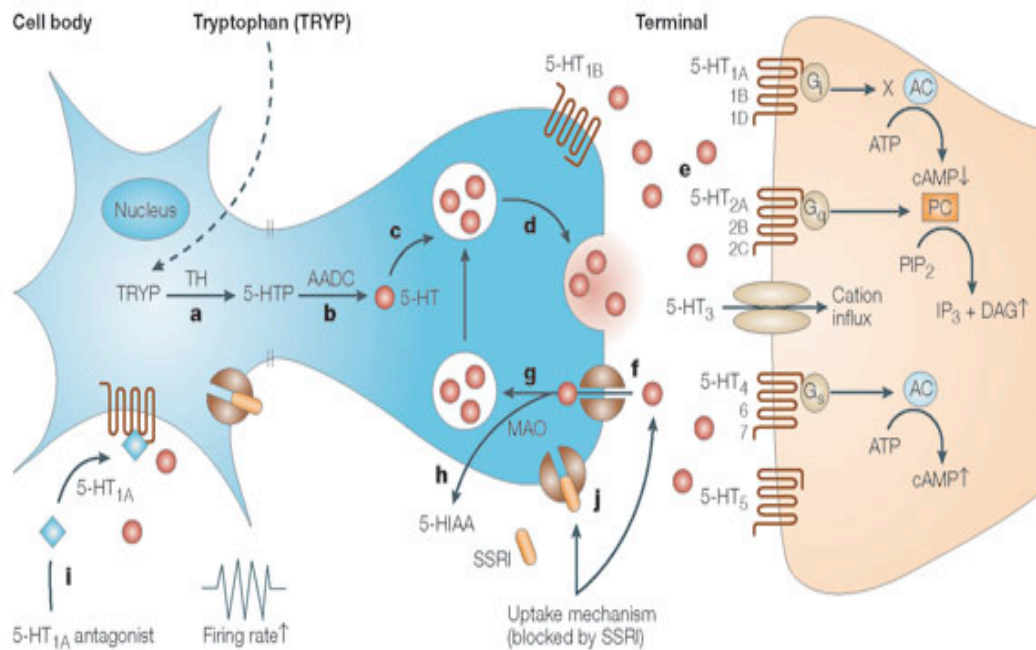
Plusieurs approches sont présentement disponibles pour traiter le DDM, incluant la psychothérapie, le traitement électroconvulsif (ECT) pour les cas sévères, et la médication. Les AD constituent la médication de premier choix pour traiter la dépression et prévenir les rechutes (Bauer, Whybrow, Angst, Versiani, & Moller, 2002a, 2002b). Ils ont fait l'objet de considérables études afin d'élucider leurs mécanismes d'actions et il a été largement proposé qu'une augmentation de la neurotransmission sérotoninergique centrale constitue un facteur clé du mécanisme d'action des ADs (Blier & de Montigny, 1994, 1999). Ils produisent leurs effets thérapeutiques en augmentant aussi l'efficacité de la neurotransmission dans le système noradrénergique. Bien que la 5-HT et la NA ont des actions indépendantes, elles ne doivent pas être considérées en isolation puisque les deux systèmes sont intimement connectés dans le système nerveux central. En effet, des projections noradrénergiques, dérivant du locus coeruleus (LC), sont liées aux projections sérotoninergiques du raphé dorsal (RD) et médian dans le tronc cérébral (Artigas, Nutt, & Shelton, 2002). Le LC contrôle l'activité du RD et la relâche de 5-HT. Pour pouvoir comprendre le mécanisme d'action des ADs disponibles, il est nécessaire de saisir la physiologie de la neurotransmission des monoamines.

1. Neurotransmission des monoamines NA et 5-HT

Une fois synthétisés dans les neurones à partir de leur précurseur respectif (tyrosine et tryptophane), les neurotransmetteurs NA et 5-HT sont entreposés dans des vésicules où ils seront protégés contre la dégradation effectuée par l'enzyme catabolique monoamine oxydase (MAO). Lorsque le neurone reçoit un potentiel

d'action se manifestant par une entrée de Ca^{++} et une fusion des vésicules avec la membrane pré-synaptique, les neurotransmetteurs (NT) sont relâchés dans la fente synaptique par un mécanisme d'exocytose. Ils se lieront à des récepteurs post-synaptiques spécifiques pour induire la cascade de signalisation nécessaire à la réponse cellulaire. Les neurotransmetteurs 5-HT et NA peuvent être recapturés par des transporteurs de recapture sur la membrane pré-synaptique, comme fin d'action. Ils sont par la suite soit recapturés et stockés dans les vésicules pour recommencer le cycle soit dégradés par la MAO. Pour moduler leur libération, des mécanismes de régulation sont mis en place. La neurotransmission monoaminergique est régulée par des autorécepteurs, somatodendritiques et terminaux, qui procèdent à une rétroaction négative, en reconnaissant le NT de la fente synaptique et de la région somatodendritique. Ils sont de type α_2 pour le NA, et de type 5-HT_{1A} dans le noyau du raphé ou 5-HT_{1B/1D} sur les terminaisons axonales des nerfs 5-HT (Artigas et al., 2002).

La figure 1 représente le processus de neurotransmission de la sérotonine.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 1 : Schéma du processus de neurotransmission sérotoninergique

a) L'enzyme Tryptophane Hydroxylase (TH) catalyse la conversion du tryptophane (TRYP) en 5-hydroxytryptophane (5-HTP). b) L'enzyme Aromatique aminoacide decarboxylase (AADC) catalyse elle-même la conversion du 5-HTP en 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine). c) La 5-HT venant d'être produite est stockée dans des vésicules, lui permettant de la protéger. d) La 5-HT est relâchée dans la fente synaptique grâce à une exocytose (déclenchée par un potentiel d'action) des vésicules au niveau de la membrane. e) La 5-HT peut activer différents sous-types de récepteurs post-synaptiques (1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7). f) La 5-HT est recapturée par les transporteurs de 5-HT pré-synaptiques. g, h) La 5-HT peut être soit capturée par les vésicules de stockage soit dégradée par l'enzyme MAO. i) La 5-HT active les autorécepteurs pré-synaptiques somatodendritiques 5-HT_{1A}, responsable de la rétro-inhibition négative sur la fréquence de décharge. j) Les inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine agissent à cette étape, en inhibant le transporteur de 5-HT. 5-HIAA, 5 hydroxyindolacetic acid; AC, adenylate cyclase; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol-1,4,5-trisphosphate; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. (D. T. Wong, Perry, & Bymaster, 2005).

2. Les groupes d'antidépresseurs

Les antidépresseurs sont classés en différents groupes selon leur structure et leurs propriétés neuropharmacologiques. Les différentes classes seront brièvement décrites.

a. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)

Ce n'est que dans les années 50, à la suite de recherche d'un médicament contre la tuberculose, que les IMAO ont commencé à être synthétisés comprenant l'iproniazide, la tranylcypromine et la phénelzine. Leur introduction en clinique a permis une évolution rapide du traitement et une amélioration de la qualité de la vie des patients (Lierberman, 2003). Les inhibiteurs de l'enzyme MAO ont la fonction de bloquer l'action enzymatique de la MAO mitochondriale, protégeant ainsi les NT recapturés de la dégradation. De ce fait, les IMAO permettent d'augmenter le niveau de la 5-HT ou NA pré-synaptique. À l'origine, les IMAO étaient irréversibles et se liaient à l'enzyme de façon permanente. Ces inhibiteurs étaient accompagnés d'effets secondaires dont une dangereuse hypertension artérielle à la suite d'une ingestion d'amines dans l'alimentation ne pouvant plus être dégradés par l'enzyme MAO et dont le niveau augmente considérablement. Cet effet est appelé "effet du fromage" et est observé en outre après l'ingestion de noix, de fromages trop mûrs et de certains vins rouges riche en tyramine (Krishnan, 2007). Le développement de nouveaux IMAO réversibles rend leur utilisation moins dangereuse et plus sûre.

La découverte des 2 isoformes, A et B, de la MAO (MAO-A et MAO-B) a permis de mettre au point des ADs sélectifs pour l'une ou l'autre enzyme. La moclobemide, un IMAO réversible d'une efficacité modérée dans le traitement de la dépression, se lie sélectivement à la MAO-A, métabolisant seulement la NA et la 5-HT, ce qui laisse la MAO-B libre de dégrader la dopamine (DA) (Livingston & Livingston, 1996).

b. Les antidépresseurs tricycliques (ATC)

Les ATC ont été aussi des types d'ADs de première génération qui ont été développés à partir de noyaux tricycliques des antipsychotiques. Ils comprennent les ADs plus sélectifs à la 5-HT, tels que imipramine, amitriptyline, chlorpromazine et chlomidramine, et les ADs plus sélectifs à la NA, tels que desipramine et nortryptiline. Les ATC bloquent la recapture de la 5-HT, de la NA et de la DA, mais ne sont pas complètement sélectifs à l'une d'elles. De plus, ils bloquent également les récepteurs cholinergiques de type muscarinique, histaminiques H1 et adrénergiques de type α_1 . C'est pour cette raison que ces ADs ont plusieurs effets secondaires non négligeables, dont, hypotension, bouche sèche, constipation, rétention urinaire, sédation, gain de poids et interactions médicamenteuses dangereuses. En cas de surdosage, ils peuvent entraîner des arythmies, voire même un arrêt cardiaque, découlant du blocage des canaux sodiques au niveau du cerveau et du cœur (G. Pineyro, Azzi, M., 2004). Depuis quelques années, de nouveaux ATC atypiques, ayant pour fonction de bloquer la recapture des monoamines, ont été développés (Stahl, 2000). L'amineptine et le bupropion agissent de préférence sur la recapture de la DA en l'inhibant. Mais ces derniers ont aussi des effets secondaires si de grandes doses sont accumulées, tels que des crises d'épilepsie ou cardiotoxicité (Garattini, 1997). Le bupropion est classé parmi les inhibiteurs de recapture de DA et NA, et n'a donc pas d'effet direct sur la neurotransmission sérotoninergique (Thase & Denko, 2008).

c. Les inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine (ISRS)

Entre 1970 et 1990, les nouveaux antidépresseurs ISRS ont vu le jour une fois que les chercheurs comprirent qu'il fallait développer des ADs sans les effets secondaires observés chez les ATC (M. L. Wong & Licinio, 2001). Les ISRS

agissent en inhibant de façon sélective la recapture de la sérotonine par les transporteurs.

En effet, immédiatement après l'administration des ISRS, les transporteurs de la 5-HT, situés sur le corps cellulaire et les terminaisons nerveuses des neurones 5-HT, sont bloqués. Par conséquent, la concentration de 5-HT extracellulaire est augmentée au niveau somatodendritique et dans les aires de projections axonales. Cependant, cette augmentation transitoire finit par activer les autorécepteurs 5-HT_{1A}, responsable de la diminution de la fréquence de décharge, et 5-HT_{1B/D}, responsable de la diminution de libération de la 5-HT terminale (Celada, Puig, Amargos-Bosch, Adell, & Artigas, 2004). Ceci dit, ils entraînent une diminution de l'activité sérotoninergique. De ce fait, la prise aigue d'ISRS peut entraîner une diminution de la neurotransmission de la 5-HT (Artigas et al., 2002).

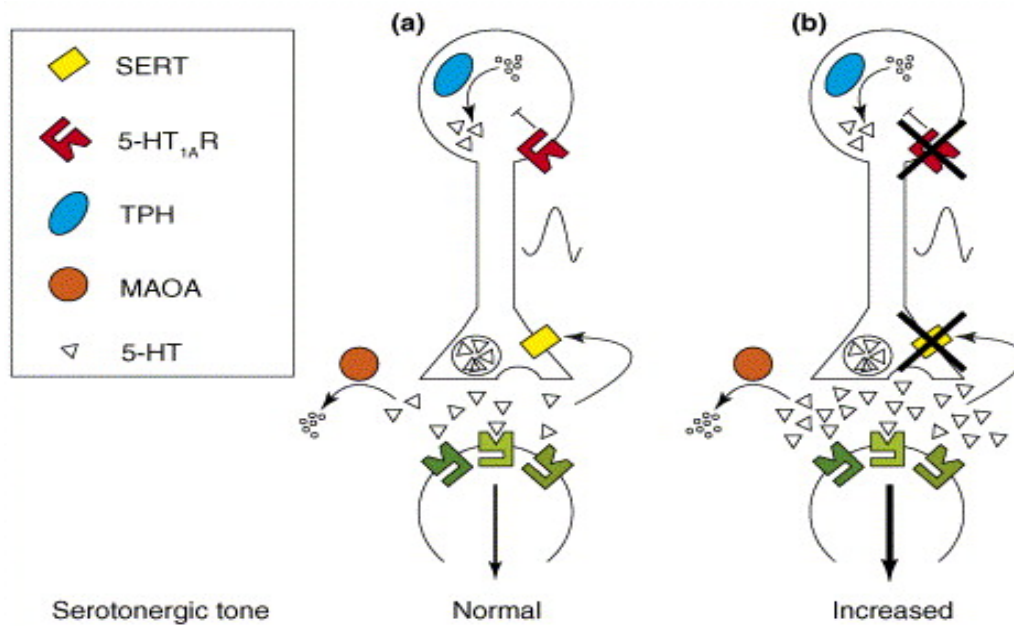


Figure 2 : Neurotransmission et synapse sérotoninergique

a) synapse sérotoninergique normale (avec côté pré et post-synaptique). Les molécules clés régulant la synthèse de 5-HT, sa relâche, sa recapture et sa dégradation y sont figurées. b) Le schéma représente une synapse lors du blocage de transporteur de 5-HT ou des autorécepteurs 5-HT_{1A}

somatodendritiques, augmentant ainsi la 5-HT extracellulaire. Image adaptée à partir de (Ansorge et al., 2007).

Il faut donner cet AD de façon chronique pour augmenter la disponibilité de la 5-HT. En effet, en chronique, les autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodendritiques et 5-HT_{1B/1D} terminaux se désensibilisent, augmentant la fréquence de décharge des neurones du raphé et la libération du NT. (Artigas, Celada, Laruelle, & Adell, 2001). Les ISRS n'ont aucun effet sur la recapture de la NA ou la DA. Toutefois, bien que les ISRS soient aussi efficaces que les ATC, ils ont beaucoup moins d'effets secondaires et de problèmes cardiovasculaires, puisqu'ils ont très peu d'affinité pour les récepteurs cholinergiques, histaminergiques et α -adrénergiques (G. Pineyro, Azzi, M., 2004). Les effets secondaires de cette classe d'AD reflètent les effets gastro-intestinaux (nausée, diarrhée) et du système nerveux central (mal de tête, nervosité, tremblements, insomnie) ainsi que des troubles sexuels après l'inhibition de la recapture de la sérotonine. Par contre, ils sont reconnus pour leur meilleure tolérance, puisqu'ils ne présentent pas de crise d'hypertension artérielle ni d'arythmie. En effet, comparées aux drogues traditionnelles (ATC, IMAO), les nouvelles drogues ISRS offrent une meilleure tolérance à la thérapie. Les ISRS sont les AD les plus prescrits dans le monde et sont le traitement de premier choix que ce soit pour le DDM, la dysthymie, le trouble de panique, le désordre obsessionnel-compulsif, le trouble de l'alimentation en raison, bien sûr, de leur efficacité, leur bon profil d'effets secondaires, leur tolérance, leur sécurité en cas de surdose, ainsi que la compliance des patients (Bauer et al., 2002b). Les AD suivants sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement de la dépression et la prévention des rechutes : fluoxétine, sertraline, paroxétine, citalopram et escitalopram (Thase & Denko, 2008). La fluoxétine, connu sous le nom commercial de Prozac, est l'ISRS le plus vendu aux États-Unis pour son efficacité soutenue (D. T. Wong et al., 2005).

d. Les inhibiteurs de recapture de noradrénaline (IRN)

Les IRN augmentent la concentration de NA extracellulaire, en inhibant la recapture des transporteurs de NA. On retrouve dans cette classe les ADs reboxetine et viloxazine. La reboxetine est un très faible inhibiteur de 5-HT et a un mécanisme similaire aux ISRS. En inhibant la recapture, elle cause une augmentation accrue de sa concentration synaptique au niveau somatodendritique et dans les aires de projections axonales. Par conséquent, l'augmentation de NA extracellulaire favorise des autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques axonales et terminaux, des récepteurs couplés à *Gai*, qui sont responsables de la diminution de la fréquence de décharge et de la libération de la NA. Les récepteurs α_{2A} sont aussi situés sur les axones des neurones 5-HT où ils jouent un rôle d'hétérorécepteurs inhibant la libération de ce neurotransmetteur. À différence des ISRS, les IRN ne produisent pas de désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques. En conséquence la fréquence de décharge des neurones NA n'est pas récupérée après le blocage prolongé de leur transporteur. Les récepteurs β et α_2 post-synaptiques finissent par se désensibiliser, alors que les récepteurs α_1 post-synaptiques s'activent (Scates & Doraiswamy, 2000). Et comme les neurones 5-HT et NA sont liés, les récepteurs α_1 situés sur les neurones 5-HT, sont activés de la même manière, augmentant ainsi la fréquence de décharge de 5-HT. Ceci a pour conséquence d'augmenter la neurotransmission de 5-HT (Szabo & Blier, 2001). Contrairement aux ATC, les IRN ne bloquent pas les récepteurs muscariniques, histaminiques ou α_1 -adrénergiques, d'où l'absence des effets secondaires indésirables reliés au blocage des récepteurs.

e. Les inhibiteurs de recapture de sérotonine et noradrénaline (IRSN)

Les IRSN inhibent la recapture de la NA et de la 5-HT, et de ce fait, augmentent la neurotransmission des deux neurotransmetteurs, après

désensibilisation des autorécepteurs correspondants. Ils incluent la venlafaxine et la duloxetine, fortement utilisés aux États-Unis. Ils sont aussi appelés des inhibiteurs de recapture à action duale. Comme les ISRS, les IRSN présentent très peu d'affinité pour les récepteurs muscariniques, histaminiques et adrénergiques (Stahl, 1998); plusieurs effets secondaires des ATC sont absents. La venlafaxine inhibe d'abord la 5-HT et ensuite inhibe la NA. À très hautes doses, la venlafaxine a un effet sur la recapture de la DA (Danileviciute & Sveikata, 2002). Ils sont souvent comparés aux ISRS; en effet, certaines études comparant l'escitalopram à la venlafaxine montrent un même taux de réponse et de rémission (Kennedy, Andersen, & Lam, 2006; Thase & Denko, 2008). Certaines autres études rapportent que les IRSN seraient bénéfiques chez certains patients, puisque leurs mécanismes touchent un plus large spectre de symptômes, comparativement aux antidépresseurs agissant sur un seul transporteur (Zajacka & Albano, 2004).

f. Les antidépresseurs atypiques

D'autres types d'ADs ont fait leur apparition, alors qu'ils ont un mécanisme d'action atypique. Ce sont des drogues qui agissent selon un mécanisme différent des autres ADs (Stahl, 1998). Dans cette classe, on y inclut, entre autre, les phenylpiperazines telles que la trazodone et la nefadozone. Ils ont deux caractéristiques : le blocage des transporteurs de 5-HT et le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} post-synaptiques. En l'absence d'AD, une augmentation de 5-HT synaptique entrainera l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{1A} post-synaptique. La nefazodone est un puissant antagoniste sélectif des récepteurs post-synaptiques 5-HT_{2A} et réduit la recapture du NT de façon modérée. De ce fait, la fonction des 5-HT_{1A} prédomine. La trazodone, quant à elle, est un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques et histaminiques, mais n'agit pas autant qu'inhibiteur de la recapture de monoamine. Quant à la mirtazapine, un antagoniste des α_2 -adrénorécepteurs

et agent bloquant des auto- et hétérorécepteurs α_2 , elle améliore la neurotransmission de la 5-HT et de la NA (Artigas et al., 2002).

3. Neuroadaptations et effets à long terme des antidépresseurs

Les effets pharmacologiques utilisés pour classifier les différents ADs correspondent aux effets aigus et directs de ces drogues. Seulement, le mécanisme impliqué dans l'effet thérapeutique est beaucoup plus complexe. Les augmentations rapides des concentrations de 5-HT et de NA extracellulaires, à la suite de l'administration d'ADs, n'expliquent pas le délai dans l'action thérapeutique de ces molécules. En effet, l'effet thérapeutique des ADs sur l'humeur n'apparaît que plusieurs semaines après le début du traitement chez les patients. De même, chez les modèles animaux comportementaux de dépression, une période de 2 à 4 semaines d'administration continue est nécessaire pour obtenir des effets antidépresseurs (Duman, 2007; G. Pineyro & Blier, 1999). Ainsi, des neuroadaptations progressives ont été proposées afin d'expliquer ce long temps de latence. Deux hypothèses ont été présentées, dont la première implique les récepteurs à monoamines (hypothèse monoaminergique) (Hindmarch, 2001; Schildkraut, 1965) et dont la seconde implique la modulation de l'expression de gènes de la signalisation intracellulaire, tels que les seconds messagers (AMPC) et les facteurs de transcription (CREB, BDNF) (Tanis & Duman, 2007).

a. L'hypothèse monoaminergique

Depuis, les années 50, l'hypothèse monoaminergique domine l'approche biologique de la dépression. Elle se base sur des évidences précliniques électrophysiologiques et neurochimiques qui suggèrent les changements de la

sensibilité des récepteurs monoaminergiques soient liés au retard de l'action des AD. Elle propose que les AD augmentent l'efficacité de la transmission sérotoninergique et/ou noradrénergique en modifiant l'efficacité avec laquelle les systèmes monoaminergiques parviennent à stimuler leurs récepteurs post-synaptiques par l'intermédiaire de la désensibilisation d'autorécepteurs inhibiteurs (tel que décrit précédemment). Le développement de cette désensibilisation pourrait expliquer leur temps de latence thérapeutique et leur réduction d'effets secondaires.

Un des problèmes majeur de l'hypothèse monoaminergique demeure le temps de latence des ADs. En fait, le temps de désensibilisation des récepteurs est de l'ordre de minutes ou d'heures *in vitro*, tandis que le temps nécessaire pour observer un effet thérapeutique des traitements *in vivo* est beaucoup plus long, voire 2 à 4 semaines. Toutefois, les traitements sont donnés à un organisme entier possédant un plus grand nombre de cellules, et qui par conséquent, n'entraînent pas les mêmes effets physiologiques observés sur certaines cellules. De ce fait, un grand nombre de mécanismes rentreraient en compte chez les êtres vivants et changeraient les temps nécessaires pour désensibiliser tous les récepteurs. Une approche complémentaire sur les facteurs neurotrophiques a été proposée par la suite.

b. L'hypothèse neurotrophique

L'hypothèse neurotrophique spécule que le long temps de latence des ADs serait dû à une modification de l'état fonctionnel des neurones post-synaptiques (Kozisek, Middlemas, & Bylund, 2008). Elle se base sur le fait que le stress induit certains changements retrouvés chez les déprimés, puisqu'une grande partie des dépressions sont reliées au stress. En effet, le stress chronique réduit la synthèse du facteur BDNF (brain-derived neurotrophic factor) dans l'hippocampe. Ces réductions de BDNF entraînent des changements physiologiques se manifestant chez les patients déprimés et leurs modèles précliniques par des atrophies de certaines

structures limbiques, incluant l'hippocampe et le cortex préfrontal (Duman, Heninger, & Nestler, 1997). Par ailleurs, un stress prolongé et sévère entraîne aussi une élévation soutenue de glucocorticoïdes, une conséquence de la dérégulation du système hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA pour hypothalamo-pituitary-adrenocortical) (Ansorge et al., 2007). Il s'est avéré en effet que la moitié des patients présentaient une activation excessive anormale de l'axe HPA, exhibant ainsi une augmentation de CRF (corticotropin releasing factor) et cortisol. Ceci peut endommager les neurones de l'hippocampe et se manifeste par une perte d'arbres dendritiques neurones hautement spécialisés qui sont responsables d'activer les neurones de l'hippocampe (Duman et al., 1997). Les différents classes d'antidépresseurs, particulièrement les ISRS, s'avèrent prévenir l'atrophie des neurones de l'hippocampe (Berton & Nestler, 2006; Duman et al., 1997) et promouvoir différentes formes de neuroplasticité, incluant la neurogénèse, la synaptogénèse et la maturation neuronale dans l'hippocampe. Plusieurs facteurs neurotrophiques sont associés à l'action des antidépresseurs. En effet, les prétraitements chroniques avec ADs bloquent la réduction de l'expression de l'ARNm de BDNF par les glucocorticoïdes (Nibuya, Morinobu, & Duman, 1995), ce qui augmente la synthèse et la signalisation du BDNF dans l'hippocampe. L'augmentation de ce facteur neurotrophique semble être nécessaire pour l'effet comportemental de ces drogues (Castren, Voikar, & Rantamaki, 2007). Ce facteur, agissant à travers son récepteur TrkB, préviendrait les dommages structurels et réductions de neurogénèse induits tous les deux par un stress. Il a été démontré que, d'une part les souris transgéniques TrkB.T1, auxquelles le gène TrkB a été muté et, d'autre part les souris dominant négatifs pour le gène BDNF, entraînant toutes deux une réduction de l'activation du récepteur TrkB, étaient tous les deux résistantes aux effets des ADs lors des tests de nage forcée (Saarelainen et al., 2003). Ces études montrent que le facteur BDNF et son récepteur sont nécessaires dans l'action thérapeutique induits par le traitement. L'infusion intracérébrale de BDNF stimulerait, par ailleurs, la survie et la germination d'axones 5-HT dans le cerveau de

rats adultes (Mamounas, Blue, Siuciak, & Altar, 1995), et démontrent une activité antidépressive dans des modèles animaux de dépression (Shirayama, Chen, Nakagawa, Russell, & Duman, 2002). Finalement, ces observations permettent de croire que l'augmentation de l'expression de BDNF contribue aux neuroadaptations vues par l'action des ADs. Alors, selon l'hypothèse neurotrophique, elles peuvent expliquer pourquoi les réponses antidépressives sont retardées; l'efficacité des ADs requerrait suffisamment de temps pour que les niveaux de BDNF augmentent graduellement et exercent leur effet neurotrophique.

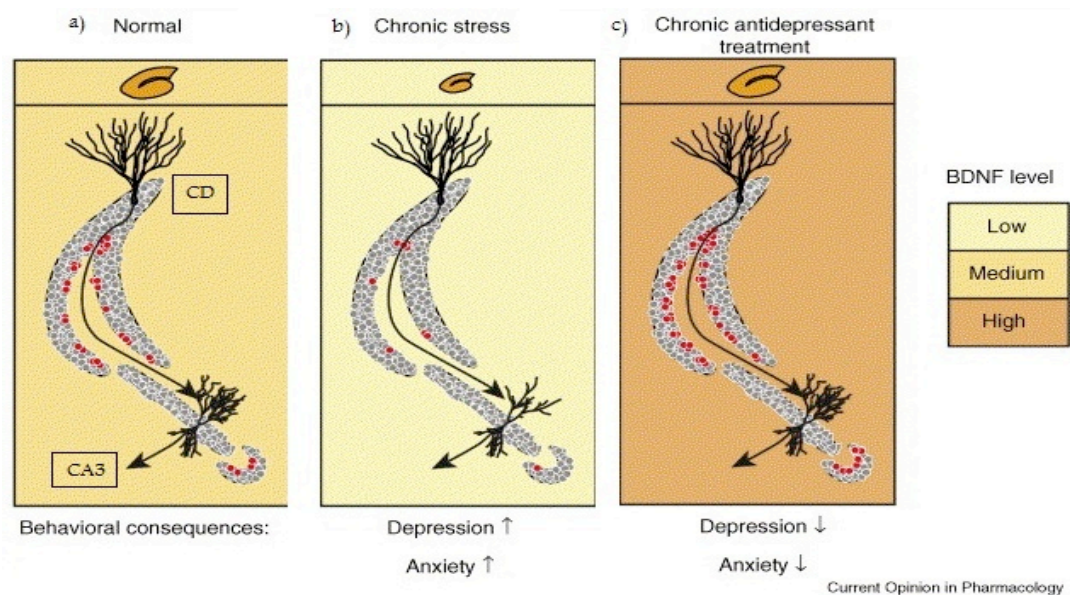


Figure 3 : Niveaux de BDNF associés à la dépression et à la plasticité de l'hippocampe

a) Niveaux normaux de BDNF dans la circonvolution dentelée (CD) et aires CA3. b) Un stress chronique entraîne une réduction du niveau de BDNF, du volume de l'hippocampe et des arbres dendritiques neuronaux CA3. c) Un traitement chronique avec un AD est associé à un niveau élevé de BDNF et une augmentation de la neurogénèse. Image adaptée à partir de (Ansorge et al., 2007).

En évidence, le mécanisme par lequel les ADs peuvent stimuler le BDNF implique l'AMPC (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) et le facteur de transcription CREB (cAMP-response-element-binding) impliqué dans la régulation

de la neurogénèse et de la neuroplasticité. L'activation de l'AMPc et de CREB entraîne la régulation de gènes spécifiques dans l'hippocampe, impliqués dans l'action des ADs. Le promoteur du gène du BDNF possède un élément de réponse CRE, qui une fois occupé par CREB, stimule l'expression de BDNF. Tandis que les ADs modifient ces processus en augmentant la prolifération des cellules de l'hippocampe, l'inhibition de l'activité de CREB diminue ces processus. Au niveau de l'hippocampe, CREB semble être un médiateur crucial des effets antidépressifs. En effet, l'administration chronique de plusieurs ADs, incluant les ISRS et ISRN, augmentent l'expression de l'ARNm de CREB, ainsi que la fonction et l'expression de la protéine, dans l'hippocampe des rats (Nibuya, Nestler, & Duman, 1996). Ces observations soulèvent que CREB soit une cible intracellulaire commune pour l'action des différentes classes d'ADs. Par conséquent, les composés qui activent directement CREB ou ses modulateurs intracellulaires peuvent aussi agir comme AD. Le rolipram, nouvelle classe d'AD agissant en tant qu'inhibiteur de phosphodiesterase de type 4 (enzyme qui a pour rôle d'augmenter les niveaux intracellulaires d'AMPc en diminuant son taux de dégradation) a des effets antidépressifs chez les modèles animaux de dépression (O'Donnell & Zhang, 2004). Mais cette étude a été abandonnée à cause des effets secondaires engendrés. Par ailleurs, l'activation directe des récepteurs 5-HT post-synaptiques tels que les 5-HT₄ pourraient aussi entraîner une augmentation d'AMPc et de l'activité de CREB. Ensemble, ces observations spéculent que les ADs partagent la propriété de moduler positivement la croissance cellulaire et la plasticité dans les aires limbiques.

Le délai de l'action clinique des ADs résulte des mécanismes neurobiologiques d'adaptation secondaires à l'activation de cible pharmacologique initiale. Le développement de nouveaux ADs vise à diminuer ce délai de latence, en plus d'augmenter l'efficacité thérapeutique.

4. Mécanisme diminuant la latence

Les efforts des chercheurs ont permis d'identifier l'effet pharmacologique des ADs, mais ces connaissances ont peu contribué à produire des drogues plus rapide et plus efficace. Les problèmes majeurs des ADs restent leur longue latence à induire un effet antidépressive chez les déprimés, voire 2 à 4 semaines, et leur efficacité sous-optimale (Celada et al., 2004; G. Pineyro & Blier, 1999). Ceci justifie la nécessité de développer des traitements plus rapides afin de conforter les patients atteints. Les chercheurs essaient de répondre à ces problèmes, entre autre en combinant le mécanisme des ISRS avec celui des antagonistes des autorécepteurs 5-HT_{1A}. Des études récentes se sont faites sur des récepteurs à sérotonine, particulièrement de type 5-HT₄.

a. La combinaison des ISRS et des antagonistes de 5-HT_{1A}

En 1993, des chercheurs ont proposé que les antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} accélèrent les effets cliniques des antidépresseurs, en prévenant la rétroaction négative, normalement effectuée par ce type de récepteurs (Artigas, 1993; Blier, 2001; Celada et al., 2004). Ces antagonistes permettront une augmentation plus rapide de 5-HT synaptique, tout en prévenant l'inhibition de la 5-HT relâchée observée dans des études de microdialyse et en mimant la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} produite par l'administration chronique des ISRS. Cette proposition a été testée avec le pindolol, un antagoniste partiel de β -adrénergique et de l'autorécepteur 5-HT_{1A}. Ce médicament bloque plusieurs actions médiées par l'activation des récepteurs centraux 5-HT_{1A}. Parmi les 15 essais cliniques comprenant 800 patients, 5 études sur 7, ont montré que cet antagoniste accélère significativement l'action des ISRS, en prévenant probablement la rétroaction négative effectuée par les autorécepteurs 5-HT_{1A} (Artigas et al., 2001; Blier & Bergeron, 1998). Une autre étude effectuée sur 111 patients randomisés pour lesquels

l'ISRS fluoxétine (20 mg/jour) a été donnée avec un placebo ou le pindolol (7,5 mg/jour) (Perez, Gilaberte, Faries, Alvarez, & Artigas, 1997) montre que 75 % d'entre eux ont répondu au traitement avec le pindolol alors que seulement 59 % ont répondu au traitement avec placebo. De plus, il a même été noté que le nombre de jour pour atteindre une réponse durable était plus court chez le groupe avec pindolol (19 jours avec pindolol vs 29 jours avec placebo). Par contre, le pindolol n'augmente pas l'efficacité des traitements aux ISRS chez les patients qui n'y répondent pas. Par ailleurs, la paroxétine a fait aussi l'objet de certaines études en combinaison avec le pindolol (Bordet, Thomas, & Dupuis, 1998; Tome, Isaac, Harte, & Holland, 1997; Zanardi et al., 1997). Dans l'étude de Bordet et ses collègues (Bordet et al., 1998), un groupe est rajouté pour vérifier si le blocage du beta-adréno-récepteur est impliqué dans l'action de la combinaison pindolol + paroxétine, en donnant l'antagoniste metoprolol (50 mg/jour) dépourvue de toute affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Encore ici, le taux de réponse positif chez le groupe traité avec pindolol + paroxétine est plus élevé que celui avec placebo, tandis que le groupe traité au metoprolol + paroxétine a exhibé un profil d'effets secondaires comparables au groupe traité à la paroxétine seule. Ces observations suggèrent que le pindolol, et non le metoprolol, soit efficace dans l'accélération de l'effet de la paroxétine et qu'il doit être administré tout le long du traitement de l'ISRS. Il est important de signaler que l'efficacité de l'ISRS reste la même et n'est nullement affecté par ces antagonistes. Plusieurs recherches se font en cours afin de développer d'autres antagonistes des autorécepteurs 5-HT_{1A}, plus sélectifs et plus puissants que le pindolol, dont l'affinité ne serait pas seulement pour les autorécepteurs 5-HT_{1A} mais aussi pour les transporteurs à 5-HT, et dépourvue des propriétés de blocage des β -adréno-récepteurs, afin de contourner les limitations des ISRS (Artigas et al., 2001).

b. Les agonistes des récepteurs 5-HT₄

Il a été récemment observé que les agonistes des récepteurs à sérotonine de type 5-HT₄ constituaient une nouvelle approche pour développer un traitement rapide pour la dépression. En effet, dans de modèles précliniques, l'administration pendant 3 jours d'agoniste des récepteurs 5-HT₄ étaient aussi efficace qu'un traitement de 2 semaines avec un ISRS (Lucas et al., 2007). Les études dont ont fait l'objet ces récepteurs ont été très conclusives. Elles ont pu montrer que les agonistes des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₄ produisaient des changements fonctionnels, comportementaux, électrophysiologiques, cellulaires et biochimiques similaires à ceux observés après un traitement chronique aux ISRS. Ces changements, apparaissant seulement après 3 jours de traitement, sont maintenus et ne génèrent pas de tolérance (Lucas et al., 2007).

En effet, les récepteurs 5-HT₄ exercent un contrôle excitateur sur l'activité des neurones 5-HT du noyau du raphé dorsal (NRD) des rats (Lucas & Debonnel, 2002). Ce contrôle se fait indirectement, puisque le NRD est pauvre en ARNm et protéine de récepteurs 5-HT₄. Une injection intra-péritonéale (IP) de l'agoniste des récepteurs 5-HT₄, RS 67333 (1.5 mg/kg), augmente le taux de décharge des neurones 5-HT du NRD de 60 % (Lucas et al., 2005). Par ailleurs, ce contrôle semble impliquer les récepteurs 5-HT₄ localisés dans le cortex préfrontal médian et non du striatum ni de l'hippocampe. De plus, les traitements à court et long terme (3 et 21 jours) avec ces agonistes ont reporté que les effets positifs induits par les récepteurs 5-HT₄ sont déjà à leur niveau maximal après 3 jours et gardent la même amplitude à long terme, alors que le traitement au GR125487 les bloquent, un antagoniste des récepteurs 5-HT₄. (Lucas, 2008; Lucas et al., 2007). Les agonistes des récepteurs 5-HT₄ auraient des propriétés en communs avec les ADs classiques en réduisant l'immobilité des rats face au test de nage forcé. Ce test permettait d'étudier l'AD à court terme, puisqu'il s'agit d'un test dont les effets sont observés tout de suite après la prise du médicament. De plus, le RS67333 est capable d'augmenter la proportion de CREB et de sa phosphorylation dans l'hippocampe. Ces 3 jours de traitement sont

aussi responsable d'augmenter l'activité mitotique et ainsi de la neurogénèse (division cellulaire et prolifération) dans la zone subgranulaire (ZSG) de l'hippocampe. Il a aussi été montré que les 3 jours de traitement étaient suffisants de réduire et l'hyperlocomotion des rats, induite par la bulbectomie olfactive, et la diminution de la prise du sucrose, induite par le stress chronique modéré (Chronic Mild Stress ou CMS) et qui est lié à l'anhédonie, un symptôme important observé dans la dépression. À part leur rapidité, l'effet de l'agoniste est maximale au 3^{ème} jour et est maintenu durant les 21 jours du test de CMS. C'est effectivement cette résistance à la tolérance à laquelle nous nous sommes intéressés. La régulation des récepteurs fait partie de la tolérance de type pharmacodynamique. Pour cela, notre intérêt repose sur la caractérisation des mécanismes de cette régulation. Mais avant de se focaliser là-dessus, il est important de placer ce récepteur parmi les autres types de récepteurs à 5-HT.

III. Les récepteurs à 5-HT

Les récepteurs 5-HT₄ font partis de la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), comme la plupart des récepteurs à 5-HT (Hoyer et al., 1994; Hoyer, Hannon, & Martin, 2002). A date, il existe 14 sous-type de récepteurs à 5-HT, dont 13 couplés aux protéines G et un seul à canal ionique, le récepteur 5-HT₃. Ils sont largement distribués dans le système nerveux central, ainsi que dans les tissus de l'estomac, du système cardiovasculaire et dans les cellules sanguines (Hoyer et al., 2002). Ils sont classés en 4 groupes différents selon leur homologie de séquence, leur structure et leur mécanisme de signalisation (Nichols & Nichols, 2008).

La liaison du ligand endogène, la sérotonine, à ses récepteurs, entraîne une activation des protéines G hétérotrimériques dans la cellule, qui une fois activées par les récepteurs vont interagir avec des effecteurs intracellulaires entraînant la production de seconds messagers et la phosphorylation de protéines clés impliquées dans le fonctionnement de la cellule. Les protéines G sont composées de trois sous-unités : α , β et γ . Au départ, le récepteur est inactif et la sous-unité α de la protéine G est liée au guanosine diphosphate (GDP) au niveau de son domaine GTPase. Une fois que le ligand occupe son site de liaison, le récepteur est activé et peut activer à son tour la protéine G. Associée au récepteur activé, la protéine G échange le GDP en guanosine triphosphate (GTP), devenant active et prête à moduler l'activité de ses cibles (McCudden, Hains, Kimple, Siderovski, & Willard, 2005).

La figure 4 est un schéma représentatif des effecteurs classiques régulés par les sous-types de protéines G majeures.

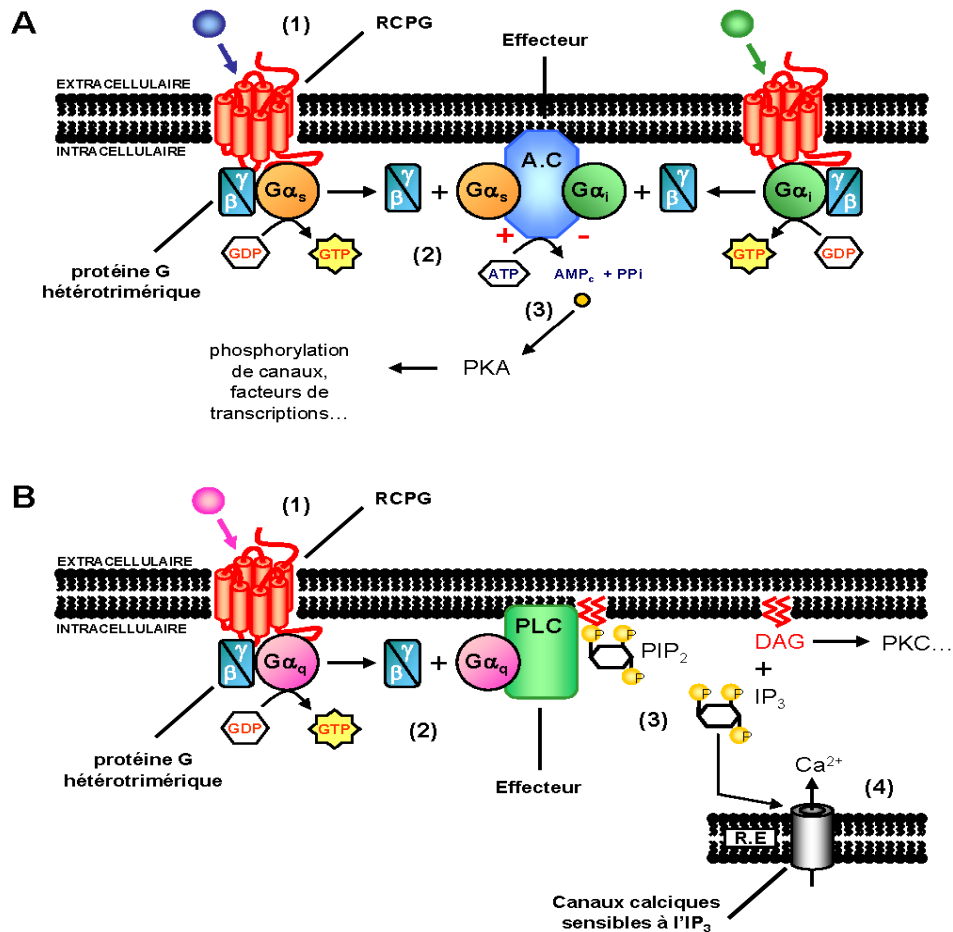


Figure 4 : Voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Les figures présentent A) la voie de l'AC régulée via l'activation de la G_{α_s} (à gauche) ou de la G_{α_i} (à droite). La protéine G_{α_s} permet d'activer l'AC et la production d' AMP_c . L' AMP_c a pour but d'aller activer la PKA, qui elle-même a pour rôle de phosphoryler différentes protéines essentielles au bon fonctionnement de la cellule, par exemple le facteur de transcription (CREB) et des canaux perméables au K^+ et Ca^{++} . B) L'activation de la voie de la PLC/PKC à travers la stimulation de la protéine G_{α_q} entraîne l'activation de la PLC β , ce qui entraîne l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-4-5-diphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ induit l'ouverture de canaux Ca^{++} du RE. Ensemble, le DAG et le Ca^{++} sont responsables de l'activation de la PKC. Image tirée à partir de Wikipédia

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9b/RCPG_et_seconds_messagers.png).

1. Les récepteurs 5-HT couplés à Gai

Cette classe de récepteurs inhibe l'activation de l'AC et la production d'AMPC à travers la protéine inhibitrice Gai/o. À travers les sous-unités $\beta\gamma$ de cette protéine, ces récepteurs sont responsables de l'ouverture des canaux K^+ et de la réduction de l'excitabilité neuronale, ainsi que de la fermeture des canaux Ca^{++} et de la réduction de la libération des neurotransmetteurs (Nichols & Nichols, 2008). Elle comprend les récepteurs 5-HT₁ dont les sous-types 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F} et les récepteurs 5-HT₅ dont les sous-types 5-HT_{5A} et 5-HT_{5B}. Les récepteurs 5-HT₁ sont aussi capables d'activer la voie ERK (extracellular signal-regulated kinases ERK1 et ERK2), tel qu'il a été reporté dans les cellules CHO (Lin, Setya, Johnson-Farley, & Cowen, 2002; Mendez, Kadia, Somayazula, El-Badawi, & Cowen, 1999).

a. Les récepteurs 5-HT_{1A}

Les récepteurs 5-HT_{1A}, composés de 422 acides aminés, ont un rôle important dans le comportement alimentaire et la régulation de la température corporelle. Ils s'avèrent contrôler, du moins en partie, le comportement sexuel et sont impliqués dans les désordres psychiatriques, tels que la dépression et l'anxiété (Gerhardt & van Heerikhuizen, 1997). Ils sont largement distribués dans le système nerveux central. Tel que mentionné précédemment, ils sont somatodendritiques et agissent en tant qu'autorécepteurs inhibiteurs de la décharge dans le noyau de raphé. Dans de nombreuses régions cortico-limbiques, dont l'hippocampe, ils sont post-synaptiques. Les études, utilisant des souris knockout pour le gène 5-HT_{1A}, ont pu supporter l'idée que ces récepteurs modulaient des comportements reliés à l'anxiété. De plus, chez ces souris, leur activité motrice est réduite dans les tests de nage forcée et de

suspension par la queue, qui sont des tests qui déterminent leur phénotype dépressif (Heisler et al., 1998; Parks, Robinson, Sibille, Shenk, & Toth, 1998).

b. Les récepteurs 5-HT_{1B}

Les récepteurs 5-HT_{1B} (390 acides aminés) sont impliqués dans la contraction des artères en réponse à la 5-HT, dans l'anxiété, les comportements agressifs, l'apport alimentaire et l'activité sexuelle. Ils sont exprimés dans le système nerveux central et sont particulièrement concentrés dans les noyaux gris centraux (basal ganglia), le striatum et le cortex frontal. Ils agissent en tant qu'autorécepteurs terminaux et peuvent aussi agir en tant qu'hétérorécepteurs contrôlant la relâche d'autres neurotransmetteurs, tels que acétylcholine (ACh), glutamate (Glu), dopamine (DA), noradrénaline (NA) et acide g-aminobutyrique (GABA) (Pauwels, 1997). Ces récepteurs sont aussi retrouvés dans les artères cérébrales et d'autres tissus vasculaires (Hoyer et al., 2002).

Des études de souris dépourvus de ces récepteurs ont reporté des comportements agressifs (Saudou et al., 1994) et d'abus d'alcool (Crabbe et al., 1996), suggérant l'implication de ces récepteurs dans la régulation du comportement agressif et de récompense. Par ailleurs, leur pharmacologie est proche de celle des récepteurs 5-HT_{1D}, mais n'est pas identique. Bien que les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} aient plus de 97 % d'homologie séquentielle et 63 % d'homologie structurale, leur différente pharmacologie est attribuable à une mutation d'un acide aminé Asp123 à Arg123 (Hoyer et al., 2002).

c. Les récepteurs 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}

Les récepteurs 5-HT_{1D} (390 acides aminés) sont beaucoup moins exprimés comparés aux récepteurs 5-HT_{1B}, mais sont impliqués dans les mêmes fonctions (dépression, migraine, anxiété). Certaines études suggèrent qu'ils soient retrouvés

dans le noyau raphé (G. Pineyro, de Montigny, Weiss, & Blier, 1996), mais aussi dans le cœur, où ils modulent la relâche de la 5-HT. Les récepteurs 5-HT_{1D} semblent être impliqués dans l'inflammation neurogénique et l'activité nociceptive dans les afférentes trigéminovasculaires. De ce fait, les agonistes des récepteurs 5-HT_{1D} suppriment l'inflammation et suggèrent qu'ils soient représentés en tant que cible thérapeutique importante pour la migraine et les maux de tête (Cutrer, Yu, Ayata, Moskowitz, & Waeber, 1999; Hamel et al., 1993).

Les récepteurs 5-HT_{1E} (365 acides aminés) et 5-HT_{1F} (366 acides aminés) ont plus de 70 % d'homologie dans leur séquence. Toutefois, leur distribution et leur fonction restent mal comprises. Leur distribution dans le cerveau suggère qu'ils puissent agir en tant qu'autorécepteurs de la 5-HT (Hoyer et al., 2002).

d. Les récepteurs 5-HT₅

Les récepteurs 5-HT₅, comprenant les sous-types 5-HT_{5A} (357 acides aminés) et 5-HT_{5B} (370 acides aminés), sont les moins caractérisés parmi les récepteurs à 5-HT. Aucune fonction ne leur a été encore associée. Chez le rat, ils sont exprimés au niveau central (région CA1 de l'hippocampe, noyau raphé), mais l'isoforme B est plus identifié au niveau périphérique (Erlander et al., 1993; Matthes et al., 1993). L'isoforme B ne semble pas être exprimé chez l'homme. Par contre, il a été reporté que l'isoforme 5-HT_{5A}, exprimé prédominamment dans les cellules gliales, serait couplé négativement à l'AC (Carson, Thomas, Danielson, & Sutcliffe, 1996).

2. Les récepteurs 5-HT couplés à Gαq

Dans cette classe, on retrouve les récepteurs 5-HT₂, comprenant 3 sous-types : 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Ils sont couplés à la protéine Gαq. Leur séquence d'acides aminés présente une forte homologie, toutefois leur gène est différent des

autres récepteurs 5-HT et se démarquent des autres récepteurs par les introns qui conservent leur place dans les régions codantes (Sanders-Bush, Fentress, & Hazelwood, 2003).

a. Les récepteurs 5-HT_{2A}

Les récepteurs 5-HT_{2A} (471 acides aminés) sont largement distribués en périphérie et dans les tissus centraux. Au niveau central, ils sont localisés dans les structures limbiques comprenant le cortex, le claustrum et les noyaux gris centraux. Ils contrôlent aussi l'activité sexuelle, la régulation du sommeil, le comportement moteur et seraient impliqués dans les désordres psychiatriques (tels que l'anxiété, dépression, schizophrénie) et dans l'épilepsie, la migraine et les hallucinations. En périphérie, ils entraînent des réponses contractiles dans plusieurs muscles vasculaires lisses. De plus, ils contribuent à l'agrégation plaquettaire et à l'augmentation de la perméabilité capillaire après exposition à la 5-HT (Hoyer et al., 2002).

b. Les récepteurs 5-HT_{2B}

Les récepteurs 5-HT_{2B} sont les derniers récepteurs qui ont été découverts. Lorsqu'ils sont activés, ils entraînent la contraction du muscle lisse fundique. L'ARNm des récepteurs 5-HT_{2B} a été détecté dans variables tissus, incluant la voie gastro-intestinale et le cerveau. Il a été suggéré qu'ils aient un rôle dans la différenciation des cellules de type sérotoninergique (Loric, Maroteaux, Kellermann, & Launay, 1995). Les ligands SB20474 et SB200646 sont des ligands sélectifs aux récepteurs 5-HT_{2B}, et ont très peu d'affinité pour les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} (Baxter, Kennett, Blaney, & Blackburn, 1995).

c. Les récepteurs 5-HT_{2C}

Les récepteurs 5-HT_{2C} sont distribués dans le système nerveux central et sont fortement exprimés dans le plexus choroïde. Ils ont une haute affinité pour la 5-HT. Ils sont particulièrement impliqués dans la modulation de l'appétit. Les souris transgéniques, dont le gène de 5-HT_{2C} a été ôté, ont un excès de poids, comme celui résultant d'un comportement d'alimentation déraisonnable. Ceci suggère que les récepteurs 5-HT_{2c} pourraient être une cible pour la découverte de nouveaux traitements contre l'obésité (Bickerdike, Vickers, & Dourish, 1999).

3. Les récepteurs 5-HT couplés à G α s

Dans cette classe, on retrouve les récepteurs couplés positivement à la protéine G α s (stimulatrice), 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇. Leur activation permet de stimuler l'AC qui catalyse l'hydrolyse d'ATP en AMPc et vient activer la PKA, tel que expliqué au début du chapitre. Les récepteurs 5-HT₄ seront discutés amplement dans le prochain chapitre.

a. Les récepteurs 5-HT₆

Les récepteurs 5-HT₆ (438 acides aminés) sont localisés dans le striatum, l'amygdale, le noyau accumbens, l'hippocampe, le cortex et le tubercule olfactif, mais aucun n'a été trouvé dans les organes périphériques. Ces récepteurs ont été d'intérêt particulier pour leur rôle dans des processus cognitifs, dont la mémoire (Branchek & Blackburn, 2000) et seraient une cible putative pour le traitement de l'Alzheimer (Meneses, 2001). De plus, l'activation de ces récepteurs altère la fonction des neurotransmetteurs impliqués dans les processus cognitifs, tels que l'Ach et le Glu, en augmentant leur neurotransmission. D'autres études suggèrent

qu'ils aient des rôles putatifs dans la régulation de l'alimentation (Woolley, Bentley, Sleight, Marsden, & Fone, 2001).

b. Les récepteurs 5-HT₇

Les récepteurs 5-HT₇ (445 acides aminés) ont une distribution vasculaire étendue et sont exprimés fortement au niveau du CNS, particulièrement dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et le cortex. Ils sont impliqués entre autre dans la régulation des rythmes circadiens, de la mémoire, de l'apprentissage et du sommeil (Forbes et al., 2003; Hedlund & Sutcliffe, 2004). Quatre structures ont été identifiées : A, B et C exprimés chez le rat et A, B et D exprimés chez l'homme. Ces récepteurs seraient capables d'activer la voie ERK dans les cellules neuronales de l'hippocampe du rat (Errico, Crozier, Plummer, & Cowen, 2001). Ces récepteurs sont d'un intérêt particulier puisque l'utilisation de souris knock-out (KO) a montré que l'absence de ces récepteurs auraient des effets anxiolytiques et antidépresseurs (Hedlund, Huitron-Resendiz, Henriksen, & Sutcliffe, 2005). De plus, certains résultats récents suggèrent que les antagonistes des récepteurs 5-HT₇ réduiraient fortement le délai des ISRS lorsqu'ils sont administrés ensemble, faisant d'eux une cible putative pour le développement d'un traitement antidépresseur efficace (Mnie-Filali, Lambas-Senas, Zimmer, & Haddjeri, 2007).

4. Les récepteurs 5-HT₃

Les récepteurs 5-HT₃ sont les seuls récepteurs sérotoninergiques à canal ionique activés par la 5-HT. Ce récepteur est formé par 5 sous-unités, (a à e) (Teitler & Herrick-Davis, 1994), et sont largement distribués dans le SNC (particulièrement dans le noyau nerveux trigéminal spinal, area postrema, mais aussi dans l'hippocampe, dans le noyau accumbens, l'amygdale) et dans le système périphérique. L'activation des récepteurs 5-HT₃ régule la motilité et la sécrétion de la

voie gastro-intestinale (Nichols & Nichols, 2008). Une fois stimulés, les récepteurs 5-HT₃ ouvrent des canaux ioniques membranaires perméables au Na⁺ et peu au Ca⁺⁺, ce qui entraîne une dépolarisation membranaire et la libération des neurotransmetteurs.

Il s'avère que certaines combinaisons de sous-unités des récepteurs 5-HT₃ soient nécessaires pour induire leurs fonctions complètes. La sous-unité A modifie la cinétique, la pharmacologie, l'amplitude et la conductance de la sous-unité B. De plus la co-expression des deux isoformes modifie la durée de la réponse des récepteurs 5-HT₃, augmentant l'affinité des agonistes et des antagonistes (Dubin et al., 1999). Par ailleurs, ces récepteurs sont des cibles potentiels dans le traitement de la schizophrénie et l'anxiété puisque d'une part leur activation dans le cerveau entraîne la relâche de la dopamine et d'autre part les antagonistes des récepteurs 5-HT₃ produisent des effets comparables aux antipsychotiques et anxiolytiques (Nichols & Nichols, 2008). Il a été aussi reporté que les antagonistes amélioraient la cognition chez les rats et qu'ils auraient un effet bénéfique sur la mémoire (Hoyer et al., 2002).

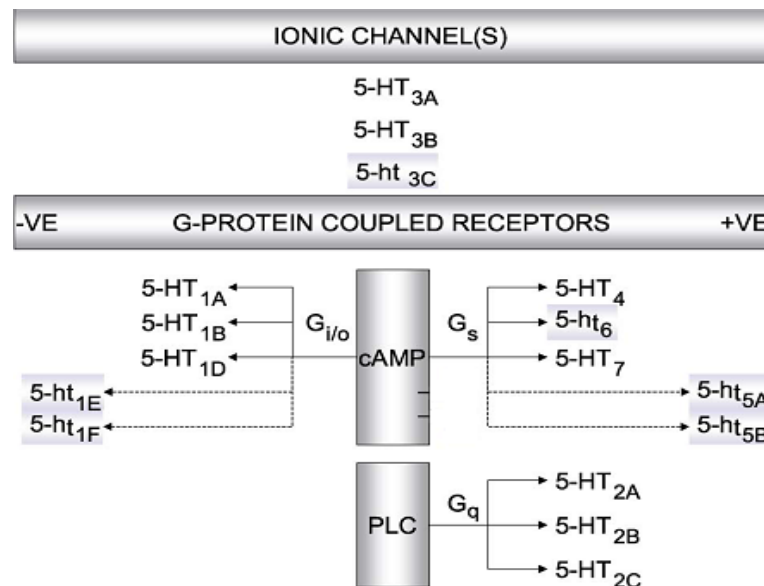


Figure 5 : Classification des différents récepteurs à 5-HT

Le schéma montre la classification des différents récepteurs 5-HT selon leur couplage aux protéines G (Gi/o, Gs, Gq) et les différents effecteurs qu'ils stimulent (AMPC, PLC). Le récepteur 5-HT₃ est le seul récepteur qui correspond à un canal ionique. Image adaptée à partir de (Hoyer et al., 2002).

IV. Les récepteurs 5-HT₄

L'observation, selon laquelle l'activation des récepteurs 5-HT₄ entraîne des réponses antidépressives rapides dans des modèles précliniques, s'avère très encourageante, puisque la latence thérapeutique est l'un des problèmes majeurs dans la dépression clinique. Habituellement, les ligands thérapeutiques, qui produisent leurs effets bénéfiques à travers l'activation des RCPG, développent de la tolérance, ce qui poserait un inconvénient majeur dans le traitement de la dépression, une maladie chronique et qui nécessite une médication permanente. Étonnement, les agonistes des récepteurs 5-HT₄ ne semblent pas déclencher ce type d'adaptation (Lucas et al., 2005), et c'est ce qui a relevé notre attention dans l'étude de leurs propriétés de régulation. Afin de mieux comprendre comment les agonistes de ces récepteurs peuvent échapper au développement de tolérance, nous nous sommes intéressés à leur mécanismes de régulation. Mais tout d'abord, il est essentiel de revoir les connaissances concernant leur distribution, leur signalisation, leur activité et finalement les aspects connus de leur régulation.

1. Distribution

Les récepteurs 5-HT₄ ont été identifiés dans plusieurs tissus dans le système nerveux central (SNC) (Eglen, Wong, Dumuis, & Bockaert, 1995) et périphérique (Hegde & Eglen, 1996).

Leur distribution centrale a été déterminée en utilisant des antagonistes marqués, tels que le [³H]-GR113808 (Grossman, Kilpatrick, & Bunce, 1993). La grande majorité des récepteurs 5-HT₄ est exprimée dans les régions de l'hypothalamus, l'hippocampe, le noyau accumbens, le pallidum ventral, l'amygdale, les ganglions de base, le tubercule olfactif, le cortex frontal, l'aire septale, la substance noire, le striatus fundus, faisant partie du système limbique (Bockaert, Claeysen, Compan, & Dumuis, 2004; Eglen, Wong et al., 1995; Vilaro et al., 1996; Vilaro, Cortes, & Mengod, 2005; Waeber et al., 1993). La localisation de ces récepteurs dans le système limbique spécule un rôle dans le contrôle des émotions. En effet, les antagonistes SB204070, SB207266 et GR11308 ont reporté des effets anxiolytiques dans le « test de elevated plus-maze » chez le rat (Silvestre, Fernandez, & Palacios, 1996). La localisation de ces récepteurs dans l'hippocampe et dans le cortex spécule des propriétés pro-cognitives (mémoire, apprentissage) (Dumuis, Bouhelal, Sebben, Cory, & Bockaert, 1988). Par ailleurs, ces récepteurs semblent être fortement réduits chez les patients atteints d'Alzheimer, avec une perte de 23 % dans le cortex et de 66 % dans l'hippocampe (Reynolds et al., 1995). Au niveau du cortex préfrontal, ils pourraient réguler l'apprentissage et la mémoire à long terme à travers la relâche de l'acétylcholine (Consolo, Arnaboldi, Giorgi, Russi, & Ladinsky, 1994), ce qui suggère que ces récepteurs sont localisés aussi sur les neurones cholinergiques. Dans le striatum dorsal, les récepteurs 5-HT₄ sont impliqués dans le contrôle de la libération de la dopamine et leur stimulation pourrait avoir des applications thérapeutiques dans la maladie de Parkinson (Bonhomme, De Deurwaerdere, Le Moal, & Spampinato, 1995), ainsi que dans le contrôle d'anhédonie (causée par CMS) (Bockaert et al., 2004; Compan et al., 1996; Vilaro et al., 2005).

Les récepteurs 5-HT₄ sont aussi très présent dans le système périphérique (Hegde & Eglen, 1996). En effet, ils sont retrouvés dans les myocytes des oreillettes droite et gauche où ils sont responsables de tachycardie et d'inotropisme positive

(Kaumann, Sanders, Brown, Murray, & Brown, 1990, 1991). Ils sont retrouvés dans la voie gastro-intestinale leur permettant de réguler la motricité digestive et la sécrétion des électrolytes. Ils provoquent la contraction des fibres musculaires lisses et augmentent la sécrétion du chlore. D'ailleurs, ces récepteurs sont utilisés dans le contrôle des nausées et des vomissements (Hegde & Eglen, 1996). Ils sont aussi retrouvés dans la glande surrénale où ils régulent la sécrétion des corticostéroïdes, et régulent la production d'aldostérone et de cortisol (Lefebvre et al., 1998). Ils sont présents dans la vessie et jouent un rôle dans l'inhibition de sa contraction (Waikar, Ford, & Clarke, 1994). Ils sont donc impliqués dans les désordres urinaires (Boyd & Rohan, 1994).

2. Isoformes

En 1995, deux ADNc de ces récepteurs ont été clonés chez le rat par amplification PCR à partir d'amorces d'oligonucléotides communes à plusieurs récepteurs 5-HT et dont la particularité était le nombre différent d'acides aminés : un de 387 acides aminés appelé récepteur 5-HT_{4S} pour court et un de 406 acides aminés appelé récepteur 5-HT_{4L} pour long (Gerald et al., 1995). Ils sont identiques jusqu'au résidu en position 360 de l'extrémité C-terminale. Les auteurs rapportent que, chez le SNC du rat, l'isoforme S est largement exprimé dans le striatum tandis que l'isoforme L est exprimé dans plusieurs régions du cerveau incluant cette structure (à l'exception du cervelet). Après un second séquençage de l'isoforme L, il s'est avéré qu'il possédait 388 acides aminés au lieu de 406 et cela dans n'importe quelle espèce (Van den Wyngaert et al., 1997). Plus tard, les chercheurs ont pu démontrer l'existence d'une extrémité C-terminale variable dans les autres espèces (Blondel, Gastineau, Dahmoune, Langlois, & Fischmeister, 1998; Claeysen et al., 1998), et la nomenclature du récepteur court et long a changé pour 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} respectivement.

Les gènes qui encodent les récepteurs humains 5-HT₄ ont été localisés sur le chromosome 5 dans la région q31-33 (Claeyssen et al., 1997), et ce grâce à l'hybridation in situ par fluorescence. Ces gènes sont font partis des plus larges gènes encodant les récepteurs couplés aux protéines G avec un poids de 700 kb. Sa région 5' non traduite est longue de 500 kb et son promoteur contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1, AP-2, AP-4 et GATA. Le gène possède 38 exons et génère 9 différents isoformes (Bockaert et al., 2004). Parmi les 9 isoformes, 8 ont leur séquence primaire identique (a-g et n) mais diffèrent dans leur extrémité C-terminale à partir de la Leucine 358 (Leu358) grâce aux différents épissages alternatifs de l'ARNm. Un autre variant interne (H) a été découvert plus tard, qui, par contre, diffère dans sa séquence primaire au niveau de la seconde boucle externe (Bender et al., 2000; Bockaert et al., 2004).

Une fois l'ADN transcrit en ARN pré-messager, il subit un épissage, qui consiste en une excision des introns (séquence non codantes) et en la ligature des exons (séquence codante). L'isoforme a possède 387 acides aminés et le b en possède 388. En ce qui concerne l'isoforme c le plus long isoforme avec 411 acides aminés, il possède le plus grand nombre de site de phosphorylation. L'isoforme d avec 360 acides aminés est une forme très courte du récepteur 5-HT₄ à la suite d'une troncation de deux acides aminés après la Leu358 (Blondel et al., 1998). L'isoforme e en possède 371, le f en possède 363 et le g en possède 378. Les isoformes e et f sont des versions raccourcies du g. L'isoforme n est le plus court avec 359 acides aminés. Quant à l'isoforme h, il est généré à partir de l'insertion de 14 acides aminés de l'exon 30 entre les domaines transmembranaires 5 et 6 du récepteur membranaire. Il est seulement généré à partir de l'isoforme b, c'est pour cette raison qu'il est nommé aussi 5-HT_{4hb}.

La figure 6 schématise le récepteur humain 5-HT₄ à la surface membranaire, ses différents isoformes formés par épissages alternatifs, ainsi que le gène et ses exons.

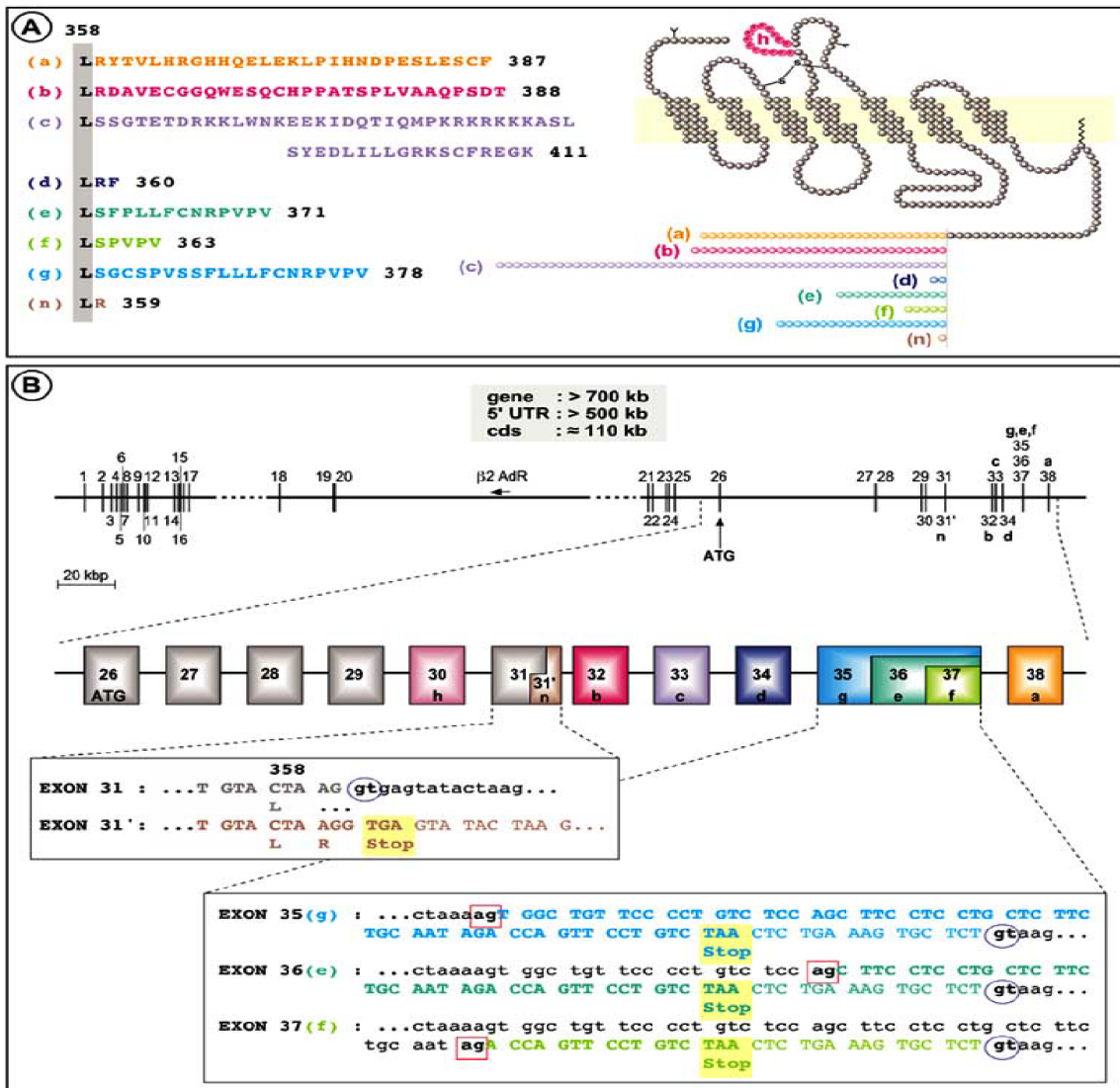


Figure 6 : Les 9 différents isoformes humains et la structure de leur gène

A) Cette figure présente la séquence détaillée des extrémités C-terminales des isoformes humains à partir de la Leu358 ainsi que leur nombre en acides aminés. L'isoforme h est le seul à posséder une boucle additionnelle dans sa portion extracellulaire. B) la structure organisationnelle du gène du récepteur 5-HT₄. Les exons y sont indiqués et numérotés par des barres noires. Le codon ATG représente le site de départ de traduction de l'ARNm du récepteur 5-HT₄. Sur le même complexe, on retrouve le gène du récepteur β₂-adrénergique, mais la traduction est dans le sens opposé. Les exons 26 à 38 représentent les exons présents dans les séquences des isoformes des récepteurs 5-HT₄. Les lettres sous les exons indiquent les noms de chacun des isoformes formés si le codon stop est à cet endroit. La région grise, comprenant les exons 26 à 29, est la région commune de tous les isoformes,

et la région 30 à 38 est celle qui représente l'extrémité C-terminale des récepteurs. L'isoforme n est généré à partir d'un codon stop au domaine C-terminal en 5'. Les isoformes e et f sont générés à partir du codon stop placé dans la section codant pour l'isoforme g. (Bockaert et al., 2004).

Grâce à l'utilisation d'un PCR et à l'analyse quantitative des niveaux d'ARNm, les chercheurs ont démontré une forte expression des isoformes a, b, c, g et n dans le SNC (Medhurst, Lezoualc'h, Fischmeister, Middlemiss, & Sanger, 2001; Vilaro, Domenech, Palacios, & Mengod, 2002), mais qui diffèrent d'un isoforme à un autre. L'isoforme a semble être fortement exprimé dans l'amygdale, l'hippocampe, le noyau accumbens et le noyau caudé. Il est aussi fortement retrouvé dans le petit intestin, l'atrium, et glande hypophyse. L'isoforme b semble être la forme la plus prédominante dans le SNC et en périphérie. Il serait plus exprimé dans le noyau caudé, le putamen, l'amygdale, ainsi que la glande hypophyse et le petit intestin. L'isoforme c serait plus exprimé dans la glande hypophyse et le petit intestin, mais on le retrouve aussi dans le noyau caudé, l'hippocampe et le putamen, mais à de plus bas niveaux. Par contre, l'isoforme d ne serait pas détecté dans le SNC et serait présent seulement dans le petit intestin. Quant à l'isoforme g, il semble être hautement exprimé dans l'hypothalamus et le cortex (Bockaert et al., 2004).

L'épissage alternatif des récepteurs spéculent des propriétés pharmacologiques presque identiques (Bach et al., 2001), mais avec des profils fonctionnels distincts. Et cette divergence est responsable entre autre des différentes activités constitutives.

3. Activité constitutive

En effet, les récepteurs 5-HT₄ sont reconnus pour leur forte activité constitutive (Bockaert et al., 2004; Claeysen, Sebben, Becamel, Bockaert, & Dumuis, 1999), même s'ils sont exprimés à des densités physiologiques (<500 fmol/mg de protéine). À la même densité, les récepteurs 5-HT₄ présentent une activité constitutive plus élevée que celle des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -AR). Leur

activité constitutive correspond à leur capacité d'activer spontanément la voie de signalisation intracellulaire en l'absence de stimulation par l'agoniste, c'est-à-dire de passer de la conformation inactive R à la conformation active R*.



Figure 7 : Représentation de l'équilibre entre la forme inactive R et active R* des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -AR) (à gauche) et des récepteurs 5-HT₄ (à droite).

Image illustrée à partir de (Claeysen et al., 1999).

L'extrémité C-terminale du récepteur s'avère être un régulateur clé de l'activité spontanée, puisque les isoformes les plus courts (e et f) montrent une plus forte activité constitutive, comparé aux isoformes longs (a, b et c). De plus, la troncation progressive d'acides aminés sur l'extrémité C-terminale entraîne une augmentation graduelle de cette activité. Par exemple, la troncation de l'isoforme a à la position 358 de l'extrémité C-terminale lui confère une activité constitutive similaire à celle de l'isoforme f, tandis qu'une délétion plus large de 13 acides aminés en position 346 entraîne complètement l'activation du récepteur (Claeysen et al., 1999). Par ailleurs, lorsqu'ils sont testés sur des récepteurs mutants constitutivement actifs, certains antagonistes 5-HT₄ agiraient en tant qu'agonistes inverses, tel est le cas pour le GR125487 et le SB207266 (Claeysen et al., 1999; Claeysen et al., 2000). En effet, les agonistes inverses inverseraient l'isomérisation en raison de leur haute affinité pour le R au lieu du R* et diminueraient l'activité constitutive basale. De ce fait, la capacité du récepteur à isomériser de la forme R à R* est dépendante de l'extrémité C-terminale variable d'un isoforme à un autre.

4. Signalisation

Les récepteurs 5-HT₄ sont couplés positivement aux protéines G et leurs activations stimulent la voie de l'adénylate cyclase et de l'AMPc intracellulaire, aussi bien dans les neurones des colliculi des souris (Dumuis et al., 1988), que dans l'hippocampe des cochons d'inde ainsi que dans le cortex préfrontal humain (Monferini et al., 1993). Ce couplage positif a aussi été montré dans le cœur (Kaumann et al., 1990) et dans l'œsophage (Ford, Baxter, Eglén, & Clarke, 1992). Dans les neurones, l'activation de ces récepteurs induit l'accumulation de l'AMPc, activant par la suite la protéine Kinase A (Torres, Chaput, & Andrade, 1995). L'activation de la PKA, par les récepteurs 5-HT₄ induit la fermeture des canaux potassiques (K⁺) dans les neurones de l'hippocampe des rats et dans les neurones colliculi des souris, entraînant une augmentation de l'excitabilité neuronale (Ansanay, Dumuis, Sebben, Bockaert, & Fagni, 1995; Fagni, Dumuis, Sebben, & Bockaert, 1992).

Lorsqu'ils sont exprimés transitoirement à des niveaux comparables dans les cellules COS-7, les isoformes a, b, c et d induisent des productions d'AMPc significativement différentes d'un isoforme à l'autre face à un agoniste renzapride, indiquant que les isoformes peuvent différer dans la magnitude de réponse face à un agoniste. Une comparaison entre les isoformes d et e, exprimés dans les cellules CHO, semble montrer que le d est plus puissant dans sa capacité à stimuler la production d'AMPc (Mialet et al., 2000), alors que l'extrémité C-terminale de l'isoforme d est plus courte que celle du e. Ceci dit, la modification de l'extrémité C-terminale des différents isoformes peut induire un changement dans la puissance de la liaison des agonistes et antagonistes au récepteur (Dumuis, Sebben, & Bockaert, 1989).

La différente extrémité C-terminale de chaque variant peut signifier des activations de protéines G différentes. Il a été prouvé chez certains récepteurs, tel que le récepteur prostaglandine EP3, que certains motifs ou régions des isoformes du

récepteur participent au processus de sélectivité de la protéine G (Sato et al., 1999). Tandis que chez d'autres, tel que le récepteur somatostatine 2, les isoformes diffèrent dans leur efficacité de couplage et leur événements activés à la suite de la désensibilisation (Vanetti, Vogt, & Holtt, 1993). À cet égard, certaines études ont voulu déterminer le profil pharmacologique et la signalisation de certains isoformes, particulièrement les isoformes les plus abondants 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} (Pindon et al., 2004; Pindon et al., 2002). Des différences sont présentes entre ces deux isoformes (Pindon et al., 2002). Premièrement, il existe une différence dans l'efficacité et/ou dans la puissance des agonistes face aux 2 isoformes. En effet, la formation d'AMPC induite par des agonistes, tels que la 5-HT, la 5-méthoxytryptamine, le prucalopride, le SDZ-HTF919 et le SB204070, diffère peu entre les 2 isoformes mais est significative. Toutefois, la 5-méthoxytryptamine et le prucalopride semblent être plus puissant envers l'isoforme b, tandis que le SDZ-HTF919 et le SB204070 le sont envers l'isoforme a. Deuxièmement, cette même étude a révélé une différence fonctionnelle entre les 2 isoformes dans leur capacité d'augmenter la concentration intracellulaire de Ca⁺⁺. L'isoforme a semble induire une plus forte augmentation de Ca⁺⁺ intracellulaire, contrairement au b. Et finalement, en ce qui concerne la sélectivité des protéines G, l'isoforme b serait capable d'activer aussi bien la protéine G_{ai} que G_{as}, alors que l'isoforme a ne couplerait qu'à la protéine G_{as}, lorsqu'ils sont transfectés de manière stable dans les HEK293. Une autre étude démontre que l'isoforme a se couplerait à G_{α13} lorsqu'il est transfecté dans les cellules *Spodoptera frugiperda* (Sf.9), ainsi que dans les cellules mammifères neuroblastoma x glioma NIE-115 (E. G. Ponimaskin, Profirovic, Vaiskunaite, Richter, & Voynoyasenskaya, 2002). La protéine G_{α13} régule divers complexes cellulaires en activant différentes voies de signalisation, particulièrement celle de la famille des GTPases Rho, qui semble réguler le cytosquelette d'actine nécessaire à la rétraction des neurites (Kato et al., 1998).

En plus de stimuler la voie PKA/AMPC, les récepteurs 5-HT₄ stimuleraient aussi la voie ERK impliqué dans le contrôle de la mémoire et l'apprentissage (Barthet et al., 2007). Dans une étude antérieure, les chercheurs avaient déjà démontré que les récepteurs 5-HT₄ induisaient la voie ERK dans les cellules HEK293 (Norum, Hart, & Levy, 2003). Mais récemment, il a pu être affirmé que la voie ERK est stimulée aussi bien dans les cellules HEK293 que dans les neurones colliculaires des souris. La stimulation de cette voie se fait de manière indépendante de la protéine Gas et de l'AMPC/PKA, puisque dans les cellules HEK293, où des récepteurs 5-HT₄ mutés (mutant D66N où le résidu aspartate D66 est remplacé par le résidu asparagine N, et mutant W272A où le tryptophane 272 est remplacé par une alanine) ont été exprimés, il a été possible de stimuler la voie d'AMPC, mais pas celle d'ERK1/2. Il semblerait aussi que la voie soit indépendante de Gαq (et donc de la phospholipase Cβ qu'elle active) et de Gαi, puisqu'elle est insensible au traitement des inhibiteurs respectifs U73122 et PTX. Par contre, la voie nécessite la protéine tyrosine kinase Src (Wang, Lu, Zhao, & Limbird, 2006). Le PP2, un inhibiteur sélectif de Src, bloquerait la phosphorylation de Src (sur la Tyr416) induite par la stimulation des récepteurs 5-HT₄, exprimés dans les HEK293. La voie ERK est aussi indépendante de β-arrestine. Il a déjà été démontré antérieurement pour d'autres récepteurs tels que le β₂-adrénergique, que l'activation de la voie ERK se faisait grâce au complexe d'échaffaudage composé de β-arrestine, de Src et de MAPK (Lefkowitz & Shenoy, 2005). Mais l'utilisation de récepteurs mutés exprimés dans les HEK293, dont la région de phosphorylation Ser/Thr est manquante, montrent que le récepteur est toujours capable d'induire l'accumulation de ERK1/2 et Src phosphorylés bien qu'ils ne soient plus capable de recruter la β-arrestine (Barthet et al., 2007). Par ailleurs, l'activation de Src a aussi été trouvée dans les cellules épithéliales humaines de l'intestin (Gill et al., 2005). Il semblerait que la sérotonine soit responsable de l'inhibition de l'activité des isoformes 2 et 3 de l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE) à travers l'activation des récepteurs 5-HT₄. Cette inhibition se produit à travers l'activation de la protéine tyrosine Kinase Src. Cette dernière a le rôle

d'activer la phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), de ce fait son activation est impliquée dans l'inhibition de l'activité de NHE. À travers la formation des produits d'hydrolyse IP3 et DAG, ainsi qu'à l'augmentation intracellulaire de Ca^{++} , ces derniers produisent l'activation de la PKC α responsable de l'inhibition de l'échangeur à travers la calmoduline. En effet, l'augmentation de Ca^{++} entraîne l'activation de la calmoduline (CAM), qui est capable d'influencer les activités de l'échangeur Na^+/H^+ . Ces observations placent Src comme étant un régulateur et activateur de la voie PLC/ Ca^{++} /calmoduline (Gill et al., 2005). Un schéma spéculatif du mécanisme d'inhibition de l'activité de NHE a été représenté par les auteurs.

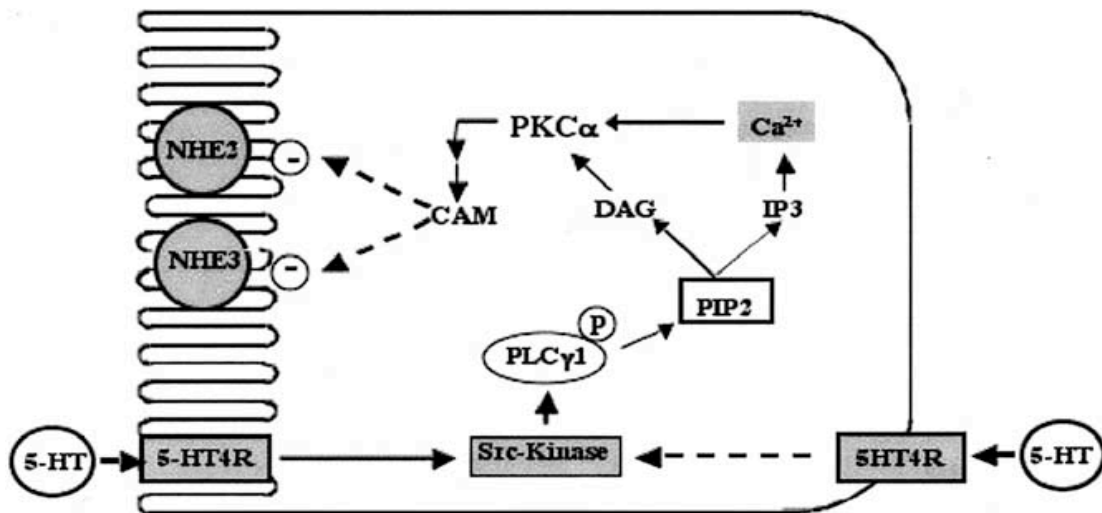


Figure 8 : Modèle spéculatif du mécanisme de signalisation de transduction impliqué dans l'inhibition des isoformes NHE2 et NHE3 de l'échangeur Na^+/H^+ dans les cellules Caco

Image tirée de (Gill et al., 2005).

Une meilleure compréhension de ce mécanisme permettrait de remédier aux perturbations d'échange d'électrolyte dans les cellules de l'intestin, retrouvées dans les diarrhées chroniques.

V. Régulation des récepteurs couplés aux protéines G

Une des grandes caractéristiques physiologiques des récepteurs couplés aux protéines G est leur capacité de moduler leur capacité de signalisation. Lorsque les récepteurs couplés aux protéines G sont exposés à un agoniste pour une période prolongée, ils subissent une désensibilisation. La quantité des récepteurs fonctionnels est contrôlée grâce à la régulation de la synthèse de nouveaux récepteurs ou à des modifications post-traductionnelles contrôlant à la fois leur couplage aux transducteurs de signalisations et leur capacité d'internalisation, dégradation et recyclage (resensibilisation). En effet, les récepteurs 5-HT₄ subissent différentes types de modification leur permettant de moduler leur signalisation, et qui sont décrites plus bas.

1. La désensibilisation

La désensibilisation contrôle la durée d'activation des récepteurs afin d'éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée par l'agoniste. Elle est précédée par la phosphorylation des récepteurs au niveau des résidus Ser/Thr de l'extrémité C-terminale et est responsable de la réduction de leur capacité de signalisation. La phosphorylation entraîne un découplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G, qui est déplacé par la β -arrestine, dont le recrutement est induit par l'ajout de groupes phosphates. La phosphorylation est entraînée par deux classes de protéines kinases : la famille des sérine/thréonine kinases appelée aussi "G-protein receptor kinases" (GRK) qui sont des protéines qui phosphorylent le récepteur dans la

conformation active stabilisé par l'agoniste (S. S. Ferguson, Barak, Zhang, & Caron, 1996) et la famille des kinases activées par les seconds messagers (PKA et PKC) (Hausdorff et al., 1989). Dès lors, deux formes de désensibilisation peuvent être distinguées : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue.

a. La désensibilisation homologue

La désensibilisation homologue débute par la phosphorylation des RCPG par les GRK (Bunemann & Hosey, 1999; S. S. Ferguson & Caron, 1998; S. S. G. Ferguson, 2007; Gainetdinov, Premont, Bohn, Lefkowitz, & Caron, 2004) sur les résidus sérine/thréonine, localisés dans son extrémité C-terminale (tel est le cas des récepteurs rhodopsines et β_2 -adrénergiques), et à la 3^{ème} boucle intracellulaire (tel est le cas des récepteurs muscariniques M2 et α_{2A} -adrénergiques). Le couplage entre la GRK et le récepteur est dit agoniste dépendant, puisque la GRK reconnaît et phosphoryle le récepteur seulement si occupé par ce dernier.

Les protéines GRK existent en 6 isoformes (1 à 6) : GRK1 (ou rhodopsin kinase), GRK2 (ou β -adrenergic receptor kinase-1), GRK3 (ou β -adrenieric recpetor kinase-2), GRK 4, GRK5 et GRK6 (S. S. Ferguson et al., 1996). À l'exception des GRK1 et GRK4, localisés respectivement de façon tissu-spécifique dans la rétine et les testicules, toutes les autres GRK sont largement distribuées. Elles sont composées de trois domaines fonctionnels : le domaine N-terminal impliqué dans la reconnaissance du substrat, le corps central responsable de l'activité catalytique et la région C-terminale dont la séquence est variable d'un isoforme à l'autre, responsable de la translocation des GRK du cytoplasme vers la membrane (S. S. Ferguson & Caron, 1998). Pour être recrutées à la membrane, elles subissent toutes des modifications différentes : la GRK1 est isoprénylé (ajout d'un groupement farnesyl via un lien thioether sur une Cys en C-terminale Cys 558) (Inglese, Glickman, Lorenz, Caron, & Lefkowitz, 1992; Inglese, Koch, Caron, & Lefkowitz, 1992), les

GRK2 et 3 nécessitent des phospholipides sur leur site de régulation dans le domaine PH pour qu'elles soient actives (Touhara, Koch, Hawes, & Lefkowitz, 1995), les GRK4 et les GRK6 sont palmitylés (Premont et al., 1996; Stoffel, Randall, Premont, Lefkowitz, & Inglese, 1994), la GRK5 est régulé par un mécanisme d'autophosphorylation stimulé par des phospholipides (Kunapuli, Gurevich, & Benovic, 1994). Le rôle physiologique des GRK dans la désensibilisation des RCPG a été confirmé grâce aux études effectuées sur les souris transgéniques, démontrant que la surexpression de GRK2 ou de GRK5 au niveau cardiaque réduisait considérablement l'activité du récepteur β_2 -adrénergique (Koch et al., 1995; Rockman et al., 1996), un récepteur utilisé comme un RCPG typique pour l'étude de la régulation de la signalisation. La surexpression de GRK2 induit ainsi une baisse de la fréquence cardiaque, qui ne semble pas différer lors de la surexpression de la GRK5. De plus, GRK2 semble être indispensable dans les premiers stades du développement embryonnaire, puisque, les souris "knockout" GRK2 \neg ne survivent pas (Jaber et al., 1996).

Une fois phosphorylé par les GRK, le récepteur recrute la β -arrestine (Bunemann & Hosey, 1999; Lefkowitz, 1998; Luttrell & Lefkowitz, 2002). La β -arrestine est un partenaire essentiel à la désensibilisation du récepteur. Elle prévient la liaison de la protéine G au récepteur et par conséquent prévient la signalisation cellulaire à travers cette voie (Lohse, Benovic, Codina, Caron, & Lefkowitz, 1990). La β -arrestine a été nommée ainsi pour son rôle dans la désensibilisation du récepteur β_2 -adrénergique (Attramadal et al., 1992; Lohse, Benovic, Codina et al., 1990), mais aujourd'hui on sait que cette famille de protéines participe à la régulation d'un grand nombre de RCPG. La β -arrestine (appelée aussi β -arrestine 1 ou encore arrestine 2) et la β -arrestine 2 (appelée aussi arrestine 3) sont largement exprimés (Bohm, Grady, & Bunnett, 1997; Krupnick & Benovic, 1998). On sait aujourd'hui que ces dernières participent à la régulation d'un grand nombre de RCPG dans l'organisme. Plusieurs domaines fonctionnels de la β -arrestine sont nécessaires à son action. Elle fait intervenir ses domaines A (activation-recognition domain) et P (phosphorylation-

recognition domain) pour la reconnaissance de la forme active phosphorylé du récepteur. Ces deux domaines sont impliqués dans la liaison simultanée des β -arrestines au récepteur activé et phosphorylé et induisent des changements conformationnels des β -arrestines (Lohse, Benovic, Codina et al., 1990). Par conséquent, ces modifications intramoléculaires augmentent l'affinité de liaison des β -arrestines pour le récepteur et le prépare pour son internalisation. La β -arrestine permet la formation des puits recouverts de clathrine tout en recrutant d'une part la protéine adaptatrice AP-2 qui est capable de lier les clathrines au récepteur à travers sa sous-unité adaptin- β_2 et d'autre part la dynamine, une GTPase qui permet l'étranglement des puits tapissés de clathrine grâce à l'échange GTP en GDP. La dynamine permet ainsi la polymérisation et la scission des vésicules de la surface membranaire (Rappoport, 2008). La dynamine et la protéine AP-2 sont liées par l'intermédiaire de la sous-unité α de l'AP-2 (Laporte et al., 1999).

D'autre part, il a été récemment suggéré que la β -arrestine contribuerait à la signalisation des RCPG en agissant aussi en tant que protéine d'échafaudage ou adaptatrice pour les composants de la voie ERK (Tohgo et al., 2003). Dans ce cas, la β -arrestine n'agirait pas pour achever la signalisation mais comme un « switch » qui permettrait de transférer les signaux d'une voie à une autre. En effet, les récepteurs angiotensines II de type 1A et vasopressines V2, connus pour former un complexe récepteur- β -arrestine stable, arrivent à activer un pool d'ERK2 de façon plus efficiente par rapport aux récepteurs adrénergiques α_{1b} et β_2 , qui forment un complexe transitoire. L'extrémité C-terminale des RCPG, déterminant la stabilité du complexe récepteur- β -arrestine, contrôle l'étendue de l'activation d'ERK et augmente la rétention d'ERK active dans le cytosol à la suite de la stimulation des RCPG (Tohgo et al., 2003).

b. La désensibilisation hétérologue

La désensibilisation hétérologue consiste en une phosphorylation d'un RCPG, dans l'extrémité C-terminale et/ou la 3^{ème} boucle intracellulaire, par les kinases activées par les seconds messagers, intervenant après avoir stimulé le récepteur en question ou d'autres récepteurs qui régulent la même voie de signalisation dans la même cellule. Ce découplage fonctionnel est dit agoniste indépendant (ne nécessite pas que le récepteur soit activé) et est induit par deux types de kinases : la PKA ou cAMP-dépendant protein kinase (Clark, Friedman, Dixon, & Strader, 1989; Lefkowitz, Hausdorff, & Caron, 1990) et la PKC (Nishizuka, 1986).

La PKA serait un médiateur important dans la désensibilisation hétérologue. Les récepteurs β_2 -adrénergiques subissent une telle désensibilisation suite à l'activation de la voie de l'adénylate cyclase. Les chercheurs ont pu prouver directement l'implication de cette kinase dans la désensibilisation des RCPG grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de PKA, tels que le H89, ou par l'expression de récepteurs mutés sur leurs sites spécifiques de phosphorylation par cette kinase (Daaka, Luttrell, & Lefkowitz, 1997). D'ailleurs, le résidu sérine 262 de l'extrémité C-terminale du récepteur α_2 -adrénergique serait le site principal de désensibilisation par la PKA (Clark et al., 1989; Hausdorff et al., 1989; Tran et al., 2004). Les études antérieures proposaient que la phosphorylation par la PKA entraîne un découplage des récepteurs β_2 -adrénergiques de la protéine Gas et l'inactivation de l'AC (Lohse, Benovic, Caron, & Lefkowitz, 1990). Certaines évidences suggèrent que la phosphorylation du récepteur β_2 -adrénergiques dépendante de PKA renforcerait le couplage du récepteur à la protéine inhibitrice G α_i (Daaka et al., 1997), induisant l'activation de la voie MAP Kinase (Daaka et al., 1998).

La PKC est également impliquée dans la désensibilisation hétérologue de nombreux récepteurs tels que le récepteur muscarinique m1 (Haga et al., 1996) et le récepteur angiotensine II de type 1A (Balmforth et al., 1995). Ces récepteurs sont

couplés à la voie de *Gaq/PLC*, générant PKC activée. Le récepteur muscarinique m1 subit une désensibilisation homologue par les GRK2 et une désensibilisation hétérologue par la PKC indépendante de l'agoniste, mais les sites de phosphorylation sont différents (Haga et al., 1996). La PKC se lierait plutôt sur l'extrémité C-terminale sur les sites Thr354, Ser356, Ser451, Thr455, et Ser457, tandis que la GRK2 phosphorylerait plutôt les sites des boucles intracellulaires sur les sites S284, S287, T289, S290, S291, S298. Il a été spéculé que la phosphorylation des résidus Ser et Thr, sur l'extrémité C-terminale ou sur l'extrémité terminale de la troisième boucle intracellulaire du récepteur m1, par PKC réduirait la capacité du récepteur à interagir avec et à activer la GRK2 (Haga et al., 1996). Quant aux récepteurs d'angiotensine II 1A, une mutation du récepteur au niveau de son résidu Tyr319 en un codon stop, lui ôtant 41 acides aminés de son extrémité C-terminale, a montré que ce site était impliqué dans sa désensibilisation par la PKC (Balmforth et al., 1995). Lorsque leur désensibilisation est induite par une faible concentration d'angiotensine II (1nM), la PKC semble être la kinase majeure dans la phosphorylation. Par contre, lorsque la concentration d'angiotensine II est élevée (100 nM), la phosphorylation par la GRK semble être dominante (Balmforth, Shepherd, Warburton, & Ball, 1997).

Et qu'en est-il des récepteurs 5-HT₄ ? Plusieurs études ont démontré que ces récepteurs subissaient une désensibilisation homologue à la suite d'une phosphorylation par la GRK2 (Ansanay, Sebben, Bockaert, & Dumuis, 1992; Barthet et al., 2005).

D'une part, l'exposition des neurones colliculaires aux agonistes sélectifs a démontré que l'activation des récepteurs 5-HT₄ murins est suivie d'une désensibilisation homologue rapide (Ansanay et al., 1992). La moitié de la désensibilisation maximale y est apparue seulement après 2 min d'incubation à 10 µM de 5-HT. Ces auteurs ont reporté que l'activation de la PKA ne changeait pas le taux de désensibilisation et qu'elle était indépendante du niveau d'AMPC

intracellulaire. Par contre, la GRK2 semble contribuer à ce processus, puisque la surexpression de cette kinase réduit significativement la capacité des agonistes à activer la formation d'AMPc comme si la signalisation serait désensibilisée à la base (E. Ponimaskin et al., 2005). Dans une autre étude comparant le profil de désensibilisation des récepteurs 5-HT₄ entre les colliculi de souris et les lignées cellulaires hétérologues (COS-7 et HEK293) (Barthet et al., 2005), les auteurs y rapportent que, dans les neurones, le découplage fonctionnel est rapide et intense, alors qu'il est lent et faible dans les systèmes hétérologues. Par ailleurs, il a été observé que GRK2 était exprimée dans les neurones et à forte densité, tandis que les cellules COS-7 et HEK293 exprimait peu de GRK2. En effet, une surexpression de GRK2 dans ces cellules était suffisante pour reproduire le découplage rapide et intense des récepteurs 5-HT₄, tel que observé dans les neurones. Par contre, différentes conditions ont été observées dans le découplage et l'endocytose. En particulier, bien que la surexpression de GRK2 soit nécessaire pour la désensibilisation fonctionnelle, la GRK2 présente chez les cellules HEK293 suffirait pour supporter l'endocytose des récepteurs 5-HT₄, via un mécanisme dépendant de la β -arrestine et de la dynamine (Barthet et al., 2005). De plus, la région de phosphorylation commune à tous les isoformes et comportant un conglomerat de résidus Ser/Thr, est absolument nécessaire pour une endocytose efficace suite à la surexpression de β -arrestine, mais elle n'est pas essentielle pour la désensibilisation fonctionnelle du récepteur. Ceci a été interprété comme une indication que l'endocytose des récepteurs 5-HT₄ requerrait l'activité kinase de GRK2 afin de phosphoryler cette région accumulant les résidus Ser/Thr (représentée dans la figure 9; (Joubert et al., 2004). De plus, la région de phosphorylation commune à tous les isoformes de ces récepteurs, comportant les résidus Ser/Thr, est absolument nécessaire pour une endocytose dépendante de β -arrestine/dynamine normale, et non au découplage.

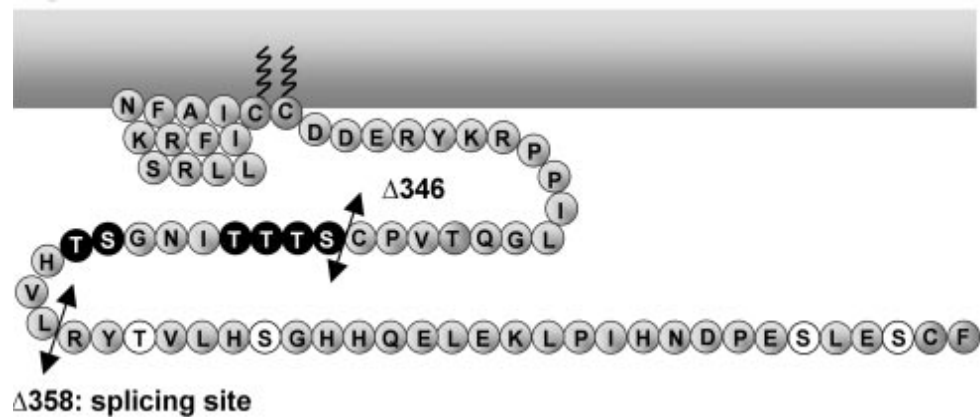


Figure 9 : La région de phosphorylation commune à tous les isoformes 5-HT₄ entre les résidus 346 et 358

Représentation de l'isoforme 5-HT_{4a}, avec les sites de troncation utilisés pour les études de mutation sur les résidus 346 et 358. La région entre ces résidus est commune à tous les isoformes 5-HT₄. Les résidus Ser et Thr sont représentés par des cercles noirs. Image adaptée à partir de (Barthet et al., 2005).

D'autre part, en périphérie, dans l'œsophage du rat, les récepteurs 5-HT₄ induisent aussi une désensibilisation homologe (Ronde, Ansanay, Dumuis, Miller, & Bockaert, 1995). Plus de la moitié de la désensibilisation maximale est apparue après moins de 5 min d'incubation à 10 μM de 5-HT. Dans les deux modèles, aussi bien dans les neurones colliculi des souris que dans l'œsophage des rats, la première phase de désensibilisation rapide est suivie d'une plus lente qui se complète après 120 min de traitement (Ronde et al., 1995). Alors que dans l'atrium humain, une désensibilisation moins étendue semble être reportée (Kaumann et al., 1990). Ces observations suggèrent que l'existence des différents isoformes dans différents tissus pourrait être responsable des désensibilisations distinctes (Pindon et al., 2002), variables d'une extrémité C-terminale l'autre.

Par ailleurs, une étude, comparant les isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}, a rapporté que l'isoforme b internalisait lorsqu'il était exprimé dans les cellules HEK293, tandis

que l'isoforme a ne l'était pas et cela en présence d'agonistes identiques (Pindon et al., 2004). De plus, le processus d'internalisation de l'isoforme b s'effectuerait de la même manière qu'il ait été transfecté seul ou cotransfecté avec l'isoforme a. Il a donc été suggéré que l'isoforme a requerrait plus de GRK et de β -arrestine dans le système hétérologue pour induire une internalisation (Pindon et al., 2004). De ce fait, bien que les ARNm des isoformes a et b soient localisés dans les mêmes tissus du SNC, les auteurs proposent que l'isoforme a serait exprimé dans différentes cellules neuronales ayant des expressions différentes de GRK et β -arrestine.

c. La palmytation

La palmytation est une modification post-traductionnelle qui s'effectue sur les sites présents dans l'extrémité C-terminale des récepteurs, sur les cystéines Cys328 et Cys329, à l'exception de l'isoforme 5-HT_{4a} qui détient aussi un résidu cystéine en position 386. La palmytation, aussi appelée S-acylation ou thioacylation, consiste en l'addition d'un acide gras de 16 carbones, le palmitate (CH₃(CH₂)₁₄COOH), grâce à l'enzyme acyltransférase créant un lien thioester. Ce lien entraîne la formation d'une quatrième boucle cytoplasmique sur l'extrémité C-terminale du récepteur (Sefton & Buss, 1987), lui permettant de devenir plus hydrophobe. C'est un processus réversible puisque le récepteur subit des cycles de palmytation et dépalmytation (Bouvier, Loisel, & Hebert, 1995; Qanbar & Bouvier, 2003), contribuant à moduler son activité. Un équilibre existe entre la forme palmytée et la forme dépalmytée.

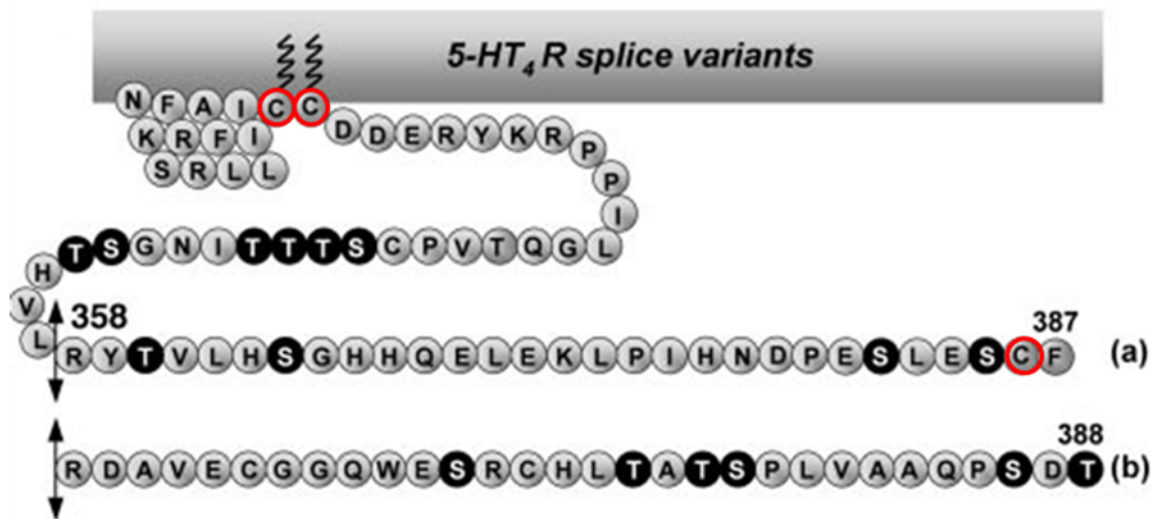


Figure 10 : La palmytation des isoformes 5-HT₄ a et b sur les résidus Cys328, Cys 329 et Cys386

La palmytation des isoformes a et b se fait sur les résidus cystéine encerclés en rouge. Les résidus Cys328 et Cys329 sont communs à tous les isoformes, y compris les isoformes a et b. Par contre, la Cys386 est propre à l'isoforme a seulement (Barthet et al., 2005).

Toutefois, les RCPG voient leur taux de renouvellement de palmytation augmenté lorsqu'ils sont stimulés par un agoniste. À cet égard, l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques, par l'isoprotérénol, entraîne une augmentation d'incorporation de palmitate marqué [³H]palmitate au récepteur surexprimé dans les cellules des insectes Sf9 (Loisel, Adam, Hebert, & Bouvier, 1996). Cette étude suggère aussi que l'activation soutenue de ces récepteurs tend l'équilibre vers la forme dépalmytillée qui serait plus sensible à la désensibilisation. D'autres études ont pu démontrer que le couplage des protéines G est impliqué dans la palmytation. Une mutation du site d'acylation potentiel (Cys341 en Gly) des récepteurs β_2 -adrénergiques voit son interaction réduite avec G α_s , réduisant de la même manière l'activation d'AC et résultant en une forme nonpalmytillée du récepteur (Moffett, Mouillac, Bonin, & Bouvier, 1993; O'Dowd, Hnatowich, Caron, Lefkowitz, & Bouvier, 1989). Ce dernier récepteur muté semble hyperphosphorylé, ce qui suggère

que la palmylation régulerait l'accessibilité aux sites de phosphorylation impliquées dans la désensibilisation (Moffett et al., 1993), mais aussi bien dans l'internalisation, tel est le cas des récepteurs THR (Thyrotropin releasing hormone) où les résidus Cys335 et Cys337, mutés pour des Ser, semblent être essentiels pour leur internalisation (Nussenzveig, Heinfliink, & Gershengorn, 1993). D'autres récepteurs ne peuvent plus stimuler ni l'AC ni la phospholipase C, lorsque les sites de palmylation sont mutés pour des Ser, tel est le cas pour le récepteur humain endothelin B (ETB) (Okamoto et al., 1997). Ces observations indiquent que la palmylation serait impliquée dans la régulation de la désensibilisation (Moffett, Rousseau, Lagace, & Bouvier, 2001; Ross, 1995),

Quant à l'isoforme 5-HT_{4a}, il subit une palmylation réversible sur les résidus Cys328 et Cys329 de la queue C-terminale (E. Ponimaskin et al., 2005; E. G. Ponimaskin, Heine et al., 2002; E. G. Ponimaskin, Schmidt, Heine, Bickmeyer, & Richter, 2001) et sur Cys386. L'activation de cet isoforme, par l'agoniste BIMU8, augmente le taux de renouvellement de liaison du palmitate au récepteur sur les sites Cys328/329. Les chercheurs ont démontré que l'isoforme muté sur ses sites de palmylation n'affectait ni son couplage à la protéine G α s, ni sa stimulation d'adénylate cyclase (AC), ni son activation du canal cationique. Par contre, la différence entre la forme mutante et la forme sauvage se retrouvait dans sa capacité de moduler l'activité constitutive. En effet, la mutation de la Cys³²⁸ en une Ser augmente la capacité du récepteur de se convertir de la forme inactive R à la forme active R* en absence de l'agoniste. Tandis que la mutation des sites Cys328/329 en Ser, tout en gardant le récepteur actif en absence ou en présence du ligand, entraîne une augmentation de phosphorylation et une désensibilisation et internalisation accrue (E. Ponimaskin et al., 2005).

2. Distribution post-endocytaire et triage

Une fois internalisé, le récepteur peut subir deux sorts : il est soit dirigé vers les endosomes de recyclage afin d'être envoyé à la membrane plasmique, soit orienté vers les lysosomes où il est dégradé par des protéases (Hanyaloglu & von Zastrow, 2008). De ce fait, l'internalisation est un phénomène réversible et les récepteurs endocytés peuvent recycler et revenir à la membrane plasmique (Oakley, Laporte, Holt, Barak, & Caron, 1999).

a. Stabilité du complexe récepteur- β -arrestine

Pour les récepteurs β_2 -adrénergiques, dopaminergiques D1A ou angiotensines II de type 1A, leur destin est médié par l'association de la β -arrestine. En effet, la dissociation des β -arrestines s'effectue juste après la scission des vésicules de la membrane plasmique, donc à la membrane ou très proche. Ils sont alors rapidement déphosphorylés et recyclés (Oakley et al., 1999). Tandis que pour les récepteurs endothéline ETA, vasopressine V2 ou neurotensine NT-1, les β -arrestines accompagnent les récepteurs dans les compartiments précoces de l'endocytose. Le complexe récepteur- β -arrestine est plus stable que pour les récepteurs cités précédemment, puisque la β -arrestine y demeure associée même dans les vésicules d'endocytose. Ils sont alors lentement déphosphorylés et recyclés (Oakley et al., 1999). Cette capacité de former un complexe stable entre le récepteur et la β -arrestine serait médiée par une région de phosphorylation de l'extrémité C-terminale (avec résidus Ser et Thr) commune à tous les récepteurs de ce type. La phosphorylation de cette région induirait un changement conformationnel permettant une interaction de haute affinité entre le récepteur et la protéine régulatrice (Oakley, Laporte, Holt, Barak, & Caron, 2001). Ainsi, la stabilité du complexe semble réguler le taux de resensibilisation, sans oublier l'étendue de l'activation d'ERK telle qu'expliquée plus haut.

b. Interaction avec des complexes de protéines

Les récepteurs endocytés dans les endosomes sollicitent la participation de nombreuses protéines cellulaires. Ils interagissent avec des protéines spécifiques qui déterminent leur triage post-endocytosique. Plusieurs récepteurs, incluant les récepteurs β_2 -adrénergiques, opiacés et cannabinoïdes 1, possèdent des séquences cytoplasmiques spécifiques après l'endocytose leur permettant de reconnaître des protéines capables d'augmenter le recyclage ou de les adresser vers les lysosomes. Les récepteurs β_2 -adrénergiques, en particulier, expriment un domaine PDZ dans leur extrémité C-terminale permettant à la protéine NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulator factor) de se lier. La régulation du pH cellulaire de ce facteur ainsi que la redirection des récepteurs vers le recyclage contrôle le destin de ces récepteurs entre leur dégradation et leur recyclage. Il a été reporté que la protéine NHERF contribuait au recyclage des récepteurs β_2 -adrénergiques (Cao, Deacon, Reczek, Bretscher, & von Zastrow, 1999). Les récepteurs 5-HT₄ ont la capacité d'interagir avec de telles protéines, car certains isoformes expriment aussi un domaine PDZ dans leur extrémité C-terminale. Les protéines SNX27 (Nexin 27) et NHERF, interagissant à travers le domaine PDZ de ces récepteurs, pourraient être des partenaires impliqués dans leur destin cellulaire et leur triage (Joubert et al., 2004). Le rôle de NHERF dans le recyclage des récepteurs 5-HT₄ est encore inconnu. Toutefois, il semble modifier la localisation subcellulaire de l'isoforme a et le rediriger dans les microvillis, où il est fortement exprimé. Quant à SNX27, elle est impliquée dans la régulation de la redirection membranaire. En effet, il semble rediriger l'isoforme a vers les endosomes précoces, puisqu'ils y ont été co-localisés. Ces observations suggèrent que les récepteurs 5-HT₄ pourraient subir différents sorts dû à leurs interactions distinctes.

Le domaine est retrouvé seulement dans les isoformes a et e et est absent dans les autres. Entre les isoformes a et e, ce domaine diffère, ce qui signifie que les 2 isoformes n'auront pas les mêmes interactions ni les mêmes destins cellulaires.

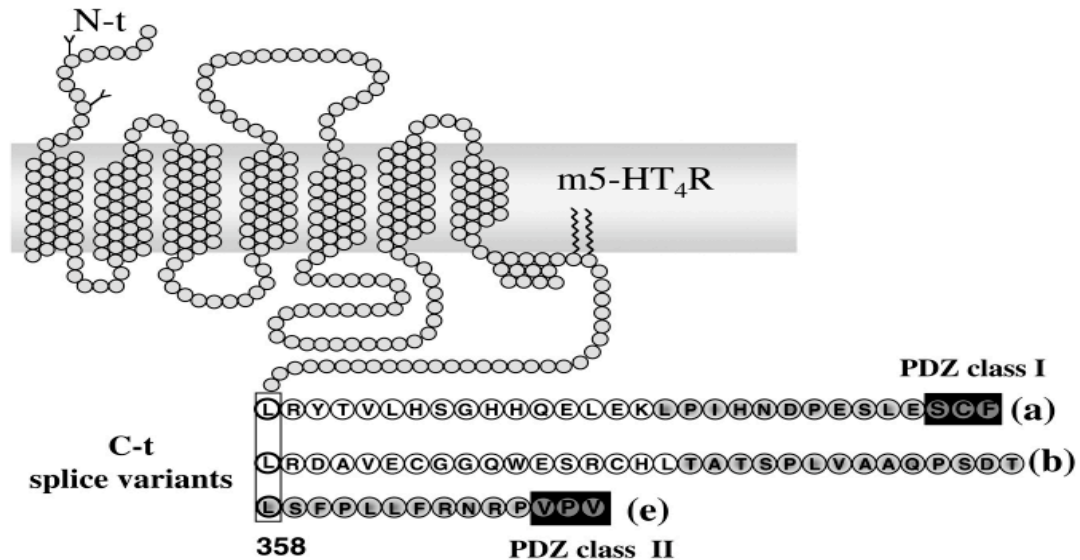


Figure 11 : La séquence C-terminale des isoformes a, b et e des récepteurs 5-HT₄ de la souris, avec domaine PDZ présent seulement dans les isoformes a (classe I) et e (classe II)

Les domaines PDZ diffèrent entre les isoformes a et e, entraînant des interactions de chacun avec différentes protéines. Image adaptée à partir de (Joubert et al., 2004).

3. La resensibilisation des récepteurs

La resensibilisation est un processus qui constitue un rétablissement de la réponse cellulaire et qui consiste en plusieurs étapes, dont la dissociation du complexe ligand-récepteur dans les compartiments précoces de l'endocytose (sorting endosome), la déphosphorylation des récepteurs, la dissociation des β -arrestines et le recyclage des récepteurs à la surface cellulaire (Bohm et al., 1997; Tsao & von Zastrow, 2000; von Zastrow & Kobilka, 1992).

Les phosphatases sont responsable de déphosphoryler les récepteurs phosphorylés par les GRK (Shih, Lin, Scott, Wang, & Malbon, 1999). La GRP (G-protein coupled receptor phosphatase) est une forme oligomérique de la phosphatase PP-2A une protéine phosphatase qui agit sur les résidus Ser et Thr des récepteurs β_2 -adrénergiques (Pitcher, Payne, Csontos, DePaoli-Roach, & Lefkowitz, 1995). L'interaction entre récepteurs et GRP dépend du pH intracellulaire des endosomes (Krueger, Daaka, Pitcher, & Lefkowitz, 1997). Ainsi, l'acidification des vésicules induit une modification de la conformation des récepteurs, essentielle à la déphosphorylation par la GRP (S. S. Ferguson & Caron, 1998). La séquestration est nécessaire pour la resensibilisation des récepteurs β_2 -adrénergiques (Yu, Lefkowitz, & Hausdorff, 1993). Pour cela, il a été reporté que les récepteurs endosomaux présentaient une stœchiométrie de phosphorylation plus basse que celle des récepteurs isolés de la membrane plasmique (S. S. Ferguson, 2001). Lorsque la séquestration est bloquée par la concanavalin A, elle prévient la déphosphorylation du récepteur et sa resensibilisation, sans affecter son couplage ni sa désensibilisation. De plus, l'inhibition de la phosphatase PP-2A, par la calyclin A, bloque la resensibilisation des récepteurs. Ainsi, la séquestration suivie de la déphosphorylation et du recyclage à la surface membranaire servent à restaurer la fonction des récepteurs désensibilisés (Pippig, Andexinger, & Lohse, 1995). Ils sont désormais prêts à restimuler la voie de signalisation en présence du ligand. Ce processus est caractérisé le mieux pour les récepteurs β_2 -adrénergiques, mais peut être applicable à plusieurs RCPG. Aucune étude ne s'est encore concentrée sur le recyclage des récepteurs 5-HT₄, de ce fait le mécanisme de resensibilisation est loin d'être clair. La figure 11 représente les différentes étapes de régulation des RCPG de la voie d'endocytose, la désensibilisation, l'internalisation, la resensibilisation et la dégradation lysosomale des RCPG.

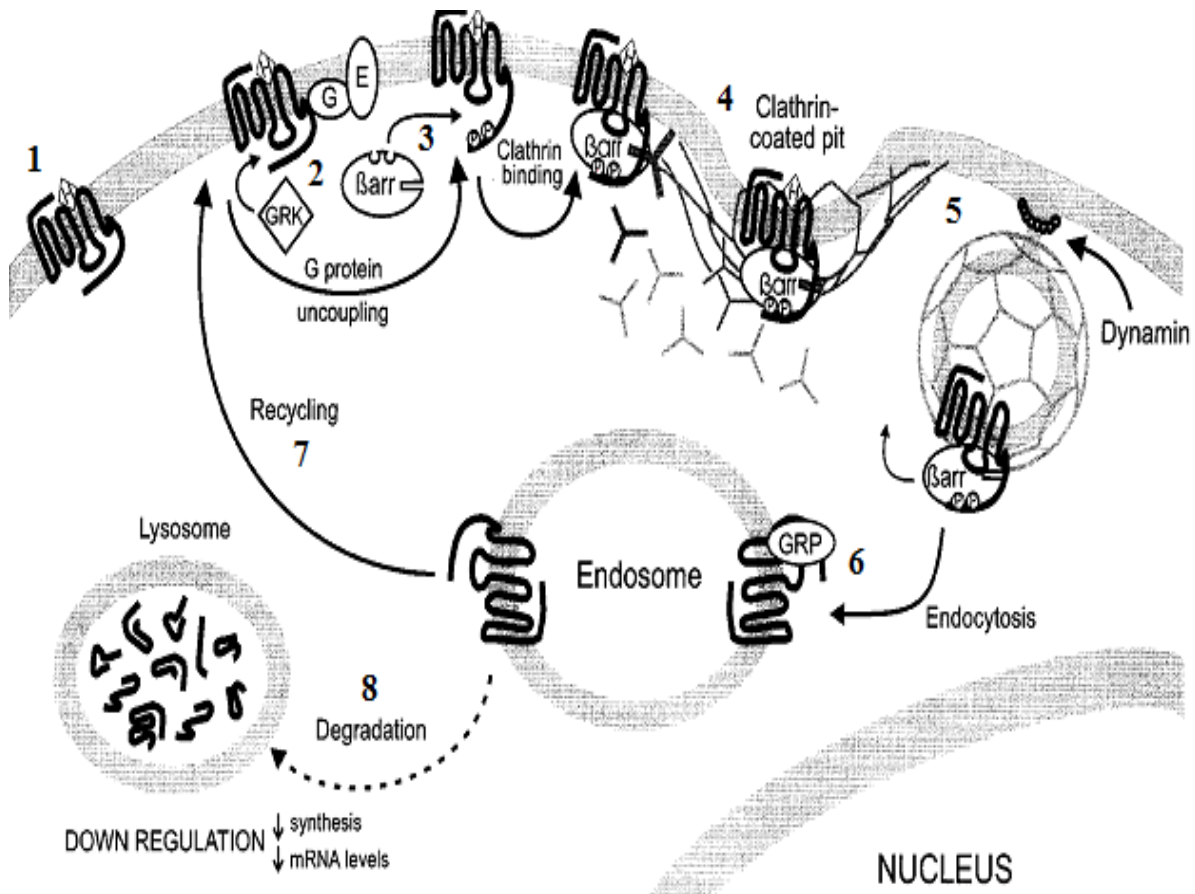


Figure 12 : Le mécanisme de désensibilisation, d'endocytose et de resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G après activation par agoniste

1) Les récepteurs sont activés en présence du ligand. La voie de régulation est déclenchée par une phosphorylation sur les résidus Ser et Thr dans leur 3^{ème} boucle intracellulaire et dans l'extrémité C-terminale. 2) La phosphorylation des récepteurs se fait par les GRK, qui entraîne 3) La liaison de la β -arrestine et le découplage du récepteur de la protéine G. 4) Les clathrines s'associent au récepteur à travers la β -arrestine. 5) Ceci entraîne l'internalisation des récepteurs dans des vésicules tapissées de clathrines, par l'intermédiaire de la dynamine. 6) Les récepteurs sont dirigés vers les endosomes, où ils peuvent subir soit une déphosphorylation par les GRP et 7) un recyclage à la membrane ou 8) une dégradation lysosomale. Abréviations : H, hormone, ici NT; G, hétérotrimérique protéine G; E, effecteur ou protéine effectrice; β arr, β -arrestine; GRK, G protein-coupled receptor kinase; GRP, G protein-coupled receptor phosphatase; P, groupe phosphate. Image adaptée à partir de (S. S. Ferguson & Caron, 1998).

VI. L'intérêt de cette étude

Le but de cette étude est de mieux caractériser les propriétés de signalisation et de régulation des récepteurs 5-HT₄, puisqu'ils semblent être des cibles putatives dans l'action des antidépresseurs de courte latence et de longue durée. Ces récepteurs sont exprimés dans des régions qui contrôlent les réponses émotives et de plaisir, particulièrement dans les régions du noyau accumbens et du striatum. Les isoformes qui y sont les plus abondants sont les isoformes a et b (Bender et al., 2000; Vilaro et al., 2002). Seulement, une bonne caractérisation de leur signalisation et de leur mécanisme de régulation est loin d'être établie encore, en raison d'un manque d'anticorps et de ligands spécifiques pouvant les distinguer. Nous avons été intéressés à étudier ces isoformes dans un système hétérologue afin de pouvoir caractériser les mécanismes de régulation de chacun d'eux.

Matériel et méthodes

1. Réactifs

Les réactifs chimiques suivants ont été obtenu de Sigma-Aldrich : la forskoline, l'isobutylmethylxanthine, la sérotonine (5-HT), la toxine pertussique (PTX), l'anticorps anti-FLAG M2, et le substrat o-phenylenediamine dihydrochlorure (SIGMA FAST™ ODP), la chéletrythrine, l'acide ascorbique et la poly-lysine. Les produits de culture cellulaire suivants proviennent de chez Wisent : G418 (geneticine), le milieu DMEM, le sérum bovin foetal, la glutamine, la pénicilline et la streptomycine. L'adénosine [³H] est fournie par PerkinElmer Life Sciences. La lipofectamine et l'anticorps Alexa 488 sont fournis par Invitrogen. La BSA est fournie par EMD chemicals. L'anticorps conjugués à une peroxidase (HRP) anti-souris a été fourni par Amersham Biosciences. L'anticorps anti-HA a été généreusement offert par Dr. L.E Trudeau (département de pharmacologie, Université de Montréal). L'inhibiteur H89 provient de Calbiochem. Le RS67333 provient de Tocris Bioscience. Le milieu «mounting» (Immu-Mount) pour immunofluorescence provient de Fisher. Quant aux plats de pétris utilisés, ils proviennent de Startedt.

2. Constructions d'ADN

L'ADNc des isoformes 5-HT_{4a} sont couplés à l'ADN de l'épitope FLAG à son domaine N-terminal par amplification PCR d'un plasmide pcDNA3 (Invitrogen) contenant une région codante de l'isoforme qui a été clonée par Vilaró et ses collègues (Vilaró et al., 2002). Cette amorce possède le site d'EcoRI, le codon initial ATG suivie de la séquence de l'épitope FLAG et les 26 premiers nucléotides de la région codante des récepteurs 5-HT₄ (dont son propre codon ATG a été exclu). L'utilisation d'anticorps dirigés vers cet épitope permet de mettre en évidence le

récepteur sans en modifier les propriétés de signalisation. L'amorce antisens contient les derniers 21 nucléotides de la région codante correspondant au domaine C-terminale de l'isoforme 5-HT_{4a} et au site de restriction NotI. Le produit d'amplification des récepteurs a été purifié sur gel, digéré par EcoRI et NotI afin de l'introduire dans un plasmide pcDNA3. Les plasmides ont été vérifiés par séquençage. Quant aux isoformes 5-HT_{4b}, ils sont couplés à l'hémagglutinine (HA) au domaine N-terminale et ont été procurés du Missouri S&T cDNA Resource Center. Les ADNc de GRK2 sauvage (Wild Type) et du dominant négatif de GRK2 (GRK2-K220R) ont été généreusement fournis par le laboratoire du Dr. F. Mayor (Departamento de Biología Molecular et Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Espagne). Le dominant négatif de β -arrestine β arr(319-418) provient aimablement du laboratoire du Dr. M. Bouvier (Département de Biochimie, Université de Montréal). La GRK2-K220R est inactive en raison de la mutation du résidu lysine (K) en position 220 en une arginine (R) qui interfère avec son activité kinase. L'ADNc β arr(319-418) au fragment de l'extrémité C-terminale de la β -arrestine 1 et fonctionne comme dominant négatif parce qu'elle compétitionne avec la β -arrestine fonctionnelle endogène.

3. Culture cellulaire et transfection

Les cellules embryonnaires humaines rénales HEK293 ont été transfectées avec 4 μ g d'ADNc (par pétri de 100 mm) des récepteurs humains 5-HT_{4a}-(FLAG) ou 5-HT_{4b}-(HA) pour exprimer l'un ou l'autre de ces récepteurs de façon stable. Les lignées cellulaires ont été produites en utilisant la lipofectamine et ont été sélectionnées à l'aide de 500 μ g/ml de G418. Quant aux transfections transitoires, effectuées à l'aide de la polyéthylèneimine, les cellules HEK 293 ont été co-exprimées avec l'un ou l'autre isoforme (15 μ g) et soit le vecteur vide pcDNA3 (8 μ g) soit la GRK2 sauvage (8 μ g) soit encore le double mutant négatif de GRK2 (GRK2-K220R) (8 μ g) pour étudier l'effet de GRK2 dans l'internalisation. Pour étudier l'effet de la

β -arrestine, les cellules ont été co-exprimées avec 15 μg d'un des isoformes et le soit le vecteur pcDNA3 (8 μg) soit le double mutant négatif $\beta\text{arr}(319-418)$ (8 μg). Les niveaux d'expression ont été vérifiés grâce aux études de radio-liaison par [^3H]GR113808, tout en s'assurant de garder le B_{max} entre 300 et 400 fmol/mg. Les lignées cellulaires ont été cultivées en monocouche dans des pétris contenant du milieu DMEM enrichi de 10 % (v/v) de sérum de bovin fœtal, 1000 unités/100ml de pénicilline, 1 mg/ml de streptomycine et de 5 mM de glutamine dans une atmosphère humide de 5 % CO_2 à 37°C. Avant chaque expérience, le sérum a été enlevé du milieu au moins 16 heures avant le début de l'expérience, afin de s'assurer que les traces de 5-HT présentes dans le sérum soient retirées du milieu.

4. Essai d'accumulation d'AMPC

Les cellules ont été exposées dans du milieu DMEM complet (sans sérum) en présence d' [^3H]-Adénine (1 $\mu\text{Ci/ml}$; 1Ci = 37 GBq), pendant au moins 16h. L'adénine tritiée est perméable à la membrane et peut s'introduire à l'intérieur de la cellule afin d'être incorporée dans l'ATP produit par la cellule, qui à son tour produit de l'AMPC marqué. Le jour de l'expérience, le milieu radioactif est enlevé et est remplacé par du milieu DMEM frais à 37°C. Les cellules sont ensuite décollées, de façon mécanique, et lavées à plusieurs reprises (4 fois) au PBS (phosphate buffered solution) 4°C. La viabilité cellulaire a été vérifiée grâce à une coloration au bleu de trypan; une viabilité de 95% était considérée acceptable. Les cellules sont par la suite incubées pendant 20 min à 37°C dans une solution contenant 300 μl de PBS/0,1 μM forskolin/2,5 μM isobutylmethylxanthine (IBMX) où on a dilué soit la drogue 5-HT aux concentrations 10^{-12} à 10^{-5} M, soit la drogue RS67333 aux concentrations 10^{-11} à 10^{-4} M. L'acide ascorbique (1 mM) a été rajouté dans les deux cas afin de protéger la 5-HT ou le RS67333 contre l'oxydation. La réaction est arrêtée sur glace à l'aide d'une solution contenant 5% acide trichloroacétique, 5 mM ATP et 5mM AMPC non marqués. Après centrifugation de 30 min à 4°C à 1200 g, l' [^3H]-ATP est

séparée de l' [³H]-AMPc par chromatographie séquentielle sur colonnes de résine Dowex et d'oxyde d'aluminium (Alumine). Quant à la désensibilisation des récepteurs par le RS67333, elle a été accomplie, le jour de l'expérience, en rechangeant le milieu pour du DMEM frais et en incubant les cellules pendant 120 min en présence d'un milieu contenant le RS67333 (10 µM) et l'acide ascorbique (1 mM). Pour les expériences mettant en perspective l'inhibition de la protéine Gαi par la toxine pertussis (PTX), les cellules sont incubées durant la nuit (au moins 16h) avec 100 nM de PTX (ou avec un véhicule dans les conditions contrôles), en plus de la radioactivité. Les résultats ont été exprimés selon le ratio : ($[\text{^3H}]\text{AMPc} / ([\text{^3H}]\text{ATP} + [\text{^3H}]\text{AMPc})$). Les effets de la 5-HT, seule ou en présence de PTX, et du RS67333 ont été exprimés en % de changement par rapport à la production d'AMPc en absence de ligand (niveau basal). Les résultats de l'effet de la désensibilisation des récepteurs ont été normalisés par rapport à l'effet de la 5-HT observé dans les conditions contrôles correspondantes.

5. Internalisation

La quantification des récepteurs à la surface membranaire a été effectuée à l'aide de la technique ELISA adaptée à partir des méthodes déjà publiées (Lavoie et al., 2002; Terrillon & Bouvier, 2004). Les cellules ont étéensemencées à une densité de 10⁵ cellules par puits dans une plaque de 24 puits couverts de poly-lysine au moins pendant 48h. Elles ont été laissées croître pendant 2 jours. La veille de l'expérience, le milieu a été changé pour du DMEM (sans sérum). Le jour de l'expérience, pour les études de comparaison des internalisations entre les 2 isoformes, la 5-HT (1µM) ou le RS67333 (100 µM) ou encore le véhicule ont été introduits dans un nouveau milieu d'incubation contenant du DMEM/acide ascorbique 1 mM aux temps indiqués sur les figures. Lorsque les effets du H89 (10 µM), l'inhibiteur de PKA, et de la chélerythrine (6 µM), l'inhibiteur de PKC ont été étudiés, ils ont été introduits 30 min avant le début de l'expérience. Une plaque a

toujours été traitée par un véhicule comme contrôle. Dans ces plaques, les cellules ont été lavées au DMEM basic à 37°C (3 X) et la stimulation par la 5-HT (1 µM) a été telle que venant d'être décrite. La réaction d'internalisation a été arrêtée par l'addition du PBS (4°C) sur glace, servant aussi de lavage (3X). Les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde (3%) pendant 15 min à 4°C. Le blocage des sites non spécifiques a été fait par une solution de PBS/BSA (1%) durant 30 min à température pièce. Les cellules, exprimant séparément les isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}, ont été incubées respectivement avec les anticorps primaires anti-FLAG M2 (1:1000 dans PBS/BSA (1%)) ou anti-HA (1:5000 dans PBS/BSA (1%)) durant 1 heure, toujours à température pièce. Les cellules ont été ensuite lavées à 3 reprises avec PBS avant d'être exposées à un anticorps anti-souris conjugué à une peroxidase (Horseradish ou HRP) (1:5000 PBS/BSA (1%)). Les cellules ont été lavées encore au PBS pendant 30 min et 200 µl de substrat HRP o-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FAST™ OPD) ont été rajoutés dans tous les puits. La réaction a été laissée progresser entre 8 à 15 minutes et a été arrêtée avec une solution de HCL 3N. La densité optique a été évaluée à 492 nm dans un lecteur de micro-plaques (Victor; Perkin Elmer) de 96 puits dans lesquelles 200 µl du mélange formé a été transféré. La lecture de la densité optique (DO) correspond au signal généré par les récepteurs demeurés à la surface cellulaire. La quantité de récepteurs internalisés à la suite de l'exposition de 5-HT (1 µM) ou RS67333 (100 µM) a été calculée en soustrayant la DO obtenue en présence de l'agoniste de celle obtenue en son absence. Les résultats sont exprimés en pourcentage de récepteurs initialement présent à la surface cellulaire selon le ratio : $((OD^{basal} - OD^{stimulé})/OD^{basal}) \times 100$ où OD^{basal} et $OD^{stimulé}$ sont les densités optiques des récepteurs en absence ou en présence de 5-HT ou RS67333 respectivement, aux différents temps. Ils correspondent aux résultats de l'internalisation en pourcentage de récepteurs en surface avant traitement (Figure 13). Les résultats des différents traitements pour modifier l'internalisation ont été normalisés selon l'internalisation induite par la 5-HT correspondant à la condition

non traitée et correspondent au pourcentage d'internalisation maximale observée en contrôle (Figures 15-17).

6. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les analyses d'immunofluorescence liées à ce projet ont été effectuées par Mohammad Amraei Gholi, un membre du laboratoire. Les cellules HEK transfectées de façon stable ont été ensemencées sur une lamelle et sont laissées croître comme décrit précédemment. Le jour de l'expérience, les cellules sont incubées ou non avec les agonistes RS67333 ou 5-HT (10 μ M; 37°C) aux temps indiqués. Le traitement a été arrêté par des lavages avec du PBS froid (4°C), et par la suite les cellules ont été fixées à l'aide de paraformaldéhyde à 3 % (15 min, à température pièce) suivies par une perméabilisation avec 0,1 % Triton X-100 (15 min). Avant d'être incubées aux anticorps primaires anti-souris (1:1000 pour anti-FLAG M2 et 1:3000 pour anti-HA) pendant une heure, les sites non spécifiques ont été bloqués avec PBS-BSA 1%. Après 3 lavages au PBS-BSA 1%, les cellules ont été exposées durant 30 min à l'anticorps secondaire Alexa 488 conjugué à un fluorochrome (1:1000, température pièce). À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées et les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide du milieu «mounting» (Immu-Mount). La microscopie a été effectuée par un microscope Olympus de modèle 1X81 équipé d'un système confocal Olympus DSU («disk scanning unit»). Les images ont été analysées par ImageJ software.

7. Analyse statistique

Les analyses statistiques et l'ajustement des courbes sont effectués à l'aide de la version 4 du logiciel Graph Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Les tests utilisés sont : ANOVA (one et two way), post hoc Tukey, ainsi que Student's T.

Certains résultats ont été effectués par certains membres du laboratoire, mais ont été inclus dans le mémoire puisqu'ils étaient conclusifs. Mohammad Gholi Amraei a effectué l'internalisation des isoformes a et b en présence de RS67333 ainsi que l'expérience d'immunofluorescence sur les cellules HEK293 en présence des 2 agonistes. L'expérience d'immunofluorescence sur les neurones, qui sera discutée dans la discussion, a été effectuée par Elodie Archer-Lahlou.

Résultats

1. Modulation de la production d'AMPC par les isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}

La capacité des isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} de moduler l'AMPC a été évaluée dans les cellules HEK293, exprimant la même quantité d'un ou l'autre des isoformes de manière stable. On remarque que la 5-HT et le RS7333 ont des effets différents sur la production d'AMPC. Dans les cellules exprimant l'isoforme 5-HT_{4a}, le ligand endogène induit une baisse dose dépendante dans la production d'AMPC avec une inhibition maximale (E_{max}) de -36 ± 3 % par rapport au basal (Figure 13 A). Au niveau de l'isoforme b, la 5-HT induit une réponse biphasique avec une augmentation dans la production basale d'AMPC entre les concentrations de 0 et 100 nM du neurotransmetteur suivie d'une diminution des niveaux du second messager aux concentrations supérieures (Figure 13 B). Afin de comprendre quel est le mécanisme responsable de la portion inhibitrice de la courbe, les cellules exprimant l'isoforme b ont été prétraitées au PTX (100 ng/ml; 16 h), qui permet d'inactiver la protéine G α i (Steiner, Saya, Schallmach, Simonds, & Vogel, 2006). Le traitement a transformé l'effet biphasique de la 5-HT en une augmentation monotonique, dont l'effet maximale (19 ± 3 %; Figure 13 B) n'était pas différent de l'augmentation maximale produit par le neurotransmetteur dans le système intacte (27 ± 5 % à 10 nM) ni de l'augmentation produit par l'agoniste synthétique RS67333 (20 ± 9 %; Figure 13 B). Dans le cas de l'isoforme a, la toxine pertussique a transformé la réponse inhibitrice de la 5-HT en une stimulation. Même si cette augmentation n'a pas atteint la signification statistique, l'inactivation de la protéine G α i a dévoilé une capacité de cette isoforme à augmenter la production d'AMPC (augmentation maximale 17 ± 3 %; Figure 13 A). Comme pour l'isoforme b, cette augmentation ne diffère pas de l'effet maximal produit par le RS67333 (20 ± 5 %; Figure 13 B).

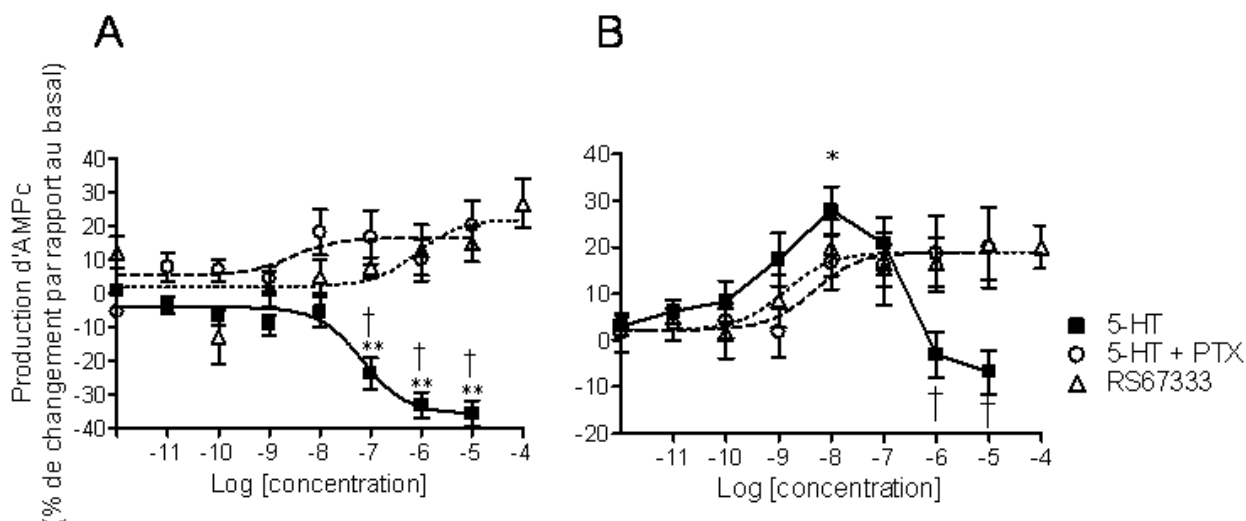


Figure 13 : Les isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} diffèrent dans leur modulation de production d'AMPc induite par la 5-HT

Les cellules HEK293, transfectées stablement soit avec les isoformes 5-HT_{4a}-FLAG (A) ou 5-HT_{4b}-HA (B), ont été utilisées dans les essais d'accumulation d'AMPc afin de générer des courbes doses réponses pour chacun des traitements selon les concentrations indiquées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de production d'AMPc par rapport au basal et représentent la moyenne \pm e.s.m pour au moins 5 expériences chaque. A) Pour l'isoforme a, un test ANOVA (one-way) suivi d'analyses post hoc révèlent que la 5-HT inhibe significativement la production d'AMPc ($F(7,188) = 16.69, p < 0.01$), un effet significatif aux concentrations 100 nM, 1 μ M et 10 μ M (-7, -6 et -5) (Tukey, $**p < 0.01$). Le blocage de la sous-unité G α i avec PTX 100 ng/mL (5-HT+PTX) a renversé l'effet inhibiteur observé aux hautes concentrations. Un ANOVA comparant les conditions 5HT et 5HT+PTX a révélé un effet de traitement ($F(1,237) = 58.84, p < 0.01$, de concentration ($F(7,237) = 2.56, p < 0.05$ et une interaction ($F(7,237) = 6.01, p < 0.01$); le test de Tukey indique que la production d'AMPc est différente aux concentrations 100 nM à 10 μ M (-7 à -5) (Tukey, $\dagger p < 0.01$). Pour la condition RS67333, l'ANOVA (one-way) indique un effet de concentration ($F(7,39) = 3.67, p < 0.01$), mais aucune des concentrations ne diffèrent significativement du basal. La production maximale d'AMPc induite par 5-HT+PTX et par RS67333 ne diffère pas. B) Pour l'isoforme b, un ANOVA (one-way) indique que la 5-HT a un effet biphasique sur la production d'AMPc ($F(7,172) = 6.76, p < 0.01$) et que la production d'AMPc à la concentration de 10 nM (-8) est significativement plus élevée par rapport au basal ($*p < 0.01$) et par rapport à l'effet induit avec 1 μ M et 10 μ M (-5 et -6; Tukey, $\dagger p < 0.01$). Comme pour l'isoforme a, le traitement avec PTX a renversé l'inhibition d'AMPc induite par la 5-HT, mais l'ANOVA two-way n'a pas indiqué d'effet de traitement. Cependant, un t-test comparant la production d'AMPc avec 5HT à 10 nM et 5HT+PTX à 10 μ M n'indique pas de différence ($t(27) = 0.67, p = 0.51$). La comparaison de la production maximale induite par les trois traitements (5-HT à 10 nM (-8), 5-HT+PTX à 10 μ M (-5) et RS67333 à 100 μ M (-4)) n'a pas indiqué de différences.

2. Régulation de la signalisation des isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}

a. Internalisation

L'internalisation est l'un des pas initiaux du processus de régulation des signaux générés par les RCPG. Nous avons donc comparé la capacité du neurotransmetteur endogène à internaliser chacun des isoformes. La quantité des récepteurs membranaires séquestrés vers l'intérieur de la cellule a été évaluée par la technique ELISA. Les résultats indiquent que l'exposition à la 5-HT produit une internalisation effective pour les deux isoformes dont la magnitude est plus élevée pour l'isoforme b (61 ± 3 % des récepteurs membranaires ont été internalisés; Figure 14) que pour l'isoforme a (40 ± 2 % des récepteurs membranaires ont été internalisés; Figure 14). Les demi-vies $t_{1/2}$ d'internalisation de l'isoforme a et b, c'est-à-dire les temps nécessaires pour que la moitié des récepteurs soit internalisée, ont été semblables (10 min pour le a vs 9,3 min pour le b), ce qui indique que la vitesse à laquelle l'internalisation de chaque isoforme s'effectue ne diffère pas l'une de l'autre. Quant à l'internalisation par le RS67333, son effet a été négligeable pour chacun des isoformes, avec des internalisations maximales de 17 ± 4 % pour l'isoforme a et 13 ± 3 % pour l'isoforme b. Les demi-vies $t_{1/2}$ sont respectivement 5,9 min et 6,8 min (Figure 13).

Afin de confirmer ces observations et dans le but de caractériser la distribution subcellulaire des récepteurs internalisés, la technique d'immunofluorescence a été appliquée. Les résultats montrent qu'en absence de ligand les isoformes a et b s'expriment à la membrane (Figure 14). L'incubation à la 5-HT induit une réduction du marquage membranaire, dépendant du temps et qui correspond à une augmentation du marquage intracellulaire. La comparaison de l'immunoréactivité intracellulaire indique que la distribution des isoformes a et b est

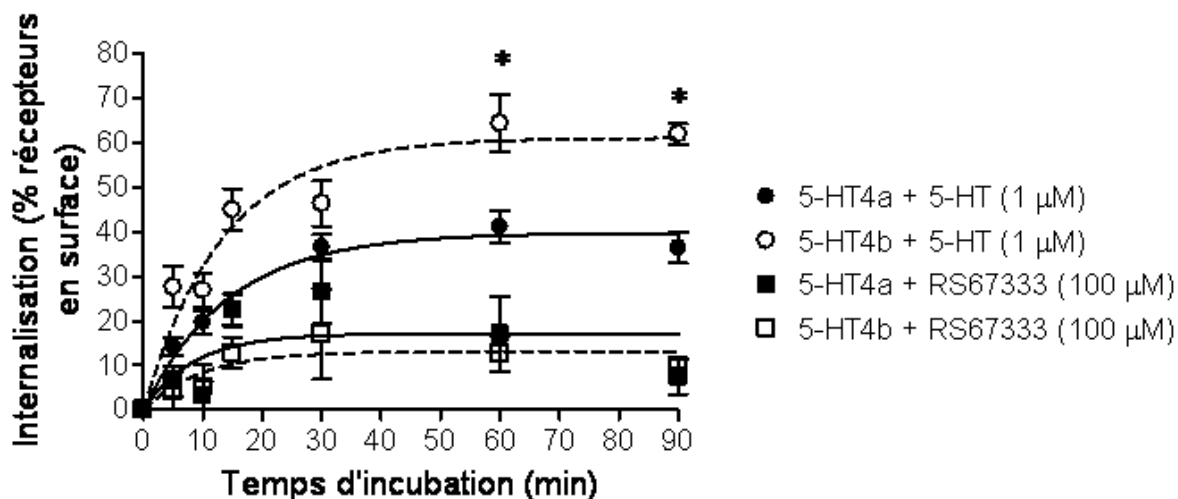


Figure 14 : La 5-HT et le RS67333 modulent différemment l'internalisation des 2 isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}

Le graphique représente l'internalisation des récepteurs en fonction du temps pour les 4 conditions indiquées. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la densité des récepteurs initialement présents à la membrane et représentent la moyenne \pm e.s.m pour au moins 3 expériences chaque. Un test ANOVA (two-way) révèle des effets de condition ($F(3,143) = 54.83$; $p < 0.01$) et de temps ($F(6,43) = 27.20$, $p < 0.01$), ainsi qu'une interaction ($F(18,143) = 3.65$, $p < 0.01$). Les tests post hoc de Tukey indiquent que la 5-HT produit une plus grande internalisation maximale de l'isoforme b par rapport à l'isoforme a (* $p < 0.05$). L'incubation avec le RS67333 n'a aucun effet sur l'internalisation des isoformes.

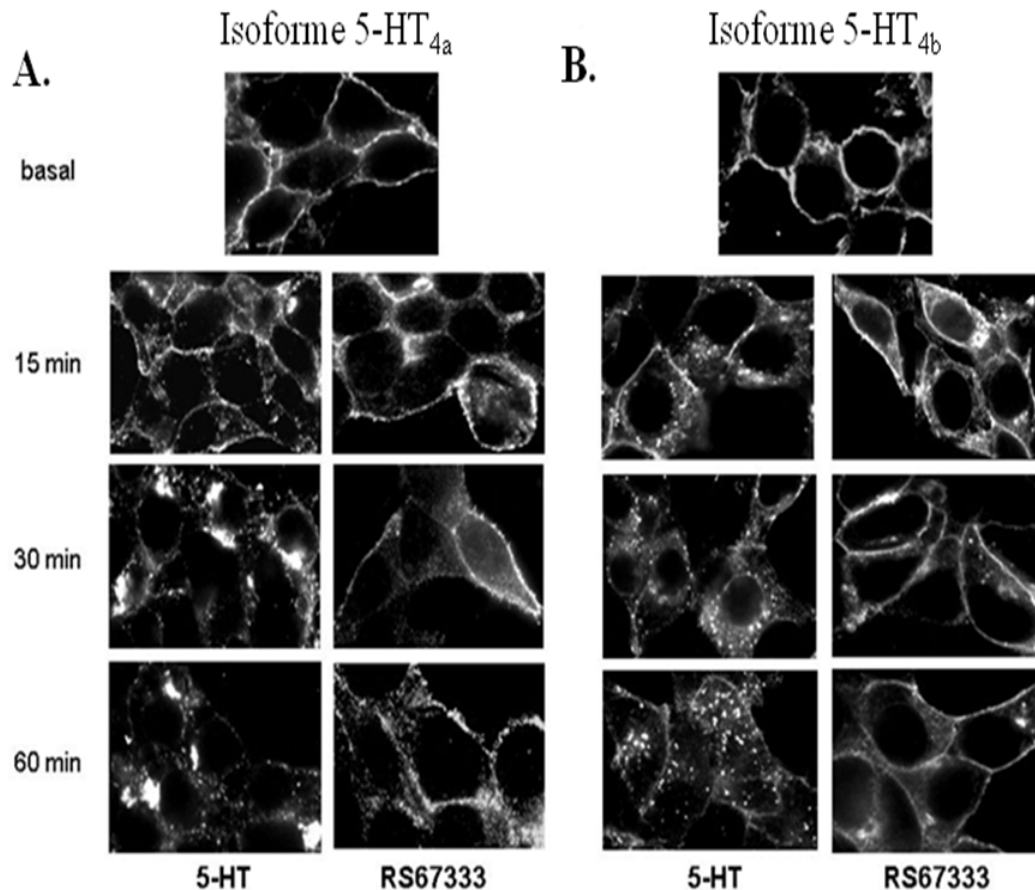


Figure 15 : La 5-HT, et non le RS67333, induit l'internalisation des isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} dans les cellules HEK 293 et leur distribution post-endocytaire est spécifique à chacun d'eux

Les cellules HEK293, stablement transfectées avec les isoformes 5-HT_{4a}-FLAG (A) ou 5-HT_{4b}-HA (B) et ont étéensemencées sur des lamelles. Le jour de l'expérience, les cellules ont été exposées au 5-HT ou RS67333 (10 μM; 37°C) aux périodes de temps indiquées. À la fin du traitement, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Elles ont été ensuite incubées aux anticorps primaires correspondant suivies de l'anticorps secondaire conjugué à Alexa Fluor 488. Les images d'immunofluorescence sont obtenues par le microscope Olympus équipé d'un système confocal DSU («disk scanning unit»).

différente. Le signal correspondant à l'isoforme b montre une distribution uniforme à travers le cytoplasme (Figure 15 B), alors que l'immunomarquage pour l'isoforme a produit rapidement des congglomérats, suggérant son accumulation dans le compartiment périnucléaire (Figure 15 A). Quant à l'incubation au RS67333, elle ne produit pas de redistribution de récepteurs vers le compartiment intracellulaire. Ces observations confirment les résultats quantitatifs observés lors de l'ELISA (Figure 14), et montrent que la 5-HT produit l'internalisation des 2 isoformes tandis que le RS67333 a un effet minimal sur leur séquestration.

b. Rôle des kinases PKA et PKC

En raison de leur internalisation maximale et leur distribution subcellulaire distinctes à la suite d'une incubation à la 5-HT, on a été intéressé de déterminer si les mécanismes impliqués dans l'internalisation des 2 isoformes différaient. Pour ceci, nous avons voulu évaluer l'implication des kinases responsables de la désensibilisation homologue et hétérologue du récepteur, ainsi que la contribution de la β -arrestine. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle tel qu'apparaissant dans la Figure 14. Afin de tester si les isoformes a et b subissaient une régulation hétérologue, nous avons utilisé des inhibiteurs de PKA et PKC, deux kinases activées par les récepteurs 5-HT₄. Les résultats montrent que l'inhibiteur de la PKA, H89, n'altère pas les internalisations des 2 isoformes, puisqu'ils atteignent la même internalisation observée chez les contrôles (105 ± 6 % du contrôle pour l'isoforme a et 95 ± 5 % du contrôle pour l'isoforme b; Figures 16 A et B). Toutefois, la PKC est essentielle à l'internalisation des 2 isoformes puisque l'inhibiteur de PKC, chélerythrine, inhibe complètement leur séquestration (internalisation maximale de 2 ± 5 % comparativement à 12 ± 5 % du contrôle pour les isoformes a et b). Ensemble, ces observations montrent que la PKC, et non la PKA, est essentielle à l'internalisation des récepteurs 5-HT₄.

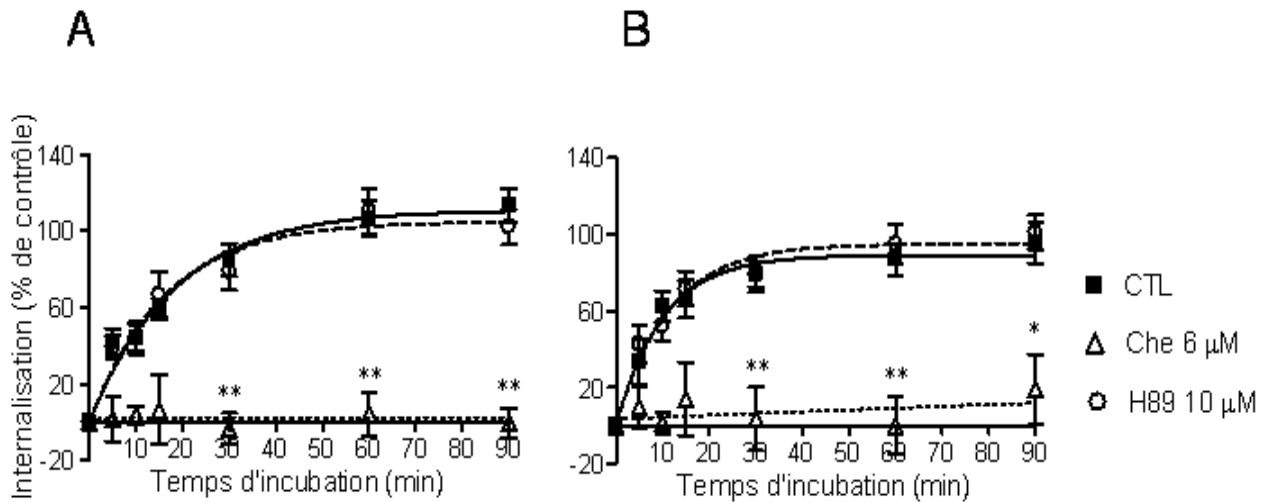


Figure 16 : La PKC, et non la PKA, est essentielle à la séquestration des isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}

Les cellules HEK293, stablement transfectées avec les isoformes 5-HT_{4a}-FLAG (A) ou 5-HT_{4b}-HA (B), ont été pré-traitées avec Che, H89 ou rien, et ensuite exposées à la 5-HT (1 μM) durant les périodes de temps indiquées. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne ± e.s.m pour au moins 6 expériences chaque. A) Le blocage de la PKC avec Che prévient l'internalisation de l'isoforme a induite par la 5-HT, tandis que blocage de la PKA avec H89 n'a aucun effet sur cette mesure (ANOVA (two-way) : effet de traitement ($F(2,201) = 82.25$, $p < 0.01$) et de temps ($F(6,201) = 23.59$, $p < 0.01$), ainsi qu'une interaction ($F(12,201) = 4.90$, $p < 0.01$); ** $p < 0.01$ vs CTL, Tukey). B) De façon similaire, le blocage de la PKC, mais pas la PKA, atténue l'internalisation de l'isoforme b induite par la 5-HT (ANOVA (two-way) : effets de traitement ($F(2,185) = 48.39$, $p < 0.01$) et de temps ($F(6,185) = 14.44$, $p < 0.01$), ainsi qu'une interaction ($F(12,2185) = 2.47$, $p < 0.01$; ** $p < .01$, * $p < 0.05$, Tukey).

b. Rôle de la protéine GRK2

Afin de tester si les isoformes a et b partageaient leur mécanisme de désensibilisation homologue, nous avons utilisé des formes actives et inactives de GRK2 (GRK2 sauvage et GRK2-K220R), une kinase qui, selon ce que les études antérieures ont pu démontrer, entraînait une séquestration de l'isoforme a (Barthet et al., 2005). Nous avons observé que la surexpression de la GRK2-K220R inhibait l'internalisation de l'isoforme a par la 5-HT de près de la moitié, atteignant une internalisation maximale de $52 \pm 10 \%$ (Figure 17A) de la séquestration observée dans les cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3. D'autre part, la surexpression de la GRK2 sauvage n'induit aucune différence d'internalisation par rapport au vecteur vide pcDNA3, ce qui indique que les kinases endogènes seraient suffisantes pour induire l'internalisation de l'isoforme a observé dans les cellules HEK293. Quant à l'isoforme b, ni la surexpression de la GRK2 sauvage ni le dominant négatif n'ont modifié l'internalisation observée dans les cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3 (Figure 17 B). Ensemble, ces observations indiquent que l'internalisation de l'isoforme a est la seule à être sensible à l'action de la GRK2.

c. Rôle de la β -arrestine

Afin de vérifier si la β -arrestine était impliquée dans la séquestration de chacun des isoformes nous avons utilisé la β arr(319-418) qui correspond à la portion terminale de la β -arrestine 1 et agit comme dominant négatif au niveau de l'internalisation (Sneddon & Friedman, 2007). Nous avons observé que la surexpression de la β arr(319-418) a abolit l'internalisation de l'isoforme a (Figure 18 A) mais que ce même mutant ne réduisait l'internalisation de l'isoforme b que de moitié ($69 \pm 17 \%$; Figure 18 B). Ces résultats démontrent que l'internalisation de l'isoforme a nécessite davantage l'action de la β -arrestine pour induire leur séquestration.

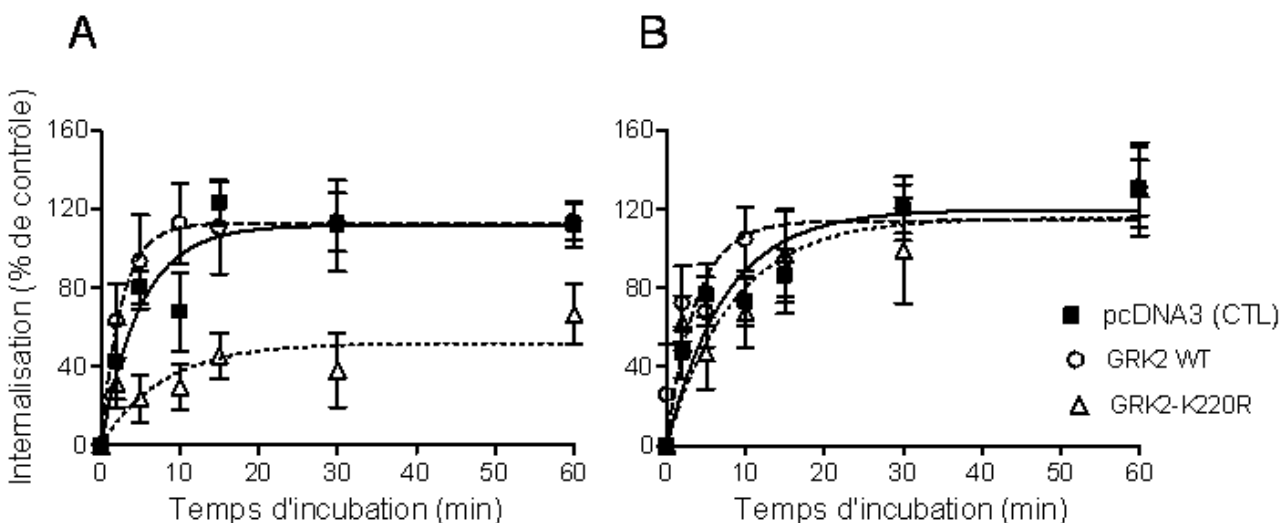


Figure 17 : L'internalisation de l'isoforme a, et non de l'isoforme b, est sensible à l'inactivation de GRK2

Les cellules HEK293, transitoirement co-transfectées avec les isoformes 5-HT_{4a}-FLAG (A) ou 5-HT_{4b}-HA (B) et avec les constructions d'ADN indiquées, ont été exposées à la 5-HT (1 μ M). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm e.s.m pour au moins 8 expériences chaque. A) Pour l'isoforme a, un test ANOVA (two-way) révèle que la 5-HT induit une internalisation réduite face à l'inactivation de la GRK2 (effets de construction ($F(2,205) = 10.33$, $p < 0.01$) et de temps ($F(6,205) = 7.46$, $p < 0.01$ mais pas d'interaction). B) Pour l'isoforme b, l'inactivation de la GRK2 n'a pas d'effet sur l'internalisation induite par la 5-HT (ANOVA (two-way): effet de temps ($F(6,252) = 16.31$; $p < 0.01$) mais pas de construction). La co-transfection des isoformes a et b par la GRK2 WT n'affecte pas l'internalisation induite par la 5-HT par rapport au CTL.

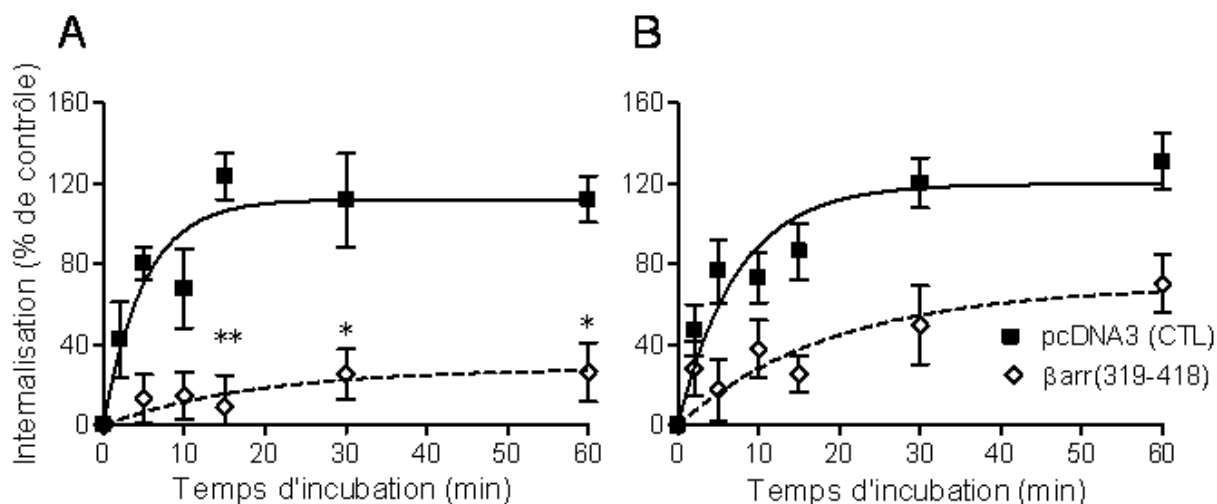


Figure 18 : L'internalisation de l'isoforme a est dépendante largement de la β -arrestine, tandis que l'internalisation de l'isoforme b en est partiellement dépendante

Les cellules HEK293, transitoirement co-transfectées avec les isoformes 5-HT_{4a}-FLAG (A) ou 5-HT_{4b}-HA (B) et avec les constructions d'ADN indiquées, ont été exposées à la 5-HT (1 μ M). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm e.s.m pour au moins 9 expériences chaque. A) Pour l'isoforme a, l'internalisation maximale induite par la 5-HT est réduite en présence de l'inactivation de la β -arrestine par rapport au CTL ou pCDNA3 (ANOVA (two-way) : effet de construction ($F(1,217) = 63.88, p < 0.01$) et de temps ($F(6,217) = 7.25, p < 0.01$), ainsi qu'une interaction ($F(6,217) = 2.87, p < 0.05$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey). B) Pour l'isoforme b, la β arr(319-418) réduit aussi l'effet de la 5-HT sur l'internalisation (ANOVA (two-way) : effets de construction ($F(1,182) = 31.55, p < 0.01$) et de temps ($F(6,252) = 16.31, p < 0.01$) mais pas d'interaction. Une comparaison des effets de β arr(319-418) sur les isoformes a et b a révélé que l'internalisation de l'isoforme b induite par la 5-HT est plus grande que celle de l'isoforme a (ANOVA two-way : effet d'isoforme ($F(1,140) = 8.33, p < 0.01$, de temps ($F(6,140) = 2.94, p < 0.01$)).

d. Désensibilisation soutenue des isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} par le RS67333

Après avoir établi que les isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} détiennent différents mécanismes de régulation, nous avons voulu déterminer s'ils s'adaptent différemment face à une exposition prolongée (120 min) à l'antidépresseur putatif RS67333. Les adaptations fonctionnelles ont été évaluées grâce aux essais d'accumulation d'AMPC où nous avons comparé la capacité du neurotransmetteur endogène à modifier la production du second messager dans les cellules traitées ou non avec le RS67333 (10 µM; 120 min). Les résultats montrent que l'exposition soutenue de l'isoforme a au RS67333 n'a pas significativement modifié la capacité de la 5-HT à inhiber les niveaux d'AMPC dont l'inhibition maximale après désensibilisation a atteint 76 ± 11 % de celle observée chez les contrôles (Figure 19 A). Quant à l'isoforme b, l'incubation soutenue avec RS67333 a aboli l'effet de la 5-HT sur la production d'AMPC (Figure 19 B). Ces observations indiquent que l'exposition maintenue au RS67333 bloque sélectivement la capacité de signalisation de l'isoforme b.

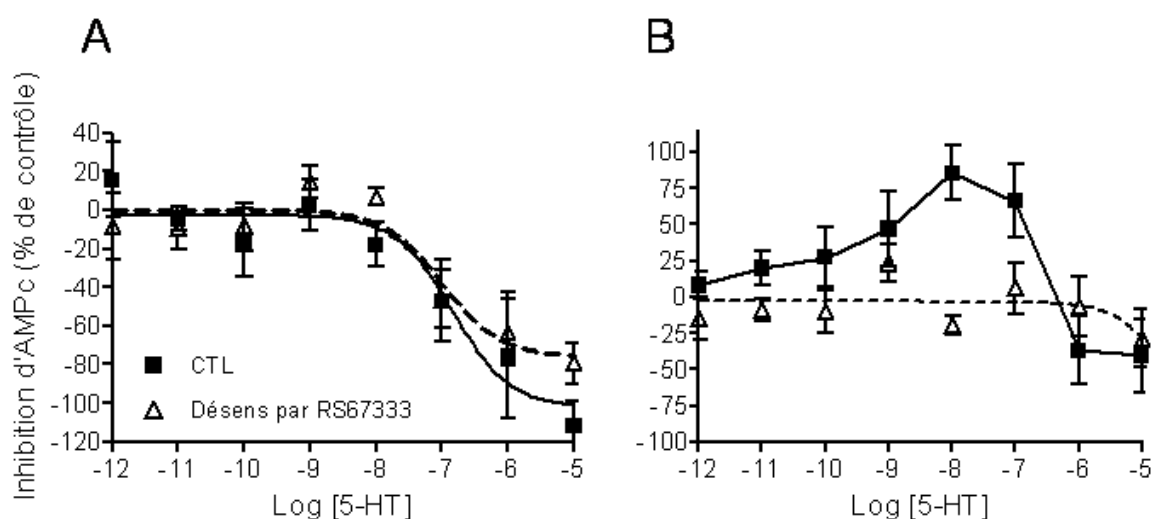


Figure 19 : Exposition soutenue au RS67333 abolit seulement la capacité de 5-HT de réguler la production d'AMPC de l'isoforme b.

Les cellules HEK293, transfectées stablement avec les isoformes 5-HT4a-FLAG (A) ou 5-HT4b-HA (B), ont été exposées à [³H]-Adénine pendant la nuit. Les cellules sont désensibilisées (ou non) avec le RS67333 (10 μM) pendant 120 min et sont utilisées dans l'essai d'accumulation d'AMPC. Les courbes doses réponses ont été effectuées en incubant les cellules à la 5-HT aux concentrations indiquées. Les résultats sont normalisés par rapport à la production maximale d'AMPC obtenue par les cellules contrôles et représentent la moyenne ± e.s.m pour au moins 5 expériences chaque. A) Le RS67333 ne désensibilise pas l'isoforme a (ANOVA (two-way) : seulement un effet de concentration ($F(7,60) = 10.81, p < 0.01$)). B) Pour l'isoforme b, la pré-incubation au RS67333 abolit complètement l'effet la production d'AMPC induite par la 5-HT (ANOVA (two-way) : effet de traitement ($F(1,201) = 7.22, p < 0.01$) et de concentration ($F(7,201) = 2.91, p < 0.01$)).

Discussion

Les récepteurs 5-HT₄ sont largement distribués dans les systèmes nerveux central et périphérique. Reconnus comme étant des cibles putatives dans l'action des antidépresseurs, les récepteurs 5-HT₄ ainsi que leur leurs agonistes nécessitent d'être mieux caractérisés. Le gène des récepteurs 5-HT₄ est l'un des plus larges gènes des récepteurs couplés aux protéines G, avec un poids de 700 kb. Comme il a déjà été décrit, les différents isoformes sont obtenus par épissage alternatif à partir de l'ARNm. Les 9 isoformes du récepteur ont leur séquence primaire identique et ne diffèrent que par leur extrémité C-terminale à partir de la Leu358 (a-g, n et h) (Bockaert et al., 2004). Le nombre d'acides aminés ainsi que la séquence C-terminale confère aux isoformes un profil fonctionnel et de signalisation distinct. Notre champs d'intérêt s'est spécialement posé sur les isoformes a et b en raison de leur forte expression dans le système limbique, particulièrement dans les régions du noyau accumbens et du striatum, responsable du contrôle des réponses de motivation et de plaisir, affectées dans la dépression (Bender et al., 2000; Vilaro et al., 2002). Cependant, en raison d'un manque d'anticorps et/ou de ligands spécifiques à chacun des deux isoformes, il est difficile de distinguer et de caractériser leurs propriétés de signalisation et de régulation afin de développer un agoniste avec une réponse antidépressive efficace et de courte latence. Pour cela, nous avons recours à une surexpression des différents isoformes séparément dans un système hétérologue utilisant les cellules HEK293. Le choix de l'utilisation de l'agoniste des récepteurs 5-HT₄, RS67333, provient du fait qu'il produisait des changements comportementaux, électrophysiologiques, cellulaires et biochimiques, tel qu'observé dans l'action des antidépresseurs, mais seulement après 3 jours de traitement et sans générer de tolérance pendant 21 jours (Lucas et al., 2007). Nous avons alors voulu étudier l'effet de cet agoniste parallèlement à celui de l'agoniste endogène dans leur capacité

de signalisation et leur mécanisme de régulation à la suite de l'activation des isoformes a et b.

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que les isoformes a et b du récepteur 5-HT₄ humain modulent distinctivement la production d'AMPC et subissent une régulation spécifique à chacun d'eux. Nous avons pu démontrer que l'exposition prolongée à la 5-HT induisait une internalisation plus efficace de l'isoforme a que de l'isoforme b et que leur séquestration repose sur différents mécanismes. En effet, pendant que l'internalisation de l'isoforme a requière de façon absolue la β -arrestine et est sensible à l'inactivation de GRK2, la séquestration de l'isoforme b est partiellement dépendante de la β -arrestine et est insensible à GRK2. L'exposition prolongée au RS67333 faillit de façon égale à induire l'internalisation des 2 isoformes mais désensibilise sélectivement l'isoforme b.

Bien que les récepteurs 5-HT₄ soient classiquement décrits comme des récepteurs couplés à la protéine Gas (Bockaert et al., 2004), leur capacité à activer la sous-unité G α i a aussi été reportée (Pindon et al., 2004). L'exposition de l'isoforme b à des concentrations croissantes de 5-HT entraîne une régulation positive et négative de la production d'AMPC et ces résultats sont compatibles avec le fait que cet isoforme affiche un couplage pléiotropique à Gas et G α i. Grâce à la capacité du PTX, d'une part, à abolir la portion décroissante de la courbe de l'isoforme b et d'autre part à sa capacité de transformer l'effet inhibiteur de l'isoforme a en une régulation positive de la production d'AMPC, nous avons pu confirmer que la sous-unité G α i contribue significativement à la régulation d'AMPC pour chacun des isoformes étudiés. Vu que la réponse prédominante de l'isoforme a induite par la 5-HT est une inhibition de la production d'AMPC, ceci suggère que le neurotransmetteur endogène dans les cellules HEK serait plus efficace à stimuler la sous-unité G α i que Gas. Par contre, l'isoforme b semble coupler de façon plus efficace à Gas, puisque ce n'est qu'aux concentrations élevées de 5-HT que le

changement vers l'inhibition de la production d'AMPC apparaît. Le couplage pléiotropique à différentes protéines G, tel que décrit dans cette étude, est un phénomène commun dans les systèmes de surexpression (Kenakin, 1997). Bien que les récepteurs 5-HT₄ soient classés autant que couplés à Gas, il est important de garder en tête que la spécificité du couplage est largement dépendante de la stœchiométrie des récepteurs et des protéines G disponibles. Actuellement on ne connaît pas la stœchiométrie de ces deux derniers dans les différents sous-domaines membranaires, ni comment leur ratio peut varier d'un neurone à l'autre. De ce fait, cela complique l'établissement de ce qu'est une « réponse normale » à la suite de la stimulation de chacun des isoformes par la 5-HT.

À la différence de la 5-HT, la stimulation des deux isoformes par l'agoniste des récepteurs 5-HT₄, RS67333, n'entraîne qu'une augmentation de production d'AMPC chez les deux. Ces observations pourraient être expliquées par deux hypothèses. D'une part, la signalisation distincte des deux ligands pourrait être simplement reliée à l'effet de la force du signal. Dans ce cas, la différente tendance de la 5-HT et du RS67333 à accumuler une même conformation active du récepteur serait responsable des différences dans la capacité des ligands à induire une réponse (Kenakin, 2007). En effet, le RS67333 est caractérisé comme étant un agoniste partiel des récepteurs 5-HT₄ dans les littératures biochimiques (Eglen, Bonhaus, Johnson, Leung, & Clark, 1995) et comportementales (Lamirault, Guillou, Thal, & Simon, 2003). En accord avec la théorie pharmacologique classique d'un agoniste partiel, le RS67333 ne serait pas capable d'accumuler autant de conformation active que le fait la 5-HT. Si nous tenons compte du fait que, au moins pour l'isoforme b, la réponse inhibitrice en AMPC requière une plus grande concentration de 5-HT que la réponse stimulatrice, nous pourrions spéculer que le RS67333 ne parvient pas à induire assez d'accumulation de la forme active et donc échouerait à inciter la réponse inhibitrice telle qu'observée par le ligand endogène. D'autre part, une explication alternative proviendrait du fait que la 5-HT et le RS67333 stabiliseraient différentes conformations du même isoforme et dont chacune induirait différents

signaux. Autrement dit, la conformation stabilisée par la 5-HT serait capable de provoquer une stimulation et une inhibition de production d'AMPC tandis que la conformation stabilisée par le RS67333 ne déclencherait que la réponse stimulatrice. En stabilisant différentes conformations du récepteur, les agonistes ne produisent pas nécessairement les mêmes déplacements d'hélices et boucles intracellulaires (G. Pineyro, 2009). Par conséquent, les récepteurs 5-HT₄ n'exposeraient pas aux protéines G les mêmes résidus quand ils sont occupés par l'agoniste endogène et par le RS67333. Ainsi, les restrictions conformationnelles imposées par la liaison de 5-HT ou RS67333 pousseraient le récepteur 5-HT₄ à adopter des conformations distinctes, qui entraîneraient une liaison différente à la protéine G α i. Ces changements induisent des interactions spécifiques avec certains partenaires de signalisation et non d'autres. La capacité du ligand à induire une partie de la réponse associée à l'activation du récepteur, tel est le cas du RS67333, est surnommée sélectivité fonctionnelle (Urban et al., 2007).

Les essais d'internalisation quantitative ont permis de démontrer que les mécanismes impliqués dans l'internalisation des isoformes 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} ainsi que leur magnitude diffèrent entre les deux. Quant aux études d'immunofluorescence, elles ont établi que la distribution subcellulaire des récepteurs internalisés était spécifique aussi à chaque isoforme. Ces différences étaient évidentes dans les internalisations induites par la 5-HT, mais pas par le RS67333, qui n'a pas induit d'internalisation dans aucun des cas. La faible capacité d'internalisation par le RS67333 concorde avec le fait qu'il agisse en tant qu'agoniste partiel (Eglen, Bonhaus et al., 1995). De plus, le manque d'internalisation par le RS67333 a été confirmé dans les études d'immunofluorescence révélant que la localisation à la surface de chacun des isoformes n'a pas été modifiée à la suite de l'exposition soutenue à l'agoniste.

Comparés l'un à l'autre, les isoformes a et b n'ont pas la même capacité d'internaliser suite à l'incubation à la 5-HT, et la séquestration de l'isoforme b est plus efficiente. Par ailleurs, les études d'immunofluorescence ont permis d'établir que l'isoforme a est accumulé dans un compartiment de localisation périnucléaire tandis que l'isoforme b est distribué largement dans le cytosol de la cellule. Ces différences de distribution post-endocytaire de chacun des isoformes concordent avec les différentes exigences en β -arrestine et GRK2 pour leur internalisation.

L'internalisation et la distribution post-endocytaire des RCPGs sont déterminées par plusieurs facteurs incluant l'activité des kinases capables de phosphoryler les résidus Ser/Thr intracellulaires (S. S. Ferguson et al., 1996; S. S. Ferguson & Caron, 1998), et par la capacité de β -arrestine à interagir avec le récepteur (Lefkowitz, 1998; Lohse, Benovic, Codina et al., 1990). Nos études utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des kinases ont permis de démontrer que parmi les kinases impliquées dans la signalisation des récepteurs 5-HT₄ (Ansanay et al., 1992; Barthet et al., 2005), seulement la PKC a été essentielle à la séquestration des isoformes a et b. En plus, la surexpression de GRK2 sauvage n'a pas favorisé la séquestration d'aucun des isoformes, ce qui indique que la PKC est capable par elle-même de soutenir leur internalisation maximale. Néanmoins, il est important de noter que la séquestration en soit a été faible, particulièrement dans le cas de l'isoforme a, pour lequel la séquestration n'a pas excédé 40 ± 2 % de récepteurs en surface. Ce degré d'internalisation est considérablement plus bas que celui reporté dans les neurones des colliculli (Pindon et al., 2004). En effet, ces différences d'internalisation des récepteurs 5-HT₄ ont été attribuées à la faible expression des niveaux de GRK2 dans les fibroblastes comparée aux neurones (Barthet et al., 2005). Toutefois, nos résultats ne peuvent supporter l'idée que l'internalisation modeste observée pour l'isoforme a dans les cellules HEK soit due au niveau réduit de GRK2 du moment que la surexpression de celle-ci n'a pas augmenté l'internalisation. D'autre part, la surexpression du dominant négatif de GRK2 (GRK2-K220R) a réduit la séquestration de l'isoforme a de près de 50 %. Cette observation pourrait être

interprétée de deux façons : a) le mutant inactif préviendrait la phosphorylation du récepteur par la GRK2 endogène, responsable d'au moins 50 % de l'internalisation de l'isoforme, soit b) une quantité excessive de GRK2 inactive ne permettrait pas à la PKC d'accéder au récepteur, ce signifierait que la GRK2 mutante produirait un blocage stérique empêchant l'accès de la PKC au récepteur. L'internalisation dépendante de PKC a été décrite pour d'autres RCPG (Balmforth et al., 1995; Haga et al., 1996), incluant les récepteurs opioïdes μ (MORs) pour lesquels la PKC entraîne leur séquestration médiée par β -arrestine (Johnson et al., 2006). Nos résultats démontrent que, en plus de la PKC, la séquestration de l'isoforme a est dépendante de la β -arrestine, puisque le dominant négatif de cette dernière (β arr(319-418)) a presque aboli sa séquestration.

Par ailleurs, des études antérieures ont montré que la séquestration de l'isoforme a requérait la présence de β -arrestine ainsi que la phosphorylation des conglomerats des résidus Ser/Thr situés dans la portion C-terminale commune à tous les isoformes (Barthet et al., 2005). Plusieurs RCPG possèdent ce type de conglomerat Ser/Thr. Lorsque ces résidus sont phosphorylés, la β -arrestine s'associe stablement au récepteur (Bowen-Pidgeon, Innamorati, Sadeghi, & Birnbaumer, 2001; Innamorati, Le Gouill, Balamotis, & Birnbaumer, 2001), causant son accumulation dans le compartiment périnucléaire (Bowen-Pidgeon et al., 2001; Innamorati et al., 2001), tel qu'observé pour l'isoforme a. Par contre, même si l'isoforme b possède les mêmes conglomerats des résidus Ser/Thr, nous avons observé que l'internalisation de l'isoforme b n'était pas sensible à la surexpression des formes actives ou inactives de GRK2. De plus, sa séquestration n'a été que partiellement dépendante de la β -arrestine, et sa distribution se fait au large du cytoplasme et non au niveau périnucléaire. Cette observation signifierait que le conglomerat Ser/Thr ne serait pas disponible également aux interactions avec des protéines régulatrices chez tous les isoformes des récepteurs 5-HT₄. Contrairement à nos observations, l'étude de Barthet et al., 2005 a conclu que les isoformes 5-HT_{4a}, 5-HT_{4b} et 5-HT_{4c} de type murin dépendaient de GRK2 et de β -arrestine pour leur séquestration et que leur

distribution subcellulaire à la suite de l'internalisation était similaire (Barthet et al., 2005). En plus des différences d'espèces pouvant expliquer ces résultats divergents, une autre explication possible serait que les observations dans l'étude de Barthet et al. ont été faites en présence d'une surexpression de β -arrestine, tandis que nos résultats ont été obtenus avec des taux de β -arrestine exprimée de façon endogène. La surexpression de β -arrestine aurait pu masquer les différentes distributions des deux isoformes. Par contre, le reste des conditions expérimentales était les mêmes dans les deux études étant réalisées sur des cellules HEK 293.

Pour affirmer si la distribution subcellulaire que nous avons observée chez les cellules HEK était préservée dans des systèmes où les récepteurs 5-HT₄ sont exprimés naturellement, un autre membre du laboratoire (Archer Elodie Lahlou) a répété les expériences d'immunofluorescence dans des cultures primaires de neurones corticaux transfectés avec l'un ou l'autre des isoformes (Figure 19). Des différences entre les deux isoformes se sont révélées dans la condition contrôle ainsi qu'à la suite de stimulation avec la 5-HT. Dans le premier cas il est évident que seulement l'isoforme a internalise de façon constitutive. Suite à la stimulation à la 5-HT, on constate que la distribution subcellulaire observée dans les cellules HEK293, fut aussi préservée dans les neurones avec une distribution homogène de l'isoforme b mais une accumulation périnucléaire de l'isoforme a.

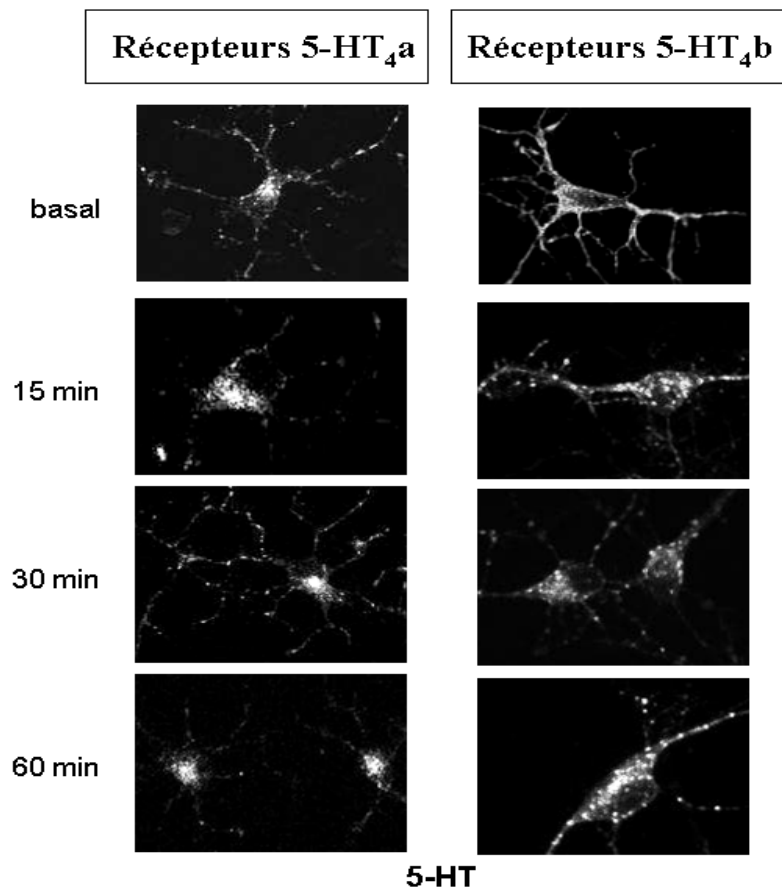


Figure 20 : Expérience d'immunofluorescence dans des cultures primaires de neurones corticaux transfectés avec les isoformes a et b aux différents temps d'incubation à la 5-HT

L'accumulation des récepteurs dans le compartiment périnucléaire a été attribuée à la stabilité de l'interaction entre β -arrestine et le récepteur (Oakley et al., 1999, 2001). À son tour, la stabilité de cette interaction est déterminée par le niveau de phosphorylation du récepteur dont la présence des congolomérats Ser/Thr augmente la phosphorylation par GRK2 et détermine à la fois une plus grande affinité du récepteur pour la β -arrestine (Oakley et al., 1999, 2001). Par conséquent, il serait plausible d'affirmer que la sensibilité à la GRK2 inactive et la nécessité de la β -arrestine à l'internalisation sont compatibles avec la distribution post-endocytaire

de l'isoforme a. D'autre part, l'absence de conglo­mé­rat pé­ri­nu­clé­aire de l'iso­forme b est com­pa­ti­ble avec son in­ter­na­li­sa­tion in­dé­pen­dan­te de la GRK2 et sa né­ces­si­té par­tiel­le de β -ar­res­tine. Au­tre­ment dit, les sites de phos­pho­ry­la­tion ciblés par la GRK2 et les sites de liai­son de β -ar­res­tine ne se­raient pas aus­si fa­ci­le­ment ac­ces­si­bles dans l'iso­forme b que dans l'iso­forme a.

Ceci é­ta­bli, ces der­nières ob­ser­va­tions nous per­mettent de nous ques­tion­ner sur les dé­ter­mi­nants de ces dif­fé­rences. Une pos­si­ble ex­pli­ca­tion pour­rait se trou­ver au ni­veau des dif­fé­rents sites de pal­mi­ty­la­tion des 2 iso­formes. Comme il a été dé­crit en in­tro­duc­tion, la pal­mi­ty­la­tion est l'ajout du pal­mi­ta­te sur les ré­si­dus Cys328/329, com­muns aux 2 iso­formes, et sur le ré­si­du Cys386, propre à l'iso­forme a seu­le­ment (E. Ponimaskin et al., 2005). Cette mo­di­fi­ca­tion post-traduc­tion­nelle, spé­ci­fi­que à cha­que iso­forme, pour­rait dé­ter­mi­ner une dif­fé­rente ac­ces­si­bi­li­té de GRK2 et/ou de β -ar­res­tine au conglo­mé­rat Ser/Thr pré­sent aus­si bien dans l'iso­forme a que dans l'iso­forme b. En effet, les cycles ré­ver­si­bles de pal­mi­ty­la­tion et dé­pal­mi­ty­la­tion con­trô­lent l'ac­ces­si­bi­li­té des protéines ki­na­ses ré­gu­la­trices aux sites de phos­pho­ry­la­tion de l'ex­tré­mi­té C-ter­mi­nale des ré­cep­teurs. Par ex­em­ple, dans le cas des ré­cep­teurs adé­no­si­ne A3, des mu­ta­tions sur leurs sites de pal­mi­ty­la­tion (Cys302/305 mu­tés en Ala) dans leur ex­tré­mi­té C-ter­mi­nale ont en­traî­nées une aug­men­ta­tion de phos­pho­ry­la­tion ba­sale du ré­cep­teur (Palmer & Stiles, 2000). Par con­traire, dans le cas des ré­cep­teurs vasopres­si­ne V1a, les mu­ta­tions des sites de pal­mi­ty­la­tion (Cys371/372 mu­tés en Gly) ont mon­tré une ba­isse de phos­pho­ry­la­tion ba­sale et de celle in­duite par l'ago­ni­ste (Hawtin, Tobin, Patel, & Wheatley, 2001). Nous pou­vons al­ors spé­cu­ler que la pré­sen­ce du ré­si­du Cys386, sur l'ex­tré­mi­té C-ter­mi­nale de l'iso­forme a, peut être res­pon­sa­ble en par­tie de la dif­fé­rence de ré­gu­la­tion ob­ser­vée entre les 2 iso­formes. Il se­rait pos­si­ble de ré­pon­dre à cette ques­tion en ayant re­cours à deux dif­fé­rentes ex­pé­ri­ences dans le fu­tur. La pre­mière ex­pé­ri­ence se­rait d'en­vi­sa­ger une mu­ta­gé­nèse di­ri­gée soit en mu­tant le site de pal­mi­ty­la­tion Cys386 de l'iso­forme a au même ré­si­du pré­sent chez l'iso­forme b, soit en in­ter-changeant les 2 ex­tré­mi­tés C-ter­mi­nales des iso­formes a et b.

Finalement, les différences entre les isoformes a et b ont aussi été évidentes dans la manière de chacun d'eux à s'adapter face à une exposition soutenue au RS67333. En effet, l'agoniste synthétique induit la désensibilisation de l'isoforme b et non du a. Le mécanisme impliqué dans la différence d'adaptation à la suite de l'activation soutenue du RS67333 reste à être éclairci. Toutefois, la régulation spécifique de chacun des isoformes n'est pas surprenante vue qu'elle est aussi présente dans la manière dont le ligand endogène les régulent. En introduction, nous avons mentionné que les agonistes synthétiques des récepteurs 5-HT₄ avaient des actions antidépressives rapides et soutenues (Lucas et al., 2007). Selon nos résultats, l'isoforme a, qui ne subit pas de désensibilisation pourrait soutenir un effet antidépressif prolongé du RS67333.

Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas de conclure que l'isoforme b ne serait pas une cible putative dans l'action antidépressive du RS67333. En effet, les derniers résultats obtenus au laboratoire indiquent que l'effet soutenu de l'administration du RS67333 sur l'isoforme b est unique. Nous avons montré qu'après la désensibilisation par RS67333, les isoformes b ne récupèrent pas le même profil de signalisation que l'isoforme basal. La resensibilisation de celui-ci, après désensibilisation par RS67333, a pu transformer la réponse biphasique induite par la 5-HT en une réponse monotonique inhibitrice. Grâce à cette observation, nous pouvons spéculer qu'au moins une partie de l'action du RS67333 découle de sa capacité de modifier la réactivité de l'isoforme b face au neurotransmetteur endogène. Par conséquent, mis ensemble, nos résultats montrent que l'agoniste RS67333 ne désensibilise pas l'isoforme a, mais modifie la signalisation de l'isoforme b. Toutefois, la contribution exacte de chacun des isoformes aux effets antidépressifs du RS67333 sera mieux comprise une fois que nous découvrirons les conséquences d'un Knock Out des isoformes a et b sur la réponse antidépressive de cet agoniste.

Il est aussi important de garder en tête que le RS67333 n'est pas une drogue sélective par rapport aux différents isoformes. De ce fait, ses effets ne seraient pas limités aux isoformes a et b du système limbique. Un manque de sélectivité pourrait contribuer à différents effets secondaires à travers l'activation d'autres isoformes centraux et périphériques. Bien qu'on puisse produire un agoniste purement sélectif aux isoformes a ou b, ces isoformes sont présents dans d'autres structures, comprenant d'autres régions du cerveau ainsi que dans le petit intestin, l'atrium et la glande hypophyse. Ceci signifie que la sélectivité du ligand ne nous garantit pas que tous les effets pharmacologiques soient des effets désirés. La gravité des effets secondaires pourrait restreindre l'utilisation thérapeutique d'un agoniste 5-HT₄ a ou b, en entraînant possiblement des arythmies, des effets gastro-intestinaux (nausée, diarrhée), gain de poids ou encore une dérégulation endocrinienne. Toutefois, bien que le développement d'un agoniste sélectif à l'isoforme a ou b assurerait un meilleur profil thérapeutique, il reste à voir s'il est possible de développer de tels ligands. Seulement, comme tous les isoformes sont identiques au site de reconnaissance du ligand, le développement d'un ligand sélectif s'avère être une tâche difficile. Toutefois, la différente extrémité C-terminale des isoformes peut théoriquement être exploitée pour répondre à la question de sélectivité. En effet, cette extrémité variante peut entraîner des interactions spécifiques à des partenaires intracellulaires distinctes. Ces derniers imposent aux isoformes des restrictions stériques qui les forcent à établir des conformations différentes. Par conséquent, l'exploitation de ces extrémités peut être un moyen de générer des ligands spécifiques aux différents isoformes.

Conclusion

Nous avons montré que deux des isoformes hautement exprimés dans le système limbique 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} détiennent une signalisation et une régulation différente l'un par rapport l'autre. Même si les deux isoformes sont capables d'un couplage pleiotropique envers les protéines Gas et Gai, seulement le ligand endogène causerait un couplage fonctionnel aux deux sous-unités. D'autre part, les mécanismes responsables de l'internalisation par la 5-HT et la régulation fonctionnelle par l'agoniste synthétique RS67333 seraient aussi spécifiques à chacun des isoformes. En effet, le manque de désensibilisation de l'isoforme a suite à l'activation prolongée par le RS67333 est une observation intéressante puisqu'elle nous permet une explication moléculaire plausible aux effets antidépressifs soutenus produit par le RS67333 dans les essais précliniques. Selon les résultats démontrés dans cette étude, les effets antidépressifs soutenus du RS67333 seraient compatibles avec l'absence de désensibilisation de l'isoforme a. Basé sur cette observation, il serait plus avantageux de développer un agoniste spécifique à l'isoforme a puisqu'il soutiendrait plus longtemps l'effet antidépressif du RS67333 et laisserait plus longtemps active la voie de la 5-HT. Toutefois, notre étude ne peut pas conclure que l'isoforme b ne serait pas une bonne cible.

Les antidépresseurs actuellement disponibles sont loin d'être des agents thérapeutiques idéaux. En effet, leur efficacité thérapeutique ne peut pas couvrir tous les patients déprimés, puisque seulement 60 à 80 % d'entre eux répondent aux traitements. De plus, les effets secondaires ne sont pas négligeables bien qu'ils ont été améliorés par rapport aux premiers antidépresseurs. Et finalement, le temps de latence est toujours considérable, puisque ca peut prendre de 2 à 4 semaines avant d'observer un effet antidépressif. Ainsi, une drogue idéale serait une drogue qui n'ait pas ces limitations et qui serait efficace universellement en renversant complètement

les effets de la maladie avec un minimum d'effets secondaires et une latence thérapeutique courte. Les récepteurs 5-HT₄ nous rapprochent d'un des objectifs de cette drogue idéale en nous offrant un agent pharmacologique putatif avec des actions antidépressives rapides.

Bibliographie

- Ansanay, H., Dumuis, A., Sebben, M., Bockaert, J., & Fagni, L. (1995). cAMP-dependent, long-lasting inhibition of a K⁺ current in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(14), 6635-6639.
- Ansanay, H., Sebben, M., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1992). Characterization of homologous 5-hydroxytryptamine₄ receptor desensitization in colliculi neurons. *Mol Pharmacol*, 42(5), 808-816.
- Ansorge, M. S., Hen, R., & Gingrich, J. A. (2007). Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol*, 7(1), 8-17.
- Artigas, F. (1993). 5-HT and antidepressants: new views from microdialysis studies. *Trends Pharmacol Sci*, 14(7), 262.
- Artigas, F., Celada, P., Laruelle, M., & Adell, A. (2001). How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci*, 22(5), 224-228.
- Artigas, F., Nutt, D. J., & Shelton, R. (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol Bull*, 36 Suppl 2, 123-132.
- Association, A. P. (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR)*. Retrieved from.
- Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., et al. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem*, 267(25), 17882-17890.
- Bach, T., Syversveen, T., Kvingedal, A. M., Krobert, K. A., Brattelid, T., Kaumann, A. J., et al. (2001). 5HT₄(a) and 5-HT₄(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 363(2), 146-160.
- Balmforth, A. J., Lee, A. J., Bajaj, B. P., Dickinson, C. J., Warburton, P., & Ball, S. G. (1995). Functional domains of the C-terminus of the rat angiotensin AT₁A receptor. *Eur J Pharmacol*, 291(2), 135-141.
- Balmforth, A. J., Shepherd, F. H., Warburton, P., & Ball, S. G. (1997). Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT₁A receptor. *Br J Pharmacol*, 122(7), 1469-1477.

- Bartels, D. J., Mitchell, D. A., Dong, X., & Deschenes, R. J. (1999). Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *19*(10), 6775-6787.
- Barthet, G., Framery, B., Gaven, F., Pellissier, L., Reiter, E., Claeysen, S., et al. (2007). 5-hydroxytryptamine 4 receptor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway depends on Src activation but not on G protein or beta-arrestin signaling. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 1979-1991.
- Barthet, G., Gaven, F., Framery, B., Shinjo, K., Nakamura, T., Claeysen, S., et al. (2005). Uncoupling and endocytosis of 5-hydroxytryptamine 4 receptors. Distinct molecular events with different GRK2 requirements. *J Biol Chem*, *280*(30), 27924-27934.
- Bauer, M., Whybrow, P. C., Angst, J., Versiani, M., & Moller, H. J. (2002a). World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 1: Acute and continuation treatment of major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry*, *3*(1), 5-43.
- Bauer, M., Whybrow, P. C., Angst, J., Versiani, M., & Moller, H. J. (2002b). World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 2: Maintenance treatment of major depressive disorder and treatment of chronic depressive disorders and subthreshold depressions. *World J Biol Psychiatry*, *3*(2), 69-86.
- Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F., & Blackburn, T. (1995). 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci*, *16*(3), 105-110.
- Bender, E., Pindon, A., van Oers, I., Zhang, Y. B., Gommeren, W., Verhasselt, P., et al. (2000). Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J Neurochem*, *74*(2), 478-489.
- Berton, O., & Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, *7*(2), 137-151.
- Bickerdike, M. J., Vickers, S. P., & Dourish, C. T. (1999). 5-HT_{2C} receptor modulation and the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab*, *1*(4), 207-214.
- Blier, P. (2001). Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *J Clin Psychiatry*, *62 Suppl 15*, 12-17.
- Blier, P., & Bergeron, R. (1998). The use of pindolol to potentiate antidepressant medication. *J Clin Psychiatry*, *59 Suppl 5*, 16-23; discussion 24-15.

- Blier, P., & de Montigny, C. (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*, 15(7), 220-226.
- Blier, P., & de Montigny, C. (1999). Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology*, 21(2 Suppl), 91S-98S.
- Blondel, O., Gastineau, M., Dahmoune, Y., Langlois, M., & Fischmeister, R. (1998). Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem*, 70(6), 2252-2261.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., & Dumuis, A. (2004). 5-HT₄ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3(1), 39-51.
- Bohm, S. K., Grady, E. F., & Bunnett, N. W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, 322 (Pt 1), 1-18.
- Bonhomme, N., De Deurwaerdere, P., Le Moal, M., & Spampinato, U. (1995). Evidence for 5-HT₄ receptor subtype involvement in the enhancement of striatal dopamine release induced by serotonin: a microdialysis study in the halothane-anesthetized rat. *Neuropharmacology*, 34(3), 269-279.
- Bordet, R., Thomas, P., & Dupuis, B. (1998). Effect of pindolol on onset of action of paroxetine in the treatment of major depression: intermediate analysis of a double-blind, placebo-controlled trial. Réseau de Recherche et d'Experimentation Psychopharmacologique. *Am J Psychiatry*, 155(10), 1346-1351.
- Bouvier, M., Loisel, T. P., & Hebert, T. (1995). Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function. *Biochem Soc Trans*, 23(3), 577-581.
- Bowen-Pidgeon, D., Innamorati, G., Sadeghi, H. M., & Birnbaumer, M. (2001). Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors. *Mol Pharmacol*, 59(6), 1395-1401.
- Boyd, I. W., & Rohan, A. P. (1994). Urinary disorders associated with cisapride. Adverse Drug Reactions Advisory Committee. *Med J Aust*, 160(9), 579-580.
- Branchek, T. A., & Blackburn, T. P. (2000). 5-HT₆ receptors as emerging targets for drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 319-334.

- Bunemann, M., & Hosey, M. M. (1999). G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol*, *517 (Pt 1)*, 5-23.
- Burt, C. W., McCaig, L. F., & Rechtsteiner, E. A. (2007). Ambulatory medical care utilization estimates for 2005. *Adv Data*(388), 1-15.
- Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A., & von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, *401*(6750), 286-290.
- Carson, M. J., Thomas, E. A., Danielson, P. E., & Sutcliffe, J. G. (1996). The 5HT5A serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia*, *17*(4), 317-326.
- Castren, E., Voikar, V., & Rantamaki, T. (2007). Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*, *7*(1), 18-21.
- Celada, P., Puig, M., Amargos-Bosch, M., Adell, A., & Artigas, F. (2004). The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci*, *29*(4), 252-265.
- Claeysen, S., Faye, P., Sebben, M., Lemaire, S., Bockaert, J., Dumuis, A., et al. (1997). Assignment of 5-hydroxytryptamine receptor (HTR4) to human chromosome 5 bands q31-->q33 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, *78*(2), 133-134.
- Claeysen, S., Faye, P., Sebben, M., Taviaux, S., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1998). 5-HT4 receptors: cloning and expression of new splice variants. *Ann N Y Acad Sci*, *861*, 49-56.
- Claeysen, S., Sebben, M., Becamel, C., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1999). Novel brain-specific 5-HT4 receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol Pharmacol*, *55*(5), 910-920.
- Claeysen, S., Sebben, M., Becamel, C., Eglen, R. M., Clark, R. D., Bockaert, J., et al. (2000). Pharmacological properties of 5-Hydroxytryptamine(4) receptor antagonists on constitutively active wild-type and mutated receptors. *Mol Pharmacol*, *58*(1), 136-144.
- Clark, R. B., Friedman, J., Dixon, R. A., & Strader, C. D. (1989). Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the beta-adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*, *36*(3), 343-348.

- Compan, V., Daszuta, A., Salin, P., Sebben, M., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1996). Lesion study of the distribution of serotonin 5-HT₄ receptors in rat basal ganglia and hippocampus. *Eur J Neurosci*, 8(12), 2591-2598.
- Consolo, S., Arnaboldi, S., Giorgi, S., Russi, G., & Ladinsky, H. (1994). 5-HT₄ receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. *Neuroreport*, 5(10), 1230-1232.
- Crabbe, J. C., Phillips, T. J., Feller, D. J., Hen, R., Wenger, C. D., Lessov, C. N., et al. (1996). Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT_{1B} serotonin receptors. *Nat Genet*, 14(1), 98-101.
- Cutrer, F. M., Yu, X. J., Ayata, G., Moskowitz, M. A., & Waeber, C. (1999). Effects of PNU-109,291, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on electrically induced dural plasma extravasation and capsaicin-evoked c-fos immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis. *Neuropharmacology*, 38(7), 1043-1053.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G., et al. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 273(2), 685-688.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta₂-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655), 88-91.
- Danileviciute, V., & Sveikata, A. (2002). [Present-day approach to pharmacological and clinical aspects of novel antidepressants]. *Medicina (Kaunas)*, 38(12), 1147-1156.
- Dubin, A. E., Huvar, R., D'Andrea, M. R., Pyati, J., Zhu, J. Y., Joy, K. C., et al. (1999). The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem*, 274(43), 30799-30810.
- Duman, R. S. (2007). A silver bullet for the treatment of depression? *Neuron*, 55(5), 679-681.
- Duman, R. S., Heninger, G. R., & Nestler, E. J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 54(7), 597-606.
- Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., Cory, R., & Bockaert, J. (1988). A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol*, 34(6), 880-887.

- Dumuis, A., Sebben, M., & Bockaert, J. (1989). The gastrointestinal prokinetic benzamide derivatives are agonists at the non-classical 5-HT receptor (5-HT₄) positively coupled to adenylate cyclase in neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 340(4), 403-410.
- Eglen, R. M., Bonhaus, D. W., Johnson, L. G., Leung, E., & Clark, R. D. (1995). Pharmacological characterization of two novel and potent 5-HT₄ receptor agonists, RS 67333 and RS 67506, in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 115(8), 1387-1392.
- Eglen, R. M., Wong, E. H., Dumuis, A., & Bockaert, J. (1995). Central 5-HT₄ receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 16(11), 391-398.
- Erlander, M. G., Lovenberg, T. W., Baron, B. M., de Lecea, L., Danielson, P. E., Racke, M., et al. (1993). Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8), 3452-3456.
- Errico, M., Crozier, R. A., Plummer, M. R., & Cowen, D. S. (2001). 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 102(2), 361-367.
- Fagni, L., Dumuis, A., Sebben, M., & Bockaert, J. (1992). The 5-HT₄ receptor subtype inhibits K⁺ current in colliculi neurones via activation of a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Br J Pharmacol*, 105(4), 973-979.
- Fava, M., & Kendler, K. S. (2000). Major depressive disorder. *Neuron*, 28(2), 335-341.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53(1), 1-24.
- Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J., & Caron, M. G. (1996). G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol*, 74(10), 1095-1110.
- Ferguson, S. S., & Caron, M. G. (1998). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, 9(2), 119-127.
- Ferguson, S. S. G. (2007). Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(4), 173-179.

- Forbes, I. T., Cooper, D. G., Dodds, E. K., Douglas, S. E., Gribble, A. D., Ife, R. J., et al. (2003). Identification of a novel series of selective 5-HT₇ receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(6), 1055-1058.
- Ford, A. P., Baxter, G. S., Eglen, R. M., & Clarke, D. E. (1992). 5-Hydroxytryptamine stimulates cyclic AMP formation in the tunica muscularis mucosae of the rat oesophagus via 5-HT₄ receptors. *Eur J Pharmacol*, 211(1), 117-120.
- Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci*, 27, 107-144.
- Garattini, S. (1997). Pharmacology of amineptine, an antidepressant agent acting on the dopaminergic system: a review. *Int Clin Psychopharmacol*, 12 Suppl 3, S15-19.
- Gerald, C., Adham, N., Kao, H. T., Olsen, M. A., Laz, T. M., Schechter, L. E., et al. (1995). The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J*, 14(12), 2806-2815.
- Gerhardt, C. C., & van Heerikhuizen, H. (1997). Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol*, 334(1), 1-23.
- Gill, R. K., Saksena, S., Tyagi, S., Alrefai, W. A., Malakooti, J., Sarwar, Z., et al. (2005). Serotonin inhibits Na⁺/H⁺ exchange activity via 5-HT₄ receptors and activation of PKC alpha in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 128(4), 962-974.
- Grossman, C. J., Kilpatrick, G. J., & Bunce, K. T. (1993). Development of a radioligand binding assay for 5-HT₄ receptors in guinea-pig and rat brain. *Br J Pharmacol*, 109(3), 618-624.
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K., & Uchiyama, H. (1996). Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem*, 271(5), 2776-2782.
- Hamel, E., Fan, E., Linville, D., Ting, V., Villemure, J. G., & Chia, L. S. (1993). Expression of mRNA for the serotonin 5-hydroxytryptamine_{1D} beta receptor subtype in human and bovine cerebral arteries. *Mol Pharmacol*, 44(2), 242-246.

- Hanyaloglu, A. C., & von Zastrow, M. (2008). Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, 537-568.
- Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem*, 264(21), 12657-12665.
- Hawtin, S. R., Tobin, A. B., Patel, S., & Wheatley, M. (2001). Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem*, 276(41), 38139-38146.
- Hedlund, P. B., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S. J., & Sutcliffe, J. G. (2005). 5-HT7 receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry*, 58(10), 831-837.
- Hedlund, P. B., & Sutcliffe, J. G. (2004). Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci*, 25(9), 481-486.
- Hegde, S. S., & Eglen, R. M. (1996). Peripheral 5-HT4 receptors. *FASEB J*, 10(12), 1398-1407.
- Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., et al. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25), 15049-15054.
- Hindmarch, I. (2001). Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. *Hum Psychopharmacol*, 16(3), 203-218.
- Holden, C. (2000). Mental health. Global survey examines impact of depression. *Science*, 288(5463), 39-40.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., et al. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, 46(2), 157-203.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4), 533-554.

- Inglese, J., Glickman, J. F., Lorenz, W., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1992). Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase. *J Biol Chem*, 267(3), 1422-1425.
- Inglese, J., Koch, W. J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1992). Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature*, 359(6391), 147-150.
- Innamorati, G., Le Gouill, C., Balamotis, M., & Birnbaumer, M. (2001). The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 276(16), 13096-13103.
- Jaber, M., Koch, W. J., Rockman, H., Smith, B., Bond, R. A., Sulik, K. K., et al. (1996). Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 12974-12979.
- Johnson, E. A., Oldfield, S., Braksator, E., Gonzalez-Cuello, A., Couch, D., Hall, K. J., et al. (2006). Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol*, 70(2), 676-685.
- Joubert, L., Hanson, B., Barthet, G., Sebben, M., Claeysen, S., Hong, W., et al. (2004). New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT4a receptor splice variant: roles in receptor targeting. *J Cell Sci*, 117(Pt 22), 5367-5379.
- Jung, V., Chen, L., Hofmann, S. L., Wigler, M., & Powers, S. (1995). Mutations in the SHR5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* suppress Ras function and block membrane attachment and palmitoylation of Ras proteins. *Mol Cell Biol*, 15(3), 1333-1342.
- Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A., & Negishi, M. (1998). Constitutively active Galpha12, Galpha13, and Galphaq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem*, 273(44), 28700-28707.
- Kaumann, A. J., Sanders, L., Brown, A. M., Murray, K. J., & Brown, M. J. (1990). A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol*, 100(4), 879-885.
- Kaumann, A. J., Sanders, L., Brown, A. M., Murray, K. J., & Brown, M. J. (1991). A 5-HT4-like receptor in human right atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 344(2), 150-159.

- Keita, G. P. (2007). Psychosocial and cultural contributions to depression in women: considerations for women midlife and beyond. *J Manag Care Pharm*, 13(9 Suppl A), S12-15.
- Kenakin, T. (1997). Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci*, 18(12), 456-464.
- Kenakin, T. (2007). Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*, 72(6), 1393-1401.
- Kennedy, S. H., Andersen, H. F., & Lam, R. W. (2006). Efficacy of escitalopram in the treatment of major depressive disorder compared with conventional selective serotonin reuptake inhibitors and venlafaxine XR: a meta-analysis. *J Psychiatry Neurosci*, 31(2), 122-131.
- Kessler, R. C., Merikangas, K. R., & Wang, P. S. (2007). Prevalence, comorbidity, and service utilization for mood disorders in the United States at the beginning of the twenty-first century. *Annu Rev Clin Psychol*, 3, 137-158.
- Koch, W. J., Rockman, H. A., Samama, P., Hamilton, R. A., Bond, R. A., Milano, C. A., et al. (1995). Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science*, 268(5215), 1350-1353.
- Kozisek, M. E., Middlemas, D., & Bylund, D. B. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther*, 117(1), 30-51.
- Krishnan, K. R. (2007). Revisiting monoamine oxidase inhibitors. *J Clin Psychiatry*, 68 Suppl 8, 35-41.
- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A., & Lefkowitz, R. J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem*, 272(1), 5-8.
- Krupnick, J. G., & Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38, 289-319.
- Kunapuli, P., Gurevich, V. V., & Benovic, J. L. (1994). Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J Biol Chem*, 269(14), 10209-10212.

- Lamirault, L., Guillou, C., Thal, C., & Simon, H. (2003). Combined treatment with galanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, and RS 67333, a partial agonist of 5-HT₄ receptors, enhances place and object recognition in young adult and old rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(1), 185-195.
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., et al. (1999). The beta₂-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 3712-3717.
- Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., et al. (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem*, 277(38), 35402-35410.
- Lefebvre, H., Gonzalez, K. N., Contesse, V., Delarue, C., Vaudry, H., & Kuhl, J. M. (1998). Effect of prolonged administration of the serotonin₄ (5-HT₄) receptor agonist cisapride on aldosterone secretion in healthy volunteers. *Endocr Res*, 24(3-4), 749-752.
- Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, 273(30), 18677-18680.
- Lefkowitz, R. J., Hausdorff, W. P., & Caron, M. G. (1990). Role of phosphorylation in desensitization of the beta-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci*, 11(5), 190-194.
- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308(5721), 512-517.
- Lin, S. L., Setya, S., Johnson-Farley, N. N., & Cowen, D. S. (2002). Differential coupling of 5-HT₁ receptors to G proteins of the G(i) family. *Br J Pharmacol*, 136(7), 1072-1078.
- Livingston, M. G., & Livingston, H. M. (1996). Monoamine oxidase inhibitors. An update on drug interactions. *Drug Saf*, 14(4), 219-227.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem*, 265(6), 3202-3211.

- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248(4962), 1547-1550.
- Loisel, T. P., Adam, L., Hebert, T. E., & Bouvier, M. (1996). Agonist stimulation increases the turnover rate of beta 2AR-bound palmitate and promotes receptor depalmitoylation. *Biochemistry*, 35(49), 15923-15932.
- Loric, S., Maroteaux, L., Kellermann, O., & Launay, J. M. (1995). Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation. *Mol Pharmacol*, 47(3), 458-466.
- Lucas, G. (2008). Fast-acting antidepressants: are we nearly there? *Expert Rev Neurother*, 8(1), 1-3.
- Lucas, G., Compan, V., Charnay, Y., Neve, R. L., Nestler, E. J., Bockaert, J., et al. (2005). Frontocortical 5-HT₄ receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT₄ agonists. *Biol Psychiatry*, 57(8), 918-925.
- Lucas, G., & Debonnel, G. (2002). 5-HT₄ receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. *Eur J Neurosci*, 16(5), 817-822.
- Lucas, G., Rymar, V. V., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., Manta, S., et al. (2007). Serotonin(4) (5-HT₄) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55(5), 712-725.
- Luppa, M., Heinrich, S., Angermeyer, M. C., Konig, H. H., & Riedel-Heller, S. G. (2007). Cost-of-illness studies of depression: a systematic review. *J Affect Disord*, 98(1-2), 29-43.
- Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115(Pt 3), 455-465.
- Mamounas, L. A., Blue, M. E., Siuciak, J. A., & Altar, C. A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci*, 15(12), 7929-7939.
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3(11), e442.
- Matthes, H., Boschert, U., Amlaiky, N., Grailhe, R., Plassat, J. L., Muscatelli, F., et al. (1993). Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B}

receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol Pharmacol*, 43(3), 313-319.

- McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., & Willard, F. S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, 62(5), 551-577.
- Medhurst, A. D., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., Middlemiss, D. N., & Sanger, G. J. (2001). Quantitative mRNA analysis of five C-terminal splice variants of the human 5-HT₄ receptor in the central nervous system by TaqMan real time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res*, 90(2), 125-134.
- Mendez, J., Kadia, T. M., Somayazula, R. K., El-Badawi, K. I., & Cowen, D. S. (1999). Differential coupling of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors to activation of ERK2 and inhibition of adenylyl cyclase in transfected CHO cells. *J Neurochem*, 73(1), 162-168.
- Meneses, A. (2001). Role of 5-HT₆ receptors in memory formation. *Drug News Perspect*, 14(7), 396-400.
- Mialet, J., Berque-Bestel, I., Sicsic, S., Langlois, M., Fischmeister, R., & Lezoualc'h, F. (2000). Pharmacological characterization of the human 5-HT_{4(d)} receptor splice variant stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol*, 131(4), 827-835.
- Mnie-Filali, O., Lambas-Senas, L., Zimmer, L., & Haddjeri, N. (2007). 5-HT₇ receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug News Perspect*, 20(10), 613-618.
- Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H., & Bouvier, M. (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J*, 12(1), 349-356.
- Moffett, S., Rousseau, G., Lagace, M., & Bouvier, M. (2001). The palmitoylation state of the beta(2)-adrenergic receptor regulates the synergistic action of cyclic AMP-dependent protein kinase and beta-adrenergic receptor kinase involved in its phosphorylation and desensitization. *J Neurochem*, 76(1), 269-279.
- Monferini, E., Gaetani, P., Rodriguez y Baena, R., Giraldo, E., Parenti, M., Zocchetti, A., et al. (1993). Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor coupled to adenylyl cyclase stimulation in human brain. *Life Sci*, 52(9), PL61-65.

- Murray, C. J., & Lopez, A. D. (1996). Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science*, *274*(5288), 740-743.
- Nibuya, M., Morinobu, S., & Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, *15*(11), 7539-7547.
- Nibuya, M., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*, *16*(7), 2365-2372.
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chem Rev*, *108*(5), 1614-1641.
- Nishizawa, S., Benkelfat, C., Young, S. N., Leyton, M., Mzengeza, S., de Montigny, C., et al. (1997). Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(10), 5308-5313.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, *233*(4761), 305-312.
- Norum, J. H., Hart, K., & Levy, F. O. (2003). Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT4(b) and 5-HT7(a). *J Biol Chem*, *278*(5), 3098-3104.
- Nussenzveig, D. R., Heinfliink, M., & Gershengorn, M. C. (1993). Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl terminus. *J Biol Chem*, *268*(4), 2389-2392.
- O'Donnell, J. M., & Zhang, H. T. (2004). Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol Sci*, *25*(3), 158-163.
- O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Bouvier, M. (1989). Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem*, *264*(13), 7564-7569.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*, *274*(45), 32248-32257.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G

protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem*, 276(22), 19452-19460.

- Okamoto, Y., Ninomiya, H., Tanioka, M., Sakamoto, A., Miwa, S., & Masaki, T. (1997). Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J Biol Chem*, 272(34), 21589-21596.
- Palmer, T. M., & Stiles, G. L. (2000). Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A(3) adenosine receptor. *Mol Pharmacol*, 57(3), 539-545.
- Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T., & Toth, M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10734-10739.
- Patten, S. B., & Beck, C. (2004). Major depression and mental health care utilization in Canada: 1994 to 2000. *Can J Psychiatry*, 49(5), 303-309.
- Pauwels, P. J. (1997). 5-HT 1B/D receptor antagonists. *Gen Pharmacol*, 29(3), 293-303.
- Perez, V., Gilaberte, I., Faries, D., Alvarez, E., & Artigas, F. (1997). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of pindolol in combination with fluoxetine antidepressant treatment. *Lancet*, 349(9065), 1594-1597.
- Pindon, A., Van Hecke, G., Jossen, K., Van Gompel, P., Lesage, A., Leysen, J. E., et al. (2004). Internalization of human 5-HT4a and 5-HT4b receptors is splice variant dependent. *Biosci Rep*, 24(3), 215-223.
- Pindon, A., van Hecke, G., van Gompel, P., Lesage, A. S., Leysen, J. E., & Jurzak, M. (2002). Differences in signal transduction of two 5-HT4 receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with Galphas- and Galphai/o-proteins. *Mol Pharmacol*, 61(1), 85-96.
- Pineyro, G. (2009). Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal*, 21(2), 179-185.
- Pineyro, G., Azzi, M. (2004). Pharmacologie des antidépresseurs et des anticonvulsivants In P. Beaulieu (Ed.), *Pharmacologie de la douleur* (pp. 215-220). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.
- Pineyro, G., & Blier, P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*, 51(3), 533-591.

- Pineyro, G., de Montigny, C., Weiss, M., & Blier, P. (1996). Autoregulatory properties of dorsal raphe 5-HT neurons: possible role of electrotonic coupling and 5-HT_{1D} receptors in the rat brain. *Synapse*, 22(1), 54-62.
- Pippig, S., Andexinger, S., & Lohse, M. J. (1995). Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol*, 47(4), 666-676.
- Pitcher, J. A., Payne, E. S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A. A., & Lefkowitz, R. J. (1995). The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18), 8343-8347.
- Ponimaskin, E., Dumuis, A., Gaven, F., Barthet, G., Heine, M., Glebov, K., et al. (2005). Palmitoylation of the 5-hydroxytryptamine_{4a} receptor regulates receptor phosphorylation, desensitization, and beta-arrestin-mediated endocytosis. *Mol Pharmacol*, 67(5), 1434-1443.
- Ponimaskin, E. G., Heine, M., Joubert, L., Sebben, M., Bickmeyer, U., Richter, D. W., et al. (2002). The 5-hydroxytryptamine(4a) receptor is palmitoylated at two different sites, and acylation is critically involved in regulation of receptor constitutive activity. *J Biol Chem*, 277(4), 2534-2546.
- Ponimaskin, E. G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D. W., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J Biol Chem*, 277(23), 20812-20819.
- Ponimaskin, E. G., Schmidt, M. F., Heine, M., Bickmeyer, U., & Richter, D. W. (2001). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *Biochem J*, 353(Pt 3), 627-634.
- Premont, R. T., Macrae, A. D., Stoffel, R. H., Chung, N., Pitcher, J. A., Ambrose, C., et al. (1996). Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J Biol Chem*, 271(11), 6403-6410.
- Qanbar, R., & Bouvier, M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther*, 97(1), 1-33.
- Rappoport, J. Z. (2008). Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J*, 412(3), 415-423.

- Reynolds, G. P., Mason, S. L., Meldrum, A., De Keczer, S., Parnes, H., Eglen, R. M., et al. (1995). 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *Br J Pharmacol*, *114*(5), 993-998.
- Rockman, H. A., Choi, D. J., Rahman, N. U., Akhter, S. A., Lefkowitz, R. J., & Koch, W. J. (1996). Receptor-specific in vivo desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(18), 9954-9959.
- Ronde, P., Ansanay, H., Dumuis, A., Miller, R., & Bockaert, J. (1995). Homologous desensitization of 5-hydroxytryptamine₄ receptors in rat esophagus: functional and second messenger studies. *J Pharmacol Exp Ther*, *272*(3), 977-983.
- Ross, E. M. (1995). Protein modification. Palmitoylation in G-protein signaling pathways. *Curr Biol*, *5*(2), 107-109.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., et al. (2003). Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*, *23*(1), 349-357.
- Sanders-Bush, E., Fentress, H., & Hazelwood, L. (2003). Serotonin 5-HT₂ receptors: molecular and genomic diversity. *Mol Interv*, *3*(6), 319-330.
- Sato, S., Chang, C., Katoh, H., Hasegawa, H., Nakamura, K., Aoki, J., et al. (1999). The key amino acid residue of prostaglandin EP₃ receptor for governing G protein association and activation steps. *Biochem Biophys Res Commun*, *255*(1), 164-168.
- Saudou, F., Amara, D. A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., et al. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science*, *265*(5180), 1875-1878.
- Scates, A. C., & Doraiswamy, P. M. (2000). Reboxetine: a selective norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of depression. *Ann Pharmacother*, *34*(11), 1302-1312.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, *122*(5), 509-522.
- Schmidt, M. F., McIlhinney, R. A., & Burns, G. R. (1995). Palmitoylation of endogenous and viral acceptor proteins by fatty acyltransferase (PAT) present

- in erythrocyte ghosts and in placental membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1257(3), 205-213.
- Sefton, B. M., & Buss, J. E. (1987). The covalent modification of eukaryotic proteins with lipid. *J Cell Biol*, 104(6), 1449-1453.
- Shih, M., Lin, F., Scott, J. D., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (1999). Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J Biol Chem*, 274(3), 1588-1595.
- Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*, 22(8), 3251-3261.
- Silvestre, J. S., Fernandez, A. G., & Palacios, J. M. (1996). Effects of 5-HT4 receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol*, 309(3), 219-222.
- Sneddon, W. B., & Friedman, P. A. (2007). Beta-arrestin-dependent parathyroid hormone-stimulated extracellular signal-regulated kinase activation and parathyroid hormone type 1 receptor internalization. *Endocrinology*, 148(8), 4073-4079.
- Stahl, S. M. (1998). Selecting an antidepressant by using mechanism of action to enhance efficacy and avoid side effects. *J Clin Psychiatry*, 59 Suppl 18, 23-29.
- Stahl, S. M. (2000). Blue genes and the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry*, 61(2), 77-78.
- Steiner, D., Saya, D., Schallmach, E., Simonds, W. F., & Vogel, Z. (2006). Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G(beta gamma) subunits. *Cell Signal*, 18(1), 62-68.
- Stoffel, R. H., Randall, R. R., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J., & Inglese, J. (1994). Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem*, 269(45), 27791-27794.
- Szabo, S. T., & Blier, P. (2001). Effects of the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine on norepinephrine and serotonin transmission in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 25(6), 845-857.
- Tanis, K. Q., & Duman, R. S. (2007). Intracellular signaling pathways pave roads to recovery for mood disorders. *Ann Med*, 39(7), 531-544.

- Teitler, M., & Herrick-Davis, K. (1994). Multiple serotonin receptor subtypes: molecular cloning and functional expression. *Crit Rev Neurobiol*, 8(3), 175-188.
- Terrillon, S., & Bouvier, M. (2004). Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J*, 23(20), 3950-3961.
- Thase, M. E., & Denko, T. (2008). Pharmacotherapy of mood disorders. *Annu Rev Clin Psychol*, 4, 53-91.
- Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., et al. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*, 278(8), 6258-6267.
- Tome, M. B., Isaac, M. T., Harte, R., & Holland, C. (1997). Paroxetine and pindolol: a randomized trial of serotonergic autoreceptor blockade in the reduction of antidepressant latency. *Int Clin Psychopharmacol*, 12(2), 81-89.
- Torres, G. E., Chaput, Y., & Andrade, R. (1995). Cyclic AMP and protein kinase A mediate 5-hydroxytryptamine type 4 receptor regulation of calcium-activated potassium current in adult hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, 47(1), 191-197.
- Touhara, K., Koch, W. J., Hawes, B. E., & Lefkowitz, R. J. (1995). Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the beta-adrenergic receptor kinase. Differential effects on G beta gamma and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J Biol Chem*, 270(28), 17000-17005.
- Tran, T. M., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R. H., & Clark, R. B. (2004). Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol Pharmacol*, 65(1), 196-206.
- Tsao, P. I., & von Zastrow, M. (2000). Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem*, 275(15), 11130-11140.
- Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., et al. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 320(1), 1-13.
- Van den Wyngaert, I., Gommeren, W., Verhasselt, P., Jurzak, M., Leysen, J., Luyten, W., et al. (1997). Cloning and expression of a human serotonin 5-HT4 receptor cDNA. *J Neurochem*, 69(5), 1810-1819.

- Vanetti, M., Vogt, G., & Holtt, V. (1993). The two isoforms of the mouse somatostatin receptor (mSSTR2A and mSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylate cyclase and in agonist-induced receptor desensitization. *FEBS Lett*, *331*(3), 260-266.
- Vilaro, M. T., Cortes, R., Gerald, C., Branchek, T. A., Palacios, J. M., & Mengod, G. (1996). Localization of 5-HT₄ receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res*, *43*(1-2), 356-360.
- Vilaro, M. T., Cortes, R., & Mengod, G. (2005). Serotonin 5-HT₄ receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *J Comp Neurol*, *484*(4), 418-439.
- Vilaro, M. T., Domenech, T., Palacios, J. M., & Mengod, G. (2002). Cloning and characterization of a novel human 5-HT₄ receptor variant that lacks the alternatively spliced carboxy terminal exon. RT-PCR distribution in human brain and periphery of multiple 5-HT₄ receptor variants. *Neuropharmacology*, *42*(1), 60-73.
- von Zastrow, M., & Kobilka, B. K. (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*, *267*(5), 3530-3538.
- Waeber, C., Sebben, M., Grossman, C., Javoy-Agid, F., Bockaert, J., & Dumuis, A. (1993). [3H]-GR113808 labels 5-HT₄ receptors in the human and guinea-pig brain. *Neuroreport*, *4*(11), 1239-1242.
- Waikar, M. V., Ford, A. P., & Clarke, D. E. (1994). Evidence for an inhibitory 5-HT₄ receptor in urinary bladder of rhesus and Cynomolgus monkeys. *Br J Pharmacol*, *111*(1), 213-218.
- Wang, Q., Lu, R., Zhao, J., & Limbird, L. E. (2006). Arrestin serves as a molecular switch, linking endogenous alpha2-adrenergic receptor to SRC-dependent, but not SRC-independent, ERK activation. *J Biol Chem*, *281*(36), 25948-25955.
- Wong, D. T., Perry, K. W., & Bymaster, F. P. (2005). The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov*, *4*(9), 764-774.
- Wong, M. L., & Licinio, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, *2*(5), 343-351.

- Woolley, M. L., Bentley, J. C., Sleight, A. J., Marsden, C. A., & Fone, K. C. (2001). A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology*, *41*(2), 210-219.
- Yu, S. S., Lefkowitz, R. J., & Hausdorff, W. P. (1993). Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem*, *268*(1), 337-341.
- Zajecka, J. M., & Albano, D. (2004). SNRIs in the management of acute major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*, *65 Suppl 17*, 11-18.
- Zanardi, R., Artigas, F., Franchini, L., Sforzini, L., Gasperini, M., Smeraldi, E., et al. (1997). How long should pindolol be associated with paroxetine to improve the antidepressant response? *J Clin Psychopharmacol*, *17*(6), 446-450.