



Rôle du récepteur 5-HT2B dans la régulation de l'activité des neurones sérotoninergiques

Amina Benhadda

► To cite this version:

Amina Benhadda. Rôle du récepteur 5-HT2B dans la régulation de l'activité des neurones sérotoninergiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne université, 2022. Français. NNT : . tel-04024028

HAL Id: tel-04024028

<https://inserm.hal.science/tel-04024028>

Submitted on 10 Mar 2023

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

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

Public Domain

SORBONNE UNIVERSITE

Ecole doctorale de Physiologie, physiopathologie et thérapeutique
(ED394)

Institut du Fer à Moulin – Equipe Sérotonine, microglie, plasticité et pathologie

Thèse de doctorat en Neurosciences

Rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans la régulation de l'activité des neurones sérotoninergiques

Par Amina BENHADDA

Dirigée par Luc Maroteaux

Présentée et soutenue publiquement le 19 Janvier 2022

Devant un jury composé de :

Mme Isabelle DUSART
M. Stefano MARULLO
Mme Sylvie CLAEYSEN
Mme Véronique FABRE
M. Bruno GUIARD

Directrice de recherche
Directeur de recherche
Chargé de recherche
Chargé de recherche
Professeur des universités

Présidente du Jury
Rapporteur
Rapportrice
Examinatrice
Examineur



*Sans la curiosité de l'esprit,
que serions-nous ? Telle est
bien la beauté et la noblesse
de la science : désir sans fin
de repousser les frontières du
savoir, de traquer les secrets
de la matière et de la vie
sans idée préconçue des
conséquences éventuelles.*

Marie Curie



A mes parents.

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ces 3 années (et demi) de travail. Je remercie donc Isabelle Dusart d'avoir accepté de présider mon jury, je remercie Stefano Marullo et Sylvie Claeysen d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Enfin, je remercie Véronique Fabre et Bruno Guiard d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'exprime toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse Luc Maroteaux. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir fait découvrir le domaine fascinant de la sérotonine. Merci également pour la grande liberté intellectuelle et expérimentale que vous m'avez accordé au cours de ces années. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et nos discussions scientifiques. Même si je pense que tous doctorants ont la même réflexion à propos de leur sujet d'étude, je suis intimement convaincu par l'importance de ce récepteur, que vous avez découvert dans le cerveau et qu'un jour il sera considéré à sa juste valeur !

Je remercie également Anne Roumier pour ta disponibilité et ton écoute. Je t'ai toujours admiré, à mener de front tant de responsabilités, avec tant d'humour et de légèreté. Merci de m'avoir aidé sur mon projet, pour nos discussions scientifiques et cette fameuse soirée Just Dance chez toi, qui restera inoubliable. Je remercie Sabine Lévi pour notre collaboration sur le papier CIPP et bien plus. Merci de m'avoir aidé sur mon projet 1A/2B et de m'avoir aiguillé vers les bons raisonnements.

Merci Catherine pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton soutien. Surtout ces derniers mois, où nous avons vu peu à peu notre étage et notre équipe se dépeupler. Merci de m'avoir fait rire, avec nos petites piques quotidiennes, tu m'as considérablement aidé à mieux supporter ces semaines d'écriture et tu me manqueras terriblement. Un grand merci à Fanny qui m'a apporté un soutien scientifique et humain considérable pendant mes premières années de thèse, merci d'avoir été à l'écoute, de m'avoir aidé à gérer mes petits « tracasseries » de la thèse. Merci mille fois, pour cela et pour tout le reste.

Merci à vous Claire et Xavier, le duo incontournable de l'IFM. Je te remercie Claire pour tous ces fous rires, ces prises de consciences, ces débats philosophiques et psychologiques sur la vie. J'ai pris deux fois plus de pauses café depuis que je te connais mais elles m'ont toujours été bénéfiques. « Ne pas se prendre la tête, profiter et accepter ses émotions »; voilà des conseils d'une grande sagesse que je m'efforce d'appliquer grâce à toi. Merci pour tout (et pour les photos de Cannelle notamment). Xavier, merci évidemment pour ton aide au STORM, de m'avoir formé durant de longues heures dans le noir et d'être resté avec moi à regarder des petits clusters de R-5-HT_{2B} clignoter inlassablement. Mais merci avant tout pour ton amitié, tu as un grand cœur qui transparait dans ta façon d'interagir avec autrui, merci d'avoir été là. J'espère que l'on conservera notre rituel du « Mardi Nouilles », car même si tu n'aimes pas Noël, j'apprécie énormément ta compagnie.

Je te remercie également Imane, tu m'as transmis tant de savoir-faire durant cette thèse. C'est simple, sans toi, je n'aurais pas pu faire la moitié de ces travaux. Merci pour nos discussions, notamment avant ton départ, qui m'ont ouvert les yeux sur beaucoup de choses, merci de me soutenir de l'autre côté de l'atlantique et je te souhaite le meilleur du monde pour la suite. Merci à Aude et Anne H., pour vos sourires, vos conseils avisés, votre main

toujours tendue pour aider. C'est toujours un plaisir de vous croiser au détour d'un couloir, vous participez définitivement à l'esprit convivial et familial de l'IFM. Merci Célia D. pour ta gentillesse et ta bienveillance. Je remercie également Florian, qui est entré dans cet institut en même temps que moi. Merci pour ton soutien et nos fous rires. Quand nous serons épuisés de la recherche académique, peut-être réaliserons nous notre rêve d'élever des lamas au Pérou. Merci à Marion pour ton aide, ta gentillesse et à toutes nos rencontres dans le L2, merci de manière générale au premier étage qui m'a quelques fois adoptée et beaucoup aidé.

Je remercie chaleureusement mon amie Mathilde, de m'avoir soutenue et supporté (dans tous les sens du terme) durant ces longues années, où le moral n'était pas toujours au rendez-vous. Merci d'avoir su me remotiver et toujours me faire découvrir mille et un restaurants. La thérapie par la nourriture est définitivement notre spécialité (et la meilleure) ! A tous les prochains, quel que soit notre avenir. Merci Emeline ; nous avons vécu nos deux années de master ensemble et ça a été un plaisir de travailler avec toi. Malgré la distance, tu as su me redonner confiance en moi et m'aider à surmonter les problèmes. Bientôt ton tour de soutenir et je serai là ! Merci également à tous mes proches, familles, amis d'être toujours là et de me soutenir. Une pensée à vous.

Je profite de cette section pour remercier tous les membres de l'IFM, anciens comme nouveaux. Je ne suis pas la première à en faire le constat (et j'espère ne pas être la dernière) mais l'Institut du Fer à Moulin est un environnement exceptionnel, chaleureux, où l'entraide est de mise et où nous ne sommes jamais seul(e)s. Outre les ressources et compétences scientifiques exceptionnelles à disposition, l'aspect humain est mis en avant dans ce petit institut et c'est un critère très important quand on se lance dans l'aventure de la thèse ! Merci infiniment.

Enfin, et pas des moindres, merci à mes parents. Vous qui m'avez toujours soutenue et suivie, même si vous ne saviez pas toujours où cela me mènerait (j'avoue que parfois moi non plus). Merci également à mon frère, Fethy, d'avoir toujours été là. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui, que je peux réaliser mes rêves et suivre mes passions. Grâce à votre dévouement et votre amour. Allez, encore un MBA et promis, j'arrête !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES.....	6
ABRÉVIATIONS.....	9
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I : Le système sérotoninergique	16
A. Généralités.....	17
1. Historique de la sérotonine et métabolisme	17
2. Développement du système sérotoninergique.....	19
3. Distribution et projections des neurones sérotoninergiques	22
B. La neurotransmission sérotoninergique	24
1. Transmission synaptique.....	25
2. Transmission volumique.....	27
3. Co-transmission glutamatergique	28
C. Transporteur à la sérotonine	30
1. Distribution	31
2. Activité et régulation.....	31
D. Implication du système sérotoninergique dans les maladies psychiatriques.....	34
CHAPITRE II : Les récepteurs à la sérotonine	37
A. Description.....	38
1. Les récepteurs 5-HT1.....	39
2. Les récepteurs 5-HT2.....	40
3. Le récepteur 5-HT3	42
4. Les récepteurs 5-HT4/6/7	42
B. Partenaires protéiques des R-5-HT.....	44
1. Protéines PDZ	44
2. Oligomérisation	45
CHAPITRE III : Le récepteur 5-HT1A.....	49
A. Généralités.....	50
B. Distribution	51
C. Signalisation.....	52
D. Régulations du gène <i>Htr1a</i>.....	55
E. Interactions du R-5-HT1A.....	56
F. Récepteur 5-HT1A : auto- vs hétérorécepteur	57
1. Implications dans les troubles anxieux et dépressifs	58
2. Hypothèses du rôle des R-5-HT1A dans le mode d'action des ISRS	59

CHAPITRE IV : Le récepteur 5-HT2B	62
A. Généralités et structure.....	63
B. Distribution	64
C. Signalisation.....	65
D. Partenaires protéiques du R-5-HT2B.....	66
E. Implication physiologiques et pathologiques du R-5-HT2B.....	68
1. Altérations du gène <i>Htr2b</i> chez l'humain	68
2. Altérations du gène <i>Htr2b</i> chez la souris.....	69
OBJECTIFS DE THESE	77
RESULTATS.....	82
Principes de pharmacologie.....	83
A. Expérience de saturation de la liaison.....	83
B. Expérience de transfert d'énergie par résonance.....	84
1. BRET	84
2. Technologie HTRF (Homogenous Time-Resolved FRET).....	86
L'interaction du R-5-HT2B avec le R-NMDA et la protéine de pontage CIPP module la plasticité des synapses glutamatergiques.....	89
A. Contexte.....	90
B. Résultats principaux.....	91
C. Conclusions	92
D. Contribution personnelle.....	93
Diaphonie entre les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2B : effets réciproques sur le trafic membranaire	133
A. Contexte et objectifs de l'étude	134
B. Résultats principaux.....	135
C. Conclusions	137
D. Contribution personnelle.....	138
DISCUSSION.....	168
A.Le R-5-HT2B : un acteur de la plasticité synaptique ?	169
B.Comment le R-5-HT2B module-t-il l'activité et l'expression des R-5-HT1A ?	171
C.Le R-5-HT2B et les ISRS	173
ANNEXE.....	177
A. Contexte.....	178
B. Résultats principaux.....	179
C. Contribution personnelle.....	180
BIBLIOGRAPHIE.....	217

ABRÉVIATIONS

5-HIAA	5-Hydroxyindoleacétique
5-HT	5-Hydroxytryptamine
5-HTP	5-Hydroxytryptophane
AA	Acide Arachidonique
AADC	Décarboxylase des acides aminés aromatiques
AC	Adénylate Cyclase
AD	Antidépresseur
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BLA	Amygdale baso-latérale
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfert
CeA	Noyau central de l'amygdale
CPM	Coups par minute
DAG	Diacylglycérol
DF	Dexfenfluramine
DPM	Désintégration par minute
DR	Raphé Dorsal
DRM	Raphé médian
DRN	Noyaux du raphé dorsal
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GFP	Green fluorescent protein
GIRK	Courant potassique rectifiant activé par les protéines G

HHS	Hypothalammo-hypophyso-surrénalien (Axe)
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence
IP3	Inositol phosphate 3
ISRS	Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
Ki	Constante d'inhibition
MAO	Monoamine Oxydase
MDMA	3,4-méthylènedioxyméthamphétamine
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PDZ	Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-diphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PSD	Densité post-synaptique
R-5-HT	Récepteur sérotoninergique
RCE	Rosa26 : CAG-loxP-STOP-loxP-EGFP
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SERT	Transporteur membranaire de la sérotonine
SNC	Système Nerveux Central
STORM	Microscopie de reconstruction optique stochastique
THC	Tétrahydrocannabinol



TPH	Tryptophane Hydroxylase
TS	Transcription synaptique
TV	Transmission volumique
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
VTA	Aire tegmentale ventrale

Résumé

De nombreuses maladies psychiatriques, notamment la dépression ou la schizophrénie, sont associées à un dysfonctionnement de la signalisation sérotoninergique. Il a été précédemment montré que le récepteur 5-HT2B est exprimé par certains neurones sérotoninergiques et est nécessaire aux effets comportementaux et neurogéniques des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et à la MDMA (3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine). De plus, l'activation des récepteurs 5-HT2B contrecarre les effets de l'activation des récepteurs 5-HT1A. L'objectif de la première étude est de comprendre comment le récepteur 5-HT2B interagit avec le récepteur 5-HT1A et l'impact de cette association sur leurs voies de signalisation respectives. Avec différents outils expérimentaux, nous avons démontré que les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2B peuvent former des hétérodimères. De plus, l'expression du récepteur 5-HT2B empêche l'internalisation du récepteur 5-HT1A par sa propre stimulation, tandis que la présence du récepteur 5-HT1A imite l'effet de la stimulation sur l'expression à la surface du récepteur 5-HT2B. Ces données soutiennent un cross-talk différentiel entre les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2B. Dans une deuxième étude, nous avons découvert que CIPP, une protéine d'échafaudage, interagit avec le récepteur 5-HT2B via son domaine PDZ et augmente la libération de calcium dendritique dépendante de la stimulation du récepteur 5-HT2B. CIPP favorise également l'augmentation de la densité et la maturation des épines dendritiques et réduit la colocalisation des récepteurs NMDA avec les récepteurs 5-HT2B. Par conséquent, ces données soutiennent le rôle du récepteur 5-HT2B dans la plasticité neuronale.

Abstract

Many psychiatric diseases including depression or schizophrenia have been associated with serotonin signaling dysfunction. It was previously shown that the 5-HT2B receptor is expressed by some serotonergic neurons and is required for selective serotonin reuptake inhibitors and MDMA (3,4-methylenedioxy-N-methylamphétamine) behavioral and neurogenic effects. Moreover, activation of the 5-HT2B receptor counteracts the effects of 5-HT1A receptor activation. The aim of the first study was to understand how the 5-HT2B receptor interacts with the 5-HT1A receptor and the impact on their respective signaling pathways. With different experimental tools, we demonstrated that 5-HT1A and 5-HT2B receptors can form heterodimers. Furthermore, the 5-HT2B receptor expression prevents the 5-HT1A receptor internalization by its own stimulation, whereas the presence of 5-HT1A receptors mimics the effect of stimulation on the 5-HT2B receptor surface expression. These data support a differential cross-talk between 5-HT1A and 5-HT2B receptors. In a second study, we discovered that CIPP, a scaffold protein, interacts with the 5-HT2B receptor via its PDZ domain and increases dendritic calcium release dependent on 5-HT2B receptor stimulation. CIPP also promotes spine density increase and maturation and reduces the clustering of NMDA receptors with 5-HT2B receptors. Therefore, these data support the role of the 5-HT2B receptor in neuronal plasticity.

Avant-propos

De la locomotion à la régulation des émotions, le système sérotoninergique (5-HT) est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. Son dysfonctionnement est donc souvent associé à des pathologies psychiatriques telles que la dépression, l'anxiété ou encore la schizophrénie. Les neurones 5-HT communiquent via un ensemble de récepteurs couplés à une protéine G, répartis en 14 sous-types. Des études du laboratoire ont montré qu'un récepteur en particulier, le récepteur 5-HT_{2B} (R-5-HT_{2B}), est nécessaire aux réponses comportementales et neurogéniques aux inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT. Son ablation génétique spécifiquement dans les neurones 5-HT a permis de mettre en évidence sa participation à l'excitabilité de ces neurones. Par surexpression virale dans les neurones 5-HT, sa stimulation module positivement leur activité électrique, à l'opposé des autorécepteurs négatifs 5-HT_{1A}.

Bien que plusieurs voies de signalisation aient été décrites dans diverses lignées cellulaires, les mécanismes de régulation et de transduction du signal du R-5-HT_{2B} dans les neurones ne sont pas encore totalement connus. L'un des obstacles principaux à l'étude de ce récepteur *in vivo* est l'absence d'anticorps sélectifs et la nécessité d'utiliser des systèmes de surexpression. Dans des lignées de cellules COS et des cultures primaires de neurones hippocampiques, j'ai donc étudié l'interaction du R-5-HT_{2B} avec une protéine de pontage CIPP (Article 1). Dans un second temps, j'ai démontré l'interaction entre les R-5-HT_{2B} et R-5-HT_{1A} dans ces mêmes modèles cellulaires (Article 2). Pour ces deux études, les interactions avec le R-5-HT_{2B} module sa distribution, sa signalisation ainsi que son expression de manière différentielle. J'ai également participé à l'étude de la contribution de l'autorécepteur 5-HT_{2B} dans un modèle murin de dépression induite par un stress social chronique (Annexe 1).

Dans ce manuscrit, un état de l'art du système 5-HT sera tout d'abord dressé et les principaux acteurs et modes de régulation y seront décrits. Ce travail de thèse s'articulant autour de la compréhension des mécanismes d'interaction du R-5-HT_{2B}, notamment avec le R-5-HT_{1A}, deux chapitres distincts leur seront accordés. Après avoir exposé les objectifs scientifiques, une deuxième partie présentera l'ensemble des résultats obtenus. J'aborderai tout d'abord l'interaction du R-5-HT_{2B} avec la protéine CIPP et son rôle dans la distribution



et la régulation de l'activité de ce récepteur. Ensuite, je présenterai l'étude de l'interaction entre les R-5-HT1A et R-5-HT2B et l'impact de celle-ci sur leur répartition membranaire respective dans une culture primaire de neurones hippocampiques. Enfin, je conclurai ce travail de thèse par les problématiques et perspectives autour du rôle du R-5-HT2B dans la régulation de l'activité neuronale.

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : Le système sérotoninergique

A. Généralités

D'un point de vue phylogénétique, le système sérotoninergique est l'un des systèmes de neurotransmission les mieux conservés. Depuis plusieurs décennies, son étude a permis de mettre en évidence son rôle prépondérant dans de nombreuses fonctions physiologiques, du contrôle de l'appétit ou de la locomotion à la gestion des émotions. Avant d'étudier les acteurs principaux qui ont mené à ce travail de thèse (Chapitre III et IV), il convient de présenter les caractéristiques principales du système sérotoninergique telles que son développement, ses modes de communication ou encore sa distribution.

1. Historique de la sérotonine et métabolisme

Découverte pour la première fois en 1935 par V. Erspamer dans les cellules entérochromaffines de l'intestin, la sérotonine a d'abord été décrite comme une substance capable d'induire la contraction des muscles lisses. En 1948, cette molécule est isolée et identifiée comme 5-Hydroxytryptamine (5-HT) à partir du sérum par le groupe de Rapport (Rapport et al., 1948) et est caractérisée comme une substance vasoconstrictrice. Ce n'est que plus tard, en 1953, que la 5-HT est observée dans le système nerveux central (SNC) où elle agit comme neurotransmetteur. On commence alors à évaluer son implication dans divers processus physiologiques et pathologiques.

La 5-HT est synthétisée à partir d'un acide aminé, le L-tryptophane. Dans un premier temps, cet acide aminé est hydroxylé en L-5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase (TPH), enzyme limitante de la biosynthèse de 5-HT. En périphérie, l'isoforme dominante de cet enzyme est la TPH1 alors que dans le système nerveux central, il s'agit de la TPH2. Dans un second temps, le 5-HTP est décarboxylé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC), donnant ainsi la 5-HT. Celle-ci est ensuite stockée dans les vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT2) via un transport actif de type antiport (proton/ 5-HT) (**Figure 1**).

Lorsque le neurone sérotoninergique (neurone 5-HT) est stimulé, celui-ci libère de la sérotonine au niveau de synapses classiques, de synapses en passant (contacts axonaux) mais également au niveau somatodendritique (Trueta et al., 2012). Ensuite, deux cas de figures se présentent. Après avoir été recaptée par le transporteur membranaire de la 5-HT, le SERT

(**Figure 1**), la 5-HT peut-être dégradée en 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA) par la monoamine oxydase (MAO). Sinon, elle sera stockée dans les vésicules via VMAT2 pour être recyclée.

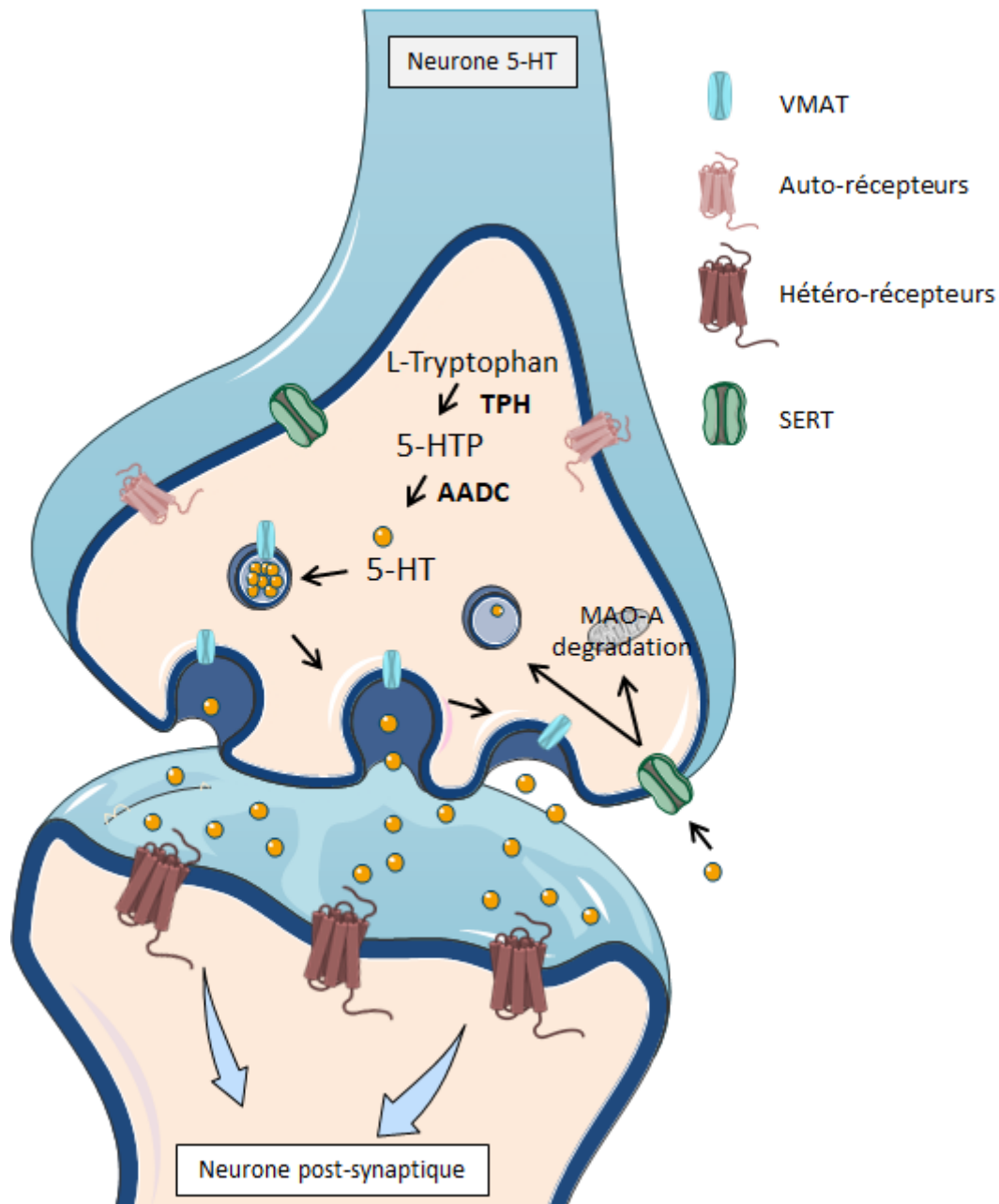


Figure 1 : Métabolisme de la sérotonine. Apporté exclusivement par l'alimentation, le L-tryptophane traverse la barrière hématoencéphalique et est transporté jusqu'aux neurones sérotoninergiques. Une suite de réactions enzymatiques (TPH, AADC) permet de synthétiser de la sérotonine 5-HT dans ces neurones, qui est ensuite stockée dans des vésicules dans l'élément présynaptique (neurone 5-HT) grâce au VMAT2. Après avoir été libéré dans le milieu extracellulaire et avoir exercé son action sur l'élément présynaptique (activation des

autorécepteurs) ou post-synaptique (activation des hétérorécepteurs 5-HT), la 5-HT est récupérée par le SERT pour être soit dégradée soit recyclée.

2. Développement du système sérotoninergique

Le système 5-HT est l'un des systèmes monoaminergiques qui se développe le plus tôt durant l'embryogénèse du système nerveux central : à partir du jour embryonnaire 9 (E9) chez la souris et E10.5 chez le rat. Le pool de neurones 5-HT est déjà complètement formé à environ E13 chez la souris et le rat et à 7 semaines de gestation chez l'humain. De nombreux facteurs de croissance interviennent dans le développement et la mise en place du système 5-HT. Par exemple, le taux du facteur de croissance astroglial S100 β est augmenté par la présence de 5-HT ce qui suggère que les neurones 5-HT régulent leur propre croissance (Azmitia, 2020; Azmitia et al., 1990; Van Hartesveldt et al., 1986). La 5-HT est également impliquée dans de nombreux autres processus dans le cerveau en développement et joue un rôle régulateur : synaptogenèse (Cases et al., 1996), différenciation neuronale (Lauder et al., 1985), établissement des réseaux neuronaux (Hernández-Carballo et al., 2020), neurogénèse (Lauder and Krebs, 1978), etc.

Au cours du développement embryonnaire, les neurones 5-HT émergent de différents rhombomères qui vont donner des groupes de neurones 5-HT distincts. Les neurones provenant du rhombomère 1 (r1) donneront les neurones 5-HT du raphé dorsal et une portion des neurones du raphé médian et de la région du noyau B9. Les neurones du rhombomère 2 donneront les neurones 5-HT en majorité du raphé médian et de la région du noyau B9. Enfin, les neurones 5-HT du raphé médian, de la région du noyau B9 et de la région rostrale du raphé magnus seront issus des rhombomères 3 et 5 (aucun neurone 5-HT n'est issu du rhombomère 4) (Bang et al., 2012) (**Figure 2**).

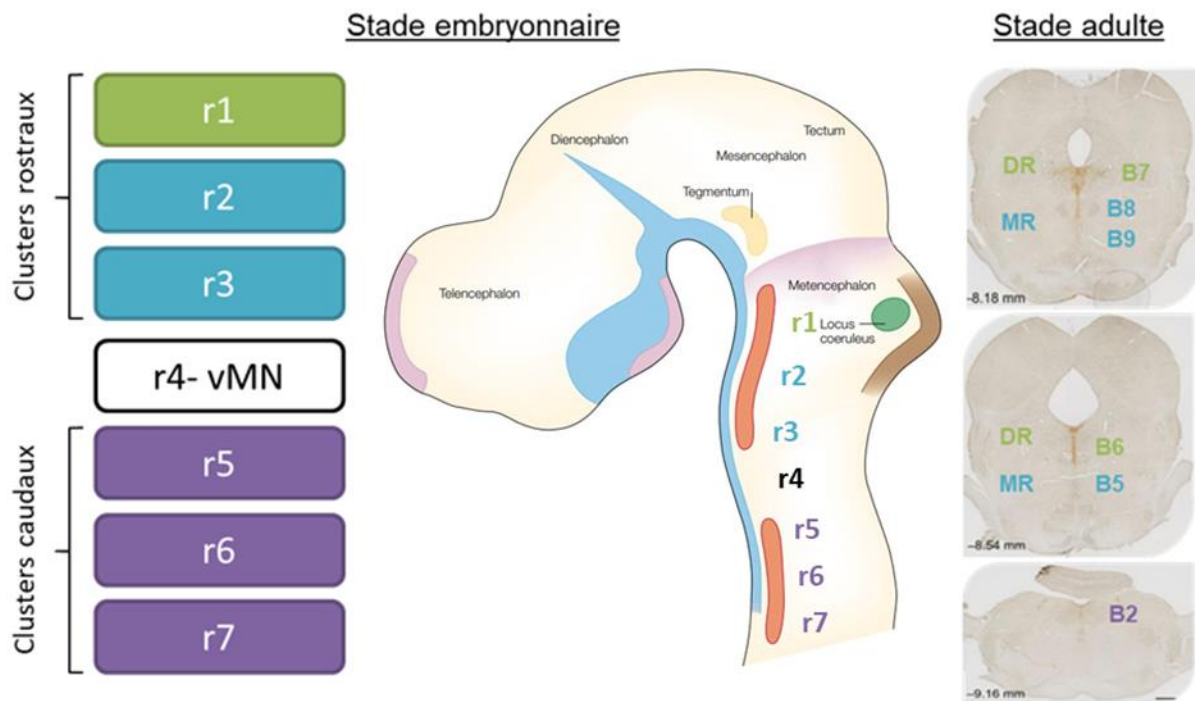


Figure 2 : Origine des différents noyaux du système 5-HT du raphé. Au stade embryonnaire, le système 5-HT se développe à partir des rhombomères 1 à 7 (excepté le rhombomère 4, à l'origine des motoneurones ventraux, vMN). Les 3 premiers donneront les noyaux les plus rostraux du raphé (B5, B6, B7, B8 et B9) et les 3 derniers donneront les noyaux les plus caudaux (B2 et B3) (Gaspar et al., 2003).

Ces origines différentes semblent expliquer le pattern de distribution de leur projection (Maddaloni et al., 2017). Par exemple, alors qu'on observe des projections éparées dans les régions cibles des neurones provenant du r1, les neurones provenant du r2 présentent une innervation dense. De plus, les neurones provenant du r1 et r3/5 mais pas du r2 innervent d'autres groupes de neurones 5-HT exerçant ainsi une autorégulation des neurones 5-HT inter-groupes (Bang et al., 2012; Deneris and Gaspar, 2018).

Parmi les facteurs de transcriptions importants pour le développement des neurones et des fibres 5-HT, Pet1 joue un rôle critique dans la modulation des taux de sérotonine (avec Lmx1B, GATA2, GATA3 et Mash1; (Alenina et al., 2006)). En effet, des motifs de liaison du facteur de transcription Pet1 ont été découverts dans la région 5'UTR des gènes du R-5-HT1A, du transporteur à la sérotonine et de la tryptophane hydroxylase (Kim et al., 2014). Il intervient également dans la différenciation finale des neurones 5-HT. En effet, chez des souris mutantes, la délétion de ce facteur de transcription (souris knock-out Pet1^{-/-}) induit une

perte de 80% du nombre de neurones 5-HT et d'une diminution d'environ 70-80% des taux de sérotonine dans les régions cibles telles que l'hippocampe ou le cortex (Hendricks et al., 2003). Ces souris présentent des altérations des projections des fibres 5-HT ainsi que des anomalies comportementales (baisse d'anxiété dans l'open-field, impulsivité dans le test d'hyponéophagie, augmentation de l'immobilisation durant le conditionnement de peur) (Kiyasova et al., 2011), suggérant un rôle important du système 5-HT dans la modulation de ces différents comportements liés à l'anxiété.

Bien qu'apparaissant très précocement durant le développement du SNC, les fibres des neurones 5-HT continuent de se développer et mûrir durant la période postnatale et ce, jusqu'à l'âge adulte. Ainsi, les neurones 5-HT présentent un phénotype électrophysiologique immature à P4 et mature à P21, les neurones à P4 étant plus excitables qu'à P21 et présentant un pic de colocalisation de 5-HT/VGLUT3 (transporteur vésiculaire du glutamate 3). Par ailleurs, il a été observé que l'inhibition exercée par l'autorécepteur 5-HT_{1A}, un régulateur essentiel de la transmission 5-HT, n'est mise en place qu'à P21 seulement (Rood et al., 2014).

Une fois arrivés à maturité, les neurones 5-HT ne sont pas figés et sont également capables de répondre à une perturbation de la transmission 5-HT d'un point de vue morphologique (entre autres). En effet, après un traitement chronique à la fluoxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la 5-HT (ISRS), la densité de fibres 5-HT est significativement réduite dans l'hippocampe chez la souris (Nazzi et al., 2019), et significativement augmentée dans les régions corticales chez le rat (Zhou et al., 2005). Ces résultats impliquent un remaniement des fibres 5-HT sous l'action de la fluoxétine dont on sait qu'elle possède un effet neurotrophique via, entre autres, le facteur neurotrophique du cerveau ou BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

Bien que, de manière évidente, les neurones 5-HT partagent la capacité de biosynthétiser de la 5-HT, ils présentent des identités moléculaires uniques. Des études transcriptomiques ont permis de mettre en évidence des différences entre les neurones 5-HT rostraux et caudaux avec une centaine de gènes régulés différenciellement (Wylie et al., 2010) durant le développement mais aussi dans les neurones matures (Dougherty et al., 2013). A plus grande échelle, il existe également des identités moléculaires différentes au sein du raphé

dorsal notamment dans la modulation subrégionale de l'ARNm de certains GPCR (Spaethling et al., 2014).

3. Distribution et projections des neurones sérotoninergiques

Le système 5-HT est un système primitif, conservé chez de nombreuses espèces au cours de l'évolution. Il existe une forte similarité dans la distribution et les projections des neurones 5-HT chez les mammifères étudiés jusqu'ici. Chez l'humain, le nombre de neurones 5-HT est estimé à environ un demi-million de cellules dans le raphé ; chez la souris, ce chiffre est d'approximativement 25 000 neurones 5-HT.

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont regroupés en noyaux (B1 à B9) qui forment le raphé. Les projections des neurones 5-HT émergent des noyaux caudaux (B1-B3), médians (B5, B8) et du raphé dorsal (B6, B7). Chaque sous-groupe de noyaux projette préférentiellement vers une région précise du cerveau. Par exemple, la partie ventrale du noyau B7 projette majoritairement vers l'amygdale, le cortex cérébral et le thalamus et en moindre proportion, l'habenula ; les parties latérales, dans le thalamus et la partie dorsale, dans la substance noire *pars compacta*, l'aire tegmentale ventrale (VTA) et l'hypothalamus (**Figure 3**) (Muzerelle et al., 2016). Les noyaux du système 5-HT ne sont pas des structures complètement homogènes et il existe au sein du raphé des neurones non 5-HT. Des études ont montré que la majorité de ces neurones non-5-HT sont de type glutamatergiques ou GABAergiques (Hioki et al, 2009; Jackson et al., 2009).

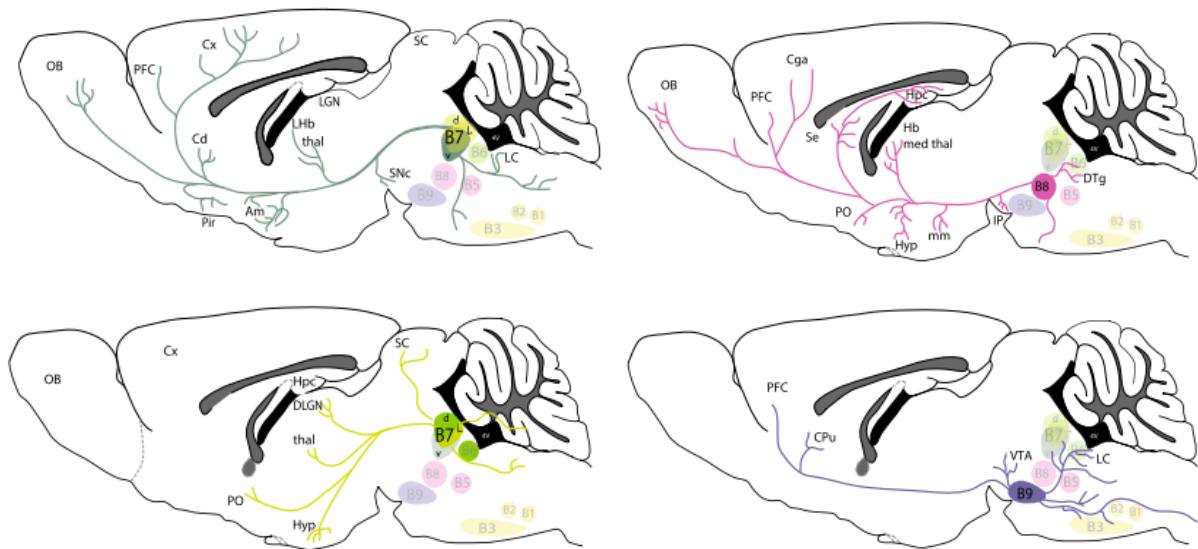


Figure 3 : Projections des différents noyaux du système sérotoninergique dans le cerveau de souris (Muzerelle et al., 2016).

En cohérence avec leur pattern de distribution, les projections du raphé dorsal et médian diffèrent par leurs propriétés électrophysiologiques (Bayasgalan et al., 2021; Ren et al., 2018). On retrouve également des différences dans la morphologie des neurones 5-HT dans les sous-noyaux 5-HT. Ainsi, dans le raphé médian, le soma des neurones 5-HT est moins volumineux, les dendrites sont plus courtes et l'arborisation est moins complexe que dans le raphé dorsal (Calizo et al., 2011). De plus, en utilisant des méthodes d'optogénétique et de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle chez la souris, il semblerait que la régulation de l'activité du système 5-HT soit davantage corrélée à l'identité et l'expression des récepteurs 5-HT post-synaptiques qu'à la densité de terminaisons de neurones 5-HT dans une région cible donnée (Grandjean et al., 2019).

En outre, il existe des sous-groupes de neurones 5-HT au sein des noyaux du raphé se distinguant par l'expression de certaines protéines. Par exemple, une sous-population est définie par son expression de VGLUT3, un transporteur vésiculaire du glutamate, et sera discuté ultérieurement. Mais il existe aussi des neurones 5-HT exprimant les récepteurs à la dopamine D1 (D1-R) et D2 (D2-R) de manière distincte. En effet, ces deux sous-populations (5-HT/D1-R et 5-HT/D2-R) se distinguent par leur rôle dans le comportement chez la souris, leur distribution au sein du raphé ainsi que leurs cibles anatomiques. Les neurones 5-HT/D1-R se situent au niveau médian du raphé ciblant les régions antérieures du cerveau et sont

impliqués dans les interactions sociales. Alors que les neurones 5-HT/D2-R sont situés dans les zones rostrales et latérales du raphé ciblant les régions plus caudales du cerveau et sont impliqués dans les comportements face à un nouvel environnement et la locomotion (Niederkofler et al., 2016).

En conclusion, sa distribution et son interaction avec d'autres systèmes font du système 5-HT un système clé dans les mécanismes physiologiques et pathologiques tels que la dépression, l'addiction (Müller and Homberg, 2015) ou encore l'impulsivité (Coccaro et al., 2015). Et l'ensemble des études investiguant les identités moléculaires, électrophysiologiques, morphologiques des neurones 5-HT du raphé montre qu'il s'agit d'une structure unique, riche et particulièrement complexe (Okaty et al., 2019).

B. La neurotransmission sérotoninergique

Le système 5-HT n'est pas non plus homogène quant à son mode de communication. En effet, chez les vertébrés et invertébrés, la transmission du système sérotoninergique repose sur deux modes distincts dont je décrirai les grandes caractéristiques dans cette partie. On retrouve donc :

- La transmission synaptique, où le neurotransmetteur (ici, la 5-HT) est libéré au niveau des terminaisons dans la fente synaptique ;
- La transmission extrasynaptique où le neurotransmetteur (ici, la 5-HT) est libéré au niveau des varicosités axonales, des dendrites et du soma, en dehors de la synapse, produisant ainsi un effet paracrine.

La proportion de ces différents modes de transmission du système 5-HT dépend de la région du système nerveux. En effet, alors que dans l'amygdale basolatérale (Muller et al., 2007) et la substance noire *pars reticulata*, la transmission synaptique semble favorisée, dans la substance noire *pars compacta* et le raphé dorsal, la transmission extrasynaptique est majoritaire (Moukhles et al., 1997).

Par ailleurs, les neurones 5-HT présentent une autre caractéristique très intéressante : la capacité de relarguer du glutamate. Cette fonction, modulable selon l'activité du système

5-HT, apporte un autre degré de complexité à la régulation de la transmission 5-HT et sera abordé à la fin de cette partie.

1. Transmission synaptique

La synapse se définit par deux éléments séparés d'une distance de 20 nm, ou "fente synaptique" :

- Un élément pré-synaptique au niveau duquel un pool de vésicules contenant les neurotransmetteurs est accolé à la membrane et prêt à libérer leur contenu. Un deuxième pool de vésicules, à distance de la synapse, constitue une réserve de neurotransmetteurs pour remplacer le premier si nécessaire. Ces régions particulières de la membrane sont appelées "zones actives".
- Un élément post synaptique ou Post synaptic density (PSD) qui est, géométriquement, un disque d'environ 200 à 400 nm de rayon, composé de récepteurs post-synaptiques. Il est localisé au niveau des épines dendritiques, de l'arbre dendritique, sur le soma ou l'axone. La composition de la PSD est un des facteurs les plus importants dans la modulation de la transmission de l'information (Vito Di Maio, 2008).

Historiquement, la sangsue est un modèle très utilisé dans l'étude de la transmission sérotoninergique en raison de la grande taille des neurones Retzius (soma de 80µm de diamètre) qui sont les cellules contenant la plus grande concentration de 5-HT dans cet invertébré (Acosta-Urquidi et al., 1989; Coggeshall, 1972). Ainsi, il a été montré grâce à ce modèle que la libération synaptique de 5-HT dépend de 3 facteurs : la présence de calcium dans le milieu extracellulaire, le potentiel de repos présynaptique et l'amplitude de dépolarisation présynaptique (De-Miguel and Trueta, 2005). Alors qu'une unique stimulation est capable d'induire la libération de 5-HT des "petites vésicules", il est indispensable d'appliquer plusieurs stimulations répétées pour libérer le contenu des vésicules dites "à cœur denses".

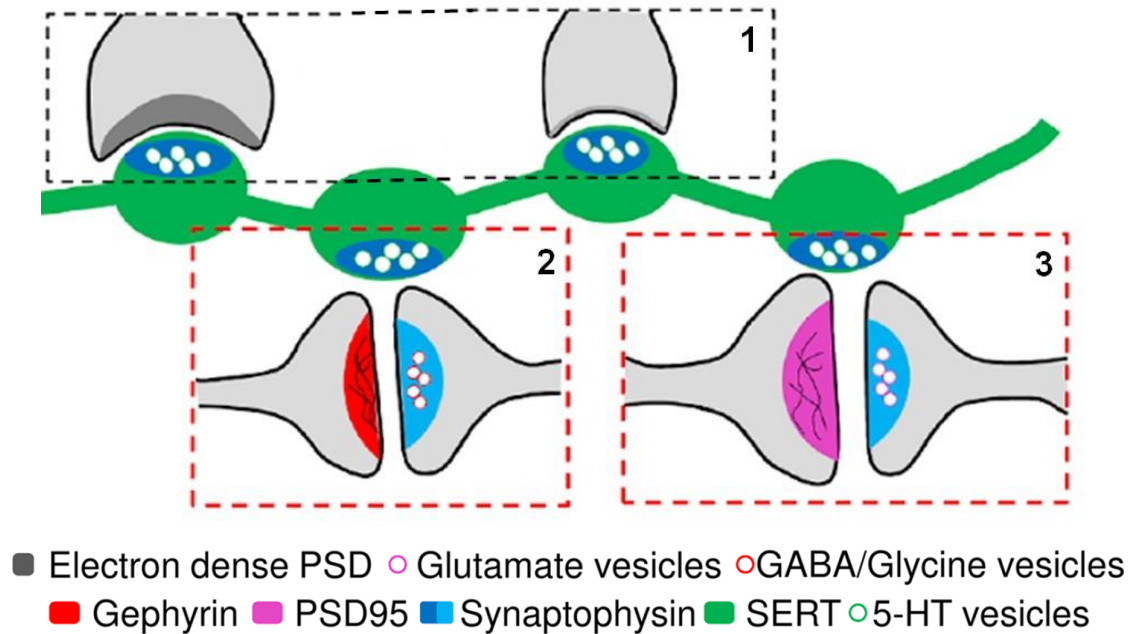


Figure 4 : Les différents modes de transmission synaptique du système 5-HT. Les fibres des neurones 5-HT sont capables de former des synapses en passant. Les varicosités, contenant des vésicules de 5-HT prêtes à être libérées, sont engagées dans des synapses classiques (1), ou des triades synaptiques inhibitrices (2) ou excitatrices (3). Dans ces deux derniers cas, la fibre 5-HT SERT positive (vert) contient des vésicules 5-HT et se trouvent en regard d'une synapse inhibitrice identifiée par la présence de synaptophysin (bleu) + vésicules de GABA dans l'élément présynaptique et de gephyrin (rouge) dans l'élément post-synaptique. Ou en regard d'une synapse excitatrice identifiée par la présence de synaptophysin (bleu) + vésicules glutamatergiques dans l'élément présynaptique et de PSD95 (rose) dans l'élément post-synaptique (Belmer et al., 2017).

De plus, le système 5-HT forme ce que l'on appelle des contacts/synapses en passant (**Figure 4**). Les éléments présynaptiques des varicosités axonales (ou boutons synaptiques) des fibres SERT+ forment des triades synaptiques avec des éléments pré- et post-synaptiques de synapses excitatrices ou inhibitrices. Encore une fois, les proportions diffèrent d'une région à une autre : environ 30% des boutons synaptiques SERT+ sont engagés dans une triade synaptique dans le cortex préfrontal, le noyau accumbens, l'hippocampe et le noyau du lit de la stria terminalis et plus de 50 %, dans le noyau central de l'amygdale, l'amygdale basolatérale et la VTA. Ces résultats indiquent que les fibres 5-HT sont capables de moduler la transmission inhibitrice et excitatrice via une transmission synaptique de manière différentielle selon la région cérébrale considérée (Belmer et al., 2017).

L'un des éléments qui va moduler l'intensité d'action de la 5-HT sur le neurone post-synaptique est la capacité de recapture de la 5-HT par le neurone présynaptique (5-HT). En effet, plus la 5-HT reste longtemps dans la fente synaptique, plus l'action de cette molécule est prolongée et importante. Par ailleurs, la 5-HT est capable d'influencer la libération de neurotransmetteurs en augmentant la vitesse de libération des vésicules ainsi que leur nombre (Southard et al., 2000).

2. Transmission volumique

Dans le cas où l'on ne retrouve pas d'éléments post-synaptiques apposés, on parle de transmission extrasynaptique ou volumique. La transmission volumique (TV) est un mode de communication intercellulaire où le messenger chimique (ici, la sérotonine) est libéré dans l'espace extracellulaire en dehors de la fente synaptique. Elle ne nécessite pas d'élément post-synaptique. Même s'il s'agit d'un mode de transmission peu avantageux d'un point de vue thermodynamique (Noguez et al., 2019), la TV permet d'émettre un signal plus lent et plus diffus, donc sur de plus longues distances (de l'ordre du micromètre) (Perrier and Cotel, 2008), que la transmission synaptique.

Ceci est possible grâce à l'existence de vésicules au niveau du soma (Sarkar et al., 2012), des axones et des dendrites des neurones 5-HT. Il a été montré par microscopie 3-photons qu'une large quantité de vésicules contenant de la 5-HT est présente au niveau du soma des neurones 5-HT (Kaushalya et al., 2008). Alors que dans des neurones en culture provenant du mésencéphale, une vésicule libère environ 1800 molécules de dopamine (Pathos and Sulzer, 1997), on estime à 4000 molécules de 5-HT le contenu d'une vésicule de neurone Retzius de sangsue (Bruns and Jahn, 1997; Bruns et al., 2000).

Grâce à des techniques de micrographies électroniques, au repos et après stimulation à une fréquence de 1Hz, on distingue dans les neurones Retzius de sangsues deux pools de vésicules à cœur dense. Ces deux pool se distinguent par leur positionnement : l'un proche de l'appareil de Golgi (~1,5µm de distance) et l'autre proche de la membrane plasmique (~3,7µm de distance) (De-Miguel et al., 2012; Trueta et al., 2012). En revanche, après stimulation à une fréquence de 20Hz, les vésicules sont toutes accolées à la membrane plasmique, prêtes à libérer leur contenu en 5-HT.

Cependant, ces deux protocoles ne mènent pas à une exocytose ; seule une stimulation d'un train de 10 potentiels d'action à une fréquence de 20Hz permet la fusion des vésicules à la membrane et la libération massive de 5-HT dans le milieu extracellulaire. Cette exocytose est dépendante de la dépolarisation du neurone (Kaushalya et al., 2008), des récepteurs glutamatergiques (R-NMDA et R-AMPA) et est possible grâce à de rapides vagues calciques intracellulaires via des canaux calciques de type L. Cette exocytose est amplifiée par la signalisation PLC attribuée aux R-5-HT₂ (Leon-Pinzon et al., 2014) qui augmente les concentrations intracellulaires de calcium en synergie avec l'activation des récepteurs NMDA et des canaux calciques de type L (Trueta et al., 2012). Cette libération peut durer dans le temps et le neurone décharge des trains de potentiels d'action jusqu'à plus de 25 minutes après stimulation à 20Hz (De-Miguel et al., 2015). Ainsi, la libération extrasynaptique de 5-HT est entretenue par la présence d'autorécepteurs et perdure sur le long terme.

Au niveau structurel, de nombreux éléments permettent d'affirmer une libération extrasynaptique de la sérotonine. D'abord, on retrouve dans le soma, les dendrites et les varicosités axonales des vésicules prêtes à être libérées sans qu'il n'y ait d'élément post-synaptique à proximité. Ensuite, sous stimulation, il a été détecté par ampérométrie de la 5-HT dans le milieu extracellulaire à distance des sites de libération, ce qui exclut une libération synaptique qui, par définition, se déroule dans la fente synaptique donc dans un rayon d'action très restreint. Par ailleurs, on retrouve l'expression du transporteur à sérotonine dans les axones des neurones 5-HT mais également au niveau des dendrites et du soma, suggérant la nécessité de capter la 5-HT libérée à ces endroits. Alors que le R-5-HT_{1B} est exprimé au niveau des terminaisons nerveuses, la présence d'autorécepteurs somatodendritiques permettent également de corroborer cette hypothèse de transmission extrasynaptique.

3. Co-transmission glutamatergique

En 2002, (Gras et al., 2002) ont mis en évidence l'existence d'un troisième type de transporteur au glutamate, VGLUT3, et son expression au niveau du soma et des projections axonales des neurones 5-HT, préférentiellement situés au niveau ventromédian du raphé dorsal. Cette information suggère que les neurones 5-HT sont capables de relarguer du glutamate par leurs terminaisons. Cette fonction de "co-transmission" a déjà été décrite dans

d'autres systèmes de neurotransmetteurs comme la dopamine, le GABA ou encore l'acétylcholine (Pour revue, Trudeau, 2004).

Comme les transporteurs VGLUT1 et VGLUT2 (Aihara et al., 2000; Bellocchio et al., 2000; Herzog et al., 2001), les transporteurs VGLUT3 sont impliqués dans la transmission glutamatergique rapide et leur présence dans le striatum augmente considérablement la transmission cholinergique au niveau présynaptique en favorisant la recapture d'acétylcholine dans les vésicules par rapport à d'autres régions où VGLUT3 n'est pas exprimé dans les fibres cholinergiques (Gras et al., 2008).

Afin d'évaluer la contribution de ce transporteur dans les fibres 5-HT, un modèle de souris knockout pour VGLUT3 a été développé (Amilhon et al., 2010). L'ablation génétique de VGLUT3 ne semble pas avoir d'effet sur la concentration extracellulaire de 5-HT basal et après injection d'un antidépresseur de type inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS). Cependant, il a été observé que l'inhibition de la décharge des neurones 5-HT par la stimulation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} est plus faible que chez les souris contrôles, et que cela est dû à une désensibilisation des auto-R-5-HT_{1A} plus importante chez les souris *Vglut3*^{-/-} à l'état basal. De plus, comme pour l'acétylcholine, la dopamine ou encore le GABA, la présence de glutamate a pour effet d'augmenter l'accumulation de 5-HT dans les vésicules via VGLUT3 (Amilhon et al., 2010; Gras et al., 2008; Voisin et al., 2016; Zander et al., 2010). Chez les souris soumises à un stress social chronique, on retrouve moins de neurones co-exprimant TPH2 et VGLUT3 bien que les taux d'ARNm des gènes *Tph2* et *Vglut3* ne soient pas modifiés (Prakash et al., 2020), ce qui suggère une modulation post transcriptionnelle/traductionnelle en réponse à des facteurs environnementaux.

D'un point de vue comportemental, les souris *Vglut3*^{-/-} présentent un phénotype anxieux plus important que les souris contrôles (Amilhon et al., 2010). Ceci peut être expliqué par le fait que, dans le raphé dorsal, les neurones 5-HT co-exprimant TPH2 et VGLUT3 projettent préférentiellement sur les régions corticales du cerveau, modulant ainsi de manière différentielle (libération de 5-HT ou co-libération 5-HT/glutamate) les réponses comportementales face au stress par exemple ou d'autres situations aversives (Ren et al., 2018).

Par ailleurs, des études utilisant des techniques électrophysiologiques, pharmacologiques et optogénétiques montrent que dans l'amygdale basale, la stimulation des

fibres 5-HT à basse fréquence induit une libération de glutamate alors qu'une stimulation à haute fréquence provoque une libération de 5-HT (Sengupta et al., 2017). Ceci suggère que la co-transmission glutamate/5-HT est plus complexe qu'une libération synchrone des 2 neurotransmetteurs et dépend de l'activité des neurones 5-HT. Ainsi, en plus de réguler l'activité des neurones non 5-HT présents au sein du raphé, la neurotransmission glutamatergique, via la présence de VGLUT3 dans les neurones 5-HT, affecte directement la transmission 5-HT.

C. Transporteur à la sérotonine

Le transporteur à la sérotonine, ou SERT, est une protéine possédant 12 domaines transmembranaires. Il est majoritairement localisé au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Allen et al., 2007) où il peut exister sous formes de monomères ou d'oligomères, ces derniers pouvant être stabilisés par la liaison directe de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) au SERT (Anderluh et al., 2017). Il s'agit d'un transporteur échangeur de Na^+/Cl^- dont le mécanisme de recapture actif de la sérotonine requiert de l'énergie. Cette énergie est acquise via l'hydrolyse d'ATP ou via les mouvements inverses aux gradients électrochimiques (Cooper et al., 2019) par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (**Figure 5**). Le SERT est la cible des antidépresseurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et permet également de transporter d'autres substrats dérivés de l'amphétamine tels que la 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine ou MDMA.

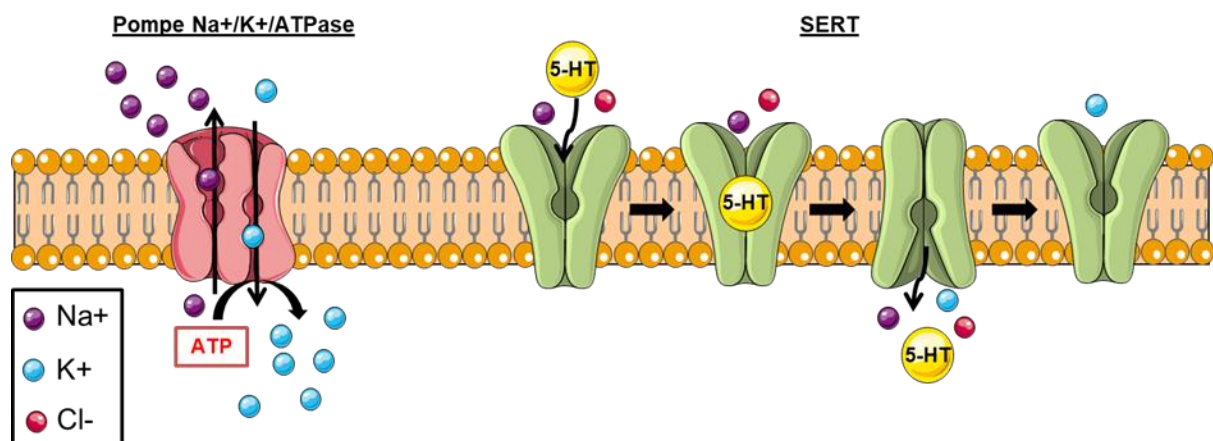


Figure 5 : Transport de la sérotonine à travers la membrane plasmique par le SERT. La pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ va former un gradient électrochimique en augmentant la concentration intracellulaire de potassium (K^+) et en diminuant la concentration

extracellulaire de sodium (Na^+) via l'hydrolyse de molécules d'ATP. Ce gradient va permettre au transporteur à la sérotonine (SERT) de capter la sérotonine (5-HT) extracellulaire, accompagnée de Na^+ et de Cl^- (chlore) en échange de K^+ .

1. Distribution

Le transporteur à la sérotonine est exprimé par les neurones du raphé projetant dans l'ensemble du cerveau. On retrouve son expression dans le noyau caudé putamen, l'amygdale, la substance noire, le nucleus accumbens (Nacc), les aires corticales, le noyau olfactif, l'hippocampe, le septum et le pallidum ventral. Une très forte densité de fibres axonales SERT positives sont retrouvées dans la VTA (Belmer et al., 2017). Le SERT est également fortement exprimé par les neurones 5-HT au niveau des noyaux du raphé dorsal et en plus faible abondance dans les noyaux médian et ventrolatéral (Bengel et al., 1997).

Le SERT se trouve proche de l'élément synaptique mais aussi au niveau de la membrane axonale. Il est souvent utilisé comme marqueur pour étudier le pattern de projections des fibres sérotoninergiques (Belmer et al., 2017). En effet, à l'âge adulte, le SERT est exclusivement exprimé par les neurones 5-HT. Mais durant le développement, quelques neurones non sérotoninergiques l'expriment de manière transitoire, notamment dans le cortex limbique, la rétine, le thalamus et l'hypothalamus (Lebrand et al. 1998; Narboux-Nême et al. 2008). Des études ont montré une expression transitoire de l'ARNm durant le développement embryonnaire et jusqu'au jour post-natal P28 dans ces régions cérébrales (Hansson et al., 1998; Zhou et al., 2000). Cependant, aucun marquage TPH2 n'a été observé dans ces fibres durant la période post-natale suggérant que ces neurones ne sont pas capables de produire de la 5-HT mais uniquement d'en contrôler la concentration extracellulaire (Hansson et al., 1998). L'expression de SERT dans des fibres non 5-HT jusqu'à la troisième semaine post-natale semble coïncider avec la fin de maturation du système 5-HT et la mise en place de ses différents acteurs (Awasthi et al., 2021; Narboux-Nême et al., 2008).

2. Activité et régulation

Le contrôle de la concentration de 5-HT dans le milieu extracellulaire est très important pour le maintien d'une transmission 5-HT fonctionnelle. C'est pourquoi un dérèglement de l'homéostasie sérotoninergique extracellulaire peut être à l'origine de troubles et maladies psychiatriques.

Les antidépresseurs de type ISRS, qui ciblent le SERT, vont bloquer la recapture de 5-HT et prolonger sa signalisation. Le transporteur de la 5-HT est également inhibé par des traitements d'antidépresseurs tricycliques qui, en plus d'agir sur le système 5-HT, modulent le système noradrénergique.

Il existe une seule copie du gène *Slc6A4* codant pour le SERT exprimée par tous les tissus mais avec des promoteurs spécifiques à chaque tissu. La partie C-terminal du SERT interagit avec de nombreux partenaires dont des protéines du cytosquelette (Chang et al., 2012; Mochizuki et al., 2005). Le SERT subit de nombreuses modifications post-transcriptionnelles tels que des phosphorylations, glycosylations et la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines 200 et 209 qui permettent d'obtenir la conformation mature de ce transporteur (Cooper et al., 2019; Prasad et al., 2019; Sørensen et al., 2014). Parmi les variants génétiques connus du gène *Slc6a4*, les variants courts (allèle S, pour "short") et longs (allèle L) contenant respectivement 14 et 16 répétitions sont les plus étudiés. Lesch et al. (1996) ont montré que le variant court est associé à une activité transcriptionnelle plus faible, impliquant une expression de SERT inférieure que pour le variant long. Chez les humains porteurs du variant court, le risque de développer des maladies psychiatriques (dépression, anxiété) ou d'avoir des comportements agressifs est plus élevé que chez les personnes porteuses du variant long.

De plus, il existe un polymorphisme du gène du transporteur à la 5-HT (ou SNP, single nucleotide polymorphisme) qui résultent en 2 formes distinctes de l'allèle L (L-A et L-G) et de l'allèle S (S-A et S-G). Ces SNP leur confèrent des activités transcriptionnelles différentes (Hu et al., 2006) ce qui influe sur l'expression du transporteur à la sérotonine, donc la transmission 5-HT et le risque de développer certaines pathologies dans un environnement donné (Houwing et al., 2017). En effet, dans un modèle de souris surexprimant transporteur à la sérotonine, mimant ainsi un polymorphisme présent chez l'humain, on observe un phénotype anxieux moins élevé que chez des souris contrôles dans certains tests comportementaux (Jennings et al., 2006).

D'autres régulations du transporteur à la sérotonine existent :

- Le promoteur du gène SERT contient une séquence CRE (élément de réponse à l'AMPc) impliquant une régulation de la transcription de ce gène par la signalisation AMPc. Dans un modèle de lignée de cellules RN64A (cellules dérivées du raphé

dorsal de rat), l'élévation intracellulaire d'AMPc augmente l'activité de recapture du SERT et est maintenue par l'activité de la PKA. Cette action semble être accompagnée d'une augmentation de l'expression de la protéine SERT, l'inhibition de sa dégradation et la différenciation des cellules RN64A (Yammamoto et al., 2013).

- Chanrion et al., (2007) ont mis en évidence une interaction entre l'enzyme produisant l'oxyde nitrique neuronal (ou nNOS, neuronal Nitric Oxide Synthase) et le SERT. Cette enzyme est activée par la liaison de Ca^{2+} /Calmodulin pour former de l'oxyde nitrique à partir de L-arginine, indiquant une activité dépendante des taux calciques intracellulaires (Bredt and Snyder, 1990). Le NO, à travers l'action du cGMP est capable d'augmenter l'activité du SERT d'environ 30%. De plus, l'application de 5-HT augmente la production de cGMP dans des cellules co-transfectées avec du SERT et la nNOS; cet effet étant dépendant de leur liaison directe (Chanrion et al., 2007). De manière intéressante, dans le cerveau de souris, la liaison de nNOS avec le SERT diminue l'activité de celui-ci d'environ 45% via l'inhibition de son transport à la surface. D'un point de vue comportemental, le phénotype dépressif est aboli après injection d'inhibiteurs de nNOS ou chez les souris dépourvues du gène nNOS dans un protocole de dépression induite par un stress chronique. Ainsi, les interactions réciproques entre le SERT et le nNOS sont capables de moduler la transmission 5-HT et constituent une cible thérapeutique prometteuse dans les troubles de types dépressifs.
- Le SERT contient de nombreux sites de phosphorylation par la PKA, la PKC et la protéine kinase dépendante du Ca^{2+} /calmoduline. Dans des cellules 1C11 (progéniteurs neuro-ectodermal) qui expriment de manière endogène, après 4 jours de différenciation, le transporteur à la 5-HT, le R-5-HT2B promeut la phosphorylation du SERT et joue donc un rôle essentiel dans le taux de 5-HT extracellulaire. Il a été montré qu'une hyperphosphorylation du SERT médiée par la stimulation du R-5-HT2B par son agoniste affecte la liaison des ISRS au transporteur à la sérotonine. Cet effet pourrait être médié par la phosphorylation de la PKC sur le résidu sérine 277, induisant ainsi l'internalisation du SERT (Sørensen et al., 2014). La voie PKC dépendante de l'activation des R-5-HT2B affecte aussi l'activation de la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ /ATPase (Launay et al., 2006).

D. Implication du système sérotoninergique dans les maladies psychiatriques

Comme mentionné plus haut dans ce chapitre, le système 5-HT est hautement conservé au sein des espèces vertébrées et invertébrées. Du fait de son organisation topographique, le système 5-HT module un panel considérable de processus et son altération peut donc conduire à divers comportements inadaptés et maladies psychiatriques. En effet, le noyau B7 du raphé projette abondamment dans le cerveau antérieur, l'amygdale, le cortex et le thalamus. Le noyau B6 innervent majoritairement l'hypothalamus et l'hippocampe dont il est une source majeure de 5-HT dans la zone sous ventriculaire (SVZ). Le noyau B8, quant à lui, projettent principalement dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le noyau interpédonculaire (Muzerelle et al., 2016). Ces régions sont associées à la régulation des émotions peur/aversion *versus* récompense (cerveau antérieur, amygdale), à la régulation du sommeil (hypothalamus) mais aussi à la locomotion (cortex) et l'addiction (noyau interpédonculaire, aire tegmentale ventrale entre autres). La forte densité de fibres 5-HT dans l'hippocampe suggère également une implication du système 5-HT dans les formes d'apprentissages et de mémoire.

Parmi toutes ces modulations, le système 5-HT joue un rôle prépondérant dans la réaction face au stress (adaptabilité, fuite, confrontation, etc). Bien que nécessaire à l'adaptation à notre environnement, une mauvaise gestion ou un excès de stress peut conduire à des troubles anxieux et dépressifs. Un des modèles de dépression couramment utilisé est le modèle de défaite sociale chronique. Pour cela, durant une à cinq semaines, on confronte quotidiennement une souris naïve avec une souris agressive lors de sessions courtes (environ 20 minutes). Ce protocole induit un phénotype dépressif chez la souris naïve que l'on peut attester par une anhédonie, un désintérêt des interactions sociales ou encore une augmentation des taux plasmatique de corticostérone.

Ce modèle présente, entre autres, une augmentation des taux d'ARNm de *Htr1a* et de *Slc6a4* associée à une augmentation des taux de R-5-HT1A dans le raphé dorsal (Carneiro-Nascimento et al., 2021; Filipenko et al., 2002; Zhang et al., 2012). Il est intéressant de noter que, dans les neurones 5-HT, la signalisation associée aux glucocorticoïdes est capable de réguler positivement la transcription du gène humain de la protéine SERT. En effet, la corticostérone augmente l'expression du SERT et son activité de recapture (Glatz et al., 2003; Zhang et al., 2012) Ces modifications pourraient être à l'origine d'une diminution de

l'activité du système 5-HT et de la mise en place d'un phénotype dépressif, en lien avec une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS). En effet, les patients dépressifs présentent une sur-activation de l'axe HHS qui se traduit, entre autres, par une augmentation du taux de corticostérone ainsi qu'une diminution du volume de l'hippocampe (Varghese and Brown, 2001) et une perturbation du cycle circadien.

En utilisant un protocole de stress répété ("inescapable tail shock") chez des rats adultes, (Vincent et al., 2018a) ont montré dans le raphé dorso-médian une augmentation du taux d'ARNm *Tph2*, une augmentation du taux de la protéine TPH2 et une augmentation du taux de corticostérone plasmatique, respectivement, 4h, 24h et 28h après la fin du test. Ces résultats corroborent les études menées chez des personnes suicidées qui présentent une augmentation des taux d'ARNm du gène *Tph2* et de la protéine associée dans le raphé dorsal (Boldrini et al., 2005; Bonkale et al., 2006).

L'expression du gène *Tph2* est par ailleurs inhibée par les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) dans les noyaux du raphé dorsal (Heydendael and Jacobson, 2010; Vincent et al., 2018b). L'administration chronique de corticostérone induit un phénotype anxieux et de type dépressif de manière dose-dépendante. Ce traitement provoque une diminution de la concentration plasmatique d'ACTH (hormone corticotrope hypophysaire stimulant la production de corticostérone) ainsi qu'une atrophie des glandes surrénales (Donner et al., 2012). De plus, il a été montré que les antidépresseurs sont capables de moduler l'expression des GR du raphé dorsal (Heydendael and Jacobson, 2010). Ceci suggère une implication de l'axe HHS dans la régulation de la transmission 5-HT et la réponse aux ISRS.

Cependant, il n'est pas nécessaire d'appliquer des protocoles de longue durée pour observer une réponse du système 5-HT au stress. Un événement de stress aigu, unique (test de nage forcée) augmente l'activité des neurones 5-HT dans le raphé dorsal (Ehlinger and Commons, 2019). De cette étude a été déduit que les mécanismes d'adaptation au stress sont dépendants des canaux calciques Cav1.2 de type L des neurones du raphé et de l'auto-inhibition médiée par le R-5-HT1A. En effet, les souris n'exprimant plus ces canaux calciques spécifiquement dans les neurones 5-HT présentent un temps d'immobilité plus élevé que les souris contrôles donc sont moins combatives, suggérant qu'elles s'adaptent moins bien à un nouveau stress. Ce comportement est rectifié via l'injection d'un antagoniste

des R-5-HT1A (Ehlinger and Commons, 2017, 2019) , signifiant qu'il y a une augmentation de l'activité de ces récepteurs chez les souris mutantes après stress.

Ce lien entre stress et intégrité des R-5-HT1A a déjà été mis en évidence précédemment. L'ablation des glandes surrénaliennes chez le rat et donc l'absence de production de corticostérone induit une diminution significative de la liaison du R-5-HT1A pour son agoniste, alors qu'un traitement de corticostérone reverse ce résultat. En effet, en se fixant sur le GR, la corticostérone est capable de diminuer l'affinité et la signalisation de l'autorécepteur 5-HT1A (Bellido et al., 2004). De plus, via des études *in vitro*, il a été montré que le GR module directement l'expression du gène du R-5-HT1A en se fixant sur un élément de réponse aux glucocorticoïdes présents dans son promoteur (Ou et al., 2001).

Ainsi, une augmentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire se traduisant par une élévation du taux de corticostéroïdes peut moduler différenciellement le système 5-HT via les récepteurs à la 5-HT et donc participer à la mise en place de phénotypes anxieux et dépressifs.

CHAPITRE II : Les récepteurs à la sérotonine

A. Description

Une fois libérée dans la fente synaptique ou dans le milieu extracellulaire, la sérotonine va activer les récepteurs 5-HT (R-5-HT) des neurones cibles et également des neurones 5-HT eux-mêmes (auto-régulation). Hormis le R-5-HT3 qui est un canal ionique perméable aux cations, tous les autres R-5-HT sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). De manière générale, les RCPG représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires et sont la cible de 30 à 40% des traitements médicamenteux (Hauser et al., 2017). Leur activation, permettant l'induction et la transmission de divers messagers, se traduit en un changement de conformation qui va activer des voies intracellulaires par les protéines $G\alpha$ ou d'autres effecteurs comme les protéines $\beta\gamma$, les β -arrestines, ou les kinases de RCPG.

Il existe 7 sous-types de récepteur à la sérotonine (5-HT1 à 5-HT7) qui se répartissent en 3 groupes selon leur couplage à la protéine $G\alpha$ (Barnes and Sharp, 1999). En effet, les R-5-HT1 sont couplés à la protéine $G\alpha_i$ et leur activation induit une régulation négative de l'adénylate cyclase (AC). Les R-5-HT2 sont couplés à la protéine $G\alpha_q$ conduisant à l'activation de la phospholipase C (PLC) et donc la production d'inositol tri-phosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). Les R-5-HT4/6/7, quant à eux, activent l'AC et donc la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) via leur couplage à la protéine $G\alpha_s$ (**Figure 6**).

Durant ma thèse, mon attention s'est portée sur le R-5-HT2B et son interaction avec, d'une part, la protéine de pontage CIPP (**Article 1**) et d'autre part, avec le R-5-HT1A (**Article 2**). C'est pourquoi, les R-5-HT1A et R-5-HT2B feront l'objet de deux chapitres distincts. Dans cette partie, je décrirai les principales caractéristiques des différents récepteurs à la 5-HT et comment leur activité peut agir sur la modulation du système 5-HT et de ses cibles.

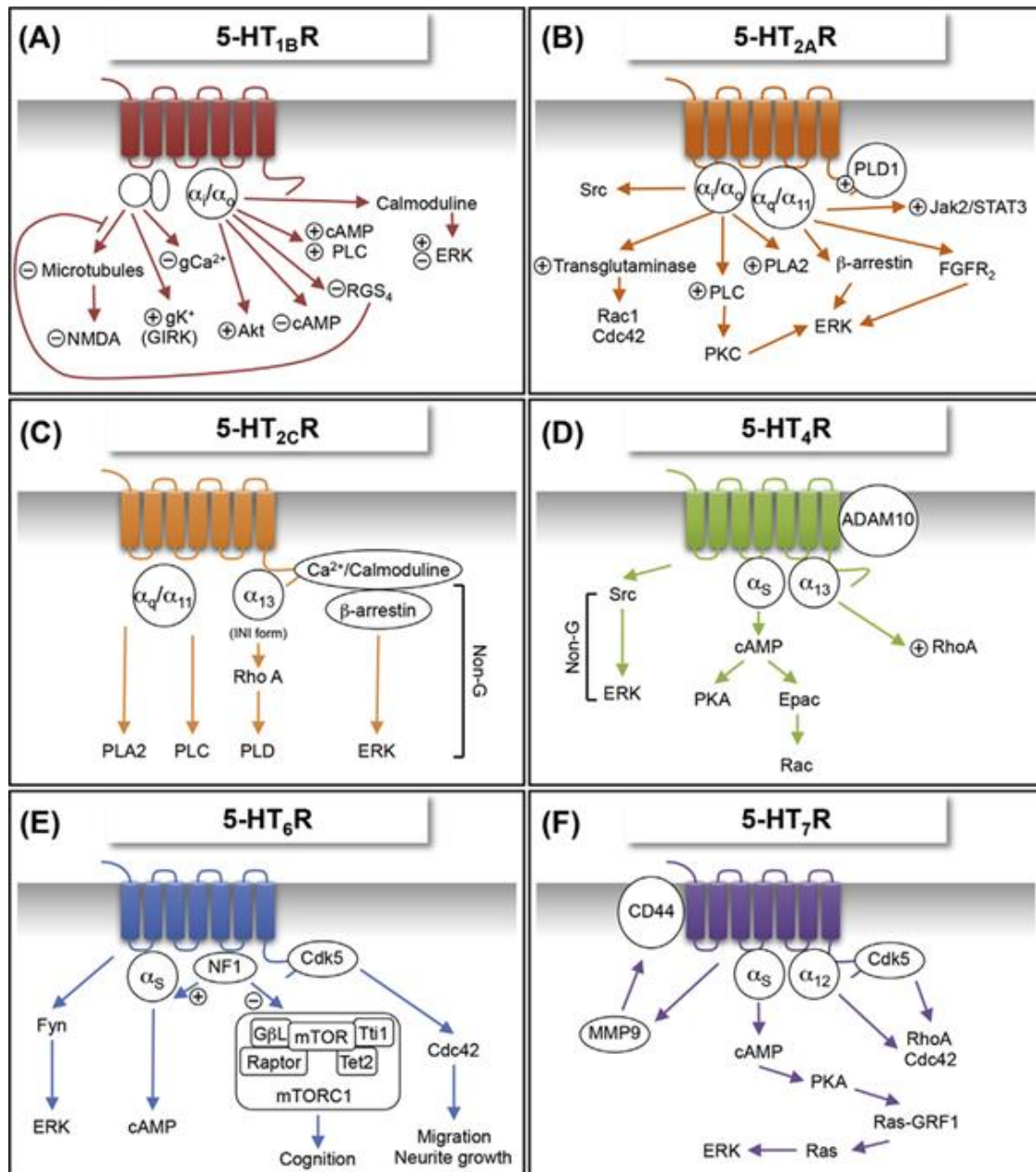


Figure 6 : Voies de signalisation des différents récepteurs à la sérotonine. Les récepteurs 5-HT₁ sont couplés à la protéine G_i; les récepteurs 5-HT₂ sont couplés à la protéine G_q. Les récepteurs 5-HT_{4/6/7} sont majoritairement couplés à la protéine G_s (Marin et al., 2020).

1. Les récepteurs 5-HT₁

Le récepteur 5-HT_{1B}

Couplé à la protéine G_i, le R-5-HT_{1B} est négativement couplé à l'AC et sa stimulation induit une diminution des taux intracellulaires d'AMPc. Via sa sous-unité, il agit

également sur l'ouverture des canaux GIRK qui provoquent l'hyperpolarisation neuronale (Heblinski et al., 2019).

Le R-5-HT1B est fortement exprimé au niveau des neurones du Nacc qui innervent, entre autres, la VTA, ce qui suggère son implication dans la régulation du système dopaminergique et notamment la prise de drogues. Il intervient dans la sensibilisation psychomotrice (Neumaier et al., 2002) et les effets récompensants de la cocaïne (Barot et al., 2007). Par ailleurs, comme les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2B, le R-5-HT1B est exprimé par les neurones 5-HT mais dans les projections axonales uniquement où il va réguler négativement la libération synaptique de 5-HT dans les régions cibles telles que l'hippocampe. Dans un modèle de souris dépourvues d'autorécepteurs 5-HT1B, on observe un phénotype de type anxieux et dépressif en comparaison avec des souris contrôles (Nautiyal et al., 2016).

Le récepteur 5-HT1D

Dans le SNC, le R-5-HT1D est exprimé en faible quantité à l'âge adulte dans les ganglions de la base (globus pallidus, la substance noire, le putamen caudé), l'hippocampe et le cortex (Bruinvels et al., 1993). Dû à sa grande similarité structurelle avec le R-5-HT1B, il existe peu de composés pharmacologiques (agoniste/antagoniste) spécifiques du R-5-HT1D, ce qui rend son étude difficile (Hoyer et al., 2002), et de nombreux traitements contre la migraine (les tryptans, agonistes des R-5-HT1B/1D) ne font pas la distinction entre ces deux récepteurs (Goadsby, 1998; Lipton et al., 2004).

2. Les récepteurs 5-HT2

Le récepteur 5-HT2A

Comme tous les récepteurs 5-HT2, le R-5-HT2A est couplé à la protéine Gαq et sa stimulation active la PLCβ conduisant à une accumulation d'IP3 et une augmentation des taux calciques intracellulaires via l'activation des canaux calciques de type L et de la PLC. Le R-5-HT2A active également la PLA2 via un couplage à la Gαi/o et Gα12/13 (Day et al.,

2002; Kurrasch-Orbaugh et al., 2003). Sa signalisation et son trafic intracellulaire sont régulés, entre autres, par son interaction directe avec la protéine PSD95 (Xia et al., 2003).

Le R-5-HT_{2A} est fortement exprimé dans le cortex cérébral, le cortex piriforme, le bulbe olfactif, le cortex entorhinal et modérément au niveau du système limbique et des ganglions de la base. Du fait de son interaction avec de nombreuses drogues hallucinogènes et antipsychotiques, le R-5-HT_{2A} est suspecté de jouer un rôle important dans la schizophrénie. En effet, on retrouve des symptômes de type schizophrènes après injection d'hallucinogènes. Par ailleurs, la stimulation du R-5-HT_{2A} est associée à une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire (Zhang and Stackman, 2015; Zhang et al., 2013).

Le récepteur 5-HT_{2C}

Le R-5-HT_{2C} présente une activité constitutive (Berg et al., 1999; Herrick-Davis et al., 1999) et l'une de ses particularités est qu'il est l'un des seuls récepteurs à 7 domaines transmembranaires à subir des éditions de son ARN remplaçant des résidus adenosines en inosines ("A-to-I editing"). En plus de cette modification post transcriptionnelle qui module sa signalisation et sa désensibilisation (Burns et al., 1997; Gardiner and Du, 2006; Herrick-Davis, 2013; Werry et al., 2008), l'ARNm du R-5-HT_{2C} subit, comme les autres R-5-HT, des épissages alternatifs, ce qui complexifie son mode d'action sur les neurones qui l'expriment (Stamm et al., 2017).

Le R-5-HT_{2C} est majoritairement exprimé par les cellules épithéliales du plexus choroïdes et module le volume et la composition du fluide cérébro-spinal. Ailleurs dans le cerveau, on le retrouve au niveau des régions limbiques, l'hippocampe, l'amygdale, les ganglions de la base, le nucleus accumbens et l'aire tegmental ventral. Exprimé par les neurones dopaminergiques et GABAergiques de l'aire tegmentale ventrale (Bubar et al., 2011), il inhibe la voie mésolimbique et la libération *in vivo* de dopamine dans le striatum et le nucleus accumbens (De Deurwaerdère et al., 2020; Deurwaerdère et al., 2004; Navailles et al., 2006). Par ailleurs, le R-5-HT_{2C} est également exprimé par les neurones GABAergiques au sein du raphé dorsal et médian, suggérant une modulation négative de la transmission 5-HT (Serrats et al., 2005). Il est impliqué dans de nombreuses maladies psychiatriques telles que la dépression, la schizophrénie, la maladie de Parkinson ou l'autisme (Palacios et al., 2017; Rosenzweig-Lipson, 2011). Il présente une affinité de l'ordre du nanomolaire pour certains ISRS (Pälvimäki et al., 1996) et intervient dans la réponse rapide aux antidépresseurs (Opal et al., 2014).

3. Le récepteur 5-HT₃

Le R-5-HT₃ est le seul récepteur à la 5-HT à ne pas être couplé à une protéine G. En effet, c'est un récepteur canal composé de 5 sous-unités et appartient à la famille des récepteurs Cys-loop (canaux ioniques pentamériques activés par un ligand). Ses sous-unités peuvent être identiques et donc former un récepteur homopentamérique 5-HT_{3A} ou avoir une composition mixte de sous-unités 5-HT_{3A} et 5-HT_{3B-E} formant ainsi un R-5-HT₃ hétéropentamérique (Thompson and Lummis, 2006).

Le R-5-HT₃ est exprimé à la fois dans le système nerveux central et périphérique. Dans le SNC, il présente un pattern de distribution large et se retrouve dans de nombreuses régions tel que le cortex, l'hippocampe, le Nacc, la substance noire et la VTA (Engel et al., 2013; Tecott et al., 1993).

4. Les récepteurs 5-HT_{4/6/7}

Le récepteur 5-HT₄

La voie canonique attribuée au R-5-HT₄ est la signalisation G α s mais des études dans des lignées cellulaires en culture ont montré que le R-5-HT₄ est couplé également à la protéine G α q et G α 13 (Chang et al., 2007; Ponimaskin et al., 2002).

Dans le système nerveux central, le R-5-HT₄ est exprimé au niveau post-synaptique (non exprimé par les neurones 5-HT) dans l'hypothalamus, les ganglions de la base, l'amygdale, l'hippocampe, le bulbe olfactif et le néocortex. Dans le cortex préfrontal, les R-5-HT₄ modulent la fréquence de décharge des neurones 5-HT et chez les souris knockout pour le R-5-HT₄, le taux de décharge basal des neurones du raphé dorsal est réduit de 50% comparé aux souris sauvages (Conductier et al., 2006).

Dans l'hippocampe, la stimulation du R-5-HT₄ par un agoniste augmente le phénomène de LTP, suggérant qu'il pourrait jouer un rôle dans la modulation des phénomènes d'apprentissage et de mémoire en modulant l'encodage d'informations spécifiques (Hagena and Manahan-Vaughan, 2017; Kemp and Manahan-Vaughan, 2005; Lecouflet et al., 2021; Twarkowski et al., 2016).

Le récepteur 5-HT₆

Le R-5-HT₆ est un récepteur post-synaptique couplé à la protéine Gas et son activation induit la stimulation de l'AC et donc l'augmentation intracellulaire d'AMPc.

Son expression se situe majoritairement au niveau des tubercules olfactifs, du cortex cérébral, du striatum et de l'hippocampe (Gérard et al., 1994; Hamon et al., 1999; Kohen et al., 1996; Marazziti et al., 2012). Il présente une haute affinité pour certains antidépresseurs et antipsychotiques dont la clozapine; ce qui en a fait la cible dans le traitement de certaines pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie, l'anxiété et la dépression (Abraham et al., 2014; Glatt et al., 1995).

Il module directement la signalisation cholinergique et GABAergique et indirectement la transmission glutamatergique. Son inactivation par l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens a pour conséquence d'augmenter les performances cognitives de rats dans un paradigme de labyrinthe de Morris (Bourson et al., 1995; Hirst et al., 2006). Son expression quasi-exclusive dans des zones cérébrales impliquées dans la mémoire et l'apprentissage et l'effet procognitif de son inhibition en font une cible d'intérêt dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Ferrero et al., 2017; Geldenhuys and Van der Schyf, 2008).

Le récepteur 5-HT₇

Le R-5-HT₇ est couplé à la protéine Gas et sa stimulation induit une activation de l'adénylate cyclase qui va convertir l'ATP en AMPc et active également la voie de signalisation MAPK/ERK via la stimulation du facteur Epac (Lin et al., 2003). Il présente peu d'homologie avec les autres récepteurs 5-HT (moins de 40%) mais est hautement conservé entre les espèces (90% d'homologie interespèces) (Eglen et al., 1997; Martín-Cora and Pazos, 2004).

Des techniques d'hybridation *in situ* et de northern blot ont permis de mettre en évidence sa forte densité dans le SNC au niveau de l'hypothalamus, le thalamus, l'hippocampe et le cortex cérébral. On le retrouve également dans le raphé au niveau des interneurons GABA, ce qui suggère qu'il exerce un rôle direct sur la transmission 5-HT en modulant l'activité des neurones 5-HT (Kusek et al., 2015).

Chez les souris knockout pour le R-5-HT₇, bien qu'aucune anomalie majeure ne soit détectée (pas de mortalité aberrante, croissance et régulation de la température normales), on

observe une altération du cycle circadien et un phénotype moins combatif dans le test de nage forcée (Guscott et al., 2005). Il est par ailleurs transitoirement exprimé au cours du développement post-natal avec le SERT dans des neurones non 5-HT du cortex préfrontal où il est indispensable aux effets comportementaux et morphologiques d'un traitement périnatal d'ISRS (Olusakin et al., 2020).

B. Partenaires protéiques des R-5-HT

1. Protéines PDZ

A l'image de nombreux RCPG, les récepteurs 5-HT possèdent des sites de liaison aux protéines PDZ. Composées d'environ 90 acides aminés, il s'agit de séquences partagées par les protéines PSD-95 (postsynaptic density protein), DlgA (*Drosophila* disc large tumor suppressor), et ZO-1 (zonula occludens-1 protein) dont elles tirent leur nom (PDZ). Elles jouent le rôle d'adaptateurs cytoplasmiques en interagissant avec des protéines membranaires et cytoplasmiques et modulent ainsi la signalisation cellulaire, l'internalisation des protéines membranaires, leur recyclage, etc. De nombreuses protéines PDZ ne possèdent pas d'activité enzymatique et sont simplement des protéines d'échafaudage, faisant le lien entre 2 autres protéines ou plus. Elles reconnaissent une séquence de résidus spécifiques sur la partie C-terminale des protéines avec lesquelles elles s'associent. Il existe environ 500 domaines PDZ au sein du génome humain (Kim and Sheng, 2004; Liu and Fuentes, 2019).

Les protéines PDZ qui se fixent aux domaines PDZ des R-5-HT peuvent avoir différents effets. Par exemple, *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, le R-5-HT_{2C} interagit avec le dixième domaine PDZ de la protéine MUPP1. Cette interaction facilite la phosphorylation du R-5-HT₂ et est sensible à l'application de sérotonine (Parker et al., 2003). Les R-5-HT_{2A} et R-5-HT_{2B} sont également capables de s'associer à MUPP1 dans une lignée de cellules COS-7 (Bécamel et al., 2002).

Par ailleurs, les R-5-HT_{2A} et R-5-HT_{2C} interagissent avec la protéine PSD95. Bien que ces deux récepteurs à la sérotonine présentent de fortes similarités structurelles, leur association avec la protéine PSD95 engendre des actions différentes. Pour le R-5-HT_{2A},

l'interaction de PSD95 avec son domaine PDZ augmente la transduction du signal dépendante de ce récepteur et inhibe son internalisation sous l'action d'un agoniste spécifique (Xia et al., 2003). En revanche, pour le R-5-HT_{2C}, on observe une augmentation de la désensibilisation en présence de PSD95 sans modifier l'efficacité de sa signalisation intracellulaire en réponse à la 5-HT (Gavarini et al., 2006). De plus, il a été identifié que pour chaque sous-type de R-5-HT₂, il existe un ensemble de protéines PDZ distinctes. Par exemple, les R-5-HT_{2C} sont associés à des protéines pré-synaptiques tandis que les R-5-HT_{2A} sont majoritairement associés à des protéines post-synaptiques (Bécamel et al., 2004).

Ces domaines PDZ sont donc importants puisqu'ils permettent de rapprocher deux protéines et permettre leur potentielle hétérodimérisation mais sont aussi capables d'affecter la signalisation cellulaire et augmenter les cinétiques de transmission du signal.

2. Oligomérisation

De plus en plus d'études montrent que les RCPG forment des complexes oligomères. Il existe de nombreuses techniques permettant d'étudier la dimérisation de deux récepteurs (Cottet et al., 2012; Lohse et al., 2012). Parmi elles, le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) a été utilisé lors de ce travail de thèse et son principe sera détaillé dans la partie Résultats.

La dimérisation (2 récepteurs) ou oligomérisation (3 récepteurs ou plus) de RCPG se fait parfois avant d'atteindre la membrane plasmique, dans le réticulum endoplasmique et régule alors l'expression à la surface de ces récepteurs. Ce phénomène peut également affecter la transduction du signal des récepteurs impliqués dans un oligomère ou dimère ainsi que leur processus d'internalisation ou encore leur réponse à des antagonistes/agonistes (Grant et al., 2004; Milligan, 2010; Pellissier et al., 2011; Terrillon and Bouvier, 2004; Toneatti et al., 2020).

Ainsi, l'oligomérisation de RCPG complexifie considérablement les mécanismes d'actions de ces derniers. Et puisque ce phénomène affecte leur signalisation intracellulaire, un déséquilibre entre monomères/hétéromères peut être impliqué dans des pathologies et représentent donc des cibles thérapeutiques très intéressantes (Borrito-Escuela et al., 2021). Par ailleurs, l'association de deux récepteurs couplés aux protéines G peut être un phénomène

dynamique et que, selon les conditions, ces récepteurs peuvent s'associer et se dissocier avec des cinétiques différentes (Calebiro and Sungkaworn, 2018; Kasai and Kusumi, 2014).

Dans cette partie, je présenterai quelques exemples de récepteurs 5-HT formant des homodimères et hétérodimères et aborderai leurs caractéristiques fonctionnelles.

a. Homodimère

Un homodimère est un complexe de 2 éléments (ici, deux récepteurs 5-HT) identiques. Il a été montré que les R-5-HT1A, 1B, 1D, 4 et 7 sont capables de former des homodimères (Berthouze et al., 2005; Claeysen et al., 2013; Xie et al., 1999). A l'exception du R-5-HT2B, les récepteurs de la famille des 5-HT2 forment également des homodimères. Il est intéressant de noter que les R-5-HT2C peuvent exister sous la forme de monomères, homodimères, ou oligomères mais que sous l'action d'antagonistes de ce récepteur, la forme monomérique est privilégiée (Herrick-Davis et al., 2005).

b. Hétérodimère

En 1999, Xie et al. montrent pour la première fois la dimérisation de 2 RCPG de types différents : le **R-5-HT1B** et le **R-5-HT1D**. *In vitro*, lorsqu'ils sont exprimés seuls, ces récepteurs restent sous la forme de monomères ou forment des homodimères. En revanche, lorsqu'ils sont co-exprimés, ils forment préférentiellement des hétérodimères (R-5-HT1B/1D).

Le R-5-HT2A est capable de former un hétérodimère avec le récepteur dopaminergique D2 (Albizu et al., 2011; Łukasiewicz et al., 2010). La voie G α i, activée par un agoniste des récepteurs D2, est inhibée en présence de R-5-HT2A, suggérant une modulation de la voie G α i dépendante du D2 par la formation d'**hétérodimère R-5-HT2A/D2** (Borroto-Escuela et al., 2010, 2014, 2021).

Par ailleurs, en utilisant la méthode de ligation par proximité (qui attestent une distance inférieure à 40 nm entre deux éléments), il a été montré dans le cortex de souris que l'injection répétée d'halopéridol augmente le taux d'hétérodimères **R-5-HT1A/D2** et un traitement de clozapine augmente la présence des hétérodimères **D2/5-HT1A** et **R-5-HT1A/5-HT2A** (Szlachta et al., 2018).

En 2008, (González-Maeso et al., 2008) ont identifié pour la première fois le dimère **5-HT2A-mGluR2** et son implication dans les phénomènes de psychoses. L'activation du R-5-HT2A induit des courants excitateurs post synaptiques dans la couche V des neurones pyramidaux qui sont supprimés si l'on ajoute un agoniste des récepteurs mGluR (Marek et al., 2000). Il existe une interaction entre ces deux récepteurs : dans des études de co-expression des récepteurs 5-HT2A et mGluR2 dans des lignées cellulaires, l'activation du récepteur mGluR2 par un agoniste stimule la voie Gαq (couplé au R-5-HT2A) mais pas la voie Gai (Baki et al., 2016). Par ailleurs, dans le cortex de souris et dans le cortex préfrontal de patients schizophréniques, l'activation de mGluR2 augmente l'affinité du R-5-HT2A pour son agoniste alors que l'activation du R-5-HT2A, elle, diminue l'affinité de mGluR2 pour son agoniste (González-Maeso et al., 2008). *In vivo*, cette interaction est fonctionnelle et affecte probablement la réponse comportementale résultant de l'activation du R-5-HT2A (Halberstadt et al., 2019). En effet, chez des souris knockout pour mGluR2, les réponses cellulaires et comportementales à des drogues hallucinogènes ciblant le R-5-HT2A sont abolies. Ces résultats suggèrent donc que les effets dû à des composés hallucinogènes sont dépendant du complexe mGluR2/R-5-HT2A et non du R-5-HT2A seul (Moreno et al., 2011).

Le cannabis est une drogue récréative dont la molécule active, le delta 9-tétrahydrocannabinol ou THC, agit sur le système nerveux en activant les récepteurs cannabinoïdes, R-CB1. Ces récepteurs sont exprimés dans des zones cérébrales telles que l'hippocampe, l'amygdale et le cortex cérébral qui sont liées à la mémoire, l'apprentissage et la régulation des émotions. Ainsi, les consommateurs de cannabis font face à des symptômes délétères tels que des effets anxiogènes, des troubles de la mémoire mais aussi positifs tels que l'analgésie, des effets neuroprotecteurs et paradoxalement des effets anxiolytiques. Ces structures cérébrales expriment également le R-5-HT2A et celui-ci forme un hétérodimère avec le R-CB1. Le complexe **R-CB1/R-5-HT2A** participe aux effets anxiolytiques et amnésiques de la THC. Leur expression est augmentée dans l'épithélium olfactif des consommateurs chroniques de cannabis et l'usage à long terme induit des effets pro-hallucinogènes dépendants du R-5-HT2A (Galindo et al., 2018; Ibarra-Lecue et al., 2018; Viñals et al., 2015).

Le **R-5-HT2C** est capable de former des dimères avec le **R-5-HT2A** et le **R-5-HT2B**. Dans ces dimères, le R-5-HT2C masque le site de liaison des R-5-HT2A et R-5-HT2B à leurs ligands respectifs et inhibe leurs signalisations. En effet, la signalisation Gαq dépendant du

R-HT2C devient exclusive (dominante). Par ailleurs, le R-5-HT2A et le R-5-HT2B sont capables de s'hétérodimériser, bien que leur association n'affecte pas leurs signalisations (production d'IP) respectives (**Figure 7**) (Moutkine et al., 2017).

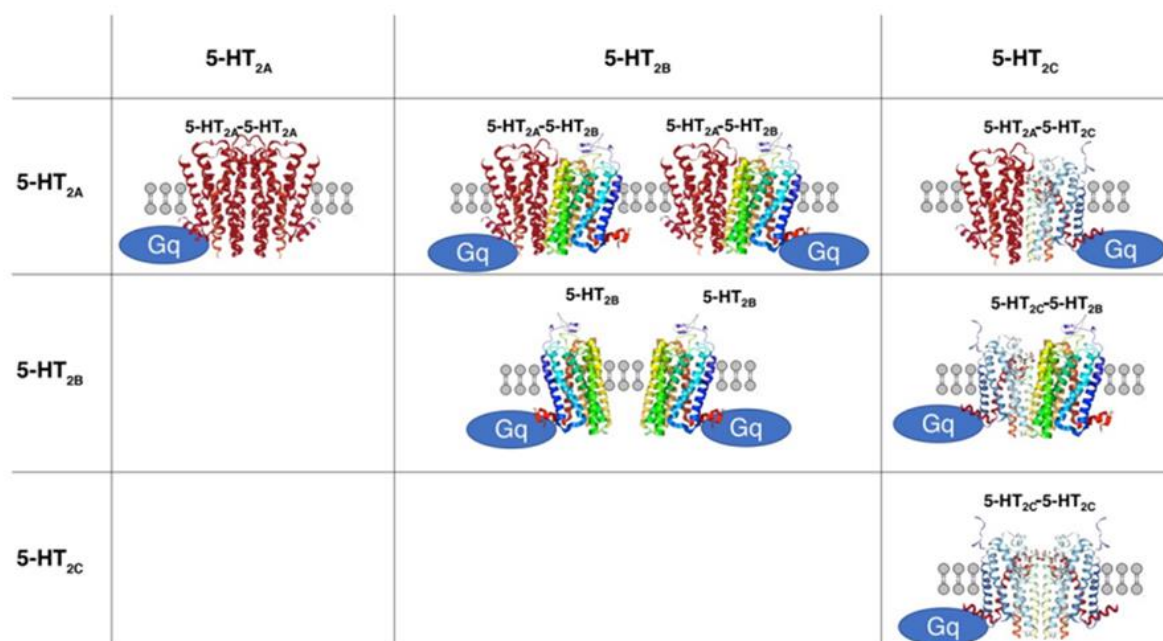


Figure 7 : Effets de la dimérisation des récepteurs 5-HT2 sur la signalisation associée à la protéine Gαq (Maroteaux et al., 2019).

Ainsi, la dimérisation affecte les récepteurs impliqués de diverses façons : pour certains récepteurs, elle est indispensable à leur expression à la membrane (e.g. R-GABA; (Jones et al., 1998; White et al., 1998), elle peut nécessaire à la liaison du ligand va entraîner une signalisation unique (Waldhoer et al., 2005). Pour d'autres récepteurs, la stimulation par un ligand suffit à induire l'internalisation des deux protomères d'un dimère (Xu et al., 2003) ou au contraire, les maintenir à la membrane plasmique malgré la liaison au ligand (Terrillon and Bouvier, 2004). L'oligomérisation de RCPG est donc un phénomène apportant un nouveau champ de recherche et fait l'objet d'un des axes de mes travaux de recherche (**Article 2**).

CHAPITRE III : Le récepteur 5-HT1A

A. Généralités

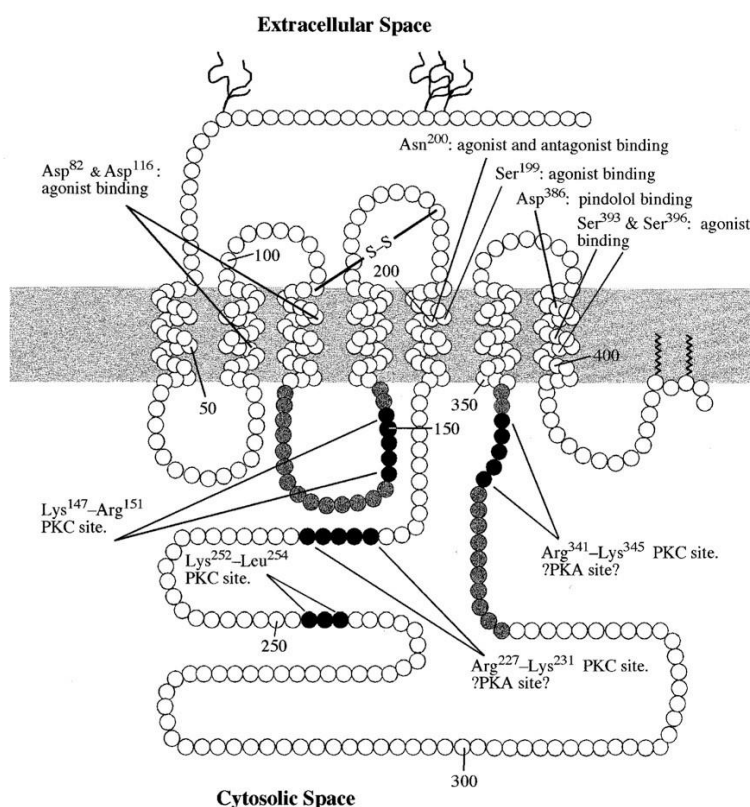


Figure 8 : Structure du récepteur 5-HT1A.

Dépourvu d'introns, le gène du récepteur 5-HT1A (R-5-HT1A) a été cloné pour la première fois en 1987 à partir des gènes de rat et de souris qui présentent environ 90% d'homologie avec le gène du R-5-HT1A humain. Chez la souris, le gène est localisé au niveau du chromosome 13 et chez l'humain, au niveau du chromosome 5 (5q11.2-q13) (Barnes and Sharp, 1999).

Il est composé de 7 domaines transmembranaires avec 3 boucles intracellulaires, contenant 3 sites de phosphorylation et 3 boucles extracellulaires, contenant 3 sites de N-glycosylation (**Figure 8**) (Olivier et al., 1999).

Le R-5-HT1A est couplé à la protéine G α_i/o et, en tant qu'autorécepteur des neurones 5-HT, il régule négativement leur activité en inhibant la voie de l'adénylate cyclase (AC) et active l'ouverture des canaux potassiques de rectification entrante, GIRK, favorisant ainsi l'hyperpolarisation des neurones (Colino and Halliwell, 1987).

B. Distribution

Du fait de la découverte très tôt d'agonistes spécifiques permettant d'analyser ses caractéristiques pharmacologiques, le R-5-HT_{1A} est l'un des récepteurs à la sérotonine les plus étudiés (Gozlan et al., 1983). La production, plus tard, d'un anticorps dirigé contre le R-5-HT_{1A} a permis d'observer sa distribution dans le cerveau et au niveau cellulaire (Gérard et al., 1994; el Mestikawy et al., 1990), corrélant ainsi les sites de liaison révélés par l'utilisation de ligands tritié et l'expression de la protéine (**Figure 9**) (Lanfumeey and Hamon, 2000).

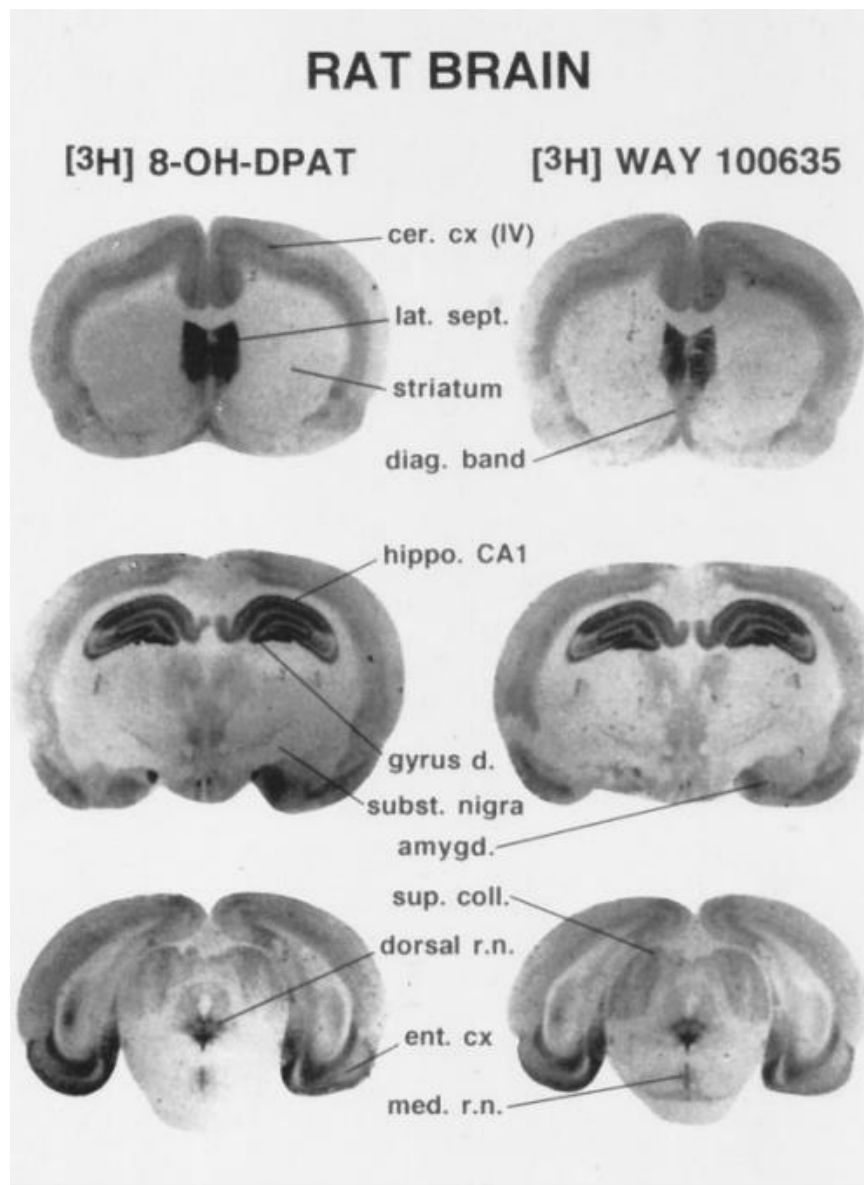


Figure 9 : Expression du R-5-HT_{1A} observée par autoradiographie via la liaison spécifique du [3H]8-OH-DPAT et du [3H]WAY 100635 (Lanfumeey and Hamon, 2000).

Ainsi, le R-5-HT_{1A} est fortement exprimé dans les régions limbiques du cerveau, mais également dans l'hippocampe, le cortex entorhinal, le cortex préfrontal, l'hypothalamus, l'amygdale, le cortex piriforme, le colliculus supérieur et le thalamus (Albert et al., 1990; Gérard et al., 1994; Pompeiano et al., 1992; Riad et al., 2000). Le R-5-HT_{1A} est également localisé au niveau somatodendritique des neurones 5-HT des noyaux du raphé où il exerce un rôle d'autorécepteur négatif (Sprouse and Aghajanian, 1988).

C. Signalisation

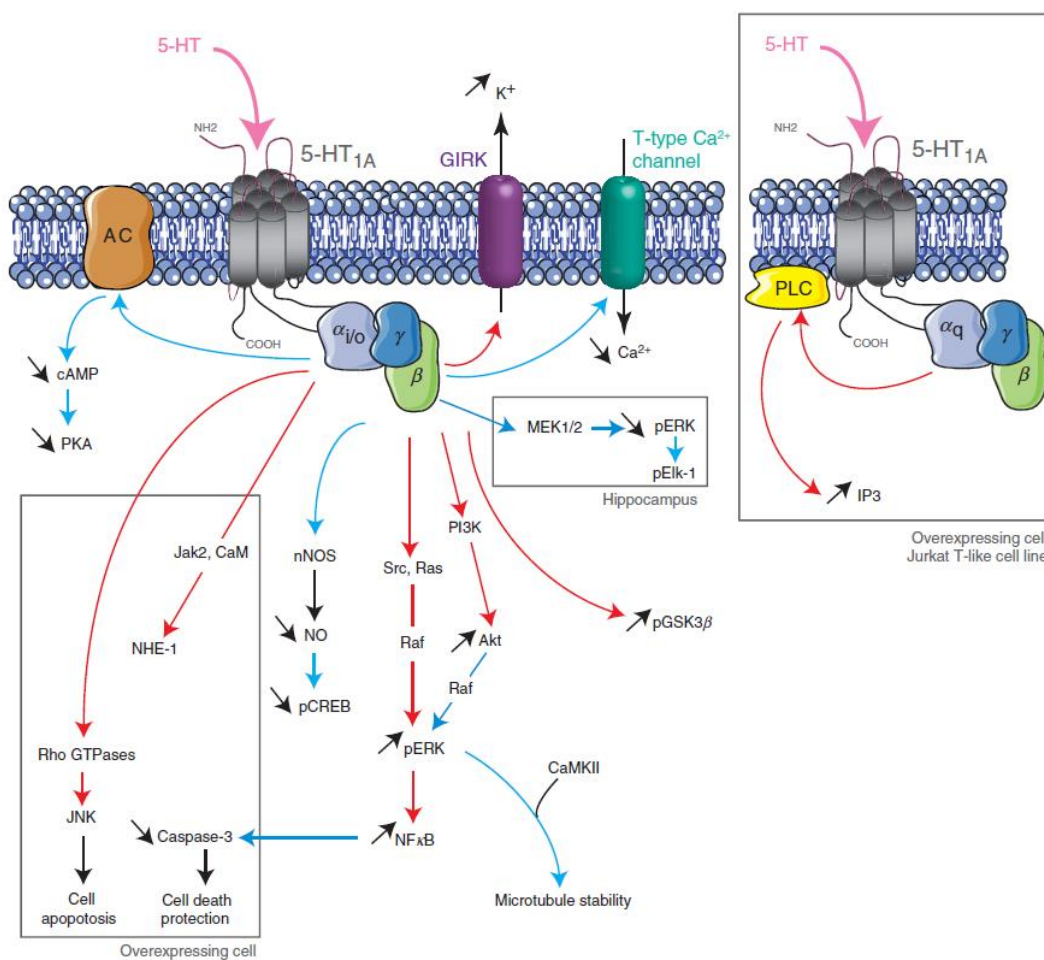


Figure 10 : Les différentes voies de signalisation attribuées au R-5-HT_{1A}. La voie canonique du R-5-HT_{1A} est la stimulation de l'adénylate cyclase par la protéine G_{αi}, ce qui induit une diminution du taux d'AMPc cytoplasmique (Masson et al.).

Voie de l'adénylate cyclase

La voie canonique de couplage du R-5-HT1A est celle de l'adénylate cyclase. Étant couplé à la protéine G α_i l'activation de ce récepteur diminue l'activité de l'adénylate cyclase ce qui contribue à réduire le taux d'AMPc et l'activité de la protéine kinase A (PKA) (**Figure 10**).

Des études ont montré que cet effet est retrouvé dans des cellules HeLa transfectées avec le gène codant pour le R-5-HT1A (Lanfumeu and Hamon, 2000), dans des cultures de neurones hippocampiques et corticaux (Dumuis et al., 1988; Sprouse and Aghajanian, 1988) mais pas dans les neurones du raphé dorsal (Clarke et al., 1996). Cette différence d'activité entre R-5-HT1A en tant qu'autorécepteur et hétérorécepteur peut être expliquée par une différence de couplage. En effet, dans le noyau du raphé dorsal, le R-5-HT1A se couple préférentiellement avec la protéine G α_3 et à la protéine G α_o dans l'hippocampe (Mannoury la Cour et al., 2006).

Voie de la phospholipase C

Bien moins efficace que l'inhibition de l'AC, dans des lignées cellulaires, la stimulation du R-5-HT1A contribue à l'activation de la phospholipase C (PLC) et donc l'hydrolyse du PIP₂. Ce couplage a également été observé dans des cultures de cellules non différenciées de raphé et d'hippocampe et de manière indirecte, dans le cortex préfrontal. En effet, l'activation de la CAMKII (protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante) dans cette région du cerveau semble passer par la voie R-5-HT1A/G α_i /PLC β (Purkayastha et al., 2012).

Voie des courants ioniques

La signalisation du R-5-HT1A est également liée à la régulation de l'activité de certains canaux ioniques. En effet, l'activation du R-5-HT1A inhibe les courants potassiques rectifiant activés par les protéines G ou GIRK (G-protein activated inwardly rectifying K⁺ currents). Cette régulation est présente tant pour les hétérorécepteurs que les autorécepteurs. Chez les souris dépourvues de la protéine GIRK2, le couplage du R-5-HT1A aux courant potassiques est totalement aboli dans l'hippocampe (Lüscher et al., 1997) et réduit dans le raphé (Llamas et al., 2015, 2017; Montalbano et al., 2015). De plus, un traitement chronique aux glucocorticoïdes entraîne une diminution de l'expression des canaux GIRK2

dans le raphé, corrélé à une diminution d'inhibition 5-HT1A-dépendante de l'activité des neurones 5-HT.

L'activation des R-5-HT1A module également les courants calciques via les canaux calciques voltage dépendants (Penington and Kelly, 1990) de type N (Bayliss et al., 1997; Koike et al., 1994) et de type L (Cardenas et al., 1997; Ehlinger and Commons, 2019) en les inhibant. Dans une lignée de cellules F11, la désensibilisation du R-5-HT1A est dépendante des taux de calcium intracellulaires, de la PKC dans ces cellules (Wu et al., 2013) et de la PKA dans le raphé (Yao et al., 2010), ce qui suggère un recrutement d'effecteurs différents dépendants de l'environnement du R-5-HT1A.

Voie ERK

Le R-5-HT1A agit également sur la voie des MAPK. Cette voie, composée de sérine/thréonine kinases, est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose, la potentialisation à long terme, etc. Cependant, les conséquences diffèrent d'un tissu à l'autre, d'une lignée cellulaire à l'autre. Alors que la stimulation du R-5-HT1A diminue les taux de phospho-ERK dans l'hippocampe mais pas dans le cortex de rat, l'application d'agoniste du R-5-HT1A augmente les taux de ERK phosphorylé dans le noyau paraventriculaire et le noyau du raphé dorsal (Sullivan et al., 2005). Cependant, *in vitro*, des études montrent dans des cultures de lignée d'hippocampe et de raphé, que la stimulation du R-5-HT1A inhibe (Kushwaha and Albert, 2005) et stimule pERK1/2 (Adayev et al., 1999), respectivement. Il semblerait donc qu'il existe une régulation de la voie ERK par le R-5-HT1A spécifique d'une région cérébrale donnée (Buritova et al., 2009).

Une modulation de la signalisation glutamatergique peut également être induite par l'activité du R-5-HT1A et ses effecteurs. Indirectement, *via* la CaMKII et la voie ERK, la stimulation du R-5-HT1A dans le cortex préfrontal et le cortex auditif conduit à une diminution des courants ioniques des R-NMDA et réduit l'expression à la surface membranaire de la sous-unité NR2B (Yuen et al., 2005). Cette action passe par l'inhibition de l'activité ERK, ce qui conduit à une diminution de la phosphorylation de MAP2, de l'interaction MAP2/microtubule et de la stabilité des microtubules. Ces effets sont

contrecarrés par l'activation des R-5-HT2A qui recrutent la bêta arrestine, empêchant ainsi le R-5-HT1A d'exercer son action sur la voie ERK (Yuen et al., 2008).

D. Régulations du gène *Htr1a*

Dans les cellules neuronales, le gène du R-5-HT1A, *Htr1a*, est réprimé par Freud-1 et Freud-2, puisque l'inhibition de ces deux protéines par l'utilisation d'un siRNA augmente l'expression neuronale des R-5-HT-1A. Dans les neurones du raphé, le R-5-HT1A est exprimé avec Freud-1 exclusivement, tandis que dans les régions cibles des neurones 5-HT, Freud-1 et Freud-2 sont co-exprimés avec les R-5-HT1A (Luckhart et al., 2016; Philippe et al., 2018). Chez les souris knockout pour le gène de Freud-1 exclusivement dans les neurones 5-HT, on observe une augmentation de l'expression du R-5-HT1A provoquant une diminution des taux de 5-HT dans le raphé. D'un point de vue comportemental, ces souris knockout développent un phénotype anxieux et dépressif (Vahid-Ansari et al., 2017). Par ailleurs, des études récentes montrent que chez l'humain, mais pas chez la souris, la région 3'UTR du gène du R-5-HT1A présente des sites d'épissage alternatif conduisant à 3 isoformes d'ARNm qui diffèrent dans leurs demi-vies, stabilités et propriétés de traduction (Le François et al., 2018).

L'expression du gène *Htr1a* est également modulée par le polymorphisme C(-1019)G (rs6295) situé dans la région promoteur du gène. Ce polymorphisme modifie l'expression du gène *Htr1a* différemment selon la région cérébrale et est reconnu par les facteurs de transcriptions Deaf1 et les protéines Hes1 et Hes5. En conditions normales, ces effecteurs vont réprimer l'expression du gène *Htr1a*, alors que le polymorphisme rs6295 va limiter leur interaction et donc favoriser l'expression de la protéine. Chez l'humain, ce polymorphisme est associé à des troubles dépressifs majeurs, une résistance à un traitement d'ISRS, une augmentation du volume de l'hippocampe (Phillips et al., 2015) et une augmentation de la réponse aversive dans l'amygdale (Selvaraj et al., 2015); tous ces troubles étant liés à une modulation de l'expression de l'autorécepteur 5-HT1A (pour revue (Albert, 2012; Albert et al., 2019; Nautiyal and Hen, 2017)).

Ces résultats complexifient d'autant plus le rôle du R-5-HT1A dans la régulation du système 5-HT et de ses régions cibles.

E. Interactions du R-5-HT1A

Dimérisation des récepteurs 5-HT1A/7

En plus de former chacun des homodimères, le R-5-HT1A s'associe avec le R-5-HT7 pour former un hétérodimère. Étudiée par FRET, cette interaction a pour conséquence d'inhiber l'activation de la protéine G α i médiée par le R-5-HT1A sans affecter la signalisation G α s du R-5-HT7. De plus, la dimérisation empêche le R-5-HT1A d'activer les GIRK, un effet médié par la protéine G $\beta\gamma$ du R-5-HT1A. Son internalisation et sa capacité à activer la MAP kinase sont également affectées, ce qui suggère un rôle de l'hétérodimérisation dans le développement et le maintien de troubles dépressifs (Prasad et al., 2019; Renner et al., 2012). Ce dimère est donc la cible de nouveaux antidépresseurs (Gu et al., 2018). Des études post-mortem par tomographie par émission de positons (PET) ont mis en évidence chez des patients dépressifs une augmentation du taux de R-5-HT1A présynaptique alors que le taux de R-5-HT1A post-synaptique est réduit par rapport à des patients non-dépressifs (Hsiung et al., 2003; López-Figueroa et al., 2004). Par ailleurs, le taux de R-5-HT7 varie également selon les conditions : alors qu'un stress chronique augmente le taux de R-5-HT7 dans l'hippocampe, un traitement chronique aux antidépresseurs inhibe son expression (Li et al., 2009). Ainsi, selon les conditions (physiologiques ou pathologiques), l'expression des R-5-HT1A et R-5-HT7 est capable d'être modifiée, de même que leur capacité à se dimériser (Naumenko et al., 2014).

Dimérisation des récepteurs 5-HT1A/2A

Comme mentionné dans le chapitre II, les R-5-HT1A et R-5-HT2A forment un complexe, que l'on retrouve majoritairement dans les cellules pyramidales des régions CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe. Ces résultats ont été obtenus sur coupes de cerveaux fixés par essai de ligature de proximité (ou "proximity ligation assay", PLA), une méthode permettant d'identifier deux protéines à une distance inférieure à 40 nm. Puis leur dimérisation a été confirmée dans des cellules HEK293T par BRET. Il est intéressant de noter que ces deux récepteurs, bien qu'exprimés dans les mêmes neurones, ne forment pas majoritairement de dimères dans d'autres régions cérébrales (où on les retrouve sous forme monomérique ou homodimérique). Le dimère R-5-HT1A/2A est dynamique et répond aux stimulations

extérieures. En effet, 24h après une session de test de nage forcée, on observe une diminution significative du nombre de complexes R-5-HT1A/R-5-HT2A dans les régions CA1 et CA2 de l'hippocampe. Par ailleurs, la dimérisation de ces récepteurs a également été démontrée par PLA dans le cortex préfrontal (Szlachta et al., 2018). Il y existe une modulation de l'activité de ces deux récepteurs l'un par l'autre dans le cortex préfrontal, où l'on retrouve 80% de colocalisation (Amargós-Bosch et al., 2004). D'un point de vue fonctionnelle, il a été montré via des expériences de compétitions par ligand radioactif sur des préparations de membranes hippocampiques que la stimulation du R-5-HT2A par un agoniste diminue l'affinité du R-5-HT1A pour son agoniste. En tant qu'hétérodimère, on a donc une modulation inhibitrice du R-5-HT2A sur la capacité de liaison du R-5-HT1A à son ligand (Borrito-Escuela et al., 2017a).

Dimérisation des récepteurs FGFR1/5-HT1A

Le R-5-HT1A est également capable de s'associer au récepteur FGFR-1, un récepteur à activité tyrosine kinase. Ce complexe est détecté par PLA dans l'hippocampe et au niveau du raphé dorsal ainsi que dans une culture primaire de neurones hippocampiques et par BRET dans lignée de cellules HEK293T. La co-stimulation par un agoniste de chacun des composants de ce dimère induit des réponses de types antidépressifs durant le test de nage forcée. De plus, la stimulation du R-5-HT1A seule induit la phosphorylation du FGFR-1 médiée par le facteur Src et augmente le taux de ce dimère. L'activation simultanée des deux récepteurs induit un effet synergique sur la signalisation intracellulaire caractérisée par une augmentation de pERK supérieure par rapport à la stimulation d'un des deux récepteurs. Enfin, il a été proposé que ce dimère joue un rôle dans plasticité synaptique dans l'hippocampe et les états dépressifs (Borrito-Escuela et al., 2012, 2017b, 2018).

F. Récepteur 5-HT1A : auto- vs hétérorécepteur

Depuis de nombreuses années, il est admis qu'un dysfonctionnement de l'expression ou de l'activité du R-5-HT1A est corrélé avec des troubles anxieux et/ou dépressifs (Savitz et al., 2009). L'implication du R-5-HT1A en tant qu'auto-récepteurs *versus* hétérorécepteurs dans les pathologies psychiatriques telles que la dépression ou l'anxiété a longtemps été

investiguée. Dans cette partie, j'aborderai les différentes études visant à comprendre l'implication de l'un ou de l'autre dans des modèles murins.

1. Implications dans les troubles anxieux et dépressifs

En utilisant un modèle de souris de répression transitoire de l'autorécepteur R-5-HT1A (système Tet on/Tet off), il a été montré que la répression de l'expression du R-5-HT1A dans les neurones 5-HT de P14 à P30 (correspondant à la période "adolescente") induit une augmentation à long terme de l'anxiété mais ne modifie pas l'adaptativité de ces souris au stress. Ces résultats suggèrent que le R-5-HT1A exerce un rôle important dans la régulation de l'anxiété au cours du développement. De plus, l'inactivation post-natale des auto-R-5-HT1A durant une courte période de temps est suffisante pour modifier de manière durable les propriétés électrophysiologiques des neurones du raphé (une augmentation de l'excitabilité, une dépolarisation du potentiel de repos membranaire et une augmentation de la résistance membranaire) (Donaldson et al., 2014).

Un autre modèle de souris knockout pour le R-5-HT1A spécifiquement dans les neurones 5-HT (Tamoxifen-dépendant Cre/lox system) mais cette fois-ci où l'expression du gène du R-5-HT1A est abolie à l'âge adulte (souris 1AcKO) a été étudié. Alors qu'un traitement chronique d'ISRS n'induit aucune différence chez les souris contrôles dans le test d'hypophagie induite par la nouveauté ou NSF ("Novelty-Suppressed Feeding"), chez les souris 1AcKO, on observe une augmentation de l'anxiété qui se traduit par une augmentation significative de la latence à se nourrir. Ceci pourrait être dû à une hyperactivité du système 5-HT stimulée par le traitement de ISRS et dépourvue de feedback inhibiteur chez ce modèle de souris.

De plus, dans le test du labyrinthe surélevé, le traitement à la fluoxétine induit une diminution du temps passé dans les bras ouverts (zones anxiogènes) chez les souris 1AcKO mais pas chez les souris contrôles (Donaldson et al., 2014). Ces résultats impliquent un effet anxiogène d'un traitement aux ISRS chez les souris n'exprimant plus l'autorécepteur 5-HT1A à l'âge adulte (Turcotte-Cardin et al., 2019).

La délétion du R-5-HT1A durant toute la vie de l'animal en tant qu'auto- (souris auto-KO) ou hétérorécepteur (souris hétéro-KO) a été évalué (conditional Tet on system). Un troisième modèle est utilisé où l'hétérorécepteur 1A est délété à l'âge adulte (adulte hétéro-KO). Chez les souris auto-KO, la délétion du R-5-HT1A dans les neurones 5-HT entraîne une augmentation significative du taux basal de 5-HT extracellulaire dans le cortex mais pas dans

l'hippocampe. Des tests comportementaux permettant d'évaluer l'état anxieux de ces différents modèles de souris ont permis de montrer que la modulation de l'expression de l'autorécepteur 5-HT_{1A} est nécessaire et suffisant à l'établissement d'un état anxieux contrairement aux hétérorécepteurs (Richardson-Jones et al., 2010, 2011).

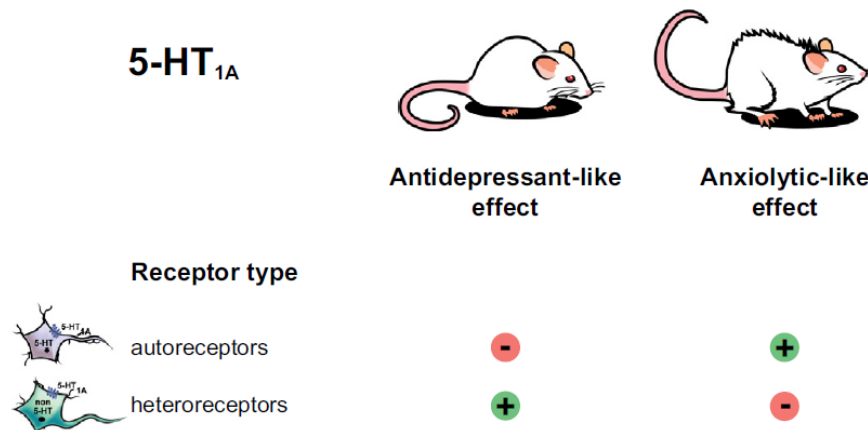


Figure 11 : Rôle différentiel des auto- vs hétérorécepteurs 5-HT_{1A} sur le phénotype anxieux et dépressif chez la souris (Sałaciak and Pytko, 2021)

Ainsi, l'ensemble de ces études montrent les rôles dichotomiques des auto- vs hétérorécepteurs 5-HT_{1A} dans le phénotype de type dépressif et anxieux et soulignent leur rôle important dans les traitements ciblant ces troubles (**Figure 11**).

2. Hypothèses du rôle des R-5-HT_{1A} dans le mode d'action des ISRS

Une des limitations de la prise d'antidépresseurs de type ISRS chez l'humain est le délai entre le début du traitement et l'amélioration visible des symptômes. De plus, durant cet intervalle de temps, on reporte souvent une aggravation des symptômes dépressifs, dont une augmentation des pensées suicidaires. Une des hypothèses de la littérature est d'attribuer cet effet à l'internalisation progressive de l'autorécepteur 5-HT_{1A}. En effet, en bloquant la recapture de la sérotonine, celle-ci s'accumule dans le milieu extracellulaire prolongeant son effet sur les récepteurs à la 5-HT avoisinants. Un de ces récepteurs est le R-5-HT_{1A} présent sur les neurones 5-HT et sa stimulation produit une diminution de la fréquence de décharge de ces mêmes neurones. Au cours du temps, contrairement au R-5-HT_{1A} post-synaptique, le R-5-HT_{1A} pré-synaptique est désensibilisé et internalisé; diminuant ainsi le feedback négatif

sur la fréquence de décharge des neurones 5-HT (Popa et al., 2010). L'application de l'agoniste spécifique du R-5-HT1A, le 8-OH-DPAT ou une application unique de fluoxétine (ISRS) va induire l'internalisation de l'autorécepteur ; ce qui n'est pas observé pour les hétérorécepteurs. Il a été montré par ailleurs que l'association d'ISRS et de pindolol, qui inhibe préférentiellement les R-5-HT1A présynaptique, diminue la latence des effets des ISRS (Martinez et al., 2000). La suppression locale de l'autorécepteur via un siRNA ou l'ablation génétique du R-5-HT1A (souris knockout) provoque une augmentation de la capacité des neurones 5-HT à libérer de la 5-HT et ainsi que des réponses de type antidépresseurs (Bortolozzi et al., 2012; Guilloux et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'internalisation du 5-HT1A pré-synaptique favoriserait l'apparition des effets antidépresseurs des ISRS.

Cependant ce phénomène n'explique pas la totalité des effets apparaissant à la suite de l'application d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine. Il a été observé qu'après 2h et jusqu'à 3 jours de traitements à la fluoxétine, le nombre de décharges spontanées et le taux moyen de décharges des neurones 5-HT sont effectivement réduits par rapport au contrôle; indiquant une augmentation du feedback inhibiteur sur les neurones 5-HT; après 7 jours, seul le taux moyen de décharge est significativement différent. Cependant, à 14 et 21 jours de traitement, aucune différence significative avec le contrôle n'est observée dans les paramètres électrophysiologiques étudiés. Ceux-ci sont similaires à ceux des souris sauvages. Ces résultats suggèrent qu'après 14 jours de traitement, il existe une compensation au sein du système 5-HT permettant de retrouver des paramètres physiologiques de l'activité des neurones 5-HT et que la désensibilisation des R-5-HT1A ne signifie pas nécessairement une augmentation significative de l'activité des neurones 5-HT par rapport à une situation contrôle (Babb et al., 2018; Czachura and Rasmussen, 2000). Il a été suggéré que, suite à un traitement chronique d'antidépresseurs de type ISRS, cela est plutôt dû à une augmentation de la stimulation des neurones 5-HT par les fibres glutamatergiques innervant le raphé dorsal (Berman et al., 2000; Commons and Linnros, 2019; Geddes et al., 2015), induisant ainsi une stimulation accrue du système 5-HT dont l'hypofonction serait étroitement liée au trouble dépressif.

De plus, le taux de feedback inhibiteur sur les neurones 5-HT ne dépend pas du niveau de sensibilité des R-5-HT1A. En effet, en mesurant le taux de décharge des neurones 5-HT sur tranche de cerveaux de souris TPH2^{-/-} et SERT^{-/-} (altérations génétiques de la

production de 5-HT et de la recapture de la 5-HT, respectivement), (Gutknecht et al., 2012) observent que la capacité d'autoinhibition via le R-5-HT1A n'est pas modifiée chez ces souris, malgré une modification de la sensibilité des neurones 5-HT à l'agoniste du R-5-HT1A. Ces résultats suggèrent la participation d'un mécanisme adaptatif autre que le feedback dépendant des R-5-HT1A.

Par ailleurs, un traitement chronique avec de la fluoxétine induit l'internalisation du SERT d'une part et diminue son expression à la membrane d'autre part, ce qui suggère que celui-ci est dégradé et non recyclé (Descarries and Riad, 2012). Ceci pourrait participer à l'adaptation du système 5-HT à une élévation de la 5-HT extracellulaire lors d'un traitement chronique aux ISRS, en parallèle de la désensibilisation des R-5-HT1A.

A ce jour, le rôle du R-5-HT1A n'est pas totalement compris (Andrade et al., 2015). Son expression différentielle (auto- *versus* hétérorécepteurs), ses différents partenaires protéiques dépendants de l'environnement cellulaire (e.g. Freud-1/2), la diversité de sa signalisation, ainsi que la limitation des techniques et outils expérimentaux accessibles aujourd'hui rendent la compréhension de ses mécanismes d'action difficile. En tant qu'acteur majeur de la régulation de l'activité des neurones 5-HT, l'un des objectifs de mon travail de thèse est donc de comprendre un aspect du mode de fonctionnement du R-5-HT1A dans un contexte donné.

CHAPITRE IV : Le récepteur 5-HT_{2B}

A. Généralités et structure

D'abord identifié dans le fundus chez le rat (Duxon et al., 1997), le R-5-HT2B est mis en évidence chez la souris et l'humain par clonage moléculaire. Le gène du R-5-HT2B (gène *Htr2b*) est situé sur le chromosome 2 dans le locus 2q36.3-2q37.1 chez l'humain (Horton et al., 1996; Le Coniat et al., 1996) et sur le chromosome 1 chez la souris.

Comme tous RCPG, le R-5-HT2B est composé de 7 domaines transmembranaires avec une partie N-ter extracellulaire, une partie C-ter intracellulaire, 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Contribuant à réguler son activité et son expression, on retrouve dans sa séquence d'acides aminés des sites de glycosylation, de palmitoylation et un pont disulfure (**Figure 12**). Comme d'autres récepteurs à la 5-HT, le R-5-HT2B contient sur sa partie C-ter un domaine de liaison au domaine PDZ et est capable de s'associer à des protéines PDZ pour créer des microdomaines protéiques au niveau membranaire (Manivet et al., 2000).

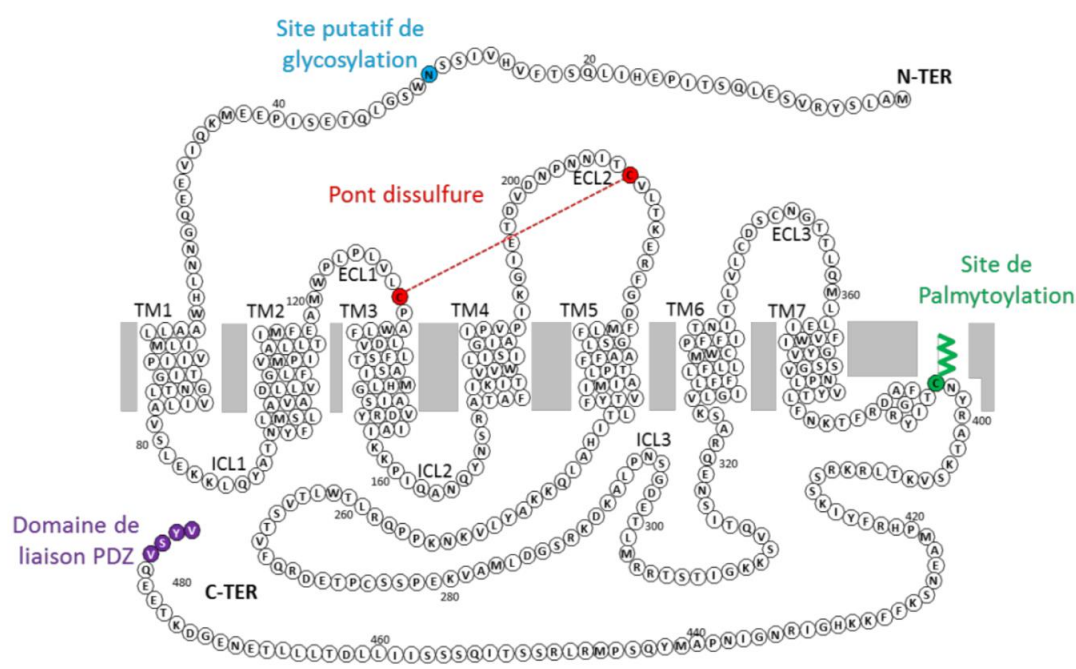


Figure 12 : Topologie du R-5-HT2B humain.

B. Distribution

Il a été montré par immunohistochimie que le R-5-HT2B est exprimé dans l'intestin, les poumons, le myocarde ainsi que dans le SNC. Durant le développement embryonnaire, on observe un pic d'expression au jour E8.5 (Choi et al., 1997). Dans le cerveau, on retrouve du marquage positif principalement au niveau du cervelet mais aussi de l'hippocampe (Choi and Maroteaux, 1996). Plus tard, en utilisant la technique d'hybridation *in situ*, il a été possible de confirmer l'expression du R-5-HT2B dans divers régions cérébrales telles que l'hippocampe, l'amygdale, le cervelet, le cortex, l'hypothalamus, la VTA, le noyau paraventriculaire, le locus coeruleus, l'habenula ainsi que les noyaux du raphé dorsal (**Figure 13**) (Bonaventure et al., 2002).

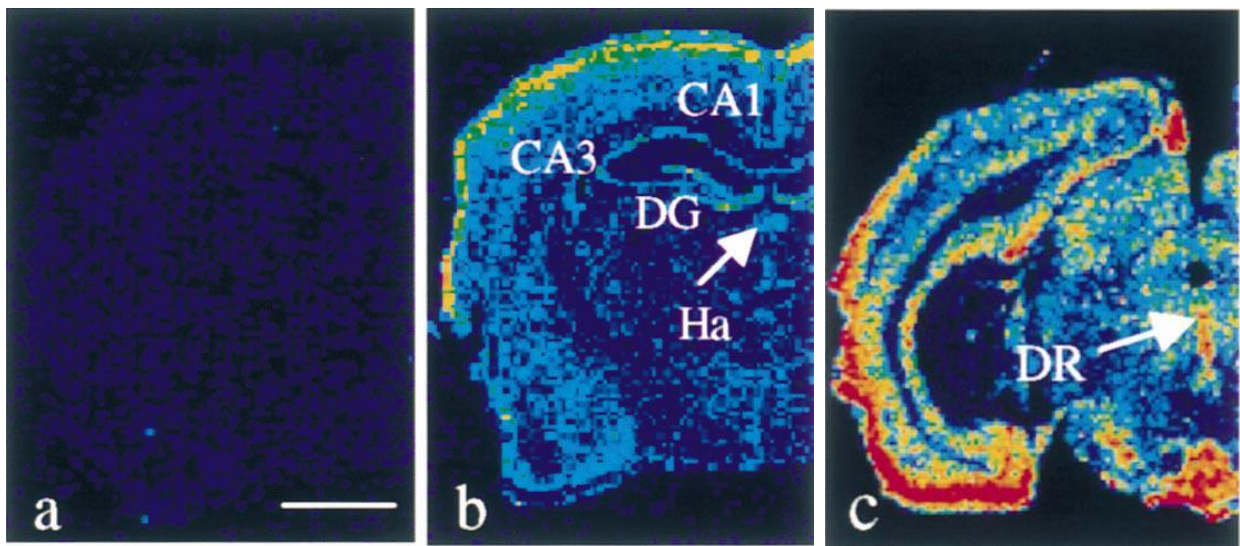


Figure 13 : Détection de l'ARN messager du R-5-HT2B chez la souris (Bonaventure et al., 2002).

Par qPCR sur des extraits de cerveau humain, on observe une expression élevée du gène *Htr2b* au niveau du cervelet, des lobes occipital, frontal et pariétal et, à plus faible niveau, dans le Nacc, l'hippocampe et le thalamus (Bevilacqua et al., 2010). Il s'agit du principal récepteur à la sérotonine exprimé par les microglies (Kolodziejczak et al., 2015), mais il est également exprimé par quelques neurones dopaminergiques (Diaz et al., 2012).

Même si peu exprimé en comparaison à d'autres récepteurs à la sérotonine, la distribution du R-5-HT2B dans le SNC suggère qu'il module diverses fonctions physiologiques tels que la locomotion (cervelet), l'aversion/peur (amygdale), la prise de nourriture (hypothalamus), la mémoire (hippocampe) et l'immunité du SNC (microglie).

Mais à ce jour, il existe peu d'études investiguant son rôle dans des états physiologiques ou pathologiques du SNC.

C. Signalisation

Les R-5-HT2B sont couplés aux protéines Gαq ou Gα11/13 qui activent la PLC. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du PIP2 en IP3 et en DAG. L'IP3 va provoquer le relargage de calcium intracellulaire tandis que le DAG active la PKC qui, en agissant sur les canaux calciques de types L, induit une entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire. Ces deux seconds messagers (IP3 et DAG) vont, par exemple, moduler la prolifération cellulaire et un nombre important d'autres fonctions cellulaires régulées par la voie ERK. C'est la voie canonique attribuée au R-5-HT2B. Cependant, l'activation de ce récepteur peut avoir différentes signalisations selon le type cellulaires dont quelques exemples sont décrits ci-dessous afin de mettre en évidence la diversité d'actions du R-5-HT2B (**Figure 14**).

Dans une culture primaire d'hépatocytes, l'activation de la voie Gαq/PLC et PI3K/ERK/mTOR résultant de la stimulation du R-5-HT2B module la prolifération cellulaire (Naito et al., 2016). Par ailleurs, le R-5-HT2B est capable de moduler, via la voie 5-HT2B-Gαq/11-PLCβ-PKCε, la fonction du récepteur TRPV1, un récepteur impliqué dans l'hyperalgésie et la nociception thermique (Caterina et al., 2000; Su et al., 2016). De plus, la stimulation des R-5-HT2B active la voie NOS et donc l'accumulation du GMP cyclique grâce à la NO synthase (NOS) via le motif PDZ VSYI (Manivet et al., 2000; Nebigil et al., 2001a). La modulation de l'activation de la NOS passe par ailleurs par le couplage Gα13 du R-5-HT2B, ce qui induirait des phosphorylations sur le SERT, affectant son activité.

Dans une lignée de cellule 1C11 qui a la capacité de se différencier en cellules neuronales 5-HT, le R-5-HT2B est capable de réguler la phosphorylation du transporteur à la sérotonine et son interaction avec les ISRS via la PKC (Launay et al., 2006); ce qui suggère un rôle du R-5-HT2B dans la modulation de l'action de ce sous-types d'antidépresseurs. Dans cette même lignée cellulaire, il a été montré que le R-5-HT2B est capable d'induire la libération d'acide arachidonique (AA) dépendante de la stimulation de la phospholipase A2. L'activation de cette voie de signalisation est capable d'inhiber la signalisation des R-5-

HT1B/1D (Tournois et al., 1998); ce dimère étant fortement associé au développement de migraines.

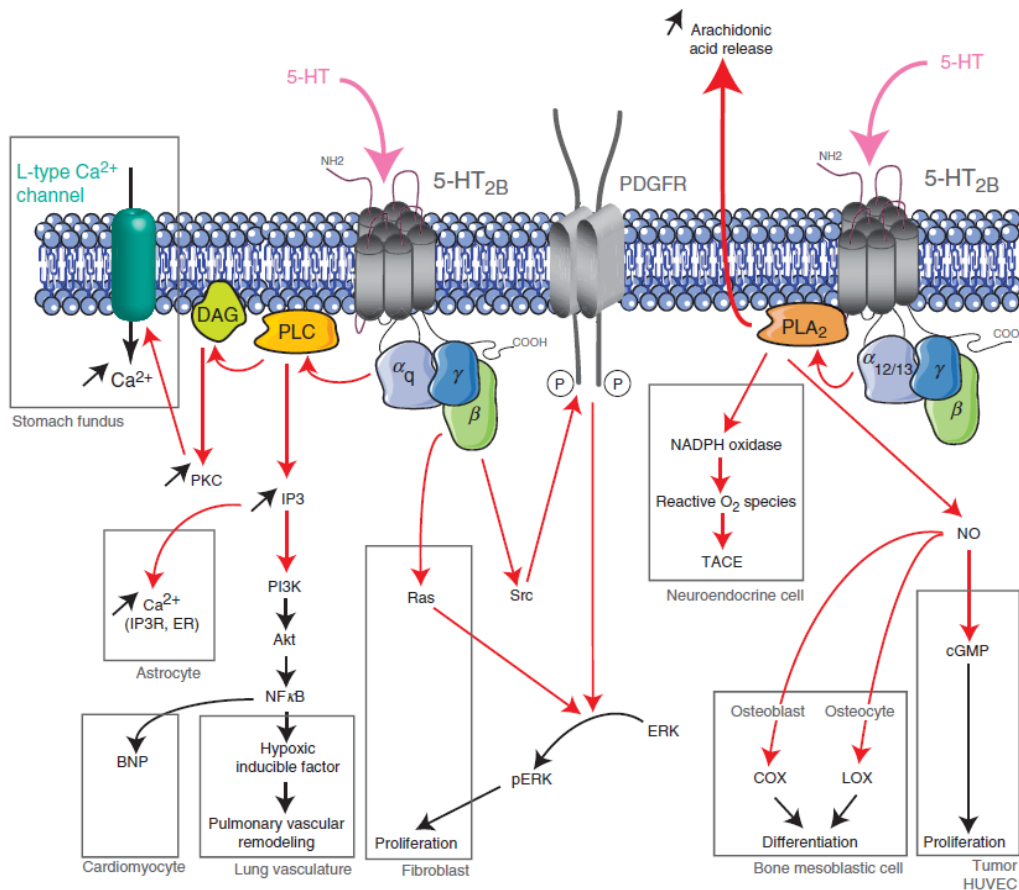


Figure 14 : Les différentes voies de signalisation associées au R-5-HT_{2B} du système nerveux central et périphérique (Masson et al.).

D. Partenaires protéiques du R-5-HT_{2B}

Dans le monde biologique, les protéines membranaires tendent à se regrouper et former des complexes ou “clusters” (voir chapitre II) plutôt que de diffuser librement au niveau de la membrane plasmique. Cette organisation de plusieurs protéines (membranaire et/ou intracellulaire) est plus avantageuse d’un point de vue biophysique puisqu’elle permet dans certains cas d’augmenter l’efficacité d’un signal, d’assurer sa spécificité et sa sensibilité (Liu and Fuentes, 2019). C’est le cas du R-5-HT_{2B} qui compte plusieurs partenaires protéiques selon le modèle biologique. Etudier les différentes signalisations qui peuvent leur être associées permet de mieux comprendre les résultats de nouvelles investigations, comme dans ce travail de thèse, par exemple.

AT1 et R-5-HT2B receptors

AT1 est un récepteur à l'angiotensine II et est couplé à la protéine Gαq, comme le R-5-HT2B. D'un point de vue fonctionnel, le blocage pharmacologique ou l'ablation génétique du R-5-HT2B est suffisante pour inhiber la libération de cytokines dépendante de l'angiotensine II dans les fibroblastes cardiaques. Les mêmes résultats sont observés chez les souris n'exprimant pas le récepteur à l'angiotensine II, ce qui suggère une coopération entre ces deux récepteurs. De plus, il a été observé par immunohistochimie et microscopie confocale que les récepteurs AT1 et 5-HT2B colocalisent dans une culture primaire de fibroblaste cardiaque de rats nouveau-nés, ce qui suggèrent une hétérodimérisation. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par co-immunoprécipitation dans ce même modèle cellulaire (Jaffré et al., 2009).

R-5-HT1B/5-HT2B

L'interaction entre 2 récepteurs membranaires ne se fait pas nécessairement via une interaction physique. La modulation d'un récepteur par un autre (et *vice versa*) peut se faire via des mécanismes intracellulaires et, un moyen de réguler la transmission du signal est la désensibilisation et l'internalisation du récepteur.

C'est le cas pour les récepteurs 5-HT1B et 5-HT2B. Des études par surexpression des deux récepteurs seuls ou co-exprimés dans une lignée cellulaire de fibroblaste murin (LMTK) ont permis de montrer que ces deux récepteurs ne colocalisent pas mais affectent leur processus d'internalisation respectifs. En effet, la stimulation du R-5-HT1B induit l'internalisation du R-5-HT2B dans la condition de co-expression, alors que la stimulation du R-5-HT2B n'a pas d'effet sur l'internalisation du R-5-HT1B mais augmente sa cinétique. Alors que la demi-vie du R-5-HT2B est d'environ 23 minutes après stimulation à la 5-HT lorsqu'il est exprimé seul, celle-ci diminue à environ 4 minutes en condition de co-expression avec le R-5-HT1B. L'internalisation du R-5-HT1B, elle, n'est pas affectée par la présence du R-5-HT2B suite à une stimulation avec de la 5-HT mais est trois fois plus rapide après stimulation avec un agoniste spécifique du R-5-HT1B. La présence et la stimulation du R-5-HT1B est suffisante pour accélérer d'un facteur cinq l'internalisation du R-5-HT2B.

Exprimés seuls, ces deux récepteurs utilisent deux mécanismes d'internalisation distincts : la caveolin-1 pour le R-5-HT1B et la clathrin pour le R-5-HT2B. En condition de

co-expression, l'internalisation du R-5-HT1B devient indépendante de la caveolin 1 et dépend alors de la signalisation PKC induite par la stimulation du R-5-HT2B.

Ces résultats montrent que, sans interaction directe, physique, les R-5-HT1B et R-5-HT2B sont capables de moduler leur cinétique d'internalisation réciproque dépendante de la stimulation à la 5-HT ou à des agonistes spécifiques (Janoshazi et al., 2007).

E. Implication physiologiques et pathologiques du R-5-HT2B

Comme mentionné dans la partie B., le R-5-HT2B est exprimé dans le SNC et en périphérie où il est impliqué dans divers processus physiologiques. Par exemple, en périphérie, le R-5-HT2B est nécessaire au développement du cœur et que son ablation génétique chez les souris *Htr2b*^{-/-} induit une mortalité de 30% des souris. Les souris qui survivent à la première semaine post-natale ont des problèmes cardiaques avec notamment une diminution de la masse du cœur due à un défaut de prolifération des cardiomyocytes (Nebigil et al., 2000, 2001b). La contribution du R-5-HT2B dans la fonction cardiaque est donc un élément important à prendre en compte lors du développement de traitements ciblant ce récepteur. En effet, dans les années 80, le dexfenfluramine (DF) a été commercialisé pour ses propriétés anorexigènes afin de lutter contre l'obésité. Cependant, cette drogue agit via le transporteur à la sérotonine ce qui augmente la libération de sérotonine extracellulaire. Beaucoup d'effets secondaires lui sont attribués dont des effets sur le cœur (valvulopathies et hypertension pulmonaire) médiés par le R-5-HT2B (Banas et al., 2011), ce qui a conduit à l'arrêt de sa commercialisation.

Dans cette partie, je m'intéresserai plus particulièrement au rôle du R-5-HT2B dans le SNC et plus particulièrement en lien avec la modulation de l'activité des neurones 5-HT.

1. Altérations du gène *Htr2b* chez l'humain

Les variations d'expression de la protéine du R-5-HT2B ou de son activité sont susceptibles d'altérer le développement cérébral ou encore les réponses comportementales (Lin et al., 2004). En effet, un polymorphisme spécifique du gène *Htr2b*, le Q20*, est corrélé à des comportements impulsifs dans une population finlandaise. Ce polymorphisme est caractérisé par un codon stop présent au début de la séquence du gène conduisant à une perte d'expression du R-5-HT2B chez ces individus (Bevilacqua et al., 2010). Cette mutation est plus fréquemment observée dans une population d'individus liés à des crimes avec

comportement agressif et qui présentent une augmentation du taux de testostérone dans le fluide cébrospinal. Cette population présente principalement une augmentation du comportement agressif après consommation d'alcool (Tikkanen et al., 2015) et 70% des porteurs de cette mutation de l'étude présentent un comportement impulsif suicidaire. Le R-5-HT2B est également connu pour affecter la réponse comportementale des individus sous cannabis. En effet, un polymorphisme du gène *Htr2b* est associé positivement à l'augmentation de l'agressivité consécutive à l'usage de cannabis (Montalvo-Ortiz et al., 2018). De plus, une étude récente a mis en évidence l'existence d'un SNP (rs6736017) dans le gène du R-5-HT2B dans une sous-population américaine d'usagers d'opioïdes (Kaski et al., 2019). Ce même SNP est corrélé dans une population afro-caribéenne française à un usage abusif de crack et une forte impulsivité chez ces individus (Lacoste et al., 2020).

Bien que l'on ne sache pas l'effet de ces SNP (sauf le Q20*) sur le gène *Htr2b*^{-/-} et la protéine résultante, ces études démontrent qu'une altération du R-5-HT2B chez l'humain peut considérablement affecter la réponse aux drogues.

2. Altérations du gène *Htr2b* chez la souris

a. Modèle de délétion totale du R-5-HT2B : Souris *Htr2b*^{-/-}

Suite à ces résultats, le laboratoire a développé un modèle de souris dépourvu du R-5-HT2B (*Htr2b*^{-/-}) et, bien que le taux de mortalité dû à des malformations cardiaques chez ce modèle de souris est élevé (50% de survie à une semaine post-natale), à l'âge adulte, aucun déficit majeur n'est observé. Ces souris présentent une augmentation de l'activité dans un nouvel environnement, une diminution de la latence dans le test de l'hyponéophagie, un nombre de contacts plus élevés avec un nouvel objet placé dans leur environnement. Leur génotype les rend donc plus impulsives que les souris contrôles. De plus, elles ont un taux de testostérone plasmatique plus élevé. Ce nouveau modèle de souris knockout permet donc d'étudier l'implication du R-5-HT2B dans les réponses comportementales à certaines drogues d'abus ou traitements pharmacologiques.

Effet d'un psychostimulant : la MDMA

La MDMA, également appelée "ecstasy", est très répandue dans les milieux festifs et souvent utilisée à titre récréatif. Elle agit sur le SNC en se fixant de manière préférentielle au

transporteur à la sérotonine et va inverser le sens de transport, libérant ainsi les stocks de sérotonine des terminaisons nerveuses sérotoninergiques.

Une des nombreuses actions décrites à la suite de l'injection d'un psychostimulant est l'augmentation de l'activité locomotrice et leur capacité à induire ce que l'on appelle une sensibilisation. Une seule injection est suffisante pour induire des effets à long terme, retrouvés après réinjection plusieurs semaines après (Valjent et al., 2010). En laboratoire, une des manières d'évaluer comportementalement ce phénomène chez la souris est la mesure de l'activité locomotrice dans un couloir circulaire. Une première injection de MDMA va induire une augmentation significative de l'activité locomotrice chez les souris et une seconde injection à la même dose, une semaine plus tard, induira un effet plus important encore.

Chez le modèle de souris dépourvus du R-5-HT2B, l'augmentation de l'activité locomotrice à la suite d'une injection de MDMA est totalement abolie. Ce résultat est également observé si le R-5-HT2B est bloqué pharmacologiquement par un antagoniste spécifique (Doly et al., 2008). La seconde injection de MDMA à 7 jours d'intervalle ne parvient pas non plus à induire une sensibilisation locomotrice (Doly et al., 2009a).

Lorsqu'un individu fait usage de drogue d'abus, on observe la création d'un lien entre le contexte de prise de drogue et la consommation elle-même; ce phénomène renforçant l'addiction à la drogue. Ce renforcement peut être évalué par le test de préférence de place conditionnée. Ce test repose sur l'association de l'animal entre le compartiment où il a reçu la drogue et l'effet de la drogue elle-même. A faible dose (10 mg/kg), l'effet renforçant de la MDMA est avéré chez les souris sauvages, alors qu'il est aboli chez les souris dépourvues du R-5-HT2B.

A une concentration élevée (30 mg/kg), la MDMA présente une affinité pour le transporteur à la dopamine (DAT) et va induire une libération massive de dopamine dans le milieu extracellulaire en plus de son action sur le système 5-HT. De ce fait, on observe chez les souris *Htr2b*^{-/-}, une augmentation de l'activité locomotrice, qui dans ce cas, dépend du système dopaminergique alors qu'à dose inférieure (10 mg/kg), la sensibilisation locomotrice à la MDMA est dépendante du système 5-HT et passe via le R-5-HT2B.

L'usage de psychoactifs n'induit pas seulement des changements comportementaux mais également au niveau cellulaire. En effet, après injection chez des souris contrôles, on

observe dans le Nacc une augmentation de la phosphorylation de ERK1 et 2 et plus spécifiquement dans les neurones D1. Cet effet est cependant observé chez les souris *Htr2b*^{-/-} uniquement à haute dose, donc lorsque le système dopaminergique est impliqué.

D'un point de vue moléculaire, à faible concentration (10 mg/kg), il n'y a pas d'augmentation de 5-HT ni de dopamine dans le Nacc et la VTA chez les souris dépourvues de R-5-HT2B par rapport aux souris contrôles. Une forte dose de MDMA (30 mg/kg), quant à elle, induit une augmentation de la concentration extracellulaire de 5-HT et de dopamine, respectivement, 160 et 100 fois supérieures au taux basal dans le Nacc chez les souris contrôles. Chez les souris *Htr2b*^{-/-} ou traitées avec un antagoniste du R-5-HT2B, l'augmentation par rapport au taux basal de dopamine et de 5-HT est moindre et nul, respectivement, dans le Nacc. Ceci implique que le R-5-HT2B est nécessaire à l'augmentation de la libération de 5-HT dans le Nacc même à de hautes concentrations de MDMA. Il est à noter que l'expression de SERT et du transporteur à la dopamine (DAT) n'est pas différente entre les souris *Htr2b*^{-/-} et les souris contrôles, donc que l'ablation du R-5-HT2B ne modifie pas les capacités de recapture de 5-HT et dopamine.

Ainsi, ces études montrent que le R-5-HT2B est nécessaire aux actions de la MDMA à faible dose (dépendantes du SERT uniquement), tant au niveau moléculaire que comportemental (Doly et al., 2009a) et intervient dans la libération de dopamine à forte concentration de MDMA. Le R-5-HT2B et l'intégrité de son expression ont donc un rôle essentiel à chaque étape de la prise de drogues d'abus (impulsivité, effets psychoactifs, effets à long terme).

Effets des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (ISRS)

Selon les récentes études menées par l'Organisation Mondiale de la Santé, la dépression touche aujourd'hui 300 millions d'individus dans le monde et s'accompagne fréquemment de troubles anxieux et d'un risque de suicide multiplié par 30. Cette maladie psychiatrique, dite "mal du siècle", représente donc un enjeu majeur social et économique. Étant donné l'implication du système 5-HT dans la mise en place de ces pathologies psychiatriques, la majorité des traitements actuellement prescrits sont des antidépresseurs (AD) de type ISRS.

En utilisant le même modèle de souris décrit précédemment (*Htr2b*^{-/-}), l'équipe du Dr Maroteaux a étudié la contribution du R-5-HT2B dans la réponse à ces antidépresseurs.

En plus de présenter un comportement plus impulsif à l'état basal, les souris *Htr2b*^{-/-} ne répondent ni à un traitement aigu ni à un traitement chronique d'ISRS. En effet, dans le test d'hyponéophagie après un traitement de 4 semaines à la fluoxétine, les souris contrôles présentent une diminution de la latence à se nourrir en comparaison aux souris n'ayant reçu aucun traitement. En revanche, dans les mêmes conditions expérimentales, la réponse comportementale des souris *Htr2b*^{-/-} est abolie. Ceci suggère que le R-5-HT2B est nécessaire à l'effet chronique des ISRS. Cette hypothèse est confirmée par l'injection chronique d'un inhibiteur sélectif du R-5-HT2B, le RS 12445, chez les souris contrôles, ce qui reproduit les résultats comportementaux observés chez les souris *Htr2b*^{-/-} au test d'hyponéophagie et donc mime l'ablation du R-5-HT2B.

La prolifération et la survie cellulaire sont des conséquences bien connues de la prise d'un traitement chronique aux ISRS. Chez les souris dépourvues de R-5-HT2B, ces effets sont abolis. D'autre part, la stimulation chronique du R-5-HT2B avec son agoniste est suffisante pour reproduire ces effets cellulaires d'un traitement chronique aux ISRS, dont l'expression de BDNF, ce qui souligne l'importance du R-5-HT2B dans ces mécanismes.

Une injection unique d'AD de type ISRS est capable d'induire une accumulation de 5-HT extracellulaire. Par microdialyse au niveau de l'hippocampe, les souris dépourvues de R-5-HT2B et les souris traitées avec un antagoniste du R-5-HT2B ne présentent pas d'augmentation de 5-HT dans cette région après injection de paroxétine; bien que le niveau basal de 5-HT dans cette région et le taux d'expression du SERT soient similaire à celui des souris contrôles. Le groupe a montré que ces effets sont attribuables au R-5-HT2B présynaptiques puisque des modèles de souris dépourvues de SERT ou du facteur de transcription Pet1 (diminution de 80% des neurones 5-HT) ne présentent pas de réponses aux AD ou à l'agoniste du R-5-HT2B dans le test de nage forcée. De plus, une infusion locale de l'agoniste spécifique du R-5-HT2B, le BW723C86, au niveau du raphé suffit à multiplier par 4 la concentration de 5-HT extracellulaire chez les souris contrôles.

L'hypothèse issue de ces résultats est donc que le R-5-HT2B pré-synaptique régule positivement les neurones 5-HT et médie les effets cellulaires et comportementaux de la MDMA et des ISRS (Diaz et al., 2015; Doly et al., 2009a, 2009b).

Modèle	Test/technique	Traitement	Résultats
WT	NSF	ISRS (chronique)	↑ impulsivité
WT		antagoniste 2B (chronique)	
<i>Htr2b</i> ^{-/-}		ISRS (chronique)	∅ (mais impulsivité basale + élevée)
WT	Microdialyse	ISRS (aiguë)	↑ 5-HT extracellulaire
		ISRS (aiguë) + antagoniste 2B	∅ augmentation de 5-HT extracellulaire
		ISRS (aiguë)	
<i>Htr2b</i> ^{-/-}			
WT	BrdU/taux BDNF (hippocampe)	Agoniste R-5-HT _{2B} (chronique)	↑ neurogénèse, ↑ BDNF
		ISRS (chronique)	
<i>Htr2b</i> ^{-/-}		ISRS (chronique)	∅ neurogénèse, ∅ BDNF
<i>Htr2b</i> ^{5-HTKO}		ISRS (chronique)	∅ neurogénèse, ∅ BDNF
WT	Test de nage forcée	ISRS (aiguë)	↓ temps d'immobilité
<i>Htr2b</i> ^{-/-}		ISRS (aiguë)	∅ diminution du temps d'immobilité
<i>Htr2b</i> ^{5-HTKO}		ISRS (aiguë)	
WT	Activité locomotrice	MDMA (10mg/kg) (Injection : J1 et J7)	↑ activité locomotrice + sensibilisation locomotrice
<i>Htr2b</i> ^{-/-}			∅ activité locomotrice ∅ sensibilisation locomotrice
<i>Htr2b</i> ^{5-HTKO}			∅ activité locomotrice ∅ sensibilisation locomotrice

Figure 15 : Tableau récapitulatif des modèles murins de délétions du R-5-HT_{2B} total (souris *Htr2b*^{-/-}) ou spécifiquement dans les neurones 5-HT (souris *Htr2b*^{5-HT-KO}) et leur phénotype.

b. Modèle de délétion du R-5-HT_{2B} dans les neurones 5-HT du raphé :

Souris *Htr2b*^{5-HTKO}

Au cours de ces études, l'équipe a également réalisé des expériences de RT-PCR sur cellule unique à partir du cytoplasme de neurones 5-HT. De manière intéressante, il a été observé que le R-5-HT_{2B} est exprimé par une population de neurones 5-HT du raphé (co-exprimant la protéine TPH2) (Diaz et al.). Ceci suggère que le R-5-HT_{2B} a la capacité de moduler directement l'activité des neurones 5-HT et ce, de manière positive étant donné son couplage à la protéine Gαq et les résultats précédents.

C'est pourquoi, afin d'étudier l'implication du R-5-HT_{2B} dans la régulation des neurones 5-HT plus spécifiquement, le laboratoire a généré une lignée de souris knock-out conditionnel dépourvues de R-5-HT_{2B} uniquement dans les neurones 5-HT (*Htr2b*^{5-HTKO}). Ces souris sont issues d'un croisement entre souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Pet1 (responsable de la différenciation finale des neurones 5-HT) et de souris dont le gène *Htr2b* est flanquée de sites lox; permettant ainsi d'obtenir des souris dépourvues de R-5-HT_{2B} spécifiquement dans les neurones 5-HT. Puis cette lignée a été croisée avec la lignée RCE (Rosa26 : CAG-loxP-STOP-loxP-EGFP) qui exprime la protéine GFP uniquement en présence de la Cre-recombinase. Ce deuxième croisement permet de vérifier la bonne recombinaison des neurones. On obtient enfin des souris dépourvues de R-5-HT_{2B} uniquement dans les neurones 5-HT et qui expriment la GFP dans ces mêmes neurones (Figure 16).

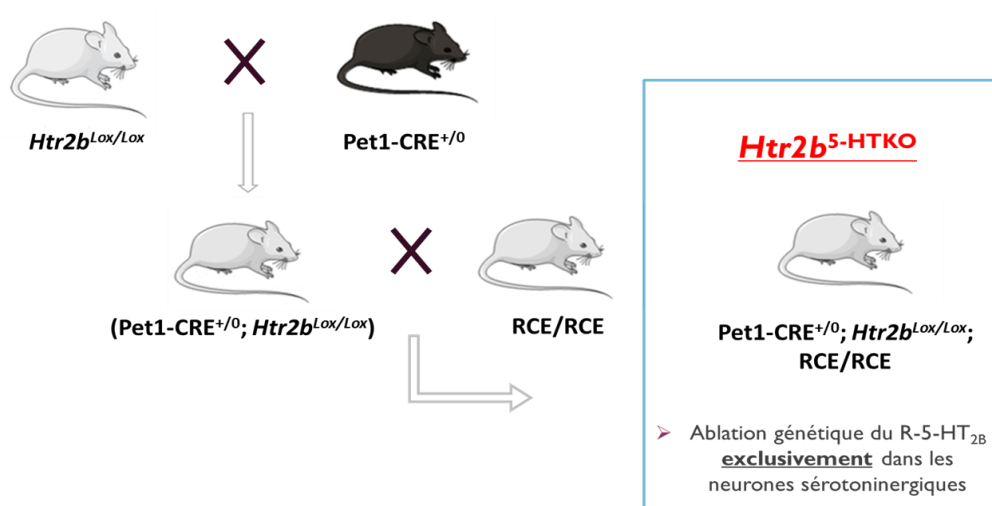


Figure 16 : Génération de la lignée transgénique *Htr2b*^{5-HTKO}

Ainsi l'inactivation génétique du R-5-HT2B exclusivement dans les neurones 5-HT du raphé, de même que l'inactivation pharmacologique, entraînent une abolition des réponses comportementales aux ISRS. On ne retrouve pas non plus de réponses neurogéniques chez ces souris. Il a également été montré que ce modèle de souris *Htr2b*^{5-HTKO} ne répond pas à la MDMA dans les tests d'activité locomotrice (Belmer et al., 2018); ce qui rappelle l'ensemble des caractéristiques phénotypiques observé chez les souris *Htr2b*^{-/-} (**Figure 15**).

Ceci confirme donc que le phénotype des souris *Htr2b*^{-/-} étudié lors de ces différents tests comportementaux et études moléculaires est modulé par le R-5-HT2B pré-synaptique.

Afin d'étudier la participation du R-5-HT2B dans l'activité des neurones 5-HT, des enregistrements électrophysiologiques sur cellules « attachées » sur tranche ont été réalisés. La stimulation des R-5-HT2B par le BW723C86 augmente la fréquence de décharge des neurones 5-HT, de même que la surexpression virale du R-5-HT2B spécifiquement dans les neurones 5-HT du raphé dorsal. Ces résultats confirment que le R-5-HT2B module positivement l'activité des neurones 5-HT; à l'inverse des R-5-HT1A qui sont connus pour diminuer leur activité (voir Chapitre III).

En effet, lorsque la stimulation du R-5-HT1A par un agoniste spécifique est précédé par l'activation des R-5-HT2B, la capacité de l'autorécepteur 5-HT1A à inhiber la fréquence de décharge des neurones 5-HT est amoindrie. De même, l'hypothermie médiée par l'activation des R-5-HT1A présynaptiques est diminuée si le R-5-HT2B est préalablement stimulé. Ainsi, les R-5-HT2B présynaptiques contrecarrent l'activité des R-5-HT1A sur les neurones 5-HT et diminuent ses actions.

Il existe donc une balance entre une activation dépendante des R-5-HT2B et une inhibition dépendante des R-5-HT1A qui régule finement l'excitabilité des neurones 5-HT (Belmer et al., 2018). Comme mentionné précédemment, le R-5-HT2B est capable d'interagir avec les R-5-HT2A, 2C et 1B; ces interactions ayant des effets différents sur le R-5-HT2B. A partir des résultats précédents (Belmer et al., 2018), nous avons ainsi posé l'hypothèse que le R-5-HT2B pourrait interagir avec le R-5-HT1A afin de moduler l'activité des neurones 5-HT et que cette association affecterait la signalisation, le trafic intracellulaire ou encore l'expression du R-5-HT1A et/ou du R-5-HT2B.

OBJECTIFS DE THESE

Les RCPG constituent la plus grande famille de protéines membranaires. Bien qu'ils soient étudiés depuis des décennies et que de plus en plus de techniques expérimentales ont été développées, il reste de nombreuses interrogations concernant leur activité et la régulation de celle-ci. En effet, l'environnement protéique d'un récepteur couplé à une protéine G dans le cytoplasme d'une cellule donnée peut considérablement changer son mode de fonctionnement via sa signalisation intracellulaire, sa distribution, son expression, etc.

Nécessaire à la modulation de nombreuses fonctions physiologiques, le système sérotoninergique communique via une quinzaine de récepteurs 5-HT couplés à des protéines G (excepté le R-5-HT3). Depuis de nombreuses années, le laboratoire de Luc Maroteaux axe ses recherches sur la compréhension de l'implication du R-5-HT2B dans le SNC de manière générale, et plus récemment, dans la régulation de l'activité des neurones 5-HT. En attribuant des phénotypes spécifiques déjà observés dans un modèle de souris knockout pour le R-5-HT2B au R-5-HT2B spécifiquement dans les neurones 5-HT, l'équipe a mis en évidence l'importance de ce récepteur en réponses à des antidépresseurs de type ISRS ou des drogues d'abus ciblant le système 5-HT. Il existe donc un "senseur positif" de 5-HT présent dans ces neurones capable d'entretenir leur activité et la libération de sérotonine. Dans le système nerveux central, certains RCPG jouent le rôle d'autorécepteur. Ils peuvent moduler positivement ou négativement l'activité du neurone qui les exprime selon leur couplage intracellulaire. Par exemple, dans le système dopaminergique, le récepteur de type D2, couplé à la voie Gi, est capable de réduire l'activité des neurones. Cependant, aujourd'hui, peu de modèles d'autorécepteurs positifs et négatifs exprimés par un même neurone ont été décrits par la littérature.

Les résultats du laboratoire précédemment cités sont à mettre en parallèle avec la régulation négative des neurones 5-HT par l'autorécepteur 5-HT1A. En effet, le R-5-HT1A est le récepteur à la 5-HT le plus étudié et son implication dans les troubles anxieux et dépressifs a été très tôt mise en évidence. L'équipe a également montré de manière très intéressante que l'activation du R-5-HT2B est capable de contrecarrer les effets négatifs de l'activation du R-5-HT1A des neurones 5-HT *in vivo*. En effet, en injectant l'agoniste du R-5-HT2B, le BW723C86, 20 minutes avant la stimulation du R-5-HT1A par le 8-OH-DPAT, on observe que la diminution de la baisse de température corporelle ainsi que l'inhibition de la fréquence de décharge des neurones 5-HT sont amoindries; ces phénotypes spécifiques étant attribués à l'auto-récepteur 5-HT1A.

C'est pourquoi la première étape durant mon travail de thèse a été de découvrir si les récepteurs R-5-HT1A et R-5-HT2B interagissent. Par la suite, nous avons cherché à savoir si cette interaction a un impact fonctionnel. Pour cela, nous avons étudié les effets de cette association sur l'expression à la membrane, la signalisation cellulaire, l'affinité au ligand de l'un et/ou l'autre récepteur.

L'absence sur le marché d'anticorps efficaces dirigés contre les R-5-HT1A/2B rend leur étude endogène *in vivo* impossible. J'ai donc, au cours de ma thèse, utilisé des modèles de surexpression à l'aide de plasmide contenant la séquence codante de la protéine en question fusionnée à un tag (Flag, HA ou myc). Par ailleurs, la culture et la transfection de neurones sérotoninergiques étant plus complexe que d'autres cultures primaires de neurones, j'ai privilégié des modèles d'études *in vitro* déjà exploités par le laboratoire : des cultures de cellules COS pour les aspects d'études pharmacologiques des deux récepteurs et des cultures primaires de neurones hippocampiques pour se rapprocher d'un environnement plus physiologique, neuronal.

Parallèlement, j'ai étudié l'interaction suggérée par les résultats préliminaires du Dr. Philippe Marin (collaboration) entre CIPP, une protéine de pontage, et le R-5-HT2B. Les travaux débutés par Emily Quentin (Doctorante) et Imane Moutkine (Ingénieure de recherche) ont permis de mettre en évidence l'effet de l'interaction de CIPP avec le R-5-HT2B via son domaine PDZ sur l'affinité de liaison du R-5-HT2B pour son ligand, sa production de second messager (inositol phosphate) et son effet sur la signalisation calcique dépendante de l'activation du R-5-HT2B. En collaboration avec le Dr Sabine Lévi, j'ai pu, dans des cultures primaires d'hippocampe, étudier la distribution du R-5-HT2B en présence ou non de CIPP, stimulé ou non par son agoniste (BW723C86) et mesurer différents paramètres.

Pour ces deux axes d'études, j'ai exploité la capacité du R-5-HT2B de se regrouper à la surface membranaire et de former des "clusters". En mesurant l'aire, l'intensité ainsi que le nombre de ces clusters, j'ai pu évaluer l'impact du R-5-HT1A d'une part, ou de CIPP, d'autre part sur la distribution du R-5-HT2B. Ce regroupement (ou "clustering") atteste de manière quantifiable, visible d'une adaptation dynamique du R-5-HT2B à son environnement protéique. Cette propriété de clustering n'est étonnamment pas observé pour le R-5-HT1A qui présente une distribution membranaire beaucoup plus diffuse. Dans l'Article 2, j'ai donc

analyse l'intensité de fluorescence de ce récepteur afin de quantifier son expression à la membrane.

Ces travaux de thèse s'engagent à étudier les interactions et les régulations du R-5-HT2B en utilisant différents outils expérimentaux dans des modèles cellulaires *in vitro*. Elucider les mécanismes de régulation de ce récepteur par des partenaires protéiques permettrait de mieux comprendre comment le R-5-HT2B, un autorécepteur positif s'opposant à son homologue négatif, le R-5-HT1A, agit sur la modulation de l'activité des neurones 5-HT.

RESULTATS

Principes de pharmacologie

Ces dernières années, l'étude des RCPG et de leur oligomérisation a pris de plus en plus d'ampleur. De nombreuses techniques existent pour mettre en évidence l'interaction de ces récepteurs et le résultat de celle-ci sur différents paramètres (signalisation, affinité, expression, etc). Dans cette partie, je décrirai les principales techniques expérimentales utilisées au cours de mon travail de thèse.

A. Expérience de saturation de la liaison

Lorsque l'on s'intéresse à l'affinité d'un récepteur pour un ligand, on utilise couramment les techniques de saturation de radioligand. Pour cela, on met en compétition deux ligands (agonistes ou antagonistes) d'un récepteur dont l'un a un marquage radioactif (=le radioligand). On applique une concentration constante du radioligand qui va dans se fixer sur les récepteurs accessibles. Puis on ajoute des concentrations croissantes de ligand "froid" qui vont déplacer progressivement le ligand radioactif de son site de liaison. On obtient ainsi les résultats de liaison en coup par minute (CPM) ou en désintégration par minute (DPM). Ces données sont ensuite normalisées par l'activité spécifique du radioligand ($AS [Ci/mmol] \times 2.22$) puis par la quantité de protéines (en mg) permettant d'obtenir la radioactivité en fmole de radioligand. Pour le ligand froid, les valeurs sont des concentrations molaires (M). On obtient ainsi une courbe de compétition de la liaison de laquelle on peut déterminer plusieurs paramètres (**Figure 17**).

Le B_{max} , exprimé en fmole/mg de protéine, se détermine par la différence entre la liaison maximale et la liaison non-spécifique et correspond au nombre de sites spécifiques liables par les ligands. La drogue "froide" va déplacer le radioligand des sites de liaison sur les récepteurs. Plus la concentration de drogue froide est élevée, plus la quantité de radioligand déplacé est grande. A 50% du B_{max} , sur l'axe des abscisses correspond la constante d'inhibition, K_i (M). Cela signifie, qu'à cette concentration de drogue "froide", la moitié du radioligand a été déplacée des sites de liaisons spécifiques. Le K_i est donc la valeur représentant l'affinité du récepteur pour le ligand (**Figure 17**).

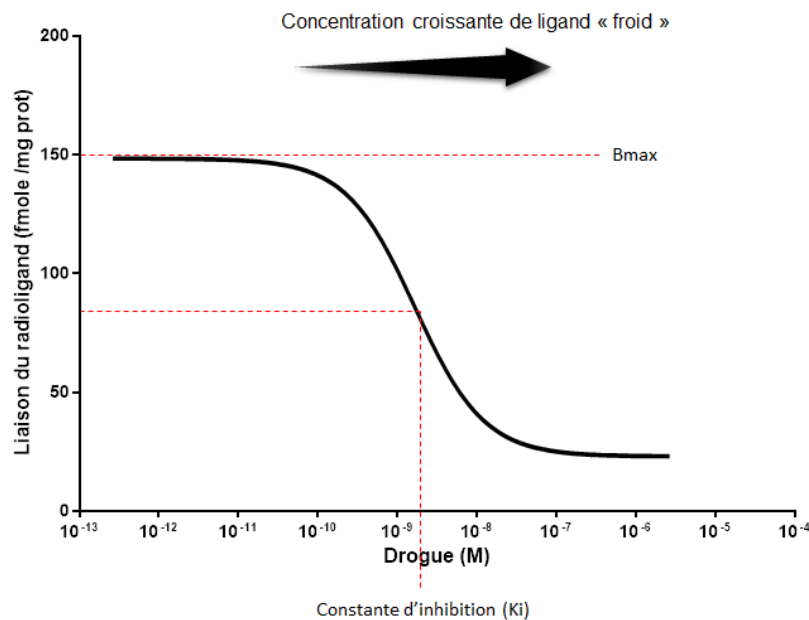


Figure 17 : Expérience de saturation de la liaison

Sur des préparations membranaires de cellules, cette technique permet d'étudier tous les récepteurs de la cellule c'est-à-dire aussi bien ceux exprimés à la surface que ceux présents dans les différents compartiments intracellulaires. Mais il est également possible de réaliser des expériences de compétition de la liaison sur des cellules entières intactes, vivantes. Dans ce cas, seuls les récepteurs exprimés à la membrane plasmique sont accessibles.

B. Expérience de transfert d'énergie par résonance

1. BRET

Le BRET, ou "Bioluminescence Resonance Energy Transfer", repose sur la capacité naturelle de la Renilla luciférase, une enzyme, à émettre de la lumière en présence de son substrat. Une molécule est fusionnée à la région codante de la luciférase (« donneur ») dont la longueur d'onde d'émission (après application du substrat) correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome (YFP, « accepteur ») porté par une seconde molécule. Si les deux molécules sont suffisamment proches (distance < 10 nm) la luciférase, en présence de son substrat (la coelentérazine), transfère de l'énergie au fluorochrome dont la longueur d'onde d'émission est mesurée (**Figure 18**).

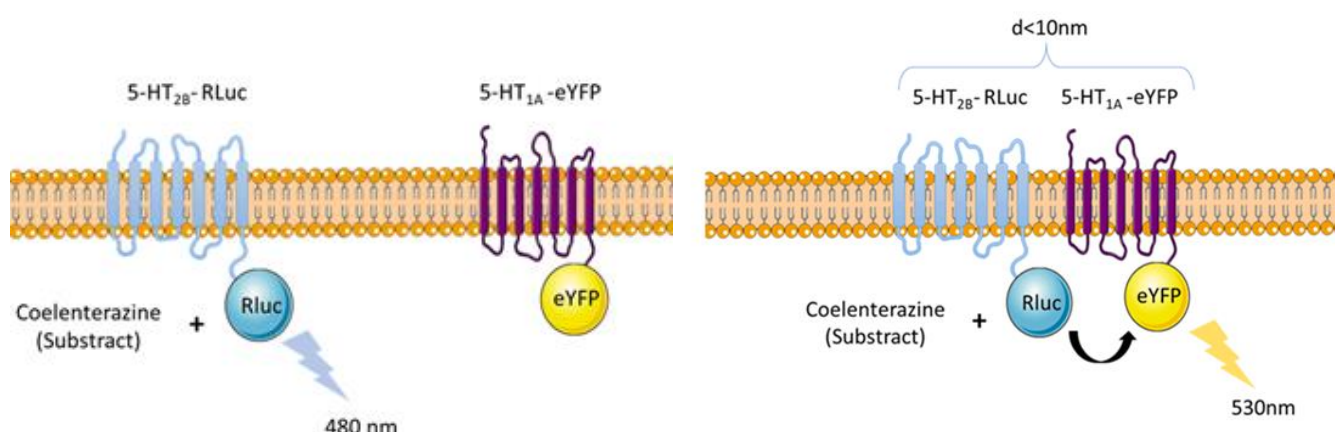


Figure 18 : Principe de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET).

Cette technique est souvent utilisée afin de confirmer des résultats de co-immunoprécipitation. En effet, les expériences de co-immunoprécipitation nécessitent la lyse des cellules et l'homogénéisation des membranes, ce qui peut mener à des interactions non spécifiques et forcées, dû à la proximité des récepteurs dans le lysat cellulaire. En revanche, le BRET s'effectue sur cellules intactes et encore vivantes, permettant de préserver au maximum l'intégrité des membranes.

Les cellules sont transfectées avec une quantité constante de plasmide codant pour la protéine de fusion au RLuc et une quantité croissante de plasmide codant pour la protéine de fusion à l'YFP. La fluorescence due à la YFP est d'abord mesurée. Puis après ajout de la coelentérazine, la luminescence et la fluorescence sont mesurées simultanément à 485 nm et 530 nm respectivement. Les ratios BRET sont calculés de la manière suivante :

$$\text{Ratio BRET} = \frac{\text{émission à } 530\text{nm}}{\text{émission à } 485\text{nm}} - \frac{\text{bruit de fond à } 530\text{nm}}{\text{bruit de fond à } 485\text{nm}}$$

Le bruit de fond correspondant au signal des cellules exprimant la construction RLuc seule (485nm) et à la fluorescence avant ajout du substrat (YFP, 530nm). Les résultats sont exprimés en milliBRET (mBRET), 1 mBRET correspondant au ratio obtenu multiplié par 1000. Les ratio BRET sont exprimés en fonction du rapport $\frac{YFP - YFP_0}{RLuc - RLuc_0}$, YFP étant le signal de fluorescence à 530 après excitation à 485nm et RLuc étant le signal à 485 après ajout de coelantérazine. YFP0 et RLuc0 correspondent aux valeurs mesurées dans les cellules exprimant la construction RLuc seule.

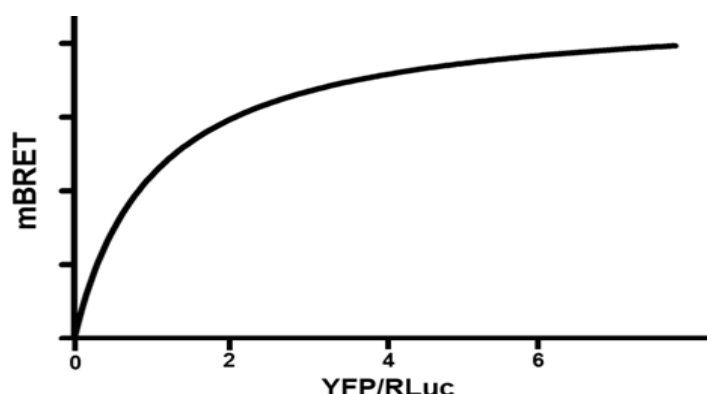


Figure 19 : Courbe représentative d'un signal BRET. Les datas sont exprimées en miliBRET en fonction du ratio $\frac{YFP - YFP_0}{RLuc - RLuc_0}$. La courbe obtenue tend vers un plateau ce qui correspond à la saturation de la liaison et donc une distance entre les 2 molécules étudiées inférieures à 10 nm environ.

La courbe hyperbolique (saturable) témoigne d'un signal BRET, c'est-à-dire que les deux récepteurs sont à une distance inférieure à 10nm l'un de l'autre, ce qui permet le transfert d'énergie (**Figure 19**). Si le résultat obtenu est une droite linéaire, ne tendant pas vers un plateau, cela signifie qu'il n'y a pas de transfert d'énergie entre ces deux protéines et donc pas d'interaction directe, détectable.

2. Technologie HTRF (Homogenous Time-Resolved FRET)

La technologie HTRF repose sur le même principe de base que le BRET : la proximité de deux molécules taggées permet un transfert d'énergie quantifiable.

La stimulation d'un récepteur couplé à la protéine Gαq induit la production d'inositol phosphate 3 dégradé en IP2 puis en IP1 (myo-inositol-1-phosphate), stable uniquement en présence de lithium. Afin de doser l'accumulation d'IP1, dans les cellules, le kit "IP-One-Gq KIT" (Cisbio) a été utilisé. Après stimulation avec un agoniste spécifique, l'IP1 produit par les cellules entre en compétition avec un analogue d'IP1 couplé à un fluorophore d2 (d2-IP1) et se lie à un anticorps anti-IP1-Cryptate.

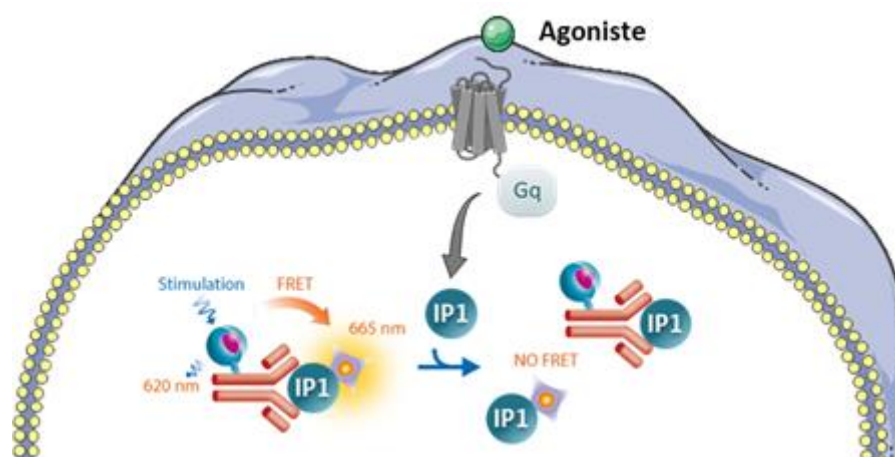


Figure 20 : Principe de la technologie HTRF. La liaison de l'IP1-d2 avec l'anticorps anti-IP1 cryptate entraîne un signal FRET émettant à longueur d'onde de 665 nm. Après stimulation du RCPG par un agoniste, la protéine $G_{\alpha q}$ va induire la production d'IP1, stabilisé par du lithium, qui va entrer en compétition avec l'IP1-d2 et donc diminuer le signal FRET. La stimulation avec une concentration croissante d'agoniste et la décroissance du signal FRET reflète l'accumulation intracellulaire d'IP1 et donc l'activité du RCPG.

Cette liaison, d2-IP1/anticorps anti-IP1-Cryptate, provoque une émission de fluorescence à 665nm. La production d'IP1 endogène entraîne donc une diminution du transfert d'énergie par déplacement de l'IP1-d2 par l'IP1 endogène (**Figure 20**). Le calcul du ratio de fluorescence (665nm/620nm) permet d'éliminer d'éventuelles interférences liées au milieu utilisé et de s'assurer que l'essai n'est pas affecté par les conditions expérimentales.

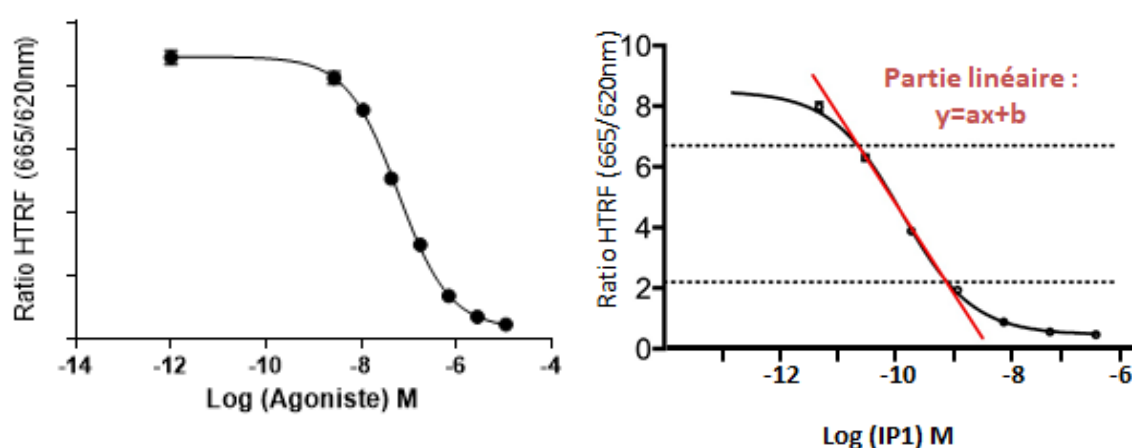


Figure 21 : Courbes représentatives de l'activation de la voie $G_{\alpha q}$ après stimulation via HTRF. A. Courbe de dose réponse du ratio HTRF en fonction de la concentration d'agoniste appliqué. B. Courbe-standard de dose réponse.

Parallèlement aux conditions expérimentales, une courbe standard, avec des concentrations croissantes d'IP1 fourni par le kit, est réalisée et permet d'extraire la partie linéaire afin d'obtenir une équation de droite de type $y=ax+b$ (Figure 21).

Le coefficient directeur de la droite, "a", permet ainsi de passer d'un ratio HTRF à la production d'IP en moles en fonction de la concentration d'agoniste appliquée. Les datas sont ensuite converties en femtomoles d'IP par mg de protéines en fonction de la concentration d'agoniste appliquée (Figure 22).

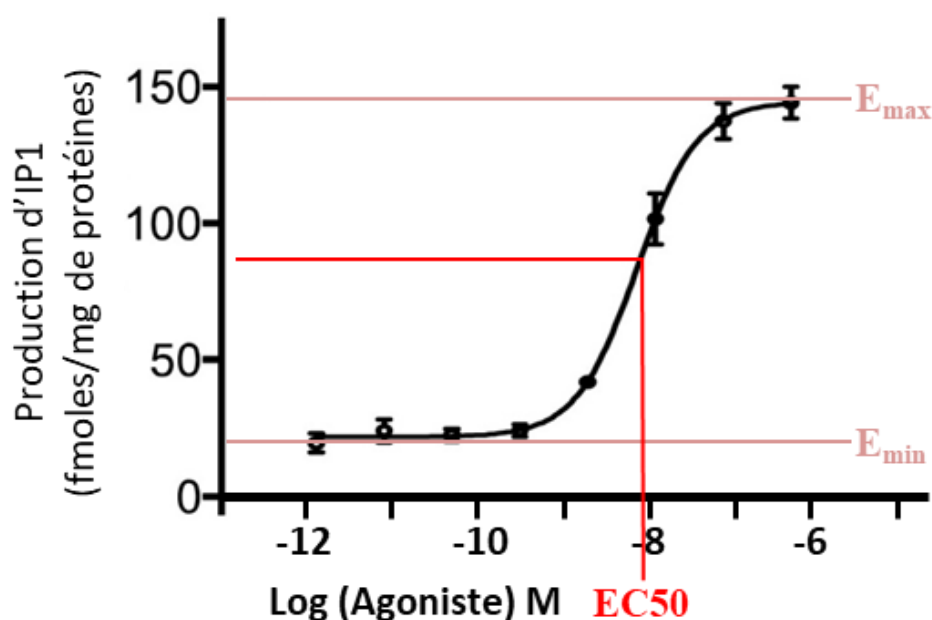


Figure 22 : Courbe expérimentale de dose-réponse de la quantité d'IP1 produite en fonction de la concentration d'agoniste.

De cette courbe expérimentale, plusieurs paramètres peuvent être analysés :

- l' E_{min} qui correspond à l'efficacité minimale du couplage et donc l'activité basale du récepteur,
- l' E_{max} , est l'efficacité maximale (plateau),
- l' EC_{50} qui correspond à la concentration nécessaire d'agoniste pour obtenir 50% de l'efficacité maximale (moins l'efficacité minimale).

Article 1 :

**L'interaction du R-5-HT_{2B} avec le R-NMDA et la
protéine de pontage CIPP module la plasticité des
synapses glutamatergiques**

A. Contexte

Les propriétés de signalisation et de trafic des RCPG sont extrêmement modulables et dépendent du contexte cellulaire. Ces protéines sont associées à des partenaires qui vont finement réguler leur fonction. Le récepteur 5-HT_{2B}, comme d'autres RCPG, contient dans sa séquence C-terminale un domaine de liaison aux protéines PDZ qui lui permet d'interagir avec des protéines de pontage par exemple. Les protéines PDZ sont très importantes pour la formation de complexe protéique, la mise en place d'une signalisation intracellulaire, etc. Par exemple, elles jouent un rôle essentiel dans la transmission synaptique. Dans une synapse excitatrice, on retrouve au niveau post-synaptique ("post synaptic density", PSD) des récepteurs au glutamate tels que les récepteurs AMPA et NMDA responsables de la réponse synaptique rapide et lente, respectivement, tous deux impliqués dans la plasticité synaptique. Des protéines de la famille PSD-95 contenant des domaines PDZ sont impliquées dans la régulation du trafic cellulaire, l'adressage et le maintien à la membrane des récepteurs NMDA. La protéine PSD-95 est par ailleurs capable de s'associer via son domaine PDZ1 au R-NMDA et via son domaine PDZ-2 à la synthase neuronale d'oxyde nitrique (nNOS) (Sattler et al., 1999). Ce complexe protéique est impliqué dans les comportements agressifs (Fang et al., 2021), la maladie d'Alzheimer (Park et al., 2020), l'excitotoxicité due à des lésions cérébrales traumatiques (Qu et al., 2020) ou ischémiques (Aarts et al., 2002; Wu and Tymianski, 2018). De par leur fonction essentielle, les domaines PDZ sont la cible de nombreux traitements qui inhibent l'interaction de deux protéines (ou plus) par ces domaines.

L'une de ces protéines PDZ est la protéine de pontage, CIPP ou "channel interacting PDZ protein", contenant 4 domaines PDZ. CIPP est fortement exprimée dans de nombreuses structures telles que le cervelet, le thalamus, les bulbes olfactifs ainsi que les noyaux du raphé.

Cette protéine est exprimée dans le cerveau ainsi que dans les reins et a été identifiée comme un partenaire de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA, entre autres (Kurschner et al., 1998). Par chromatographie d'affinité et spectrométrie de masse sur des extraits de cerveaux, il a été montré que la protéine CIPP interagit avec IRSp53, une protéine impliquée dans le remodelage du cytosquelette (Alpi et al., 2009). De plus, la protéine IRSp53 s'accumule au niveau de cette zone lors de la transmission d'un signal exciteur (Dosemeci et al., 2017). CIPP semble donc jouer un rôle pivot dans la plasticité synaptique et faire le lien

entre intégration du signal extracellulaire et réponse intracellulaire. En effet, le remodelage de la zone post-synaptique est nécessaire pour la mise en place d'une plasticité synaptique et cela passe souvent par la création de nouvelles épines dendritiques via la réorganisation du cytosquelette.

Il a été montré par des analyses transcriptomiques que l'ARNm du récepteur 5-HT2B et celui de la protéine CIPP sont exprimés dans les mêmes neurones du raphé en faible quantité (Okaty et al., 2015). Ainsi, ces deux protéines sont vraisemblablement exprimées dans le même environnement cellulaire. Nous avons donc construit un axe de recherche sur l'interaction de CIPP avec le R-5-HT2B en lien avec l'expression des R-NMDA à partir de ce résultat et de 3 informations importantes :

- CIPP interagit avec le R-NMDA via son domaine PDZ;
- la 5-HT joue un rôle dans la densité d'épines dans l'hippocampe et la plasticité synaptique (Feria-Velasco et al., 2002; Mattson et al., 2004);
- Il existe une modulation de l'activité des récepteurs 5-HT2 par les R-NMDA (Jones et al., 2009; Kim et al., 1999; Winter et al., 2004).

L'étude de l'interaction entre ces 3 protéines permet de mieux comprendre les signalisations/fonctions associées à chacune d'entre elles (modulation de l'activité neuronale, plasticité synaptique, régulation du cytosquelette) et leur potentielle contribution dans le cadre physiologique et pathologique.

B. Résultats principaux

L'identification d'une interaction possible entre CIPP et le R-5-HT2B a été permise lors d'une collaboration avec le laboratoire de P. Marin à Montpellier. Ce dernier a effectué un "screen" d'interactions entre le domaine de liaison PDZ du récepteur et des protéines du cerveau. Après analyse en spectrométrie de masse, la protéine CIPP a été identifiée comme interacteur de haute affinité pour le R-5-HT2B. Le laboratoire a donc décidé d'étudier la co-expression du R-5-HT2B et de CIPP dans une culture primaire de neurones hippocampiques et dans des cellules COS. Après avoir mis en évidence l'interaction de CIPP avec le R-5-HT2B via son domaine PDZ par recherche de partenaires par co-immunoprécipitation (ou « Affinity purification coupled with mass spectrometry »), il a été montré que :

- la co-expression de CIPP avec le R-5-HT2B augmente la signalisation calcique de ce dernier sans modifier l'affinité pour son ligand ou la quantité de R-5-HT2B présente à la membrane,
- CIPP favorise le regroupement ("clustering") de R-5-HT2B à la surface des neurones hippocampiques et prévient l'effet du BW723C86 sur les R-5-HT2B,
- CIPP augmente la signalisation calcique associée au R-5-HT2B dans la culture primaire de neurones hippocampiques,
- Les clusters de R-5-HT2B se situent majoritairement au niveau des synapses excitatrices, avec ou sans co-expression de CIPP.

En 2004, Holohean and Hackman ont mis en évidence, dans les motoneurones de grenouilles, qu'une dépolarisation dépendante de la stimulation des R-NMDA est potentialisée par la stimulation des R-5-HT2B. De plus, les sous-unités NR1 et NR2 des récepteurs NMDA co-immunoprécipitent avec les R-5-HT2B ce qui suggère que ces protéines pourraient former des complexes protéiques fonctionnels pouvant agir sur la fonction des R-NMDA (Bigford et al., 2012). Puisque la formation d'épines dendritiques résulte de l'élévation de calcium intracellulaire, notamment par l'activation des R-NMDA et que le R-5-HT2B peut libérer le calcium des stocks calciques intracellulaires, nous avons étudié l'impact de la co-expression de CIPP et de la stimulation des R-5-HT2B sur la formation et la maturation des épines dendritiques. Il en résulte que :

- CIPP et la stimulation des R-5-HT2B réduisent la colocalisation des R-NMDA avec le R-5-HT2B en favorisant la disparition et la dispersion des clusters de R-5-HT2B,
- La stimulation des R-5-HT2B exprimés seul et la co-expression de CIPP avec les R-5-HT2B augmentent significativement la formation d'épines dendritiques mais seule la stimulation du R-5-HT2B induit une maturation de ces épines.

C. Conclusions

Ainsi, cette étude montre que CIPP, une protéine de pontage interagissant avec le R-5-HT2B, exerce la même action que la stimulation des R-5-HT2B par l'agoniste BW723C86. En effet, sa co-expression est suffisante pour augmenter la signalisation intracellulaire du R-5-HT2B, la libération de calcium intracellulaire, la formation d'épines dendritiques et la

dispersion des clusters de R-NMDA colocalisant avec le R-5-HT2B. Ceci permet de poser l'hypothèse de l'implication des R-5-HT2B dans la plasticité synaptique et notamment les phénomènes de LTP dont l'implication du système 5-HT a déjà été prouvé via les R-5-HT2A.

D. Contribution personnelle

Dans cette étude, j'ai réalisé les transfections, les différents traitements et immunocytochimies sur les cultures primaires de neurones hippocampiques. J'ai également effectué l'acquisition des images et leur analyse (Metamorph et Imaris).

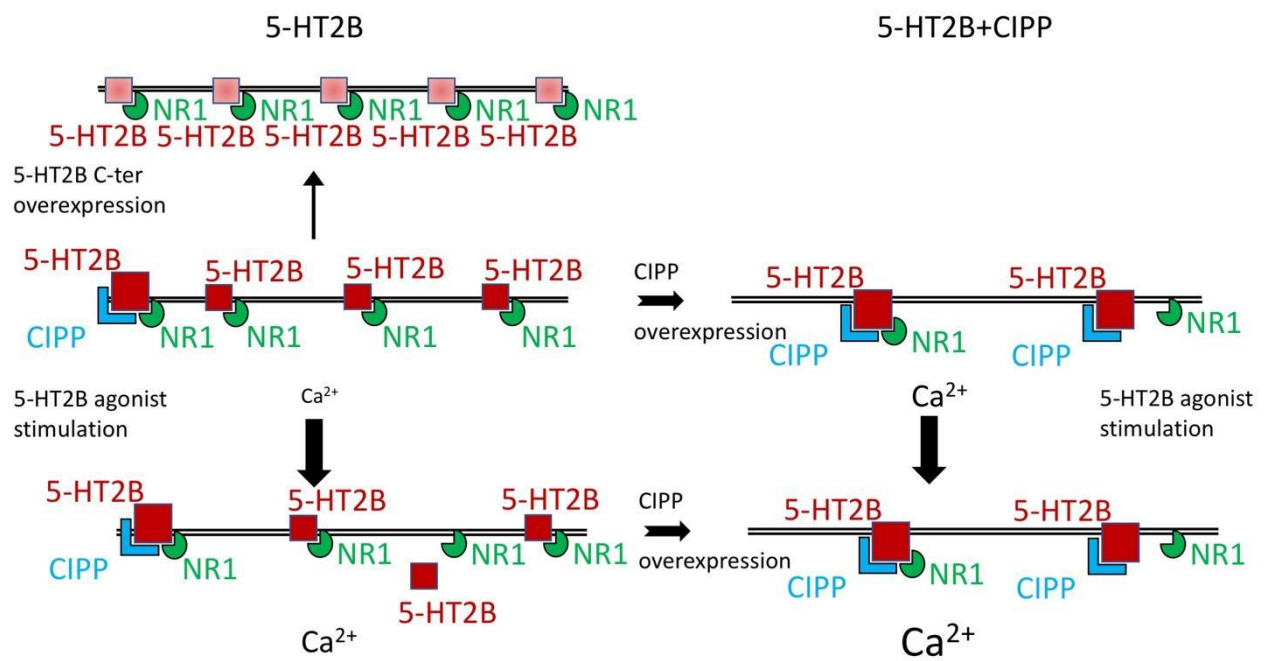
Title: The serotonin 2B receptor by interacting with NMDA receptor and CIPP protein complex may control structural plasticity at glutamatergic synapses

Authors list: Amina Benhadda^{1*}, Emily Quentin^{1*}, Imane Moutkine¹, Benjamin Chanrion², Marion Russeau¹, Philippe Marin², Sabine Levi^{1#}, and Luc Maroteaux^{1#}

Abstract: The serotonin 2B (5-HT_{2B}) receptor coupled to Gq-protein contributes to the control of neuronal excitability and is implicated in various psychiatric disorders. The mechanisms underlying its brain function are not fully described. Using peptide affinity chromatography combined with mass spectrometry, we found that the PDZ binding motif of the 5-HT_{2B} receptor located at its C-terminal end interacts with the scaffolding protein Channel Interacting PDZ Protein (CIPP). We then showed in COS-7 cells that the association of the 5-HT_{2B} receptor to CIPP enhanced receptor-operated inositol phosphate (IP) production without affecting its cell surface and intracellular levels. Co-immunoprecipitation experiments revealed that CIPP, the 5-HT_{2B} receptor, and the NR1 subunit of the NMDA receptor form a macromolecular complex. CIPP increased 5-HT_{2B} receptor clustering at the surface of primary cultured hippocampal neurons and prevented receptor dispersion following agonist stimulation, thus potentiating IP production and intracellular calcium mobilization in dendrites. CIPP or 5-HT_{2B} receptor stimulation in turn dispersed NR1 clusters colocalized with 5-HT_{2B} receptors and increased the density and maturation of dendritic spines. Collectively, our results suggest that the 5-HT_{2B} receptor, the NMDA receptor and CIPP may form a signaling platform by which serotonin can influence structural plasticity of excitatory glutamatergic synapses.

Keywords:

Serotonin, scaffolding protein, synaptic plasticity, hippocampal neurons, NMDA receptor



TOC graphic

Introduction

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter involved in many physiological functions (sleep, mood, food intake...) and pathological conditions such as addiction, impulsivity, psychosis and depression. The variety of serotonin actions reflects the presence of numerous receptor subtypes. The serotonin receptor subtype 2 family comprises 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors that are Gαq-coupled receptors. The 5-HT_{2B} receptor is expressed in several areas of the brain, including cortex, hippocampus, raphe, habenula and cerebellum in the human ¹, in the rat ^{2, 3}, and in the mouse ⁴ brain. In addition, this receptor has been shown to be expressed in serotonin ^{5,6} and dopamine ⁷ neurons and in microglia ⁸.

In humans, a loss-of-function polymorphism of 5-HT_{2B} receptor gene *HTR2B* is associated with impulsive and aggressive behaviors ¹. Other *HTR2B* polymorphisms have been associated with cannabis-related aggression ⁹ and cocaine-crack use ¹⁰. Accordingly, *Htr2b*^{-/-} mice display impulsive behavior ¹, a stronger response to cocaine ⁷, and a global deficit in sensorimotor gating as well as novelty-induced hyperlocomotion, phenotypes related to positive symptoms of schizophrenia ¹¹. These disorders are commonly associated to the serotonergic system. In hippocampal neurons, 5-HT_{2B} receptor activation prevents the stress-induced inhibition of long-term potentiation (LTP) ¹². In a neuropathic pain model, 5-HT_{2B} receptor stimulation potentiates NMDA receptor activity in dorsal horn neurons ¹³. Likewise, electrophysiological studies showed that 5-HT_{2B} receptor activation potentiates NMDA receptor-induced depolarization of frog motoneurons ¹⁴. However, the molecular mechanisms underlying the modulation of neuronal activity by 5-HT_{2B} receptors remain elusive.

Membrane proteins, including G protein-coupled receptors (GPCRs), transporters and ionic channels are targeted to specialized membrane domains *via* interactions with scaffolding proteins. These scaffolding proteins contain multiple protein-protein interaction domains that allow their interaction with a multitude of structural and signaling proteins within large protein networks ¹⁵. Postsynaptic density protein of 95 kDa (PSD95), disc large, zonula occludens-1 (PDZ) domain-containing proteins constitutes the largest family of scaffolding proteins that allows the formation of microdomains specialized in shaping specific synaptic responses ¹⁶. PDZ domain-containing proteins are not only important for the formation of signaling complexes, but also for synaptic transmission since they contribute to signaling, receptor trafficking, and cytoskeletal rearrangements in both presynaptic and postsynaptic elements ^{17, 18}. Several serotonin receptors present PDZ binding domain at their

C-terminus, including the three 5-HT₂ receptor subtypes (SCV, SYV/I and SSV, for 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor, respectively). The MUlti-PDZ domain Protein-1 (MUPP1) first identified as a partner of 5-HT_{2C} receptor¹⁹, can also interact with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors²⁰. The protein associated with Lin-7 (PALS)1 - a tight junction associated protein - gene product INADL (inactivation-no afterpotential D-like) is a paralogue of MUPP1²¹. By analogy, it was hypothesized that 5-HT₂ receptors may interact with INADL via PDZ8²². Finally, the 5-HT_{2A} receptor has been shown to colocalize with PSD-95 and MUPP1 in a subset of dendritic spines of rat cortical pyramidal neurons, and PSD-95 was reported to be necessary to target 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors to dendrites of cortical pyramidal neurons²³ and to increase their turnover *in vivo*²⁴. Other PDZ domain containing proteins associated with 5-HT_{2B} receptors have not yet been described.

Here, we identify a direct interaction between the 5-HT_{2B} receptor C-terminal PDZ-binding domain (VSYV) and the Channel Interacting PDZ Protein (CIPP, a brain INADL protein isoform) in mouse brain and COS-7 cells. This association potentiates 5-HT_{2B} receptor-dependent signaling in COS-7 cells and primary cultures of hippocampal neurons, probably by preventing 5-HT_{2B} receptor cluster dispersion at the neuronal surface. We also show that the 5-HT_{2B} receptor, the NMDA receptor, and CIPP can form a signaling platform, which leads to the formation and maturation of dendritic spines, supporting a possible functional role of 5-HT_{2B} receptor/CIPP interaction in the regulation by serotonin of structural plasticity of glutamatergic synapses.

Results and Discussion

Scaffold proteins participate in synaptic multi-protein complexes connecting receptors to downstream signaling pathways ²⁵. The structure of macromolecular complexes shapes the architecture of the synapse as reviewed in ²⁶. PDZ proteins are important in synaptic transmission because they contribute to signaling, receptor trafficking, and cytoskeleton rearrangements in the presynaptic and postsynaptic compartments ^{17, 18}. Different PDZ partners of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors have been identified: 5-HT_{2A} receptors preferentially associate with the PDZ proteins located exclusively at postsynaptic site (e.g. PSD-95, SAP97); 5-HT_{2C} receptors interact with PDZ proteins located at presynaptic and postsynaptic sites such as the Veli3 / CASK / Mint1 complex ²⁷. In order to delineate the mechanisms through which 5-HT_{2B} receptors may regulate neuronal activity, we investigated putative proteins that associate with 5-HT_{2B} receptors and their functions.

CIPP interacts with the 5-HT_{2B} receptor via its PDZ binding domain

To identify 5-HT_{2B} receptor associated PDZ domain interacting proteins, we used its last 14 C-terminal amino acids containing a PDZ binding motif as bait in affinity purification from mouse brain coupled to mass spectrometry (AP-MS). These last 14 C-terminal amino acids share the common END/EGDKV/TED/EQVSYI/V motif found in human, rat, or mouse 5-HT_{2B} receptors and not in 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors. Two-dimensional (2-D) gel analysis of affinity-retained proteins in experiments using the 5-HT_{2B} receptor C-terminal peptide as a bait, showed the specific recruitment of a protein of around 70 kDa that appeared as a train of spots on the 2-D gels (**Fig. 1A**). This train of spots was not observed in experiments using the corresponding peptide lacking the 5-HT_{2B} receptor PDZ binding motif (by introducing a stop codon that deleted of the four C-terminal VSYV residues, or ΔPDZ). The protein corresponding to these spots was identified as CIPP by peptide mass fingerprint (Mascot Score, 153, $p = 8.7 \times 10^{-11}$). CIPP corresponds to the brain isoform 3 of the scaffolding protein INADL comprising its last four PDZ domains ²⁸. Co-immunoprecipitation experiments from COS-7 cells co-expressing Flag-tagged CIPP and HA-tagged 5-HT_{2B} receptor followed by Western blotting confirmed the specific association of CIPP with full length 5-HT_{2B} receptors, which was lost after deletion of the receptor PDZ binding motif (ΔPDZ) (**Fig. 1B**). In addition to MUPP1, which was identified as a partner of 5-HT_{2C} ¹⁹, 5-HT_{2A}, and 5-HT_{2B} receptors ²⁰, CIPP can weakly interact with the C-terminus of 5-HT_{2A} but not of 5-HT_{2C} receptors ²⁷. The fact that the CIPP was the most abundant PDZ partner detected in experiments performed with 5-HT_{2B} receptor C-terminus suggests high affinity interactions.

CIPP was also reported to associate with the PDZ binding site of the NR2 subunit of the NMDA receptor²⁹, but also with IRSp53, Cypin,^{30, 31} and the acid-sensing ionic channel 3 ASIC3³². CIPP may, thus, serve as a scaffold protein that would bring together diverse but functionally connected proteins into close proximity in the neuronal membrane, thus potentiating their signaling.

CIPP increases 5-HT_{2B} receptor signaling without changing its ligand affinity or Gq-coupling

To study putative signaling impact, we transiently transfected CIPP and 5-HT_{2B} receptors in COS-7 cells. Using ³H-Mesulergine binding, (a non-selective 5-HT_{2B} receptor antagonist with Ki = 3 nM) and RS-127445 competition (a highly selective and potent 5-HT_{2B}-receptor antagonist with Ki = 2 nM)³³, we quantified the respective total and surface expression of 5-HT_{2B} receptors in the presence or absence of CIPP. Co-expression of CIPP with the 5-HT_{2B} receptor did not alter the total or membrane expression of the receptor (**Fig. 2A**). In order to evaluate the effect of CIPP on signal transduction, we stimulated transfected cells with increasing concentrations of a full 5-HT_{2B} receptor agonist (5-HT) or a partial agonist (DOI) and quantified the amount of inositol phosphate accumulated. Co-expression of CIPP with 5-HT_{2B} receptors increased constitutive (210% in the absence of serotonin, and 230% in the absence of DOI; p = 0.016; p = 0.029) and stimulated inositol phosphate signaling pathway (200% for serotonin, and 200% for DOI; p = 0.029; p = 0.029) (**Fig. 2B**). Data were further analyzed using the Black and Leff operational model in order to determine putative change in the power of agonists to activate inositol phosphate production, represented by the log(τ/K_A) with (K_A) as affinity for the receptor and (τ) its coupling efficacy in activating this particular signaling pathway^{34, 35}. No difference was found for serotonin in Gq coupling of 5-HT_{2B} receptor log(τ/K_A) = 7.19 ± 0.15, compared to 5-HT_{2B} receptor/CIPP log(τ/K_A) = 7.13 ± 0.13. These results indicate that CIPP neither affects the affinity of 5-HT_{2B} receptors for Gq proteins nor changes the coupling to the Gq pathway in COS-7 cells (**Fig. 2B**). Therefore, CIPP increases the level of inositol phosphates in basal condition or upon 5-HT_{2B} receptor stimulation without changing the total or surface expression of the receptor in COS-7 cells.

CIPP gathers 5-HT_{2B} receptors in large clusters on the surface of hippocampal neurons

Since CIPP expression potentiates 5-HT_{2B} receptor signal transduction without changing receptor/Gq coupling in COS-7 cells, we tested the hypothesis that CIPP could affect its subcellular distribution, using primary cultures of rat hippocampal neurons. First, we verified

using RT-qPCR that similar cultures depleted of astrocytes and microglia expressed 5-HT_{2B} receptors and CIPP mRNA (**Fig. 3A**). Due to a lack of selective antibody against 5-HT_{2B} receptor or CIPP, we transfected hippocampal pyramidal neurons with constructs encoding HA- and Flag-tagged 5-HT_{2B} receptor and CIPP, respectively. We observed that overexpression of the 5-HT_{2B} receptor was restricted to the somato-dendritic (MAP2-positive and Neurofilament-negative) compartment where it formed clusters, while that of overexpressed CIPP was found in both the somato-dendritic and axonal compartments (**Fig. 3B-C**).

Indeed, PDZ-domain containing proteins often influence the trafficking of various receptors including GPCRs¹⁸. In rat cortex, the 5-HT_{2A} receptor colocalizes with PSD-95 and MUPP1 in a subset of dendritic spines of pyramidal neurons, and PSD-95 was reported to be important for 5-HT_{2A} receptor targeting in dendrites of cultured cortical pyramidal neurons²³. Here, overexpressing CIPP significantly reduced (by 28%; $p < 0.0001$) the number of 5-HT_{2B} receptor clusters at the plasma membrane while having no effect on the total (surface + intracellular) pool of receptors. This effect of CIPP was accompanied for both total and surface pools of receptors by an increase in the size (by 18% and 10%, respectively; $p = 0.024$ and $p = 0.034$) and intensity (by 26% and 25% respectively; $p = 0.0009$ and $p = 0.0003$) of 5-HT_{2B} receptor clusters (**Fig. 3D-E, Table S1**). The fact that CIPP overexpression did not increase the number of clusters of total 5-HT_{2B} receptors and that the increase in size and intensity of these clusters is of similar amplitude than the one of the surface receptors suggests that CIPP effect on receptor clustering was not due to an increased expression of 5-HT_{2B} receptors but rather to a redistribution of the receptors at the cell surface.

We verified that the C-terminal end of the 5-HT_{2B} receptor was involved in its aggregation by transfecting a 5-HT_{2B} receptor deleted for the PDZ binding pattern (5-HT_{2B}ΔPDZ), which blocked the effect of CIPP on the aggregate density of the 5-HT_{2B} receptor (**Fig. S1A**). Next, we used a TAT-5-HT_{2B} peptide corresponding to the last C-terminal 11 amino acids of the 5-HT_{2B} receptor that can cross the plasma membrane through the TAT sequence and act as a dominant negative blocking the interaction of the 5-HT_{2B} receptor with the endogenous CIPP protein. We first verified by Western blot that the TAT-5-HT_{2B} peptide does act as a dominant negative by showing reduced co-immunoprecipitation of CIPP and the 5-HT_{2B} receptor in the presence of the TAT-5-HT_{2B} peptide (SYV) but not in the presence of the mutated TAT-5-HT_{2B} peptide (SSV) (**Fig. S1B**). Exposure of neurons to the TAT-5-HT_{2B} peptide (SYV) significantly increased (by 33%; $p = 0.049$) the number

of 5-HT_{2B} receptor clusters at the plasma membrane, while the mutated peptide (SSV) had no effect (**Fig. 3F-G**). This effect of the TAT-5-HT_{2B} peptide on the number of clusters was accompanied by a decrease in the size (by 38%; $p = 0.0036$) and intensity (by 39%; $p = 0.0009$) of the 5-HT_{2B} receptor clusters (**Fig. 3F-G**). We conclude that endogenous CIPP protein can contribute to the formation of 5-HT_{2B} receptor clusters on the surface of pyramidal hippocampal neurons and that overexpressing CIPP further increases the clustering of receptors on the neuronal surface, promoting the formation of larger clusters. This is in agreement with previous work showing the presence of two populations of GPCRs: a population of rapidly diffusing receptors and a second one showing slow diffusion in clusters³⁶. CIPP-induced clustering of 5-HT_{2B} receptors may drive intracellular traffic of signaling molecules or partition the membrane into microdomains.

5-HT_{2B} receptors aggregate at glutamatergic excitatory synapses regardless of CIPP overexpression

We then determined whether the CIPP-dependent increase in 5-HT_{2B} receptor clustering occurred in the vicinity of synapses. For this purpose, hippocampal cells were transfected with HA-5-HT_{2B} receptor with or without Flag-CIPP and either GFP-Homer1c or Gephyrin FingR-GFP to label excitatory and inhibitory synapses, respectively (**Fig. 4A-B**). 5-HT_{2B} receptor clusters were considered at synapses when overlapping with at least 1 pixel of GFP-Homer1c or Gephyrin FingR-GFP clusters and extrasynaptic when localized two pixels (240 nm) away from synaptic markers. We found that 5-HT_{2B} receptor clusters are partially colocalized with synaptic markers and are also located at extrasynaptic sites (**Fig. 4A-B**). Quantifications revealed the presence of about 40% of 5-HT_{2B} receptor clusters at excitatory glutamatergic synapses and this proportion was not affected by CIPP overexpression. Since endogenous CIPP is present in these cultures, it was difficult to conclude whether the presence of CIPP was necessary or not to target the 5-HT_{2B} receptor at glutamatergic synapses.

Another ~20% of 5-HT_{2B} receptor clusters were located at inhibitory GABAergic synapses, a percentage slightly increased upon overexpression of CIPP (from 22 to 27%; $p = 0.021$) (**Fig. 4C-D**). This slight increase in the localization of 5-HT_{2B} receptor clusters at inhibitory synapses was observed in parallel with an increase in the number of gephyrin clusters upon CIPP overexpression (2.41 vs. 2.93 clusters/100 μm). This means that the overexpression of CIPP does not promote the targeting of 5-HT_{2B} receptors to inhibitory synapses. In addition, ~38% of 5-HT_{2B} receptor clusters were extrasynaptic. Overall, these

results indicate that a large proportion of 5-HT_{2B} receptor clusters is located at glutamatergic synapses in hippocampal neurons regardless of CIPP overexpression. Thus, a function of 5-HT_{2B} receptor may be to tune glutamatergic synapses.

CIPP overexpression prevents the agonist-induced loss of surface 5-HT_{2B}-receptors

Agonist-induced internalization of certain GPCRs can be controlled by PDZ binding motifs located at their C-terminal tails that mediate their internalization, recycling to the plasma membrane or degradation³⁷. For instance, PSD-95 was shown to increase desensitization of the 5-HT_{2C} receptor-mediated Ca²⁺ responses, while another PDZ protein, MPP3, prevented its desensitization. These contrasting effects of PDZ proteins on the desensitization of the Ca²⁺ response were correlated with a differential modulation of the cell trafficking of the receptor³⁸. We thus explored the putative role of CIPP in the regulation of 5-HT_{2B} receptor clustering at the neuronal membrane upon agonist receptor stimulation. Neurons overexpressing 5-HT_{2B} receptors were stimulated with BW723C86 (0, 50, 100, 1000 nM), a preferential 5-HT_{2B} receptor agonist at these doses³³ at different time points (0, 10, 20 min) after stimulation. The number of clusters of membrane 5-HT_{2B} receptors decreased and their surface area increased as a function of the dose of BW723C86 applied for 20 minutes with a maximum effect at 1 µM (**Fig. S2A-B**). Furthermore, a significant decrease in the number of membrane-associated 5-HT_{2B} receptor clusters was measured 10 and 20 min after the onset of agonist application in the absence of CIPP (by 20 and 36%, respectively; $p = 0.0044$ and $p < 0.0001$ vs. T0), but no change was detected in the number of clusters in neurons overexpressing CIPP (**Fig. 5A-B, Table S1**). The surface area and intensity of 5-HT_{2B} receptor clusters did not change after BW723C86 application in the absence or presence of CIPP overexpression (**Fig. 5B**). These results indicate that the stimulation of 5-HT_{2B} receptor can decrease the number of its membrane clusters in neurons expressing the receptor in the presence of endogenous CIPP but not in neurons overexpressing CIPP.

Interestingly, the number of 5-HT_{2B} receptor clusters observed after agonist stimulation in neurons overexpressing solely the receptor reached that observed in non-stimulated neurons overexpressing both the receptor and CIPP (**Fig. 5B, Table S1**). This means that CIPP overexpression decreases the number of 5-HT_{2B} receptor clusters to a level that cannot be further lowered by agonist stimulation. Given that under basal activity conditions, the overexpression of CIPP increases the size and intensity of the 5-HT_{2B} receptor clusters and that stimulation by the agonist does not lead to a change in size or intensity of these clusters, we propose that overexpressing CIPP prevents the agonist-mediated loss of

surface 5-HT_{2B} receptors observed in neurons expressing the receptor alone, in the presence endogenous CIPP. The endogenous expression of CIPP is, therefore, sufficient to increase basal activity of the receptor probably by favoring its accumulation within a signaling platform that is saturated upon CIPP overexpression. We propose that CIPP can concentrate 5-HT_{2B} receptors near its effectors on the plasma membrane, thereby increasing its basal signaling independently of receptor stimulation and internalization.

CIPP enhances 5-HT_{2B} receptor-operated calcium signaling in hippocampal neurons

If CIPP overexpression prevents agonist-induced loss of 5-HT_{2B} receptor clusters in neurons, we reasoned that this should strengthen receptor-dependent signal transduction. The activation of the Gq-coupled 5-HT₂ receptors increases intracellular Ca²⁺ levels through inositol trisphosphate receptor (IP3R) activation^{39, 40}. We thus performed Ca²⁺ imaging on hippocampal neurons using the fluo-4-AM probe. We measured the intracellular Ca²⁺ levels in neurons overexpressing CIPP or not, before and after 5-HT_{2B} receptor stimulation with BW723C86 (1 μM). We found that 5-HT_{2B} receptor stimulation induced a Ca²⁺ peak in primary dendrites of neurons expressing the receptor alone or in combination with CIPP (**Fig. 6A-B**). The peak in intracellular Ca²⁺ level occurred around 5-sec after bath application of the agonist (**Fig. 6B**). The 5-HT_{2B} receptor stimulation with BW723C86 increased by 110% the Ca²⁺ peak height in neurons expressing the 5-HT_{2B} receptor alone (**Fig. 6C**). The expression of CIPP further increased the Ca²⁺ peak height (136% of the receptor alone; $p = 0.0056$) in neurons co-expressing the 5-HT_{2B} receptor (**Fig. 6D**), and the area under the curve (300%; $p < 0.0001$) (**Fig. 6D**). These results indicate that the overexpression of CIPP potentiates the 5-HT_{2B} receptor-dependent Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons.

CIPP overexpression or 5-HT_{2B}-receptor agonist stimulation leads to the dispersal of NMDA receptors associated with 5-HT_{2B} receptors

Glutamatergic synapses mediate excitatory neurotransmission in the brain, predominantly through the activation of ionotropic glutamate receptors such as the NMDA receptors. NMDA receptors are part of large protein complexes thanks to their binding to various PDZ domain proteins²⁶. The regulation of glutamate receptor clustering and trafficking (insertion/endocytosis) is associated with various forms of synaptic plasticity⁴¹. It was previously reported that (i) the 5-HT_{2B} receptor co-immunoprecipitates with the NR1 subunit of NMDA receptors in frog motoneurons⁴², (ii) a 5-HT_{2B} receptor agonist facilitates NMDA receptor responses in the presence of the channel blockers MK-801 or Mg²⁺ in motoneurons

¹⁴, (iii) the NMDA receptor channel blocker MK-801 exacerbates behavioral alterations of *Htr2b*^{-/-} mice, supporting the notion that the glutamatergic system is to some extent affected by a lack of 5-HT_{2B} receptors ¹¹, and (iv) CIPP can associates with NMDA receptors ²⁹. We therefore studied the influence of CIPP and the stimulation of 5-HT_{2B} receptors on the cellular distribution of the NR1 subunit of the endogenous NMDA receptor in hippocampal neurons.

The overexpression of both the 5-HT_{2B} receptor and CIPP decreased by 26% ($p = 0.046$) the number of NR1 clusters colocalized with 5-HT_{2B} receptor clusters on the neuronal membrane without affecting their size or their intensity in comparison with neurons overexpressing only the 5-HT_{2B} receptor (**Fig. 7A-B**). Therefore, the overexpression of CIPP impairs the clustering of NMDA receptors associated with 5-HT_{2B} receptors. We then tested putative effect of 5-HT_{2B} receptor stimulation on NR1 clusters. Activation of 5-HT_{2B} receptors by BW723C86 (0, 50, 100, 1000 nM) in a dose-dependent manner decrease the number of NR1/5-HT_{2B} receptor clusters with a maximum of 36% ($p = 0.015$) at 1 μ M (**Fig. S2B**). Stimulation of 5-HT_{2B} receptors by BW723C86 (1 μ M) for 10 or 20 min significantly reduced (by 35% and 25%, respectively; $p = 0.0035$ and $p = 0.0413$ vs. T0) the number of NR1/5-HT_{2B} receptor clusters in neurons overexpressing the 5-HT_{2B} receptor alone (**Fig. 7B**). On the other hand, 5-HT_{2B} receptor stimulation changed neither the size (**Fig. 7C**), nor the intensity of the remaining NR1/5-HT_{2B} receptor clusters (**Fig. 7D**). This means that the decrease in the number of NR1/5-HT_{2B} receptor clusters is not the result of a fusion of preexisting clusters and a concentration of NMDA receptors in these clusters but is rather due to their disappearance from these clusters and their dispersion in the membrane. In the presence of CIPP overexpression, 5-HT_{2B} receptor stimulation had no effect on the number, size, and intensity of NR1/5-HT_{2B} receptor clusters (**Fig. 7B-D**). Thus, the stimulation of the 5-HT_{2B} receptor in the presence of endogenous CIPP induces a reduction in the number of 5-HT_{2B} receptor-associated NR1 clusters, an effect mimicked by the overexpression of CIPP.

Interestingly, the loss of 5-HT_{2B} receptor clusters induced by the 5-HT_{2B} receptor agonist was observed only for NMDA receptors colocalized with the 5-HT_{2B} receptor. NR1 clusters that did not colocalize with 5-HT_{2B} receptor clusters (that represented 84.29% of the total population of NR1 clusters) were not affected by BW723C86 treatment. Indeed, neither the number, the size, nor the intensity of NR1 clusters located at a distance from 5-HT_{2B} receptor clusters were modified by the treatment ($p=0.36$, $p=0.58$, $p=0.57$, respectively, $n=28-25$), although CIPP overexpression slightly reduced their number (by 21%), but not their area or intensity ($p=0.02$, $p=0.39$, $p=0.06$, respectively, $n=25-29$). These results support

that the proximity of the two receptors is necessary for the regulation of NMDA receptor clustering by 5-HT_{2B} receptor signaling. Overall, these results show that activating 5-HT_{2B} receptor or overexpressing CIPP reduce the clustering of NMDA receptors with 5-HT_{2B} receptors.

5-HT_{2B} receptor stimulation affects the tripartite complex formed by CIPP, the 5-HT_{2B} receptor, and the NMDA receptor

We then determined if the effect of the 5-HT_{2B} receptor agonist on NR1 clusters was due to changes in interaction of CIPP to its partners. Co-immunoprecipitation experiments in COS-7 cells confirmed that the 5-HT_{2B} receptor interacts with CIPP and NR1, and can form a macromolecular tripartite complex (**Fig. 7E**). The 5-HT_{2B} receptor stimulation by BW723C86 decreased the amount of NR1 co-immunoprecipitated with CIPP or with 5-HT_{2B} receptors, suggesting reduced association of CIPP to its partners (**Fig. 7E**). Therefore, activating the 5-HT_{2B} receptor disperses the macromolecular complex formed by CIPP, the NMDA receptor and the 5-HT_{2B} receptor. The co-immunoprecipitation of 5-HT_{2B} receptor with both NR1 and CIPP supports the notion that the NR1 subunit of the NMDA receptor forms a ternary complex with 5-HT_{2B} receptor and CIPP. This is reminiscent of the ternary complex formed by PSD-95, NR1 and the D1 dopamine receptor⁴³. A function of PSD-95 is to interfere with NMDA-D1 receptors coupling independently or not of the cAMP or PKC intracellular signaling cascades⁴³. We show here that the overexpression of CIPP or the agonist stimulation of the 5-HT_{2B} receptor decrease the clustering of the NR1 subunit colocalized with 5-HT_{2B} receptor in hippocampal neurons. It is interesting to note that, in spinal nociceptive C-fibers, 5-HT_{2B} and NMDA receptor agonists significantly enhanced evoked potentials that were blocked by PKC ζ inhibitor peptide or by the 5-HT_{2B} receptor antagonist SB204741. This was associated to the translocation of PKC ζ to postsynaptic sites and with the phosphorylation of NR1 (pNMDA serine 896)¹³, supporting that it is upon phosphorylation, following stimulation, that NR1 may leave the complex.

CIPP overexpression or 5-HT_{2B} receptor stimulation increases the formation of new dendritic spines and the maturation of a spine subset

The formation of dendritic spines, where excitatory glutamatergic synapses are located, is triggered by a rise in intracellular Ca²⁺ levels that can be induced upon activation of NMDA receptors, voltage-dependent calcium channels and / or the release of Ca²⁺ from the endoplasmic stores⁴⁴. Since 5-HT_{2B} receptors can elevate intracellular levels of Ca²⁺ from

Ca^{2+} stores^{39, 40} and interact with NMDA receptors, we studied the impact of CIPP overexpression or of 5-HT_{2B} receptor stimulation on the formation and maturation of dendritic spines. CIPP overexpression or 5-HT_{2B} receptor stimulation affected the density and shape of dendritic protrusions (**Fig. 8A**). A quantitative analysis showed that overexpressing CIPP, eGFP together with the 5-HT_{2B} receptor increased by 213% the overall density of dendritic spines on pyramidal neurons, as compared to cells expressing the 5-HT_{2B} receptor alone (0.79 spines/ μm for cell expressing only 5-HT_{2B} receptors, compared to 1.70 spines/ μm in presence of CIPP, $p < 0.0001$) (**Fig. 8B**). The classification of the dendritic spines then revealed that overexpressing CIPP and the 5-HT_{2B} receptor increased respectively by 217% and 276% the number of filopodia and immature (thin and long thin) spines in comparison with the neurons, which only overexpressed the receptor in the presence of endogenous CIPP ($p = 0.011$ and $p < 0.0001$) (**Fig. 8C-D**). On the other hand, the number of mature dendritic spines (stubby and mushroom types) was not different in neurons overexpressing CIPP or not (3%, $p = 0.998$), (**Fig. 8E**). We conclude that CIPP overexpression increases the formation of new dendritic spines but has no influence on spine maturation.

We then tested the contribution of 5-HT_{2B} receptor activation with BW723C86 with or without CIPP in the control of spine density and morphology. In neurons overexpressing the 5-HT_{2B} receptor in the presence of endogenous CIPP, activation of the receptor with BW723C86 (1 μM) increased the total number of dendritic spines by 173% and 179% after 10 or 20 min of exposure to the agonist (T0 0.79 spines / μm , T10 1.38 spines / μm , $p = 0.0104$ and T20 1.43 spines / μm , $p = 0.0041$ vs T0) (**Fig. 8A-B**). We confirmed these findings by performing real-time live recordings of similar neuronal cultures overexpressing 5-HT_{2B}-HA and eGFP that were then treated by BW723C86 (1 μM) (**Fig 8A, Supp Movie**). This increase concerned mainly immature dendritic spines of the thin type, which increased by 202% and 193% after 10 or 20 min of treatment ($p = 0.0124$ and $p = 0.0186$, **Fig. 8D**). The density of mature (stubby and mushroom) spines also significantly increased after exposure to the agonist for 20 min (119%, $p = 0.0029$, **Fig. 8E**). In agreement with a role of the 5-HT_{2B} receptor in the formation and maturation of the spines, the density of filopodia was slightly, although non-significantly, decreased by the agonist (49% and 34% after 10 or 20 min, $p = 0.272$ and $p = 0.103$, **Fig. 8C**). Therefore, the activation of 5-HT_{2B} receptors leads to spine formation and participates to the maturation of the dendritic spines in neurons expressing solely the receptor.

Unlike neurons overexpressing the 5-HT_{2B} receptor alone, stimulation with BW723C86 for 10 or 20 min did not significantly increase the overall population of dendritic

spines (T0 1.70, T10 1.96 and T20 1.81 spines / μm) in neurons overexpressing both CIPP and the receptor (**Fig. 8B**). However, the 5-HT_{2B} receptor agonist had an effect on the density of filopodia, which was decreased by 32% and 40% after 10 or 20 min-exposures to BW723C86 (T0 vs. T10 $p=0.0003$, T0 vs. T20 $p=0.0007$, **Fig. 8C**). In contrast, the density of immature (T0 vs. T10 $p=0.738$, T0 vs. T20 $p=0.750$) and mature (T0 vs. T10 $p=0.148$, T0 vs. T20 $p=0.691$) spines was unchanged by the treatment (**Fig. 8D-E**). Therefore, 5-HT_{2B} receptor stimulation does not enhance the formation and maturation of dendritic spines in neurons overexpressing CIPP.

The comparison of the amount of the diverse categories of spines in neurons overexpressing CIPP at T0 to that of neurons overexpressing both CIPP and the 5-HT_{2B} receptor at T20 showed that the density of immature spines reaches a similar proportion ($p=0.143$) (**Fig. 8D**). Only the proportion of the mature spines was slightly greater in neurons overexpressing the 5-HT_{2B} receptor in the presence of endogenous CIPP after 20 min of treatment compared to neurons overexpressing both the receptor and CIPP at T0 ($p=0.025$) (**Fig. 8E**). This indicates that agonist stimulation has mostly the same effect as CIPP overexpression on spines.

Thus, overexpression of CIPP prevents the agonist-induced loss of 5-HT_{2B} receptors at the neuronal surface, thereby increasing its activity, leading to a rise in intracellular Ca^{2+} levels and the formation of dendritic spines. We propose that a function of the NR1/5-HT_{2B} receptor/CIPP complex could be to potentiate spine formation and maturation through 5-HT_{2B} receptor-mediated activation of IP3R/ Ca^{2+} signaling cascades. Similarly, a contribution of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in controlling dendritic spine structure has been reported. The 5-HT_{2A} receptor activation was shown to induce an increase in dendritic spine size, as well as phosphorylation of p21-activated kinase PAK, a downstream target of the neuronal Rac guanine nucleotide exchange factor kalirin-7 involved in spine remodeling ⁴⁵. Furthermore, stimulation of 5-HT₂ receptors by DOI increased transamidation of Rac1 and Cdc42, but not RhoA in primary cortical cultures, and caused a transient dendritic spine enlargement, which can be blocked by Transglutaminases inhibition ⁴⁶. PSD-95 interaction has subsequently been shown to drive the targeting of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors to apical dendrites and to control their turnover *in-vivo* ²⁴. Therefore, serotonergic signaling system via the activation of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} or 5-HT_{2B} receptors (this study) can enhance spine maturation. Spine structural plasticity underlies LTP. The role of the serotonergic system in the control of LTP has been demonstrated via 5-HT_{2A} receptors ^{47, 48}. Exposure to environmental stressors impairs hippocampal LTP via 5-HT_{2C} receptors ⁴⁹. In stressed

animals, increasing extracellular serotonin concentration by fenfluramine enabled the induction of LTP. This effect can be mimicked by agents that directly activate 5-HT₂ receptors, including the 5-HT_{2B} receptor agonist BW723C86. In addition, fenfluramine prevented the inhibition of LTP caused by the NMDA receptor antagonist D-AP5, suggesting that serotonergic agents are acting on 5-HT_{2B} receptor and NMDA receptor-dependent mechanisms of LTP¹², consistent with the present study.

The present data identify CIPP as a scaffolding molecule of the 5-HT_{2B} receptor at glutamatergic synapses, and suggests a role of the CIPP-5-HT_{2B}/receptor/NMDA receptor complex in structural plasticity. Further understanding of the function of this complex *in vivo* is critical to elucidate the contribution of serotonin to synaptic plasticity.

Materials and Methods

Plasmid Constructs- cDNAs encoding Human 5-HT_{2B} receptor or mouse 3Flag-CIPP were subcloned into pSG5 mammalian expression vector⁵⁰ or pCAGGS⁵¹. PCAGGS-3HA-5-HT_{2B} construct was obtained from pCAGGS-5-HT_{2B} by insertion of a Triple HA tag (YPYDVPDYA) to the N-terminal extremity of 5-HT_{2B} receptors. PCAGGS-3HA-5-HT_{2B}-ΔPDZ was obtained by targeted substitution in order to create stop codon before the PDZ binding site (EEQ*SYV).

The *Rattus norvegicus* Sprague-Dawley N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1-1a subunit (NR1) complete coding sequence was cloned into PCAGGS-YFP plasmid to generate the N-terminal labeled YFP-NR1 protein.

COS-7 Cell Culture- COS-7 cells were cultured as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Glutamax-GIBCO/Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest SAS) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich), in 9-cm dishes (Falcon/Corning Life Sciences). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were 70% confluent in 6-well plates for inositol phosphate accumulation, in 24-well plates for surface binding and in 9-cm dishes for total binding and co-immunoprecipitation/Western-blot, when they were transfected using the Genjuice transfection reagent (Merck Millipore) in complete DMEM, according to the manufacturer's instructions.

Peptide affinity chromatography and mass spectrometry

A synthetic peptide comprising the 14 C-terminal amino acids of the mouse 5-HT_{2B} receptor and the corresponding peptide lacking the receptor PDZ binding motif (95% purity, Eurogentec) were coupled *via* their N-terminal extremities to activated CH-sepharose 4B (GE-Healthcare). Ten µg of each immobilized peptide were incubated with CHAPS-solubilized proteins from mice brain (10 mg per condition) overnight at 4°C and affinity-retained proteins were resolved on 2-D gels and detected by silver staining, as previously described²⁷. Proteins specifically recruited by the entire peptide, but not the truncated one, were excised, digested in gel using trypsin (Gold, Promega), and the resulting peptides were analyzed using an Ultraflex MALDI-TOF-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik). Analyses were performed in reflectron mode with an accelerating voltage of 25 kV and a

delayed extraction of 50 ns. Spectra were analyzed using the FlexAnalysis software (version 2.4, Bruker Daltonik) and auto-proteolysis products of trypsin (mol wt: 842.51, 1045.56, 2211.10, 2383.90) were used as internal calibrates ²⁷. Identification of proteins was performed by peptide mass fingerprint using the free Mascot Web server (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) and the SwissProt or NCBIprot databases (containing 16,838 and 172,881 *Mus musculus* sequences, respectively). The following parameters were used for database interrogation: mass tolerance of 100 ppm; fixed chemical modification, carbamidomethylation of cysteines; variable chemical modification, oxidation of methionines; matching peptides with one missed cleavage accepted only when they included two consecutive basic residues or when arginine or lysine residues were followed by one or several acidic residues inside the peptide amino acid sequence.

Co-immunoprecipitation and Western-blotting

Co-immunoprecipitation and Western-blotting were performed as previously described ⁵². COS-7 cells transfected with a total of 10 µg of DNA per 9-cm dishes with a ratio of 1:1 (HA-5-HT_{2B} / empty vector; HA-5-HT_{2B}ΔPDZ / empty vector; Flag-CIPP / empty vector HA-5-HT_{2B} / Flag-CIPP; HA-5-HT_{2B}ΔPDZ / Flag-CIPP) or 1:1:1 of HA-5-HT_{2B}, YFP-NR1, and Flag-CIPP proteins, and maintained in culture for two days before harvesting. Cells were centrifuged and suspended in CHAPS lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05 mM EDTA, 10 mM CHAPS, and protease inhibitor cocktail, pH 7.4) and sonicated for 30 s. Cells were next solubilized for 5h at 4°C under gentle agitation. Lysates were centrifuged (12,000 x g) in order to pellet non-solubilized membranes. Protein concentrations in supernatant were measured using the Pierce™ Coomassie Protein Assay Kit.

Cell cultures were transduced with a peptide made up of the 11 C-terminal residues of the 5-HT_{2B} receptor to competitively occlude the interaction between the receptor's PDZ binding motif and target PDZ proteins. This peptide was N-terminally fused to the transduction domain of the Tat protein from the human immunodeficiency virus type-1 to allow its intracellular delivery ³⁸. TAT-5-HT2B-C-TER: YGRKKRRQRRRGDKTEEQVSYV; TAT-5-HT2B-C-TER-MUT: YGRKK RRQRRRGDKTEEQVSSV. The TAT-5-HT2B-C-ter peptide was biotinylated. Protein extracts were incubated in the absence or presence of either the TAT-5-HT2B-Cter peptide or the TAT-5-HT2B-Cter mutated peptide (10 mM each).

Lysates were co-immunoprecipitated with anti-HA, anti-Flag, or anti-NR1 antibody (CST HA-

Tag C29F4 Rabbit mAb #3724, 67 ng/ml; mouse primary antibody against Flag Sigma, 1 µg/ml; anti-NR1 antibody clone 54.1, Millipore, MAB363, 1.8 µg/ml) overnight at 4 °C under gentle agitation. Total lysate and immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE onto 10% acrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Inputs represent 5% of the total protein amount used for immunoprecipitations. Blots were probed with anti-HA (1:1,000), anti-Flag (1:1,000) or anti-NR1 antibody (1:1,000) (See **Table S2**). Anti-mouse and anti-rabbit antibodies (1:10,000) were used as secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using the Odyssey software. At least three independent experiments were performed.

Inositol phosphate accumulation measurement

Inositol phosphate accumulation was measured according to ⁵². COS-7 cells were transfected with a total of 3 µg of DNA (1:1 ratio for co-transfection) per 6-well plates. Twenty-four hours later cells were trypsinized (Trypsin 1X 0.05% EDTA; Invitrogen) and plated in 96-wells plates (30,000 cells/well). The next day, complete medium was replaced by serum-free medium. The day of the experiment, media was replaced by stimulation buffer supplemented with LiCl (NaCl 146 mM, KCl 4.2 mM, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM, Glucose 5.5 mM, LiCl 50 mM, pH 7.4) to prevent inositol phosphate degradation. Cells were stimulated for two h at 37 °C with increasing concentrations (10^{-11} to 10^{-5} M in stimulation buffer) of serotonin and DOI (full and partial 5-HT_{2B} receptor agonists, respectively). The stimulation solution was removed and cells well incubated in the lysis buffer (IP one HTRF Kit, Cisbio) for 1 h. Lysates were distributed in 384-well plates and IP1 was labeled using HTRF reagents. At least three independent experiments were performed in duplicate.

Binding assays

Binding assays were performed as previously described ⁵².

Surface binding. COS-7 cells were transfected with a total of 10 µg of DNA per 9-cm dishes using the Genjuice transfectant reagent in complete medium. Twenty-four h later, cells were trypsinized and plated in 24-well plates. The day before experiment, the culture media was replaced by serum free media. The day of experiment the media was replaced by Krebs-Ringer-Hepes buffer (130 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 2.2 mM, CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.4). Cells were incubated with a constant

concentration of [^3H]-Mesulergine (1 nM) and increasing concentrations of RS127445, a selective 5-HT_{2B} receptor antagonist. RS127445 was diluted in Krebs-Ringer-Hepes buffer at 10^{-11} to 10^{-6} M final concentrations. After 90-min incubation at room temperature, cells were washed twice on ice with cold PBS and lysed in SDS 1% for 1 h. Lysates were transferred in scintillation tubes and 4 ml scintillation cocktail was added to the samples. The radioactivity was counted using a scintillation counter (Beckman Coulter).

Total Binding. COS-7 cells were transfected with a total of 10 μg of DNA per 9-cm dishes using the Genjuice transfectant reagent in complete medium. The day after, the complete culture medium was replaced by serum-free medium. After two days, cells were scraped on ice, centrifuged for 5 min at 1,000 x g at 4 °C. Cell pellets were dissociated and lysed in 1 ml of binding buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and centrifuged for 30 min at 10,000 x g. Membranes (pellets) were then suspended in 5 ml PBS. Aliquots of membrane suspension (200 μl /well containing ~ 50 μg protein) were distributed in 96 deep well plates. Membranes were incubated at room temperature for 90 min with 25 μl of [^3H]-Mesulergine diluted in binding buffer at a final concentration of 1 nM and 25 μl /well of increasing concentrations (10^{-11} - 10^{-6} M) of RS127445. Membranes were harvested by rapid filtration onto Whatman GF/B glass fiber filters (Brandell-Harvester apparatus) pre-soaked with cold saline solution and washed 3 times with cold saline solution to reduce nonspecific binding. Filters were placed in 6-ml scintillation vials and allowed to dry overnight. The next day, 4 ml of scintillation cocktail were added to the samples. At least three independent experiments were performed in duplicate.

Experimental procedures involving animals.

All animal procedures were carried out according to the European Community Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), the guidelines of the French Ministry of Agriculture and the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris (Institut du Fer à Moulin, Animalerie des Rongeurs, license C 72-05-22) and were approved by the local Ethic Committee for Animal Experiments (No. 01170.02). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Hippocampal neuronal culture and transfection.

Hippocampal neurons were prepared from embryonic day 19 Sprague-Dawley rat pups as previously described^{53, 54}. Dissected tissues were trypsinized (0.25% v/v) and mechanically dissociated in HBSS (CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ 0.5 mM, MgSO₄ 0.4 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, D-Glucose 5.5 mM) containing 10 mM Hepes (Invitrogen). Dissociated cells were plated on glass coverslips (Assistent) precoated with 55 µg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich) in plating medium composed of MEM supplemented with horse serum (10% v/v; Invitrogen), L-glutamine (2 mM), and Na pyruvate (1 mM, Invitrogen) at a density of 3.4×10^4 cells/cm² and maintained in humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. After attachment for 2-3 h, cells were incubated in maintenance medium that consists of Neurobasal medium supplemented with B27, L-glutamine (2 mM), and antibiotics (Invitrogen). Each week, one-third of the culture medium volume was renewed. For RT-qPCR experiments, cytosine β-D- arabinofuranoside (AraC) (5 µM) was added once at 5 days in vitro (DIV)⁵⁵. Neuronal transfections with plasmids encoding HA-5-HT_{2B}, Flag-CIPP, Gephyrin FingR–GFP^{56, 57}, Homer1c–GFP⁵⁸ and eGFP were performed at 13–14 DIV using Transfectin (Bio-Rad), according to the instructions of the manufacturer (DNA/lipofectant ratio of 1:3), with 1 µg of plasmid DNA per 20-mm well. The following ratio of plasmid DNA was used in co-transfection experiments: 0.5:0.3:0.2 µg (for 5-HT_{2B}-HA/ CIPP-Flag/ Homer1c–GFP or Gephyrin FingR–GFP or mCherry or eGFP). Experiments were performed 7–10 days after transfection.

RT-qPCR

Total RNAs was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with DNase (Thermoscientific). First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription of 2 µg of total RNA with Superscript-II reverse transcriptase (Invitrogen, Illkirch, France). Reverse transcriptase was omitted in samples as negative controls. Relative expression levels of mRNAs were determined by real time RT-PCR using Absolute SYBR Green Mix (Thermoscientific) on a QuantStudio apparatus (Applied Biosystems). Efficiency of amplification for each primer pair was checked on a standard curve. Gene expression levels were normalized to rat cyclophilin B (Cyp) mRNA expression.

The primers used are: Cyp Forward: CCATCGTGTCATCAAGGACTT; Cyp Reverse: TTGCCATCCAGCCAGGAGGTC; *Htr2b* Forward: GGTGGCTGATTTGCTGGTTG; *Htr2b* Reverse: TAGCGATCCAGGGAAATGGC; CIPP

Forward: ACCCAGAAGCTGAAGGTTGG; CIPP Reverse:
TGGGAGCCTGCAGACATCAT.

Immunocytochemistry

The total (membrane plus intracellular) pools of 5-HT_{2B} receptors were revealed with immunocytochemistry in fixed and permeabilized cells, whereas the membrane pool of 5-HT_{2B}-HA was done in non-permeabilized cells. To label the total pool of 5-HT_{2B} receptors, CIPP or NMDA receptors, cells were fixed for 15 min at room temperature in paraformaldehyde (PFA; 4% w/v; Sigma) and sucrose (20% w/v; Sigma) solution in PBS. Cells were then washed in PBS, and permeabilized for 4 min with Triton X-100 (0.25% v/v) in PBS. After washes, nonspecific staining was blocked for 30 min with bovine serum albumin (BSA; 3% w/v; Sigma) and goat serum (20% v/v; Invitrogen) in PBS. Neurons were then incubated for 1 h with either the rabbit anti-HA antibody (1:400; Cell Signaling HA-Tag C29F4 Rabbit mAb #3724) or the mouse anti-Flag antibody (1:400; Sigma) or rabbit anti-Flag antibody (1:400; Sigma) or the mouse anti-NR1 antibody (1:400, clone 54.1, Millipore, MAB363) or anti-MAP2 (Chicken); Abcam; ab5392; dilution 1/500, or Monoclonal mouse anti-Neurofilament, clone RT-97, Millipore, MAB5262; dilution 1/500 in PBS supplemented with Goat Serum (GS) (3% v/v). CY3 Donkey anti-Chicken -IgY++(IgG) (H+L); Jackson; Code703-165-155; dilution 1/500; Cells were then washed three times and incubated for 45 min with Cy5-conjugated donkey anti-mouse antibodies (1.9 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) or the Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (1.9 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) in PBS-BSA-goat serum blocking solution, washed, and mounted on slides with mowiol 4-88 (48 mg/ml) (See **Table S2**). In experiments using BW723C86, the drug was diluted in imaging medium and applied to neurons for 10 or 20 min at 1 µM final concentration. The imaging medium consisted of phenol red-free MEM supplemented with glucose (33 mM), Hepes (20 mM), glutamine (2 mM), Na⁺-pyruvate (1 mM), and B27 (1X, Invitrogen). Sets of neurons to be compared were labeled and imaged simultaneously.

Fluorescence image acquisition and cluster analyses

Fluorescence image acquisition and analyses were performed as previously described^{53, 54}. Images were obtained on a Leica SP5 confocal microscope using the LAS-AF program

(Leica). Stacks of 16–35 images were acquired using a 63 X objective with an interval of 0.2 μm and an optical zoom of 2. Image exposure time was determined on bright cells to avoid pixel saturation. All images from a given culture were then acquired with the same exposure time.

Quantifications of 5-HT_{2B} receptor or NMDA receptor clusters were performed using MetaMorph software (Roper Scientific) on projections (sum of intensity) of confocal optical sections. On each cell, a region of interest (ROI) was chosen. For 5-HT_{2B} receptor or NMDA receptor cluster analyses, images were first flattened background filtered (kernel size, 3 x 3 x 2) to enhance cluster outlines, and a user-defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. Thresholded clusters were binarized, and binarized regions were outlined and transferred onto raw data to determine the mean 5-HT_{2B} receptor, CIPP or NMDA receptor cluster number, area and fluorescence intensity. The dendritic surface area of regions of interest was measured to determine the number of clusters per 10 μm^2 . For quantifications of 5-HT_{2B} receptor clusters at excitatory or inhibitory synapses, only 5-HT_{2B} receptor clusters comprising at least three pixels and apposed on at least one pixel with GFP-Homer or Gephyrin FingR–GFP clusters were considered. For each culture, we analyzed 7-12 dendrites per experimental condition and ~100 clusters per dendrites. A total of about 10 neurons were analyzed per condition from two to five independent cultures. The experimenter was blind to the culture treatment.

Calcium imaging acquisition and analyses

Calcium imaging acquisition and analyses were performed as described in ⁵⁹. Neurons expressing HA-5-HT_{2B} receptor, mCherry and/or Flag-CIPP were maintained at 37°C in a thermostated chamber and superfused with imaging medium preheated at 37°C. Time-lapse confocal images of neurons were acquired every 500 ms using an inverted spinning-disc microscope (Leica DMI4000, Yokogawa CS20 spinning Nipkow disk, 63 $\times$ objective). At every time point, neurons were illuminated by 491 nm light from an Ar/Kr laser in order to follow cytosolic calcium concentration using Fluo-4AM (Thermofisher). At first and last time point, neurons were illuminated by 561 nm light to follow eventual morphological changes or displacement artifact. Laser intensity, time of illumination and acquisition parameters of the camera remained identical to allow comparison between experiments and bleach correction. In order to analyze calcium concentration change after stimulation with BW723C86 (1 μM),

ROI were randomly selected in the dendrites of mCherry-positive cells. In addition, ROI were precisely selected out of the mCherry-labeled neurons or other cells in order to identify the background fluorescence. The background intensity was subtracted to the mean intensity values of Fluo-4AM calcium fluorescent probe. Basal intensity of each ROI was determined during the time before injection in order to determine F_0 values. Then intensity after stimulation F was normalized by F_0 in order to detect and compare each ROI by their specific F/F_0 . Finally, each ROI were plotted and analyzed using the GraphPad Prism 7 software.

Spine analysis

Quantifications of spine density and shape were performed blind to experimental conditions, on confocal stacks of eGFP images with Imaris (BitPlane, South Windsor, CT, USA). Measurements were made on maximal projection in z of confocal stacks of 16–35 images acquired with an interval of 0.2 μm , and an optical zoom of 1.26. Only spines that could be accurately followed over the entire stack were measured. A total of 15–30 dendritic segments were analyzed per condition from two independent cultures. Briefly, dendrites were semi-automatically rebuilt in 3D and spines automatically segmented using the Filament Tracer tool. Measurements were performed on one dendrite portion per image. Dendrite length, spine length and terminal point diameter data were extracted from Imaris. Dendritic spine densities and classes (stubby, mushroom, thin, and filopodia) were assessed according to ⁶⁰. Filopodia were classified as such when their length was $>2 \mu\text{m}$; mushroom spines when the head width was $>0.6 \mu\text{m}$; long-thin spines when their length $>1 \mu\text{m}$; thin spines when their length-to-width ratio (LWR) was >1 and stubby spines when their LWR was <1 .

The spine real-time recordings were realized on living neurons transfected with 5-HT_{2B}-HA and eGFP with a Nikon Ti-eclipse microscope, and with an Andor EMCCD 897 camera using a 100X objective. The neurons were kept, during the experiment, at 37°C in the imaging medium. For the images acquisition parameters, an interval of 0.2 μm and a stack of 5 μm were set. Image exposure time was determined on bright cells to avoid pixel saturation. Pictures were taken every 2 minutes. The three first pictures were acquired before any stimulation then the drug (BW723C86 at a final concentration of 1 μM) was applied in the imaging buffer until the end of the experiment (25 minutes in total). The movie and pictures are the maximal projection in z at each time point.

Statistical analyses

To determine differences between the experimental groups, normal distributions and homoscedasticity were assessed by Shapiro-Wilk's test, D'Agostino & Pearson's test, and Levene's test, respectively. Putative outliers were determined by the ROUT method and eliminated. For non-parametric test, Mann and Whitney t-test was used for simple comparisons. For parametric test, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post-test for multiple comparisons, or by two-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparison. Independent experiments were performed at least 3 times. In all cases, $p < 0.05$ was considered as statistically significant. Means and SEM are represented in all graphs. The statistical tests, indicated in each figure, were performed with the GraphPad Prism 7 software (See **Table S3** for full statistical analysis).

Author information**Author affiliations:**

¹ INSERM UMR-S 1270, F75005, Paris, France; Sorbonne Université, F75005, Paris; Institut du Fer à Moulin, F75005, Paris.

² Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

Author contributions:

A. B.*, E. Q.*, I. M., B. C., and M. R., conducted the experiments and analyzed data, P. M., L. M., S. L. designed the experiments, supervised the study, analyzed data, wrote the paper and provided funding, *Equal contributors

Correspondence should be addressed: #Luc Maroteaux, Email: luc.maroteaux@upmc.fr Tel: 331 45 87 61 23; #Sabine Levi, Email: sabine.levi@inserm.fr, Tel: 331 45 87 61 13, Institut du Fer à Moulin UMR-S 1270 INSERM 17 rue du Fer à Moulin 75005 Paris

Acknowledgments: We thank Dr. D. Choquet for the Homer1c–GFP construct, Dr. A. Triller for the Gephyrin construct, and Mythili Savariradjane, Xavier Marques and the Imaging facility of the IFM. We are indebted to Drs. Michèle Darmon and Anne Roumier for critical reading of the manuscript.

Competing interest: Authors declare no conflict of interest.

Funding: This work has been supported by grants from the *Fondation pour la Recherche sur le Cerveau*, the *Fondation de France*, the *Fondation pour la Recherche Médicale* "Equipe FRM DEQ2014039529", the French Ministry of Research (Agence Nationale pour la Recherche ANR-17-CE16-0008 and the Investissements d'Avenir programme ANR-11-IDEX-0004-02). LM and SL teams are part of the École des Neurosciences de Paris Ile-de-France network and of the Bio-Psy Labex and as such this work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02. E. Quentin received a PhD fellowship from the Region Ile de France DIM Cerveau et Pensée.

Supporting Information.

The supplementary material includes the summary of the characteristics (in absolute numbers) of 5-HT_{2B} receptor clusters in neurons expressing the receptor alone or in combination with CIPP, the list and references of antibodies used for immunolabeling, and the full statistical analysis of the reported data.

In addition, the quantification of 5-HT_{2B} receptor clusters in neurons overexpressing CIPP in the presence of 5-HT_{2B} receptor Δ PDZ and the decrease co-immunoprecipitation of CIPP with the 5-HT_{2B} receptor in COS-7 cells expressing the TAT-5-HT_{2B}-C-ter peptide are presented.

Then, the dose response effect of BW723C86 agonist on 5-HT_{2B} receptor membrane and NR1-associated clusters is displayed in order to confirm the specificity of the agonist effects. Finally, a movie of real-time live recording of neuronal cultures overexpressing 5-HT_{2B}-HA and eGFP before and after treatment by BW723C86 (1 μ M) illustrates the increase in spine over time.

References:

- (1) Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., et al. A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity, *Nature*, **2010**, 468, 1061-1066.
- (2) Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X. J., Kamme, F., Meurers, B., et al. Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain, *Brain Res*, **2002**, 943, 38-47.
- (3) Duxon, M. S., Flanigan, T. P., Reavley, A. C., Baxter, G. S., Blackburn, T. P., and Fone, K. C. F. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system, *Neuroscience*, **1997**, 76, 323-329.
- (4) Choi, D.-S., and Maroteaux, L. Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain, *FEBS Lett.*, **1996**, 391, 45-51.
- (5) Diaz, S. L., Doly, S., Narboux-Nême, N., Fernandez, S., Mazot, P., Banas, S., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., Roumier, A., et al. 5-HT2B receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions, *Mol Psychiatry*, **2012**, 17, 154-163.
- (6) Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S. L., Guiard, B. P., Fernandez, S. P., Doly, S., Banas, S. M., Pitychoutis, P. M., Moutkine, I., Muzerelle, A., et al. Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors, *Neuropsychopharmacology*, **2018**, 43, 1623-1632.
- (7) Doly, S., Quentin, E., Eddine, R., Tolu, S., Fernandez, S., Bertran-Gonzalez, J., Valjent, E., Belmer, A., Viñals, X., Callebert, J., et al. Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses, *J Neurosci*, **2017**, 37, 10372-10388.
- (8) Kolodziejczak, M., Bechade, C., Gervasi, N., Irinopoulou, T., Banas, S. M., Cordier, C., Rebsam, A., Roumier, A., and Maroteaux, L. Serotonin modulates developmental microglia via 5-HT2B receptors: potential implication during synaptic refinement of retinogeniculate projections, *ACS Chem Neurosci*, **2015**, 6, 1219-1230.
- (9) Montalvo-Ortiz, J. L., Zhou, H., D'Andrea, I., Maroteaux, L., Lori, A., Smith, A., Ressler, K., Nuñez, Y. Z., Farrer, L. A., Zhao, H., et al. Translational studies support a role for serotonin 2B receptors in aggression-related cannabis response, *Mol Psychiatry*, **2018**, 23, 2277-2286.
- (10) Lacoste, J., Lamy, S., Ramoz, N., Ballon, N., Jehel, L., Maroteaux, L., and Thibaut, F. A positive association between a polymorphism in the HTR2B gene and cocaine-crack in a French Afro-Caribbean population, *World J Biol Psychiatry*, **2019**, in press, 1-20.
- (11) Pitychoutis, P., Belmer, A., Moutkine, I., Adrien, J., and Maroteaux, L. Mice lacking the serotonin Htr2B receptor gene present an antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotype, *Neuropsychopharmacology*, **2015**, 40, 2764-2773.
- (12) Ryan, B. K., Anwyl, R., and Rowan, M. J. 5-HT2 receptor-mediated reversal of the inhibition of hippocampal long-term potentiation by acute inescapable stress, *Neuropharmacology*, **2008**, 55, 175-182.
- (13) Aira, Z., Buesa, I., García Del Caño, G., Bilbao, J., Doñate, F., Zimmermann, M., and Azkue, J. J. Transient, 5-HT2B receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons, *Pain*, **2013**, 154, 1865-1877.
- (14) Holohean, A. M., and Hackman, J. C. Mechanisms intrinsic to 5-HT2B receptor-induced potentiation of NMDA receptor responses in frog motoneurons, *Br J Pharmacol*, **2004**, 143, 351-360.

- (15) Marin, P., Becamel, C., Dumuis, A., and Bockaert, J. 5-HT receptor-associated protein networks: new targets for drug discovery in psychiatric disorders?, *Current Drug Targets*, **2012**, *13*, 28-52.
- (16) Good, M. C., Zalatan, J. G., and Lim, W. A. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information, *Science*, **2011**, *332*, 680-686.
- (17) Dunn, H. A., and Ferguson, S. S. G. PDZ protein regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling pathways, *Mol Pharm*, **2015**, *88*, 624-639.
- (18) Feng, W., and Zhang, M. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density, *Nat Rev Neurosci*, **2009**, *10*, 87-99.
- (19) Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A., and Lubbert, H. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein, *FEBS Lett*, **1998**, *424*, 63-68.
- (20) Becamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lubbert, H., and Ullmer, C. Interaction of serotonin 5-HT_{2C} receptors with PDZ10 of the multi PDZ protein MUPP1, *J Biol Chem*, **2001**, *276*, 12974-12982.
- (21) Lemmers, C., Médina, E., Delgrossi, M.-H., Michel, D., Arsanto, J.-P., and Le Bivic, A. hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells, *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 25408-25415.
- (22) Assémat, E., Crost, E., Ponsérre, M., Wijnholds, J., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex, *Exp Cell Res*, **2013**, *319*, 2514-2525.
- (23) Xia, Z., Hufeisen, S. J., Gray, J. A., and Roth, B. L. The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT_{2A} serotonin receptors in cortical pyramidal neurons in vitro, *Neuroscience*, **2003**, *122*, 907-920.
- (24) Abbas, A. I., Yadav, P. N., Yao, W.-D., Arbuckle, M. I., Grant, S. G. N., Caron, M. G., and Roth, B. L. PSD-95 is essential for hallucinogen and atypical antipsychotic drug actions at serotonin receptors, *J Neurosci*, **2009**, *29*, 7124-7136.
- (25) Zeng, M., Chen, X., Guan, D., Xu, J., Wu, H., Tong, P., and Zhang, M. Reconstituted postsynaptic density as a molecular platform for understanding synapse formation and plasticity, *Cell*, **2018**, *174*, 1172-1187.e1116.
- (26) Frank, R. A., and Grant, S. G. Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density, *Current Opinion in Neurobiology*, **2017**, *45*, 139-147.
- (27) Becamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galeotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J., and Marin, P. The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins, *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 20257-20266.
- (28) Philipp, S., and Flockerzi, V. Molecular characterization of a novel human PDZ domain protein with homology to INAD from *Drosophila melanogaster*, *FEBS letters*, **1997**, *413*, 243-248.
- (29) Kurschner, C., Mermelstein, P. G., Holden, W. T., and Surmeier, D. J. CIPP, a novel multivalent PDZ domain protein, selectively interacts with Kir4.0 family members, NMDA receptor subunits, neurexins, and neuroligins, *Mol Cell Neurosci*, **1998**, *11*, 161-172.
- (30) Alpi, E., Landi, E., Barilari, M., Serresi, M., Salvadori, P., Bachi, A., and Dente, L. Channel-interacting PDZ protein, 'CIPP', interacts with proteins involved in cytoskeletal dynamics, *Biochem J*, **2009**, *419*, 289-300.
- (31) Barilari, M., and Dente, L. The neuronal proteins CIPP, Cypin and IRSp53 form a tripartite complex mediated by PDZ and SH3 domains, *Biological Chemistry*, **2010**, *391*, 1169-1174.
- (32) Anzai, N., Deval, E., Schaefer, L., Friend, V., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. The multivalent PDZ domain-containing protein CIPP is a partner of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons, *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 16655-16661.

- (33) Maroteaux, L., Ayme-Dietrich, E., Aubertin-Kirch, G., Banas, S., Quentin, E., Lawson, R., and Monassier, L. New therapeutic opportunities for 5-HT₂ receptor ligands, *Pharmacol Ther*, **2017**, *170*, 14-36.
- (34) Black, J. W., and Leff, P. Operational models of pharmacological agonism, *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **1983**, *220*, 141-162.
- (35) Kenakin, T., Watson, C., Muniz-Medina, V., Christopoulos, A., and Novick, S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias, *ACS Chem Neurosci*, **2012**, *3*, 193-203.
- (36) Shrivastava, A. N., Rodriguez, P. C., Triller, A., and Renner, M. Dynamic micro-organization of P2X₇ receptors revealed by PALM based single particle tracking, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **2013**, *7*, 232.
- (37) Bahouth, S. W., and Nooh, M. M. Barcoding of GPCR trafficking and signaling through the various trafficking roadmaps by compartmentalized signaling networks, *Cellular Signalling*, **2017**, *36*, 42-55.
- (38) Gavarini, S., Bécamel, C., Altier, C., Lory, P., Poncet, J., Wijnholds, J., Bockaert, J., and Marin, P. Opposite effects of PSD-95 and MPP3 PDZ proteins on serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor desensitization and membrane stability, *Mol Biol Cell*, **2006**, *17*, 4619-4631.
- (39) Cox, D. A., and Cohen, M. L. 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C, *Behav Brain Res*, **1996**, *73*, 289-292.
- (40) Ullmer, C., Boddeke, H. G. W. M., Schmuck, K., and Lübbert, H. 5-HT_{2B} receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary artery endothelial cells, *Br J Pharmacol*, **1996**, *117*, 1081-1088.
- (41) Kellermayer, B., Ferreira, J. S., Dupuis, J., Levet, F., Grillo-Bosch, D., Bard, L., Linares-Loyez, J., Bouchet, D., Choquet, D., Rusakov, D. A., et al. Differential nanoscale topography and functional role of GluN2-NMDA receptor subtypes at glutamatergic synapses, *Neuron*, **2018**, *100*, 106-119.e107.
- (42) Bigford, G. E., Chaudhry, N. S., Keane, R. W., and Holohean, A. M. 5-Hydroxytryptamine 5HT_{2C} receptors form a protein complex with N-methyl-D-aspartate GluN2A subunits and activate phosphorylation of Src protein to modulate motoneuronal depolarization, *J Biol Chem*, **2012**, *287*, 11049-11059.
- (43) Zhang, J., Xu, T.-X., Hallett, P. J., Watanabe, M., Grant, S. G. N., Isacson, O., and Yao, W.-D. PSD-95 uncouples dopamine-glutamate interaction in the D1/PSD-95/NMDA receptor complex, *J Neurosci*, **2009**, *29*, 2948-2960.
- (44) Sabatini, B. L., Oertner, T. G., and Svoboda, K. The life cycle of Ca²⁺ ions in dendritic spines, *Neuron*, **2002**, *33*, 439-452.
- (45) Jones, K. A., Srivastava, D. P., Allen, J. A., Strachan, R. T., Roth, B. L., and Penzes, P. Rapid modulation of spine morphology by the 5-HT_{2A} serotonin receptor through kalirin-7 signaling, *Proc Natl Acad Sci USA*, **2009**, *106*, 19575-19580.
- (46) Mi, Z., Si, T., Kapadia, K., Li, Q., and Muma, N. A. Receptor-stimulated transamidation induces activation of Rac1 and Cdc42 and the regulation of dendritic spines, *Neuropharmacology*, **2017**, *117*, 93-105.
- (47) Wang, R. Y., and Arvanov, V. L. M100907, a highly selective 5-HT_{2A} receptor antagonist and a potential atypical antipsychotic drug, facilitates induction of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampal slice, *Brain Research*, **1998**, *779*, 309-313.
- (48) Rozas, C., Loyola, S., Ugarte, G., Zeise, M. L., Reyes-Parada, M., Pancetti, F., Rojas, P., and Morales, B. Acutely applied MDMA enhances long-term potentiation in

- rat hippocampus involving D1/D5 and 5-HT₂ receptors through a polysynaptic mechanism, *Eur Neuropsychopharm*, **2012**, 22, 584-595.
- (49) Busceti, C. L., Di Pietro, P., Rizzo, B., Traficante, A., Biagioni, F., Nisticò, R., Fornai, F., Battaglia, G., Nicoletti, F., and Bruno, V. 5-HT_{2C} serotonin receptor blockade prevents tau protein hyperphosphorylation and corrects the defect in hippocampal synaptic plasticity caused by a combination of environmental stressors in mice, *Pharmacological Research*, **2015**, 99, 258-268.
- (50) Green, S., Issemann, I., and Sheer, E. A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering., *Nucl. Ac. Res.*, **1988**, 16, 396.
- (51) Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, *Gene*, **1991**, 108, 193-199.
- (52) Moutkine, I., Quentin, E., Guiard, B. P., Maroteaux, L., and Doly, S. Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers, *J Biol Chem*, **2017**, 292, 6352-6368.
- (53) Gauvain, G., Chamma, I., Chevy, Q., Cabezas, C., Irinopoulou, T., Bodrug, N., Carnaud, M., Levi, S., and Poncer, J. C. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines, *Proc Natl Acad Sci USA*, **2011**, 108, 15474-15479.
- (54) Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Eugène, E., Poncer, J. C., and Lévi, S. Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons, *J Neurosci*, **2013**, 33, 15488-15503.
- (55) Schellekens, H., De Francesco, P. N., Kandil, D., Theeuwes, W. F., McCarthy, T., van Oeffelen, W. E. P. A., Perelló, M., Giblin, L., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. Ghrelin's orexigenic effect is modulated via a serotonin 2C receptor interaction, *ACS Chem Neurosci*, **2015**, 6, 1186-1197.
- (56) Hanus, C., Ehrensperger, M. V., and Triller, A. Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses, *J Neurosci*, **2006**, 26, 4586-4595.
- (57) Gross, G. G., Junge, J. A., Mora, R. J., Kwon, H.-B., Olson, C. A., Takahashi, T. T., Liman, E. R., Ellis-Davies, G. C. R., McGee, A. W., Sabatini, B. L., et al. Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons, *Neuron*, **2013**, 78, 971-985.
- (58) Bats, C., Groc, L., and Choquet, D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking, *Neuron*, **2007**, 53, 719-734.
- (59) Vadodaria, K. C., Mertens, J., Paquola, A., Bardy, C., Li, X., Jappelli, R., Fung, L., Marchetto, M. C., Hamm, M., Gorris, M., et al. Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts, *Mol Psychiatry*, **2016**, 21, 49-61.
- (60) Risher, W. C., Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J., and Eroglu, C. Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines, *PloS one*, **2014**, 9, e107591.

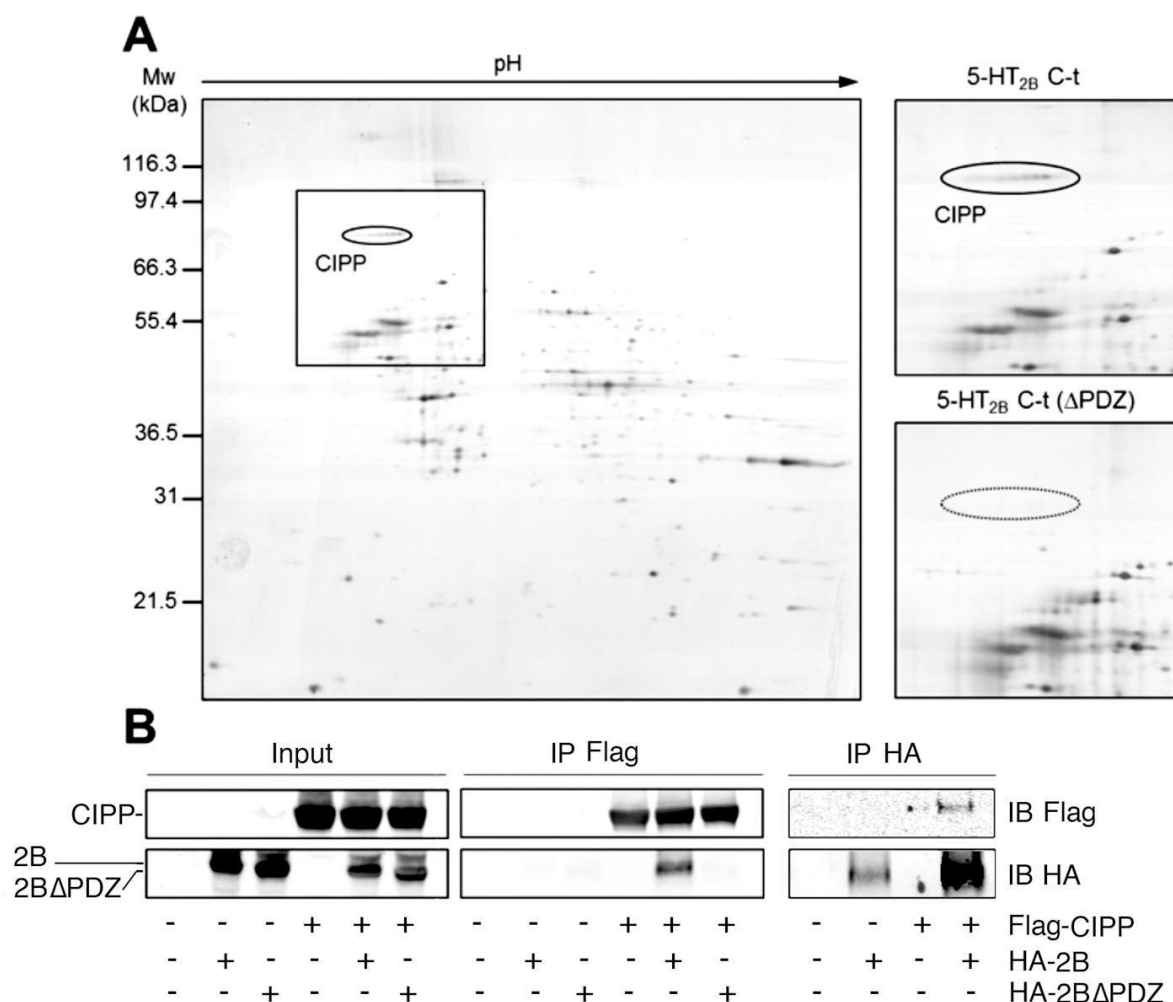


Figure 1 - Interactions between CIPP and the 5-HT_{2B} receptor PDZ binding motif. (A) Pull-down of CIPP by the 5-HT_{2B} receptor PDZ binding motif. The left panel shows an analytic 2-D gel of pull-down of brain proteins performed with the 5-HT_{2B} receptor C-terminal peptide (last 14 amino-acids) as bait, representative of three independent experiments. The right panels show a magnification of gel region comprising a circled train of protein spots otherwise absent in the corresponding region of 2-D gels obtained with the 5-HT_{2B} receptor C-terminal peptide (C-t) deleted (last three amino-acids) of the receptor PDZ binding motif (ΔPDZ). This train of spot was identified as CIPP by MALDI-TOF mass spectrometry (16 out 26 detected peptides matching the CIPP sequence, corresponding to a protein sequence coverage of 25%, Mascot Score 153). **(B) Co-immunoprecipitation of CIPP with the 5-HT_{2B} receptor in COS-7 cells.** Proteins from COS-7 cells co-transfected with plasmids coding for HA-tagged 5-HT_{2B} (HA-2B), HA-tagged 5-HT_{2B}-ΔPDZ (HA-2BΔPDZ) and/or Flag-tagged CIPP proteins analyzed by Western blotting. Blot of input of proteins revealed by anti-Flag antiserum (IB Flag-CIPP) or by anti-HA antiserum (IB HA-2B) shows the presence of the proteins in each condition (left). Immunoprecipitations using anti-Flag beads (IP Flag-CIPP) or anti-HA beads (IP HA-2B) followed by Western blotting revealed an interaction between CIPP and 5-HT_{2B} receptors but not between CIPP and 5-HT_{2B}-ΔPDZ (representative experiment of n > 3 independent experiments).

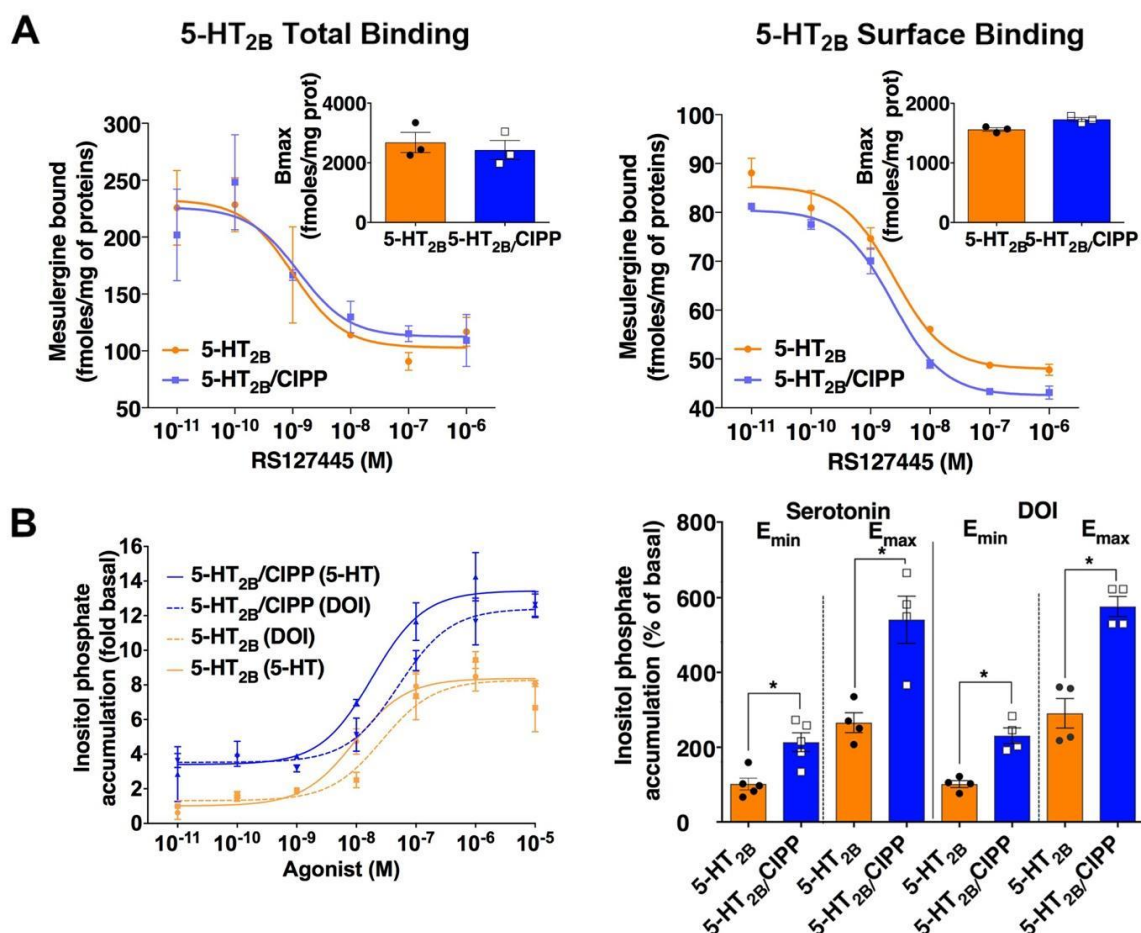


Figure 2 - Impact of CIPP on 5-HT_{2B} receptor expression and signaling. (A) Impact of CIPP on total and cell surface 5-HT_{2B} receptor expression in COS-7 cells. (left) Radioligand binding competition of tritiated mesulergine performed on membrane proteins from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B} receptors with (Blue square-bars) or without CIPP (Orange circle-bars) showed no different maximal expression of the receptors, which is represented by the Bmax. (Right) Similar experiment performed on living COS-7 cells in order to evaluate 5-HT_{2B} receptor expression at the plasma membrane (surface) showed no different expression ($p > 0.05$). Data were tested using the Mann-Whitney unpaired t-test; $n = 3$ independent experiments, each performed in duplicate. **(B) Impact of CIPP on 5-HT_{2B} receptor-operated signal transduction.** (left) The quantification of inositol phosphate production was performed in COS-7 cells expressing 5-HT_{2B} receptor with or without CIPP and stimulated with increasing concentrations of a full agonist (5-HT) or a partial agonist (DOI) of the receptor. (Right) Co-expression of CIPP with 5-HT_{2B} receptors increased the basal (E_{min} , 5-HT $p = 0.0159$, DOI $p = 0.0286$), and stimulated inositol phosphate production (E_{max} , 5-HT $p = 0.0286$, DOI $p = 0.0286$). Bmax, Emin, Emax were statistically analyzed by Mann-Whitney unpaired t-test; $n = 4-6$ independent experiments, each performed in duplicate. (* $p < 0.05$).

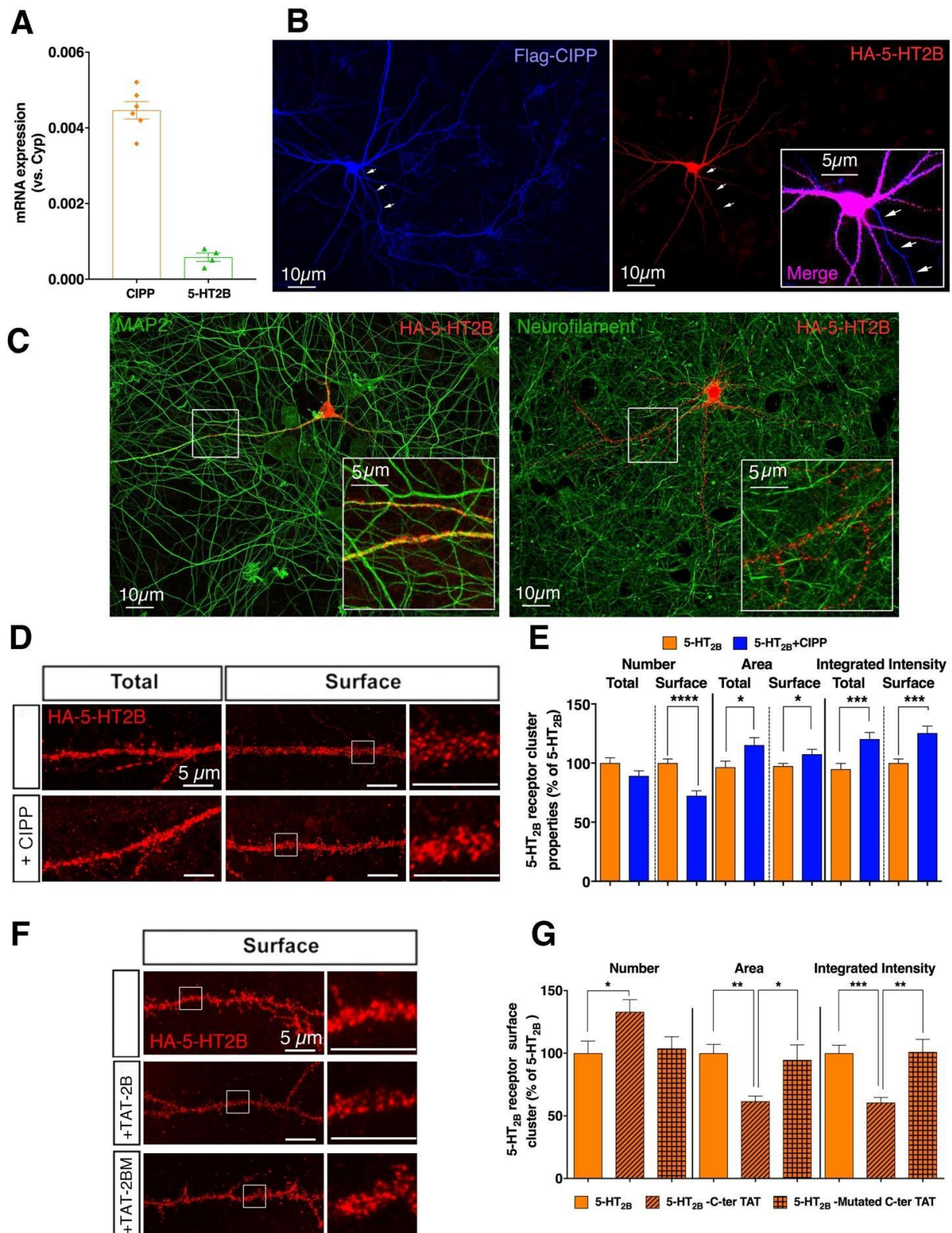


Figure 3 - Impact of CIPP expression on 5-HT_{2B} receptor distribution in hippocampal neurons. (A) Expression of 5-HT_{2B} receptors and CIPP mRNA in hippocampal cultures. mRNAs were prepared from cultured hippocampal neurons treated with AraC to eliminate astrocytes and microglia and were quantified by RT-qPCR revealing expression of both CIPP and 5-HT_{2B} receptor mRNAs in these neurons. (B) **Cellular distribution of 5-HT_{2B} receptor and CIPP.** Primary cultures of hippocampal neurons were transfected with plasmids encoding HA-5-HT_{2B} receptor and Flag-CIPP, and stained for their respective tag. Note the

partial overlap in HA-5-HT_{2B} receptor (red) and Flag-CIPP protein (blue) staining in neurons. Inset highlights Flag-CIPP labeling in neurites devoid of 5-HT_{2B} receptors. Scale bars 10 μ m, inset 5 μ m. **(C) Double-labeling of 5-HT_{2B} receptor (red), and either MAP2 (green, left) or Neurofilament (green, right) to identify respectively somato-dendritic and axonal compartments.** The HA-5-HT_{2B} receptor (red) is exclusively expressed along MAP2-positive somato-dendritic membrane and excluded from Neurofilament-positive axons. Scale bars 10 μ m, inset 5 μ m. **(D) Subcellular distribution of 5-HT_{2B} receptor and CIPP.** Morphological analyses were performed on primary cultured hippocampal neurons transfected with a plasmid encoding HA-tagged 5-HT_{2B} receptor together with a plasmid encoding Flag-tagged CIPP or an empty vector (-CIPP). Examples of total (left panel) and surface (right panel) staining of 5-HT_{2B} receptor (red) in permeabilized and non-permeabilized cells, respectively. Note that 5-HT_{2B} receptors form clusters at the surface of hippocampal dendrites with or without CIPP overexpression (see enlargements, right). Scale bars 5 μ m. **(E) Quantification of 5-HT_{2B} receptor clusters in neurons overexpressing (blue) or not (orange) CIPP.** CIPP decreased the number of 5-HT_{2B} receptor clusters at the neuronal surface ($p < 0.0001$), but not the total (intracellular + surface) number of clusters ($p = 0.08$). CIPP increased the size (area) of membrane ($p = 0.034$) or total (intracellular + membrane) 5-HT_{2B} receptor clusters ($p = 0.024$). CIPP also increased the density of 5-HT_{2B} receptors per cluster (integrated intensity) for the membrane pool ($p = 0.0003$) and total ($p = 0.0009$). Morphological parameters were analyzed by unpaired t-test, $n = 45$ -53 dendrites with 7-12 dendrites per neuron from 5 neuronal cultures. **(F) Subcellular distribution of 5-HT_{2B} receptors in neurons expressing TAT-peptides.** Morphological analyses were performed on primary cultured hippocampal neurons transfected with a plasmid encoding HA-tagged 5-HT_{2B} receptor together with TAT-5-HT_{2B}-Cter peptides. Examples of surface staining of 5-HT_{2B} receptor (red) in non-permeabilized cells. 5-HT_{2B} receptors form clusters at the surface of dendrites in absence of CIPP overexpression, whose numbers are increased by TAT-5-HT_{2B}-Cter peptide, but not TAT-5-HT_{2B}-Cter mutant peptide (see enlargements, right). Scale bars, 5 μ m. **(G) Quantification of 5-HT_{2B} receptor clusters in neurons expressing TAT-peptides.** TAT-5-HT_{2B}-Cter peptide but not the TAT-5-HT_{2B}-Cter mutant peptide increased the number of 5-HT_{2B} receptor clusters at the neuronal surface ($p = 0.049$). TAT-5-HT_{2B}-Cter peptide but not the TAT-5-HT_{2B}-Cter mutant peptide decreased the size (area) of surface 5-HT_{2B} receptor clusters ($p = 0.0036$) and the density ($p = 0.0009$) of 5-HT_{2B} receptors per cluster (integrated intensity). Morphological parameters, expressed as percentage of the basal values, were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, $n = 12$ -18 dendrites from 2 neuronal cultures (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

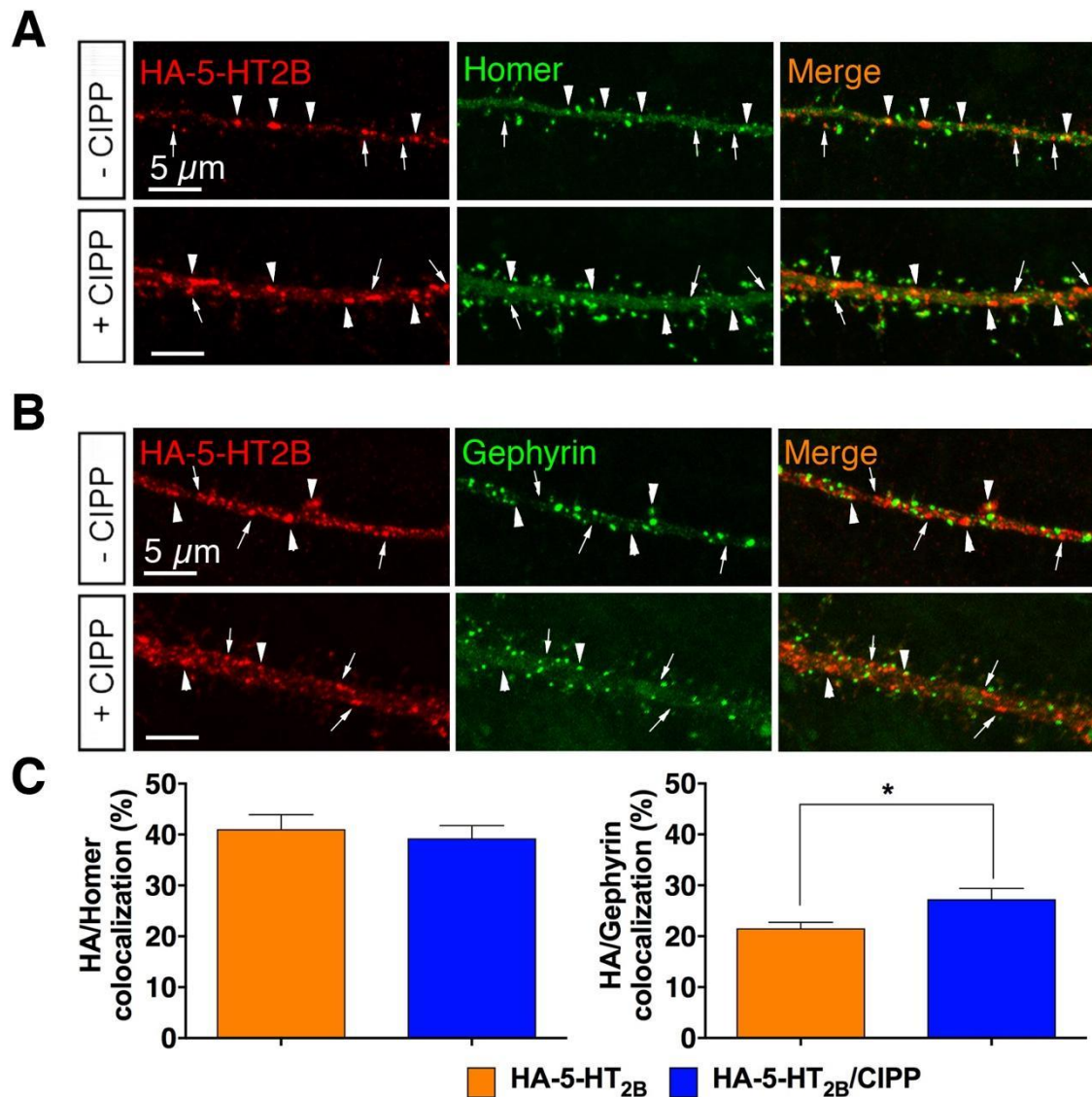


Figure 4 - Contribution of CIPP to 5-HT_{2B} receptor distribution at excitatory and inhibitory synapses. Neurons were transfected with plasmids encoding HA-5-HT_{2B} receptor, Flag-CIPP, and either the glutamatergic or the GABAergic post-synaptic markers GFP-Homer1c or Gephyrin FingR-GFP, and stained for their respective tags. **(A-B) Distribution of 5-HT_{2B} receptor and CIPP at excitatory glutamatergic (A) or inhibitory GABAergic (B) synapses.** Note the higher localization (arrowheads) of 5-HT_{2B} receptor clusters (red) near glutamatergic synapses (green in A) than near inhibitory synapses (green in B) in neurons expressing or not CIPP. Extrasynaptic clusters (small arrows) of 5-HT_{2B} receptors are detected in dendrites of neurons expressing or not Flag-CIPP. Scale bars 5 μ m. **(C) Quantification of the proportion of 5-HT_{2B} receptor clusters at excitatory or inhibitory synapses.** Quantification shows that the 5-HT_{2B} receptor expressed with CIPP (or not) is localized mainly near glutamatergic synapses (left panel). CIPP expression did not change the targeting of the 5-HT_{2B} receptor to excitatory synapses ($p = 0.64$), but slightly increased receptor targeting to inhibitory synapses (right panel) (Unpaired t-test, 5-HT_{2B} receptor + CIPP vs. 5-HT_{2B} receptor alone, $n = 25-23$ dendrites; $p = 0.021$). Data are from 2 cultures. * $p < 0.05$.

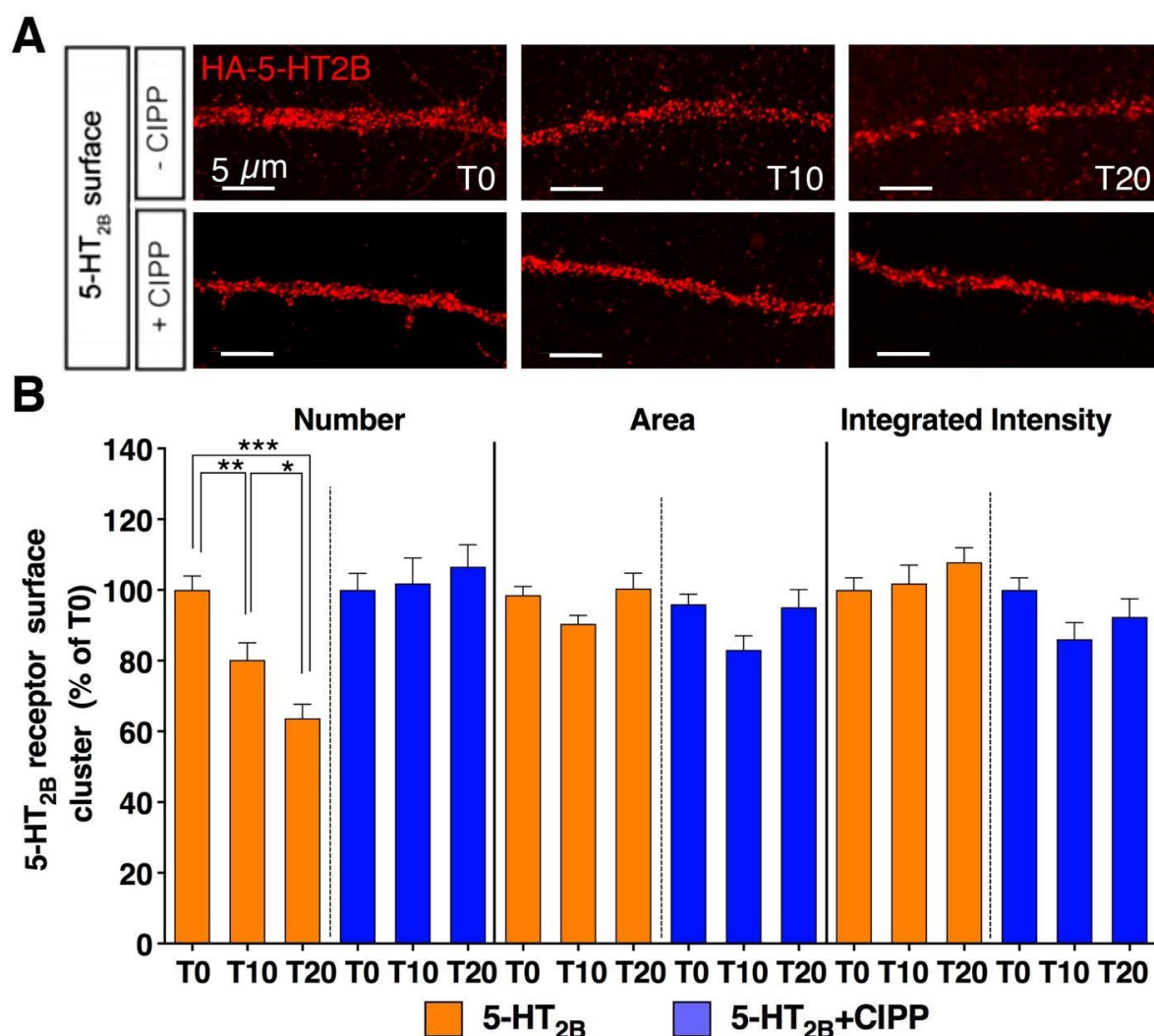


Figure 5 - Effect of CIPP on agonist-induced 5-HT_{2B} receptor redistribution. (A) 5-HT_{2B} receptor clustering at the dendritic surface 0, 10 or 20 min after BW723C86 stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of CIPP. Scale bars 5 μ m. **(B) Quantification of 5-HT_{2B} receptor surface clustering following agonist stimulation in the presence (or not) of CIPP.** Upon 5-HT_{2B} receptor stimulation by BW723C86 (1 μ M), the number of 5-HT_{2B} receptor clusters at the neuronal surface decreased from 0 to 20 min in the absence but not in the presence of CIPP (T0 vs. T10 $p = 0.0044$, T0 vs. T20 $p < 0.0001$, T10 vs. T20 $p = 0.0192$, number of dendrites = 44-50). The treatment did not change the size (area) and the molecular density (integrated intensity) of 5-HT_{2B} receptor clusters. Data, expressed as percentage of their respective values at T0, were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data are from 5 cultures. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

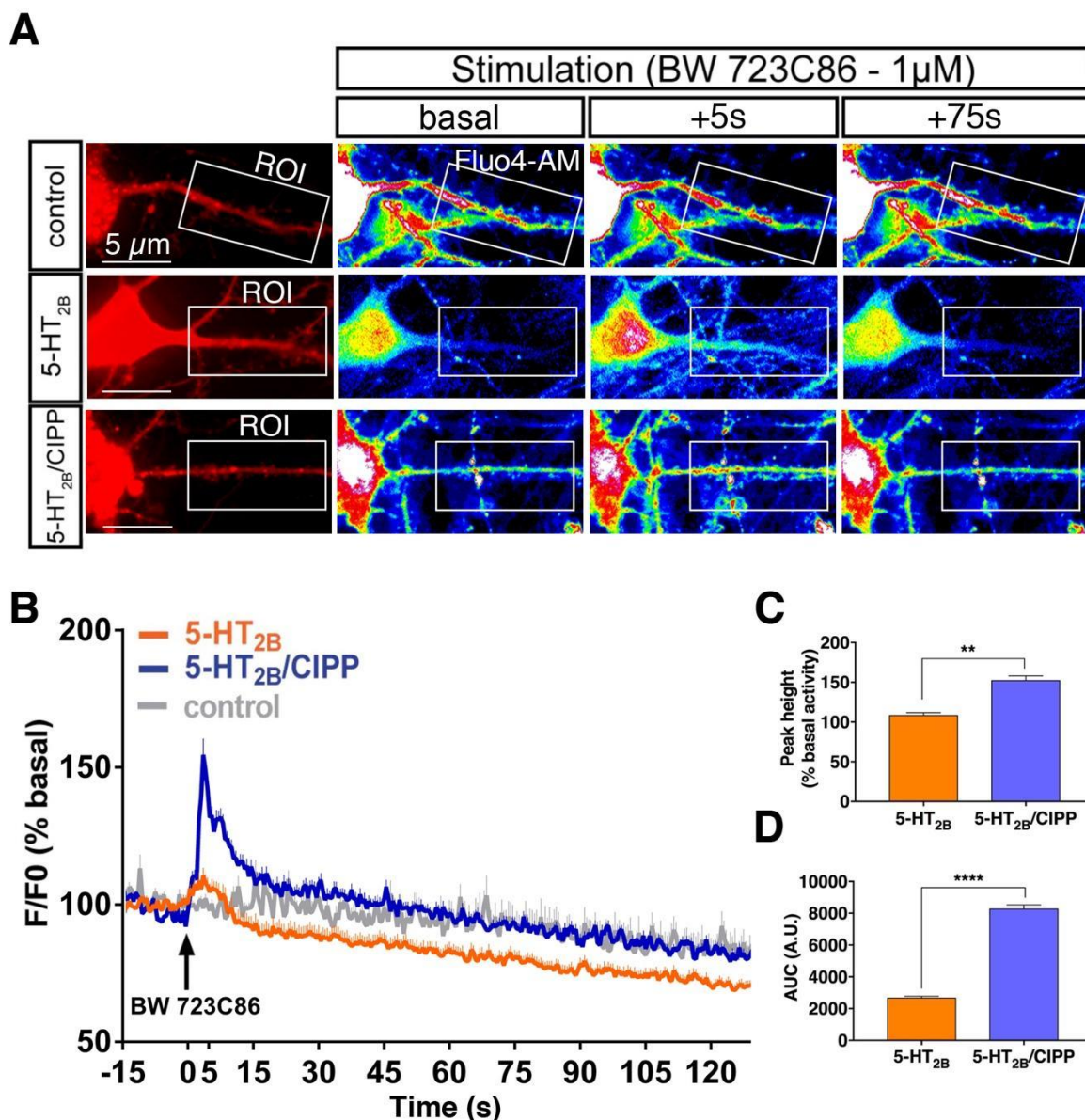


Figure 6 - Effect of CIPP on 5-HT_{2B} receptor-operated calcium signaling in hippocampal neurons. (A) The top panels show examples of selected images of mCherry (left) and Fluo4-AM recordings (right) with ROIs (white boxes) at T0 (basal), T5, and T75 s of BW723C86 stimulation of neurons expressing mCherry (control), or HA-5-HT_{2B} receptor alone, or co-expressing HA-5-HT_{2B} receptor and Flag-CIPP. Scale bars 5 μ m. (B) Summed calcium transients were recorded in hippocampal cells transfected with constructs encoding mCherry (control, grey line), mCherry and 5-HT_{2B} receptor (orange line), or 5-HT_{2B} receptor and CIPP (blue line). The curves were obtained from 3–4 independent experiments, averaging at least 49 individual ROI measurements. The arrow indicates the beginning (T0) of BW723C86 stimulation (1 μ M). (C) The histogram shows the increased height of the peak (F/F₀) in percent of basal activity for the 5-HT_{2B} receptor co-expressed with CIPP ($p = 0.0056$, $n=133$ and $n=230$ ROI). (D) The histogram shows the increased area under the curve (AUC) in arbitrary units (A.U.) for the 5-HT_{2B} receptor co-expressed with CIPP. ($p<0.0001$, $n=49$ and $n=143$ ROI). Data were analyzed by Mann-Whitney unpaired t-test). Data are from 10-50 neurons from 3-4 neuronal cultures. **** $p<0.0001$, ** $p<0.01$

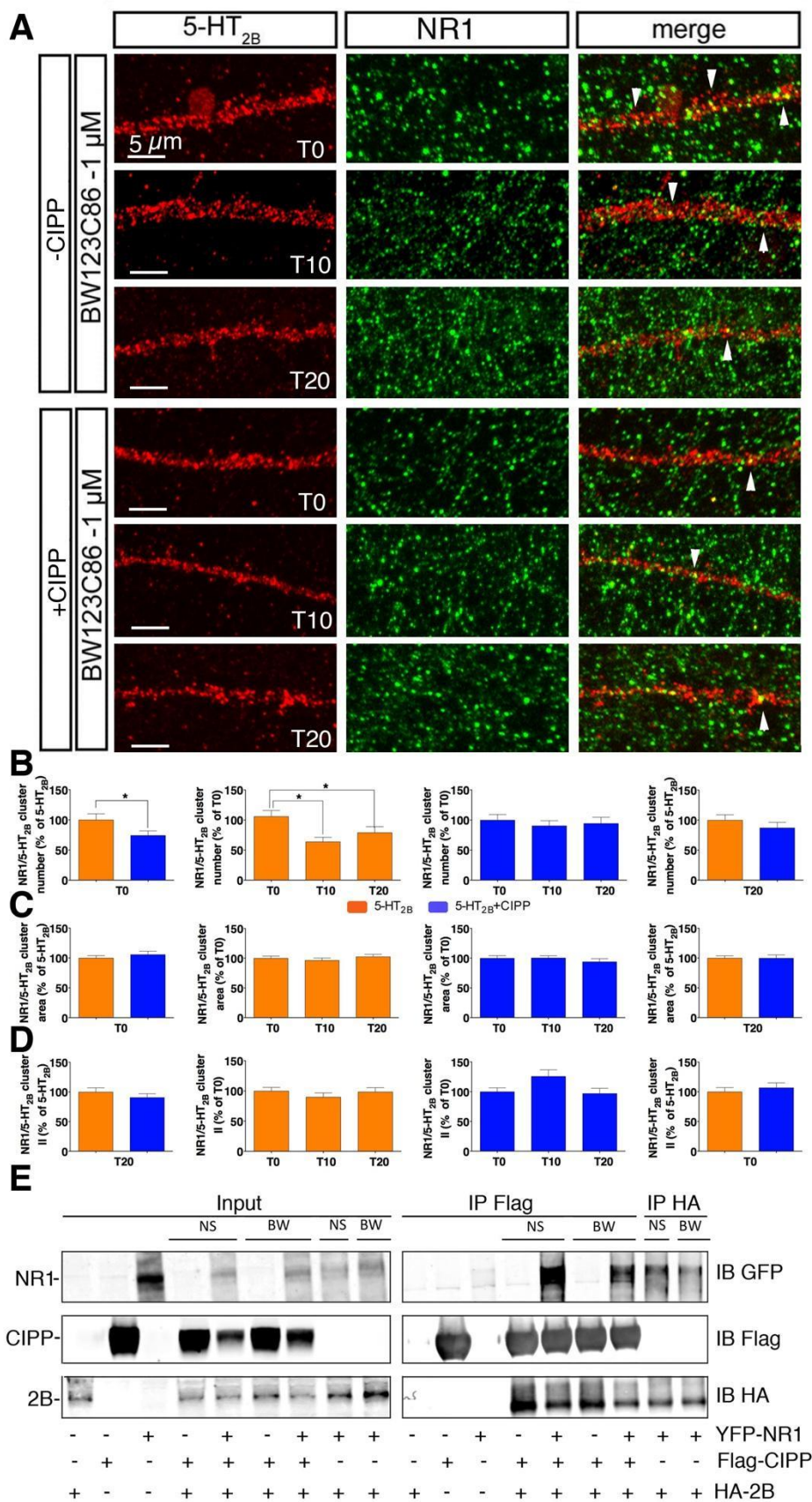


Figure 7 - 5-HT_{2B} receptor stimulation induces a cellular redistribution of the complex formed by CIPP, the NMDA receptor and the 5-HT_{2B} receptor. (A) Effect of CIPP on NMDA receptor clustering upon 5-HT_{2B} receptor stimulation. Examples of clusters of

HA-tagged 5-HT_{2B} receptor (red) and endogenous NR1 subunit of the NMDA receptor (green) in the absence (top) or presence (bottom) of Flag-tagged CIPP at different time points after BW723C86 (1 μ M) application. Note the decrease in the density of NR1 clusters (arrowheads) in the absence but not in the presence of CIPP after 10 min of treatment that persists up to 20 min. Scale bars 5 μ m. **(B) Quantification of the number of NR1 clusters colocalized with 5-HT_{2B} receptor clusters** in neurons overexpressing HA-tagged 5-HT_{2B} receptors alone (orange bars) or 5-HT_{2B} receptors and CIPP (blue bars). In basal activity condition (T0), the expression of CIPP decreased the number of NR1 clusters colocalized with those of 5-HT_{2B} receptors (CIPP+5-HT_{2B} receptor vs. 5-HT_{2B} receptor alone, $p = 0.046$, number of cells = 28-27). Stimulation of 5-HT_{2B} receptors for 10 or 20 min significantly reduced the number of NR1 clusters co-localized with 5-HT_{2B} receptor clusters in the absence of CIPP (T0 vs. T10 $p = 0.0035$, T0 vs. T20 $p = 0.0413$, number of cells = 26-28) but not in its presence. Note that after a 20-min exposure to BW723C86, the number of NR1 clusters co-localized with the 5-HT_{2B} receptor is the same in neurons expressing the receptor alone or in combination with CIPP. **(C-D) Quantification showing no effect of CIPP expression or BW723C86 on the size (C) and intensity (D) of NR1 clusters colocalized with 5-HT_{2B} receptor clusters** in neurons overexpressing the receptor alone (orange bars) or together with CIPP (blue bars). B-D: Data (expressed as percent of T0 or of 5-HT_{2B} receptor expressed alone) were statistically analyzed by one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test; n of dendrites = 22-28 from 3 independent cultures; * $p < 0.05$. **(E) Co-immunoprecipitation of CIPP, NR1 and 5-HT_{2B} receptor.** Proteins from COS-7 cells co-transfected with plasmids coding for HA-5-HT_{2B} receptor (HA-2B), YFP-NR1, and/or Flag-CIPP were analyzed by Western blotting. (left) Blots of input of proteins revealed by anti-Flag (IB Flag-CIPP), anti-GFP (IB YFP-NR1) or anti-HA (IB HA-2B) antibodies show the presence of the proteins in the control non-stimulated (NS) condition and upon BW723C86 (BW) stimulation. (right) Proteins immunoprecipitated by anti-Flag (IP Flag) or anti-HA (IP HA-2B) beads and revealed with either anti-Flag (IB Flag-CIPP), anti-GFP (IB YFP-NR1), or anti-HA (IB HA-2B) antibody showed the existence of a tripartite complex. Note the reduced amount of NR1 co-immunoprecipitated with the 5-HT_{2B} receptor upon BW723C86 stimulation. Representative blot from 3 independent experiments.

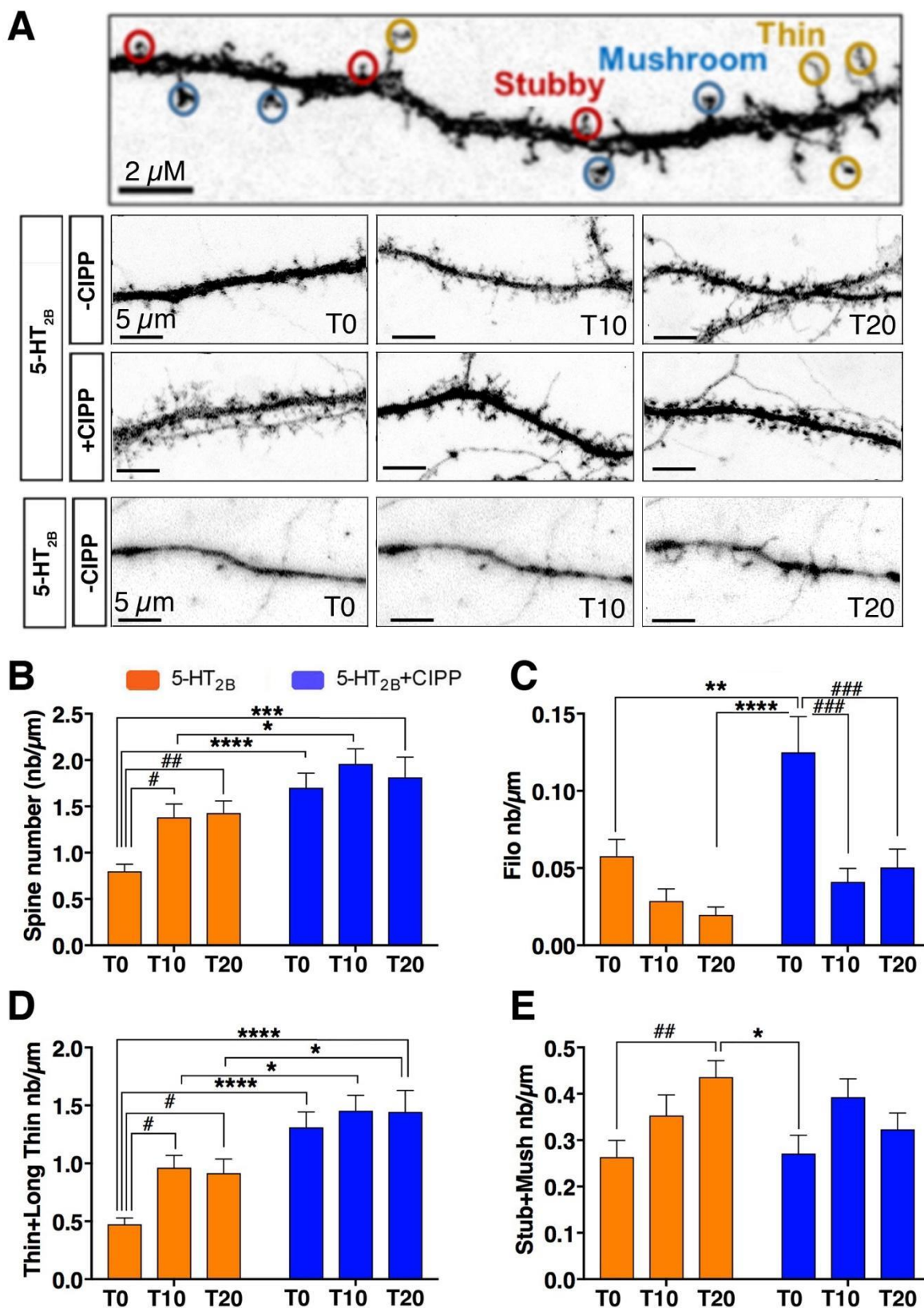


Figure 8 - CIPP expression and 5-HT_{2B} receptor stimulation induce the formation of new dendritic spines. (A) Top: Morphological classification of dendritic spines. Middle: Representative images of dendritic spines of neurons co-transfected with plasmids encoding eGFP and 5-HT_{2B} receptor, and either a plasmid encoding CIPP (+CIPP) or an empty vector (-CIPP) and exposed or not (T0) to BW723C86 (1 μ M) for 10 (T10) or 20 (T20) minutes.

Bottom: Selected images from real-time imaging of neurons co-transfected with plasmids encoding eGFP and 5-HT_{2B} receptor, before and after 10 and 20 minutes of stimulation by BW723C86 (1 μ M), for full recording, see (**Supp Movie**). Scale bars 5 μ m. (**B-E**) **Quantification of CIPP expression and/or 5-HT_{2B} receptor stimulation on dendritic spines.** In basal (T0) activity conditions, CIPP increases the total number of dendritic spines under basal activity conditions (T0) ($p < 0.0001$, $n = 17-18$) (**B**), and the number of filopodia ($p = 0.0011$) (**C**) and immature (Thin and Long Thin) ($p < 0.0001$) spines (**D**) but not that of mature, Stubby and Mushroom (Stub+Mush) ($p = 0.998$) spines (**E**). BW723C86 stimulation of 5-HT_{2B} receptors increases the overall number of spines in the absence of CIPP after 10 and 20 min of treatment (T0 vs. T10 $p = 0.010$, T0 vs. T20 $p = 0.004$, $n = 18-18-20$) (**B**), and both immature Thin + Long Thin (T0 vs. T10 $p = 0.0124$, T0 vs. T20 $p = 0.0186$, $n = 18-18-22$) spines (**D**) and mature Stub+Mush (T0 vs. T20 $p = 0.0029$, $n = 18-22$) spines (**E**) in neurons expressing the receptor alone. BW723C86 stimulation of 5-HT_{2B} receptors has no effect on the overall number of spines in neurons expressing CIPP (T0 vs. T10 $p = 0.500$, T0 vs. T20 $p = 0.863$, $n = 17-11-13$) (**B**), decreases the density of filopodia (T0 vs. T10 $p = 0.0003$, T0 vs. T20 $p = 0.0007$, $n = 18-11-13$) (**C**) in neurons expressing 5-HT_{2B} receptor + CIPP, while it has no main impact on immature Thin + Long Thin (T0 vs. T10 $p = 0.738$, T0 vs. T20 $p = 0.750$, $n = 18-11-13$) spines (**D**) and mature Stub+Mush (T0 vs. T10 $p = 0.148$, T0 vs. T20 $p = 0.691$, $n = 16-13-13$) spines (**E**). Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data are from 2 neuronal cultures. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ vs. t0; **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 5-HT_{2B} vs. 5-HT_{2B}+CIPP.

Article 2 :

Diaphonie entre les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2B : effets réciproques sur le trafic membranaire

A. Contexte et objectifs de l'étude

De nombreuses maladies psychiatriques comprenant la dépression, la schizophrénie ou encore l'anxiété sont associées à un défaut de la signalisation sérotoninergique. Les neurones 5-HT et leurs projections sur de longues distances à travers l'ensemble du cerveau contrôlent diverses fonctions physiologiques telles que le sommeil, la régulation des émotions, la locomotion, etc. Il a été précédemment démontré qu'une perte de fonction du R-5-HT_{2B} est associée à un comportement impulsif, exacerbé sous l'emprise d'alcool ou de drogues, un risque plus élevé de développer un phénotype dépressif et un comportement suicidaire (Bevilacqua et al., 2010). Nous avons montré que dans les neurones, l'expression du R-5-HT_{2B} est restreinte au compartiment somatodendritique.

En tant qu'autorécepteur exprimé par les neurones 5-HT, il module positivement l'activité de ces neurones. En effet, sur tranche de cerveau au niveau du raphé dorsal, sa stimulation ou sa surexpression spécifiquement dans les neurones 5-HT augmente la fréquence de décharges des neurones 5-HT. *In vivo*, la stimulation du R-5-HT_{2B} par son agoniste, le BW723C86, contrecarre les effets du R-5-HT_{1A}, l'autorécepteur somatodendritique négatif des neurones 5-HT (Belmer et al., 2018). L'ablation de ce récepteur spécifiquement dans les neurones 5-HT d'un modèle murin induit plusieurs effets :

- une absence de réponses comportementales et neurogéniques suite à un traitement chronique d'ISRS,
- une absence d'effet sur l'activité locomotrice en réponse à une injection de MDMA et une absence de sensibilisation (effet à long terme),
- une diminution de la proportion de neurones déchargeant à haute fréquence et une proportion plus élevée de neurones 5-HT déchargeant à basse fréquence.

Ces résultats démontrent l'importance du R-5-HT_{2B} dans la régulation des neurones 5-HT et la réponse aux drogues ciblant le système 5-HT. Ce travail met également en lumière la dualité des R-5-HT_{1A/2B} et leur effet sur les neurones 5-HT. Or, bien que le R-5-HT_{1A} soit le récepteur 5-HT le plus étudié dans la littérature, il reste encore des inconnus quant à son mode de fonctionnement, ses interactions et la régulation de l'activité des neurones 5-HT (Andrade et al., 2015).

Ceci nous a mené à poser l'hypothèse de l'existence d'une interaction entre les récepteurs 5-HT1A et 5-HT2B, qui pourraient se contrôler réciproquement, adaptant ainsi la réponse des neurones 5-HT à différents stimuli.

B. Résultats principaux

Nous avons montré que le R-5-HT2B et le R-5-HT1A sont deux autorécepteurs sérotoninergiques situés dans le même compartiment cellulaire (somatodendritique) dans les neurones 5-HT. Nous avons donc décidé d'étudier l'interaction des R-5-HT2B et le R-5-HT1A dans un premier temps au sein de cellules COS-7 par co-immunoprécipitation. Ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'une interaction possible entre le R-5-HT1A et le R-5-HT2B. Cependant, elles ne prouvent pas une interaction directe. Des expériences de BRET ont alors été réalisées car celles-ci s'effectuent sur cellules intactes, vivantes. Les résultats montrent que les R-5-HT2B et les R-5-HT1A sont très proches dans des cellules COS et que le R-5-HT2B peut donc former des hétérodimères avec le R-5-HT1A dans ces cellules.

Ces dimères peuvent avoir un impact sur leurs voies de signalisation respectives, comme cela a été observé dans d'autres cas (Łukasiewicz et al., 2016; Renner et al., 2012). Par mesures de seconds messagers, nous avons montré que l'association des R-5-HT1A/2B n'affectent pas la signalisation associée au R-5-HT2B. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres signalisations associées à ces récepteurs soient affectées. Il est, par ailleurs, intéressant de déterminer si cette dimérisation modifie la capacité de liaison d'un ou des deux récepteurs pour leurs ligands. Pour tester cela, nous avons réalisé des expériences de saturation de la liaison. En appliquant des concentrations croissantes d'un agoniste du R-5-HT2B ou du R-5-HT1A dans un milieu contenant une concentration fixe d'un antagoniste tritié du récepteur cible. Ceci induit une compétition entre les deux molécules pour lier le récepteur, nous avons observé que les constantes d'inhibition (K_i) dans la condition du récepteur 5-HT2B exprimé seul et/ou avec les R-5-HT1A ne sont pas significativement différentes. La dimérisation des deux récepteurs ne semble donc pas affecter ni leur capacité de liaison ni l'expression totale des récepteurs.

Cependant, dans des expériences de liaison (« binding ») de surface, on observe que la co-expression du R-5-HT1A ne modifie pas l'affinité du R-5-HT2B pour son ligand mais

diminue fortement son expression à la membrane, ce qui a ensuite été confirmé par biotinylation de surface.

Ainsi ces résultats nous montrent que la co-expression de ces deux récepteurs a un effet sur leur expression totale ou membranaire. Cependant, les cellules COS-7 représentent un modèle simple et assez éloigné des conditions physiologiques de ces deux récepteurs. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier leur distribution dans des neurones issus de cultures primaires de neurones hippocampiques et d'analyser, sous stimulation ou non du R-5-HT2B ou du R-5-HT1A, comment se comportent ces deux récepteurs en termes d'aire de clusters, de nombre de clusters et d'intensité moyenne. Il en résulte que :

- La co-expression du R-5-HT1A favorise la concentration (clustering) de R-5-HT2B à la surface des neurones hippocampiques et prévient l'effet du BW723C86 sur les R-5-HT2B (**Figure 23; A,C**),
- La co-expression du R-5-HT2B maintient l'expression du R-5-HT1A à la surface des neurones hippocampiques et prévient l'internalisation du R-5-HT1A sous stimulation par un agoniste (**Figure 23; B,D**),
- Dans la condition de co-expression des 2 récepteurs, la stimulation du R-5-HT1A augmente les effets de celui-ci sur le clustering du R-5-HT2B tandis que la stimulation du R-5-HT2B abolit ses effets sur l'expression à la surface du R-5-HT1A (**Figure 23 ; E,F**),
- L'application de 5-HT a le même effet que la stimulation du R-5-HT2B sur l'expression de surface du R-5-HT1A.

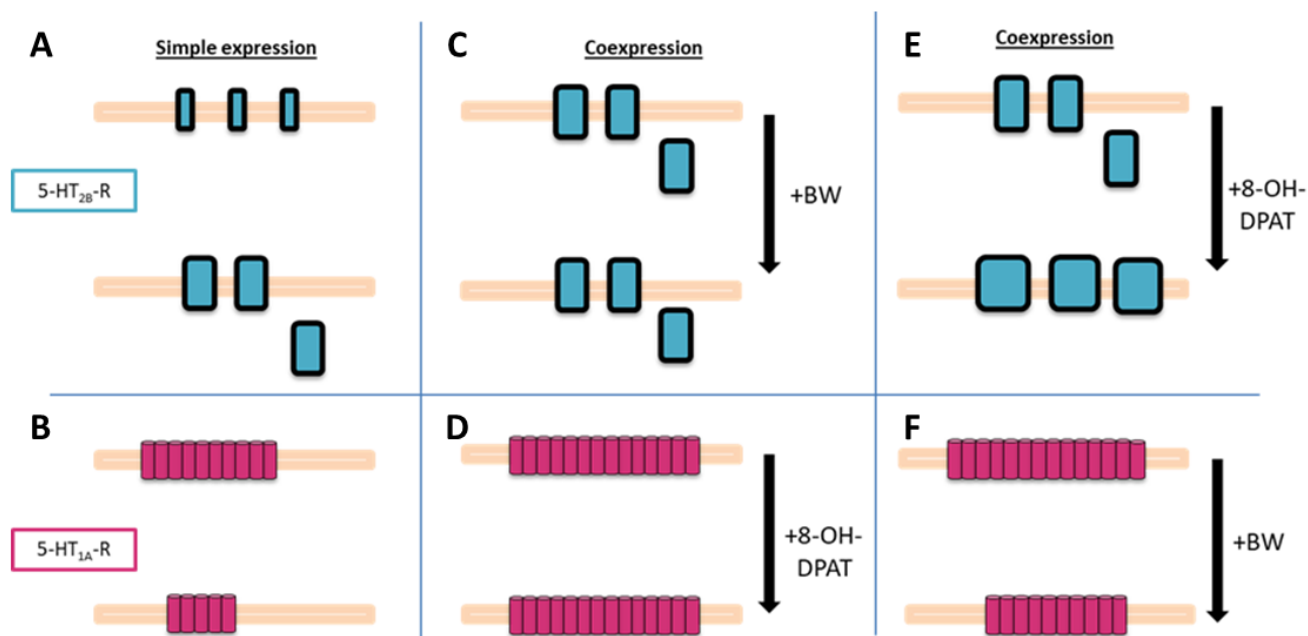


Figure 23 : Schéma récapitulatif de la co-expression et stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2B} dans une culture primaire de neurones hippocampiques.

C. Conclusions

Ces données montrent pour la première fois que les R-5-HT_{1A} et R-5-HT_{2B} interagissent et forment des dimères *in vitro* dans les cellules COS. Même si cette interaction n'a pas d'impact sur leur signalisation respective de second messager, elle affecte leur expression à la surface membranaire et donc vraisemblablement leur trafic intracellulaire. Ce que nous avons ensuite validé dans des neurones hippocampiques issus de cultures primaires, un modèle plus physiologique.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'il existe un cross-talk dans la distribution des R-5-HT_{1A} et R-5-HT_{2B} à la surface membranaire en réponse à différents ligands. Dans un second temps, nous avons observé que la sérotonine, le ligand naturel de ces deux récepteurs, n'a aucun effet sur les clusters de R-5-HT_{2B} exprimé seul ou avec le R-5-HT_{1A}. En revanche, la stimulation par la 5-HT sur le dimère augmente l'effet 5-HT_{2B}-R sur l'expression de surface 5-HT_{1A}-R, mimant l'action du BW723C86.

D. Contribution personnelle

Dans cette étude, j'ai réalisé l'ensemble des expériences et analyses excepté la préparation de cultures primaires de neurones hippocampiques.

Intracellular 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptor cross-talks: reciprocal trafficking regulation

Amina Benhadda, Imane Moutkine, Marion Rousseau, Xavier Marques, Corentin Le Magueresse, Anne Roumier, Sabine Lévi, Luc Maroteaux

Institut du Fer à Moulin, U1270 INSERM, Sorbonne Université, 17 rue du Fer à Moulin
75005, Paris, France

Abstract

Many psychiatric diseases including depression, schizophrenia or anxiety have been associated with a serotonin (5-HT) signaling dysfunction. Among 5-HT receptors, the 5-HT_{1A} receptor has been extensively studied in the literature as it is expressed in the central nervous system as an autoreceptor expressed by 5-HT neurons). We previously showed that the 5-HT_{2B} receptor is expressed by some 5-HT neurons and is required for selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) behavioral and plastic effects: mice lacking the 5-HT_{2B} receptors specifically in 5-HT neurons do not respond to SSR. Moreover, activation of the 5-HT_{2B} receptors counteracts the effects of 5-HT_{1A} receptor activation. The aim of this study was to understand how the 5-HT_{2B} receptor interacts with the 5-HT_{1A} receptor and the impact on their respective signaling pathways. By co-immunoprecipitation and BRET experiments, we show that 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptors can interact and form heterodimers. with no effect on total receptor expression nor coupling efficiency of these receptors. In primary hippocampal neurons in culture, we found that the 5-HT_{2B} receptor surface membrane expression is reduced by co-expression of the 5-HT_{1A} receptor, supporting functional interactions between the two receptors. Furthermore, 5-HT_{2B} receptor expression prevents the 5-HT_{1A} receptor internalization by its own stimulation, whereas the presence of 5-HT_{1A} receptor mimics the effect of stimulation on the 5-HT_{2B} receptor surface expression. These data support a differential cross-talk between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptor, according to stimulatory ligands, endogenous 5-HT vs. 5-HT_{1A} or 5-HT_{2B} receptor selective stimulation.

INTRODUCTION

Many psychiatric diseases including depression, schizophrenia or anxiety have been associated with a serotonin (5-HT) signaling dysfunction (Arango et al., 2003; Mann, 1999; Marazziti, 2017). Serotonergic neurons and their long-distance projections exert a control of various physiological functions such as emotions, sleep, locomotion, etc. Except the 5-HT₃ receptors (5-HT₃-Rs), which are ion channels, all 5-HT-Rs are G-protein coupled receptors (GPCR) and differ according to their G-protein coupling. 5-HT-R are able to form homodimers or heterodimers with other 5-HT-Rs or non-5-HT-Rs (Maroteaux et al., 2019). This association is able to affect receptor surface expression, modify the affinity to a ligand, enhance signal transduction or create a new one: the β 1 and β 2-adrenergic receptors heterodimers display new hybrid signaling compared with the respective homodimers (Lavoie et al., 2002; Mercier et al., 2002).

The 5-HT₁-Rs subtypes are coupled to G α i protein and their activation leads to a decrease of intracellular cAMP (Lin et al., 2002). The 5-HT_{1A}-R, extensively studied in the literature, is expressed in the central nervous system as an autoreceptor (expressed by 5-HT neurons) and as a heteroreceptor (in neurons from hippocampus, prefrontal cortex, etc.) (Albert and Vahid-Ansari, 2019; Andrade et al., 2015; Garcia-Garcia et al., 2014; Popova and Naumenko, 2013). As an autoreceptor, its expression is restricted to the somatodendritic compartment of 5-HT neurons where it exerts a negative control of their activity. Their activation induces the opening of potassium channels (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels or GIRKs) that hyperpolarize and inhibit 5-HT neuron firing (Courtney and Ford, 2016; Llamosas et al., 2015; Montalbano et al., 2015).

The 5-HT₂-Rs subtypes (5-HT_{2A}, _{2B} and _{2C}) are coupled to G α q protein. Upon activation, G α q protein activates phospholipase C (PLC) that will increase inositol triphosphate (IP3) intracellular concentration. A loss of function of a 5-HT₂ subtype receptor gene, the 5-HT_{2B}-Rs gene, is associated with impulsivity, a higher risk of developing depression and suicidal behavior (Bevilacqua et al., 2010; Tikkanen et al., 2015). Through different behavioral experiments (novelty-suppressed feeding, forced swimming test), Diaz et al. {2012} showed that 5-HT_{2B}-Rs are required for selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI)-induced extracellular 5-HT accumulation, pro-neurogenic and plastic effects. Acute and chronic activation of 5-HT_{2B}-Rs by a preferential agonist, BW723C86, is able to mimic SSRI-like effects in mice {Diaz, 2012}(Diaz et al., 2016). In mice lacking the 5-HT_{2B}-R specifically in 5-HT neurons (*Htr2b*^{5-HTKO} mice), behavioral and molecular response to SSRI are abolished. Moreover, in WT mice, activation of the 5-HT_{2B}-R by BW723C86 is able to

counteract the effects of 5-HT_{1A}-R activation, such as a decrease in 5-HT neurons firing rate and body temperature (Belmer et al., 2018). As the 5-HT_{1A} autoreceptor, its expression is restricted to the somatodendritic compartments of 5-HT neurons (Benhadda et al., 2021), where it can regulate their activity positively (Belmer et al., 2018).

The aim of this study was to understand if and how the 5-HT_{2B}-R interacts with the 5-HT_{1A}-R and to regulate its signaling pathways. By studying their expression in different cell types (COS-7 cells and primary hippocampal neurons in culture) using various pharmacological, electrophysiological and imaging techniques, we showed that the 5-HT_{2B}-R can form dimers with the 5-HT_{1A}-R. This interaction has no apparent effect on the signalization of the 5-HT_{2B}-R and their respective ligand binding properties but modifies their cell surface expression (clustering, redistribution) upon specific ligands responses.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

COS-7 cells were cultured as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma), in 9-cm dishes (Falcon). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells 70% confluent in 6-well plates were used for inositol phosphate accumulation and surface biotinylation, in 24-well plates for surface binding, in 9-cm dishes for total binding and co-immunoprecipitation/Western-blot and in 96-well plates for BRET experiments. They were then transfected using the Genejuice transfection reagent (Merck Millipore) in complete DMEM, according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours before the experimental test, cells were incubated in a serum-free medium.

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation and Western-blotting were performed as previously described {REF}. COS-7 cells transfected with a total of 10 µg of DNA per 9-cm dishes with a ratio of 7:3 (HA-5-HT_{2B} / empty vector; empty vector / myc-5-HT_{1A}; HA-5-HT_{2B} / myc-5-HT_{1A}) and maintained in culture for three days before harvesting. Cells were centrifuged and suspended in CHAPS lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05 mM EDTA, 10 mM CHAPS, and protease inhibitor cocktail, pH 7.4) and sonicated for 30 s three times. Cells were next solubilized for 5 h at 4°C under gentle agitation. Lysates were centrifuged (20,000 x g) in order to pellet non-solubilized membranes. Protein concentrations in supernatant were

measured using the Pierce™ Coomassie Protein Assay Kit. Lysates were co-immunoprecipitated with anti-HA or anti-myc antibodies overnight at 4 °C under gentle agitation. Total lysate and immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE onto 10% acrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Inputs represent 5% of the total protein amount used for immunoprecipitations. Blots were probed with anti-HA (1:1,000) or anti-myc (1:1,000). Anti-mouse and anti-rabbit antibodies (1:10,000) were used as secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using the Odyssey software. At least three independent experiments were performed.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)

BRET assays were performed according to published methods {Moutkine et al., 2017}. Briefly, in 6-well plates, COS-7 cells were transfected with 30-100 ng of plasmid DNA coding for the BRET donor (5-HT_{2B}-R-Rluc) and an increasing amount of BRET acceptor plasmids (5-HT_{1A}-R-YFP; from 100 to 4000 ng/well). Twenty-four hours later, the cells were trypsinized (trypsin 0.05% EDTA; Invitrogen) and plated in 96-well plates (50,000 cells/well). The day after, the luciferase substrate, coelenterazine-h, was added in each well at a 5 μM final concentration. Using a Mithras LB940 plate reader, luminescence and fluorescence were then measured simultaneously at 485 and 530 nm, respectively. The BRET ratios were calculated as ((emission at 530 nm/emission at 485 nm) -(background at 530 nm/background at 485 nm)) and were plotted as a function of ((YFP-YFP0)/YFP0)/(Rluc/Rluc0). The background corresponds to signals in cells expressing the Rluc fusion protein alone under the same experimental conditions. YFP is the fluorescence signal at 530 nm after excitation at 485 nm, and Rluc is the signal at 485 nm after addition of coelenterazine-h. YFP0 and Rluc0 correspond to the values in cells expressing the Rluc fusion protein alone.

Membrane radioligand binding assay

Membrane binding assays were performed on transfected cells plated in 9-cm dishes. Cells were first washed with PBS, scraped into 10 ml of PBS on ice, and then centrifuged for 5 min at 1000 g. Cell pellets were dissociated and lysed in 2 ml of binding buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and centrifuged for 30 min at 10,000 g. Membrane preparations were then resuspended in binding buffer to obtain a final concentration of 0.2–0.4 mg of protein/well. Aliquots of membrane suspension (200 μl/well) were incubated with 25 μl/well of ³H-radioligand at a final concentration near the KD value, diluted in binding

buffer and 25 µl/well of increasing concentrations of homologous or heterologous compound (from 10^{-11} to 10^{-5} M, diluted in binding buffer) in 96-well plates for 60 min at room temperature. Membranes were harvested by rapid filtration onto Whatman GF/B glass fiber filters (Brandell) pre-soaked with cold saline solution and washed three times with cold saline solution to reduce nonspecific binding. Filters were placed in 6-ml scintillation vials and allowed to dry overnight. The next day, 4 ml of scintillation mixture were added to the samples, which were counted as before. Data in disintegrations/min were converted to femtomoles and normalized to protein content (ranging from 0.1 to 1 mg/well). At least three independent experiments were performed in duplicate.

Non-permeabilized whole cell radioligand binding assay

Cells expressing 5-HT_{2B}-R and/or 5-HT_{1A}-R were plated in 24-well clusters. Twenty-four hours before the experiment, the cells were incubated in serum-free medium overnight. The next day, the medium was replaced by 400 l/well of Krebs-Ringer/Hepes buffer (130 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.4). Then, 50 µl of [³H]-mesulergine were diluted in Krebs-Ringer/Hepes buffer at a final concentration between half the K_d and the K_d for each 5-HT-R. The radioligand was competed with 50 µl of increasing concentrations of non-radioactive ligand, also diluted in Krebs-Ringer/Hepes buffer. Cells were then incubated for 30 min at room temperature and then washed twice on ice with cold PBS. Washed cells were solubilized by the addition of 500 µl of SDS 1%. The next day, 3 ml of scintillation mixture were added to the samples, and the radioactivity was counted using a scintillation counter (Beckman Coulter). Data in disintegrations/ min were converted to femtomoles and normalized to protein content (0.2–0.4 mg of protein/well). At least three independent experiments were performed in duplicate.

Second messenger measurements

COS-7 cells were transfected with 3 µg of DNA (1:1 ratio for co-transfection) in 6-well plates using Genejuice transfecting reagent in complete medium. Twenty-four hours later the cells were trypsinized (trypsin 0.05% EDTA; Invitrogen) and plated in 96-well plates (30,000 cells/well). The next day, the complete medium was replaced by a serum-free medium.

HTRF IP accumulation

The day of the experiment, media were replaced by stimulation buffer with LiCl to prevent IP1 degradation (NaCl, 146 mM, KCl, 4.2 mM, MgCl₂, 0.5 mM, CaCl₂, 1 mM, Hepes, 10 mM, glucose, 5.5 mM, LiCl, 50 mM, pH7.4). Cells were stimulated during 2 h at 37°C with a different concentration of BW723C86 (10^{-11} to 10^{-6} M in stimulation buffer). Stimulation solution was replaced by a lysis buffer (IP one HTRF Kit, Cisbio, France) during 1 h. Lysates were distributed to 384-well plates, and IP was labeled using HTRF reagents. The assay is based on a competitive format involving a specific antibody labeled with terbium cryptate (donor) and IP coupled to d2 (acceptor). After a 1-h incubation with HTRF reagent, the plate was read using Mithras LB940 plate reader according to the manufacturer's instructions. At least five independent experiments were performed in duplicate.

Surface biotinylation

Surface biotinylation was performed on transfected COS-7 cells. Briefly, cells were initially washed twice in cold PBS and subsequently incubated in PBS containing 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin for 30 min at 4°C to allow for labelling of all surface membrane proteins. Reaction was stopped by applying a quench solution (100 mM Tris pH 8 in PBS 1X) to remove excess biotin. Biotinylated cells were then homogenized in RIPA buffer containing 25 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% TritonTM X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM NaF and a cocktail of protease inhibitors (Roche). The lysate was centrifuged at 21,000 g to remove nuclei and cellular debris. A small amount of the lysate was removed and constituted the “input” or total lysate. Then, 100 µl of StreptaAvidin beads (Thermo Scientific Inc) were added to 40 µg of protein lysate and placed on a rotator at 4°C overnight. Samples were then washed three times in RIPA buffer and a fourth times in RIPA buffer without detergents (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% TritonTM X-100; protease inhibitor); beads were pulled-down after each wash by 1 min centrifugation. Bound proteins were eluted in SDS reducing buffer and heated at 70°C for 5 min.

Western blotting

For co-immunoprecipitation and surface biotinylation experiments, total lysate and immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE onto 10% acrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Blots were probed with anti-HA (1:1,000) and anti-myc (1:1,000). Anti-mouse and anti-rabbit antibodies (1:10,000) were used as secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using the Odyssey software. At least three independent experiments were performed.

Hippocampal neuronal culture and transfection.

Hippocampal neurons were prepared from embryonic day 19 Sprague-Dawley rat pups as previously described (Benhadda et al., 2021). Dissected tissues were trypsinized (0.25% v/v) and mechanically dissociated in HBSS (CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ 0.5 mM, MgSO₄ 0.4 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, D-Glucose 5.5 mM) containing 10 mM Hepes (Invitrogen). Dissociated cells were plated on glass coverslips (Assistent) precoated with 55 µg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich) in plating medium composed of MEM supplemented with horse serum (10% v/v; Invitrogen), L-glutamine (2 mM), and Na pyruvate (1 mM, Invitrogen) at a density of 3.4×10^4 cells/cm² and maintained in humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. After attachment for 2-3 h, cells were incubated in maintenance medium that consists of Neurobasal medium supplemented with B27, L-glutamine (2 mM), and antibiotics (Invitrogen). Each week, one-third of the culture medium volume was renewed. Neuronal transfections with plasmids encoding HA-5-HT_{2B}-R, Myc-5-HT_{1A}-R and eGFP were performed at 13–14 DIV using Transfectin (Bio-Rad), according to the instructions of the manufacturer (DNA/lipofectant ratio of 1:3), with 1.5 µg of plasmid DNA per 20-mm well. The following ratio of plasmid DNA was used in co-transfection experiments: 1:0.3:0.2 µg (for HA-5-HT_{2B}-R / Myc-5-HT_{1A}-R or eGFP). Experiments were performed 7–10 days after transfection.

Immunostaining

The total (membrane plus intracellular) pools of 5-HT_{2B}-Rs were revealed with immunocytochemistry in fixed and permeabilized cells, whereas the membrane pool of HA-5-HT_{2B} and myc-5-HT_{1A} was done in non-permeabilized cells. To label the total pool of 5-HT_{2B}-Rs, cells were fixed for 10 min at room temperature in paraformaldehyde (PFA; 4% w/v; Sigma) and sucrose (30% w/v; Sigma) solution in PBS. Cells were then washed in PBS, and permeabilized for 4 min with Triton X-100 (0.25% v/v) in PBS. After washes, nonspecific staining was blocked for 30 min with bovine serum albumin (BSA; 3% w/v; Sigma) and goat serum (20% v/v; Invitrogen) in PBS. Neurons were then incubated for 1 h with either the rabbit anti-HA antibody (1:500; Cell Signaling HA-Tag C29F4 Rabbit mAb #3724) or the mouse anti-myc antibody (1:500; Sigma) in PBS supplemented with Goat Serum (GS) (3% v/v). Cells were then washed three times and incubated for 45 min with Cy5-conjugated donkey anti-mouse or Alexa 488 donkey anti-mouse antibodies (1.9 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) or the Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (1.9 µg/ml;

Jackson ImmunoResearch) in PBS-BSA-goat serum blocking solution, washed, and mounted on slides with mowiol 4-88 (48 mg/ml). In experiments using BW723C86, the drug was diluted in imaging medium and applied to neurons for 10 or 20 min at 1 μ M final concentration. The imaging medium consisted of phenol redfree MEM supplemented with glucose (33 mM), Hepes (20 mM), glutamine (2 mM), Na⁺-pyruvate (1 mM), and B27 (1X, Invitrogen). Sets of neurons to be compared were labeled and imaged simultaneously.

Fluorescence image acquisition and cluster analyses

Fluorescence image acquisition and analyses were performed as previously described. Images were obtained on a Leica SP5 confocal microscope using the LAS-AF program (Leica). Stacks of 16–35 images were acquired using a 100 X objective with an interval of 0.2 μ m and an optical zoom of 1.5. Image exposure time was determined on bright cells to avoid pixel saturation. All images from a given culture were then acquired with the same exposure time. Quantifications of 5-HT_{2B}-R clusters were performed using MetaMorph software (Roper Scientific) on projections (sum of intensity) of confocal optical sections. For each cell, a region of interest (ROI) was chosen. For 5-HT_{2B}-R cluster analysis, images were first flattened background filtered (kernel size, 3 x 3 x 2) to enhance cluster outlines, and a user-defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. Thresholded clusters were binarized, and binarized regions were outlined and transferred onto raw data to determine the mean 5-HT_{2B}-R cluster number, area and fluorescence intensity. The dendritic surface area of regions of interest was measured to determine the number of clusters per 10 μ m². As the 5-HT_{1A}-R presents a diffused expression pattern, average fluorescent signal intensity was measured on a defined ROI. For each culture, we analyzed 7–12 dendrites per experimental condition. A total of about 10 neurons were analyzed per condition from three to five independent cultures. The experimenter was blind to the culture treatment.

STORM imaging

STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) imaging was performed on an inverted N-STORM Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a 100x oil immersion TIRF objective (1.49 NA) and an Andor iXon Ultra 897 EMCCD camera, using 405 and 638 nm lasers from Coherent. Movies of 30,000 frames were acquired at frame rate of 50Hz. The z position was maintained during acquisition by a Nikon Perfect Focus System and multicolor fluorescent microspheres (Tetraspeck, Invitrogen) were used as markers to register long-term

acquisitions and correct for lateral drifts. Single-molecule localization and 2D image reconstruction was conducted by fitting the PSF of spatially separated fluorophores to a 2D Gaussian distribution. Density was calculated as the total number of detections in the pixels belonging to a given cluster, divided by the area of the cluster.

RESULTS

1. Co-expression of 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-Rs revealed receptor/receptor interactions

5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R have opposite action on 5-HT neuron activity (Belmer et al., 2018) that may result from reciprocal interactions. To assess putative 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R direct interactions, we first performed co-immunoprecipitation experiments on COS-7 cells co-transfected with plasmids coding for HA-tagged 5-HT_{2B}-R and/or myc-tagged 5-HT_{1A}-R. Extracted proteins were then immunoprecipitated using anti-HA beads followed by Western blotting revealing co-immunoprecipitation between 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R (**Fig. 1A**). We then performed a BRET experiment to assess putative close interactions between the 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R. This experiment relies on the natural capacity of Renilla luciferase, used here as BRET donor, to emit energy in presence of its substrate, coelenterazine. Luciferase coding region and yellow fluorescent protein (here, BRET acceptor) were fused to the C-terminal coding region of 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R. Constant amounts of BRET donor plasmids and increasing amounts of BRET acceptor plasmids were transfected in COS-7 cells. A hyperbolic curve confirms the saturation of the BRET donor by the acceptor donor and thus, the close proximity between the 2 receptors studied. Hyperbolic curve was obtained when 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R were expressed together supporting that these 2 receptors can form heterodimers in intact cells (**Fig. 1B**). As control, no BRET was obtained when the 5-HT_{2B}-R was tested for self-association, as shown in a previous study indicating that this receptor is unable to form homodimer (Moutkine et al., 2017). Thus, co-immunoprecipitation and BRET experiments show that 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R can interact and form heterodimers.

2. Total receptor expression and second messenger coupling are not affected by 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R co-expression

We assessed if the co-expression of the 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R has an effect on their respective intracellular signalization and pharmacological properties. Radioligand binding competition of tritiated mesulergine or 8-OH-DPAT was performed on membrane proteins from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-R with or without 5-HT_{1A}-R. No difference was found in total expression of the receptors, which is represented by the Bmax, nor in binding affinity to their respective ligand (K_i) in co-expressing compared to single receptor expressing cells (**Fig. 2A**). Using HTRF-based assays, we measured the intracellular IP1 amount produced by agonist stimulation of 5-HT_{2B}-R, BW723C86. Dose-response curve of

5-HT_{2B}-R-mediated production of IP in response to BW723C86 in cells expressing 5-HT_{2B}-R alone or in combination with the 5-HT_{1A}-R were analyzed using the operational model to determine the Gq coupling efficiency of single receptor and heterodimer. The dose response curves showed no difference in the EC50 between the 2 conditions (**Fig. 2B**). These results suggest modification of neither total receptor expression nor coupling efficiency of the 5-HT_{2B}-R by co-expression.

3. 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R co-expression decreases 5-HT_{2B}-R surface membrane expression

As total expression and coupling properties of the receptors were not modified by their co-expression, we investigated putative changes in their cellular distribution. First, we performed surface binding assays on intact cells in order to evaluate their plasma membrane density. Using similar pharmacological protocol but on non-permeabilized living cells, we observed that co-expression of the two receptors did not modify their affinity but decreased the 5-HT_{2B}-R surface expression as the Bmax, that reflects the number of available receptors, was significantly lower (by ~50%) between 5-HT_{2B}-R alone compared to co-expression condition but no difference was found in 5-HT_{1A}-R plasma membrane expression (**Fig. 3A**). To confirm this result, we performed surface biotinylation assay, which is a direct method to evaluate protein surface expression. To overcome fluctuations of total protein expression in different transfection, results were analyzed by the ratio of the surface/total protein expression for each receptor. The results showed that co-expression of the two receptors decreased 5-HT_{2B}-R by ~48% (p=0.0474, n=5) but not 5-HT_{1A}-R surface expression (p=0.4593, n=5) (**Fig. 3B**). Together, these data suggest that the 5-HT_{2B}-R surface membrane expression is reduced by co-expression of the 5-HT_{1A}-R, supporting functional interactions between the two receptors.

4. Stimulation of 5-HT_{2B}-R increases 5-HT_{2B}-R surface clustering and maintain 5-HT_{1A}-R surface expression

In order to study cellular distribution of both receptors in a more physiological context, we used primary cultures of hippocampal neurons. We previously reported that this neuronal population expresses 5-HT_{2B}-Rs and independently 5-HT_{1A}-Rs were shown to be expressed in hippocampal neuron cultures (Renner et al., 2012). However, if 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R are both endogenously expressed in the hippocampus, the lack of selective antibodies against these receptors makes direct endogenous study not possible. We thus transfected HA-tagged-5-HT_{2B}-R and myc-tagged-5-HT_{1A}-R in primary hippocampal neurons in culture. We

observed that these 2 receptors present different expression patterns; the 5-HT_{2B}-R forms distinct clusters whereas the 5-HT_{1A}-R expression is more diffused in dendrites. First, we confirmed that the co-expression of 5-HT_{1A}-R decreased the surface expression of 5-HT_{2B}-R (**Fig. 4A**) as previously observed in COS cells. Then, we quantified the number, size and density (integrated intensity) of 5-HT_{2B}-R clusters with or without 5-HT_{1A}-R co-expression following selective stimulation with BW723C86. Selective stimulation of the 5-HT_{2B}-R decreased the number of 5-HT_{2B}-R clusters and increased their size but did not changed the density of receptor per cluster (**Fig. 4B-C**). Without stimulation, co-expression of the 5-HT_{1A}-R decreased the number of clusters and increased their area in the same way as 5-HT_{2B}-R stimulation (**Fig. 4D-E**). Regarding the 5-HT_{1A}-R, its selective stimulation by 8-OH-DPAT leads to a reduction of its surface expression as it is shown by the decrease of 5-HT_{1A}-R fluorescence intensity over time, which suggests an internalization process (**Fig. 4D-E**). When the 5-HT_{2B}-R was co-expressed, we observe a basal increase in the 5-HT_{1A}-R surface expression that is maintained upon 8-OH-DPAT stimulation (**Fig. 4D**). This result supports that 5-HT_{2B}-R expression prevents the 5-HT_{1A}-R internalization by its own stimulation in this context.

These results were then confirmed using STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). Clusters are small objects and the diffraction limit of 200 nm of the confocal microscopy does not allow to distinguish correctly cluster aggregation over clusters being just near from each other (**Fig. 5A**). Using this technique, we confirmed our previous observation: co-expression as well as 5-HT_{2B}-R stimulation by BW723C86 decreased significantly the number and increased the area of 5-HT_{2B}-R clusters. Interestingly, we observed that the stimulation of 5-HT_{2B}-R in the coexpression condition accentuates the effects of the 5-HT_{1A}-R (**Fig. 5B-C**). Together, these results confirmed that the presence of 5-HT_{1A}-R can mimic the effect of stimulation on the 5-HT_{2B}-R surface expression.

5. Selective stimulation of 5-HT_{1A}-R or 5-HT_{2B}-R generates cross effects on receptor surface expression

Even if no alteration of 5-HT_{2B}-R specific transduction signaling was observed when co-expressed with the 5-HT_{1A}-R in COS cells culture, the modification of their distribution upon stimulation of one or the other cannot be excluded. When the 5-HT_{1A}-R was selectively stimulated by 8-OH-DPAT in the co-expression condition, we observed a decrease in the 5-HT_{2B}-R clusters number (by ~50%), and an increase in their size (by ~70%) and integrated cluster intensity (by ~70%). This result indicates that stimulating the 5-HT_{1A}-R increases its

effects on the 5-HT_{2B}-R clustering (**Fig. 6A**). Conversely, when we selectively stimulated the 5-HT_{2B}-R with BW723C86 in the co-expression condition, we found a decrease of the 5-HT_{1A}-R surface expression compared to the unstimulated condition (**Fig. 6B**). These data suggest a cooperative association between the 5-HT_{2B}-R and the 5-HT_{1A}-R at the surface membrane, 5-HT_{1A}-R stimulation increasing 5-HT_{2B}-R clustering and 5-HT_{2B}-R stimulation decreasing 5-HT_{1A}-R surface membrane expression.

6. Co-stimulation of both receptor by 5-HT suppresses 5-HT_{2B}-R effect on 5-HT_{1A}-R surface expression

Since 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R respective agonists have differential effects on membrane receptor localization, we investigated the effect of co-stimulation with their natural ligand, 5-HT (1 μ M), on their surface expression and distribution. Surprisingly, stimulation with 5-HT did not modify 5-HT_{2B}-R clustering parameters (clusters number, size and cluster intensity) that was not affected by the coexpression of 5-HT_{1A}-Rs (**Fig. 7A**). On the contrary, stimulation of the 5-HT_{1A}-R alone with 5-HT decreased its surface expression by 30% as observed after 8-OH-DPAT application. However, when co-expressed with the 5-HT_{2B}-R, 5-HT stimulation further decreased 5-HT_{1A}-R surface expression and this effect could be reversed by the selective 5-HT_{2B}-R antagonist, RS-127445. This result suggests that stimulating the receptor complex by 5-HT somehow abolishes 5-HT_{2B}-R ability to maintain the 5-HT_{1A}-R at the plasma membrane (**Fig. 7B**). These data support a differential cross-talk according to stimulatory ligands, endogenous 5-HT vs. 5-HT_{1A}-R stimulation by 8-OH-DPAT or 5-HT_{2B}-R stimulation by BW 723C86.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time that 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R, two receptors co-expressed by 5-HT neurons, can interact and form dimers. Dimerization is an important process for GPCR and can be essential for their trafficking to the plasma membrane, agonist binding and G-protein activation (Faron-Górecka et al., 2019; Herrick-Davis, 2013). Dimerization is also able to modify signaling pathways of the receptors involved. For example, the 5-HT_{1A}-R/5-HT₇-R heterodimerization was shown to decrease Gi activation and inhibits GIRK activation, both mediated by the 5-HT_{1A}-R without affecting the 5-HT₇-R signaling (Renner et al., 2012). It has also been shown by *in situ* proximity ligation assay in rat hippocampus and BRET experiments in HEK293T cells, that 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2A}-R form oligomers (Borroto-Escuela et al., 2017). In pyramidal neurons of the prefrontal cortex co-expressing these two receptors, three types of electrophysiological responses were recorded: inhibitory responses mediated by the 5-HT_{1A}-R, excitatory responses mediated by the 5-HT_{2A}-R-dependent excitation and a biphasic response of excitation/inhibition (Avesar and Gullledge, 2012; Ju et al., 2020). These opposite and mixed effects suggested that the 5-HT transmission finely tune neurons targeted through the combinatorial expression of 5-HTRs. We previously reported that a subpopulation of 5-HT neurons express both 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R {Diaz, 2012}, and that this co-expression is likely to participate to the regulation of the 5-HT tone (Belmer et al., 2018). We showed that injection of 5-HT_{2B}-R agonist, BW723C86, attenuated 8-OH-DPAT-induced hypothermia and decreased the firing inhibition of 5-HT neurons, which is attributed to 5-HT_{1A} autoreceptors. These data thus supported that 5-HT_{2B}-R positively regulates 5-HT neurons and is able to counteract 5-HT_{1A}-R negative effects (Belmer et al., 2018). Moreover, we showed previously that both receptors are expressed in the neuronal compartment (somatodendritic) (Benhadda et al., 2021), which leads us to hypothesize a physical and functional interaction between these 5-HT-Rs.

Even if the interaction between the 5-HT_{2B}-R and the 5-HT_{1A}-R has no impact on the second messenger signalization (IP3) of 5-HT_{2B}-R, this study shows an effect of this interaction on both receptor expression at the plasma membrane. These results were further validated in hippocampal primary neurons in culture, in a more physiological environment than COS-7 cells. Nevertheless, potential effects of endogenously expressed 5-HT_{1A}-R/5-HT_{2B}-R by hippocampal neurons cannot be excluded. Indeed, in a previous study, it has been shown that interaction between endogenous CIPP already have an effect on over-expressed 5-HT_{2B}-R clusters formation on pyramidal hippocampal neurons, which was disrupted by the use of a dominant negative TAT-5-HT_{2B}-R peptide targeting the interaction sequence

between the 5-HT_{2B}-R and CIPP (Benhadda et al., 2021). The specific interacting sequence between the 5-HT_{2B}-R and the 5-HT_{1A}-R remains to be identified

Different techniques of microscopy were used to better understand the effect of 5-HT_{1A}-R on 5-HT_{2B}-R clusters surface parameters. Confocal microscopy techniques allowed us to analyze and compare in various conditions the density of receptors per cluster and their number. Biophysically, aggregation and clustering of membrane proteins are more efficacious than freely moving molecules (Liu and Fuentes, 2019). With a resolution up to 20 nm, STORM allowed us to access more quantitative information about receptor spatial distributions (MacDonald et al., 2015; Yamanaka et al., 2014). In this paper, we were able to show that either stimulation by specific agonist or co-expression with the 5-HT_{1A}-R allows the formation of bigger and more concentrated clusters of 5-HT_{2B}-R that could be associated with an increase in its transduction. While homologous agonist stimulation decreases 5-HT_{1A}-R surface expression, co-expression with the 5-HT_{2B}-R increases its expression at basal level and maintains 5-HT_{1A}-R at the surface membrane despite its stimulation. In the literature, differences were observed between 5-HT_{1A} auto- and hetero-receptor internalization capacities. It has been shown that autoreceptors desensitize and are internalized upon stimulation, which is not the case for heteroreceptor; although this result was observed for a longer period of treatment (4 and 24 h), while here we used a 20 minutes application (Bouaziz et al., 2014). Therefore, the dynamic regulation of the 5-HT_{1A}-R surface expression not only depends on the ligand used but also on the cell model.

Serotonin can stimulate a wide range of serotonergic receptors that allow the 5-HT system to be finely modulated both at pre- and post-synaptic levels. Here, we were able to show that 5-HT, the natural ligand of 5-HT_{1A}- and 5-HT_{2B}-R, has no effect on the 5-HT_{2B}-R alone or co-expressed with the 5-HT_{1A}-R. *In vivo*, we showed that activation of the 5-HT_{2B}-R by BW723C86 does not promote any changes in 5-HT neurons electrical activity (Belmer et al., 2018). But we show here that the 5-HT stimulation of the dimer abolishes the 5-HT_{2B}-R effect on the 5-HT_{1A}-R surface expression, effect which is restored by applying the 5-HT_{2B}-R antagonist RS-127445. These results demonstrate that the modulation of 5-HT_{1A}-R surface expression can be triggered through 5-HT_{2B}-R activation, confirming the cross-talk between these two receptors and may explain the *in vivo* cross-talk observed between these two receptors.

Additionally, it has to be noticed that one important function of 5-HT_{1A}-Rs is the activation of GIRK channels and the inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ channels, both of which lead to the hyperpolarization of serotonergic neurons (Llamosas et al., 2015; Lüscher

et al., 1997; Montalbano et al., 2015). The 5-HT_{1A}-R/5-HT_{2B}-R interaction could therefore modify G $\beta\gamma$ -dependent outcomes. Indeed, it has been shown that the functionality of GIRK channels depends on the promiscuous presence of PIP2 (Niu et al., 2020). However, the activation of 5-HT_{2B}-R promotes PIP2 hydrolysis through the phospholipase C protein (Maroteaux, 2021). If these two receptors interact in the same surface membrane microdomain, the activation of 5-HT_{2B}-R could lead to a depletion of nearby PIP2 that can thereby prevent 5-HT_{1A}-R signal transduction cascade. This hypothesis could also explain the *in vivo* observations. Although the mechanism underlying 5-HT neurons activity modulation by 5-HT_{2B}-R remains to be elucidated, this study gives first insights on the regulation of 5-HT_{1A}-R surface expression by 5-HT_{2B}-R through their interactions as dimers specifically in subpopulations of 5-HT neurons.

FIGURES

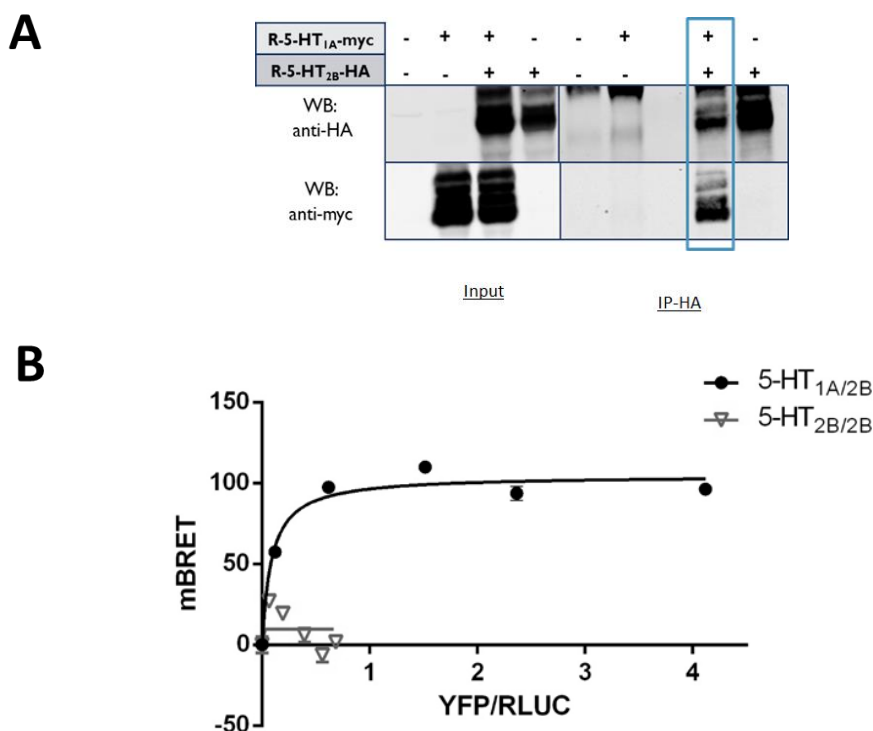


Figure 1: 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R interact *in vitro*.(A) Co-immunoprecipitation of 5-HT_{1A}-R with the 5-HT_{2B}-R in COS-7 cells. Proteins from COS-7 cells co-transfected with plasmids coding for HA-tagged 5-HT_{2B} (HA-2B) and/or myc-tagged 5-HT_{1A} (1A-myc) proteins analyzed by Western blotting. Blot of input of proteins revealed by anti-myc antiserum (WB anti-myc) or by anti-HA antiserum (WB anti-HA) shows the presence of the proteins in each condition (Input; left). Immunoprecipitations using anti-HA beads (IP HA-_{2B}) followed by Western blotting revealed an interaction between 5-HT_{1A}- and 5-HT_{2B}-Rs. (B) BRET proximity assays between heterodimers of 5-HT_{1A}- and 5-HT_{2B}-Rs. COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for a constant amount of RLuc-5-HT_{2B}-R, (BRET donors) and increasing concentrations of YFP-tagged 5-HT_{1A}-R (the BRET acceptor). The hyperbolic curve attests a physical distance between 5-HT_{1A}-YFP and 5-HT_{2B}-RLuc inferior to 10 nm (representative experiment of n > 3 independent experiments).

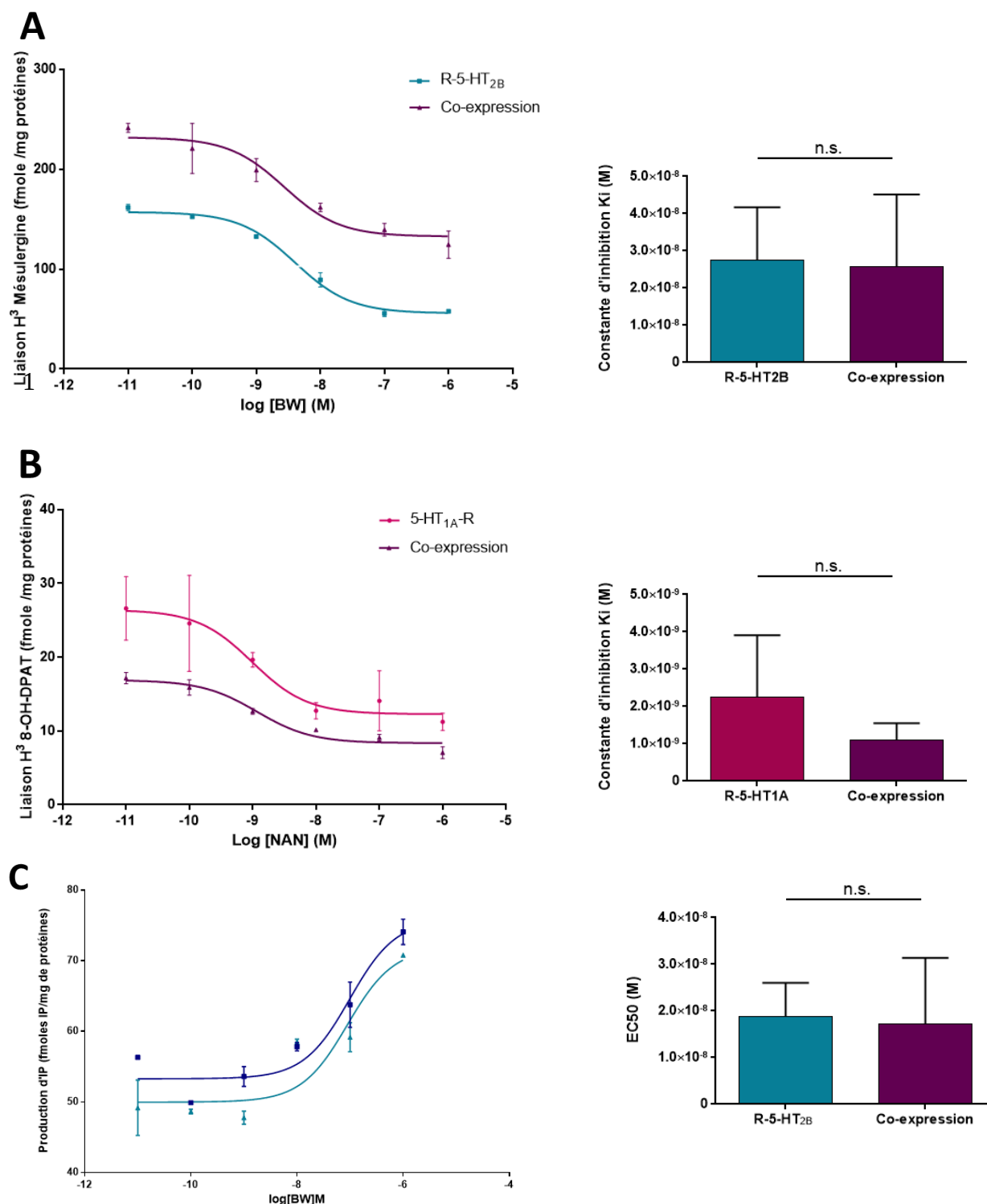


Figure 2: Total receptor expression and second messenger signaling are not affected by 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R dimerization. (A). Radioligand binding competition of tritiated mesulergine or 8-OH-DPAT performed on membrane proteins from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-Rs with or without 5-HT_{1A}-R showed no difference in maximal expression of the receptors, which is represented by the Bmax. (Right) Data were tested using the Mann-Whitney unpaired t-test; n = 3 independent experiments, each performed in

duplicate. No effects were found in the co-expression condition regarding neither the total receptor expression (B_{max}) nor their binding affinity to their respective ligand (K_i). B_{max} were statistically analyzed by Mann-Whitney unpaired t-test; **(B)** Impact of co-expression on 5-HT_{2B}-R and 5-HT_{1A}-R-operated signal transduction. The quantification of inositol phosphate was performed in COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-R and/or 5-HT_{1A}-R and stimulated with increasing concentrations of an agonist of the 5-HT_{2B}-R (BW723C86). Note the absence of effect in the co-expression condition on IP production compared to the single 5-HT_{2B}-R expression conditions. $n = 4-6$ independent experiments, each performed in duplicate.

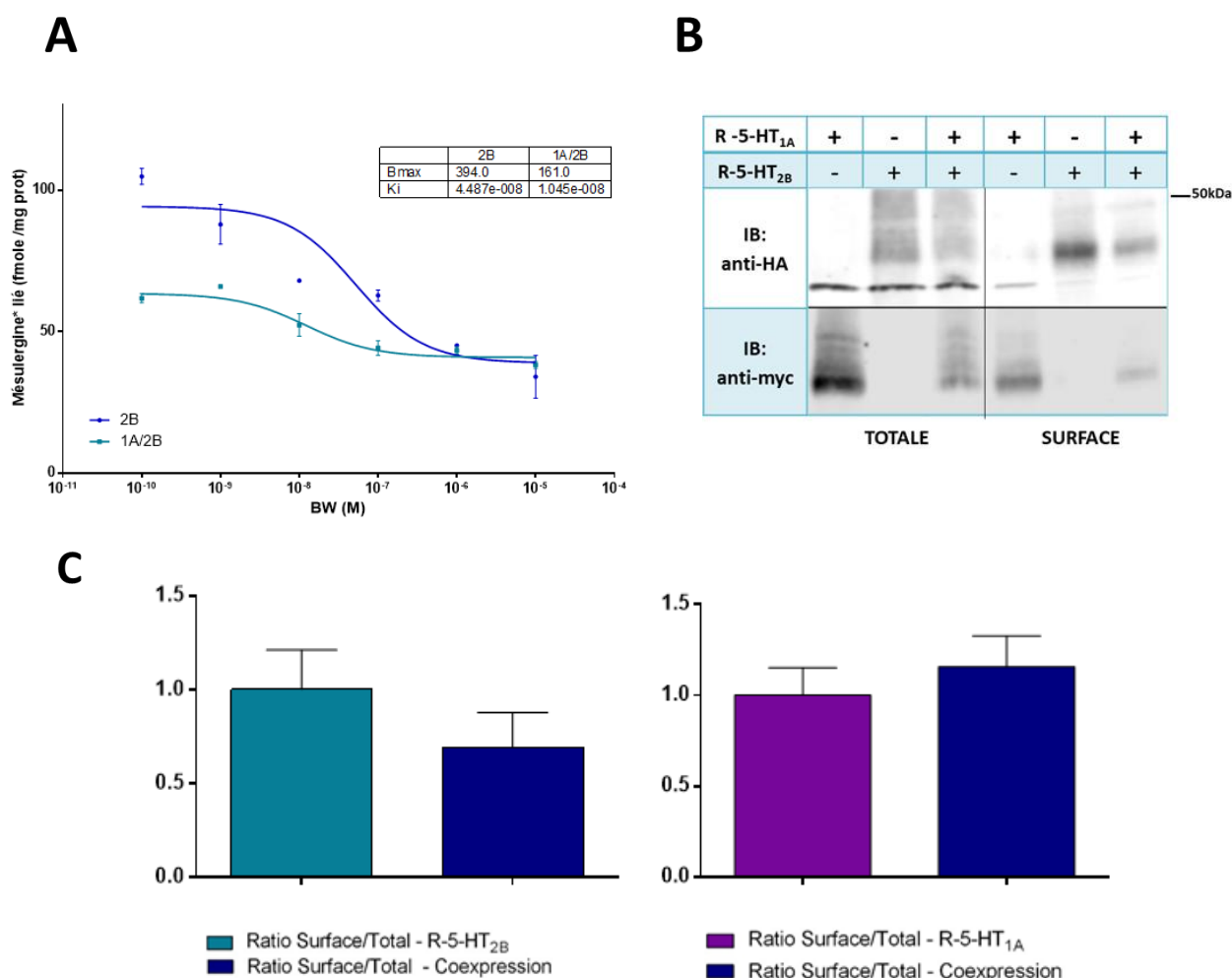
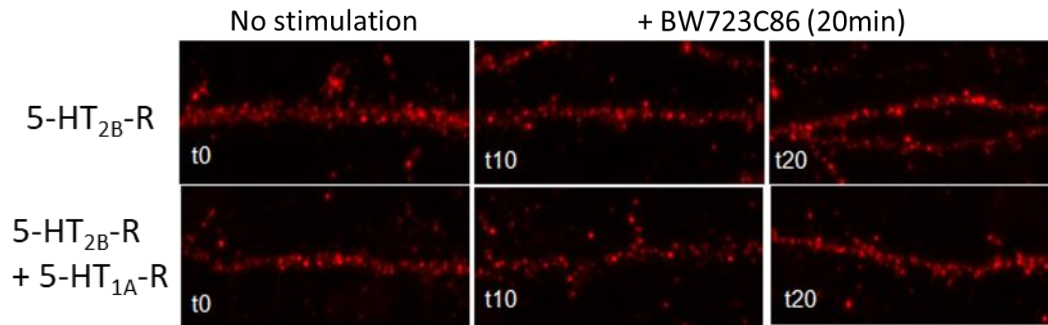


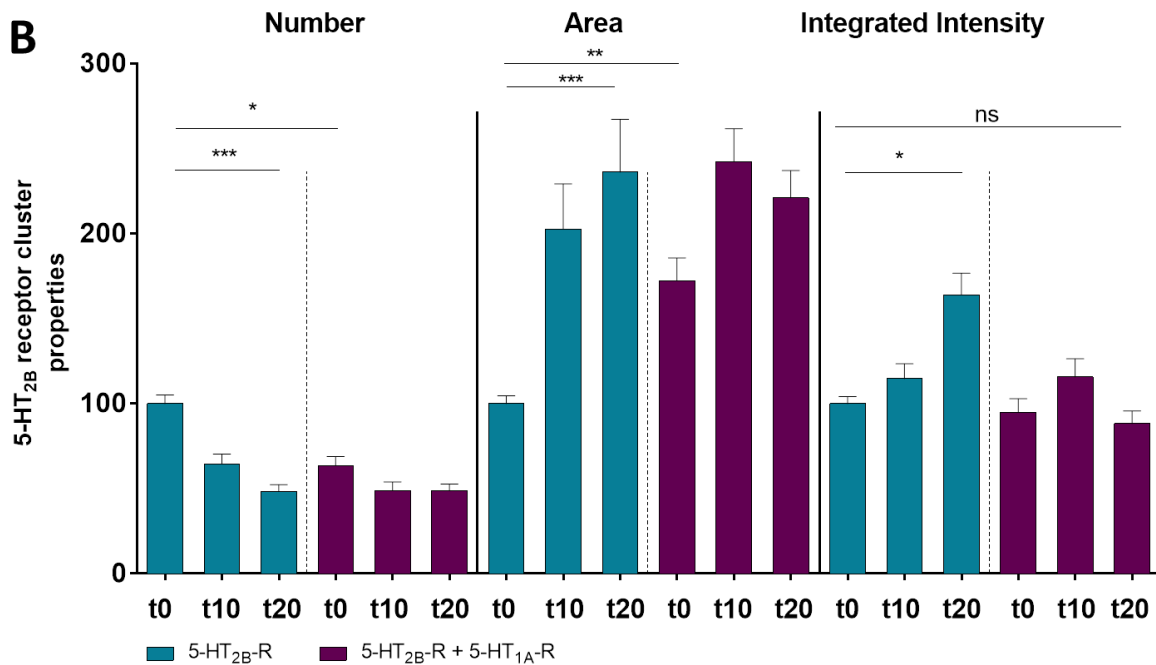
Figure 3: 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R co-expression decreases 5-HT_{2B}-R surface expression.

(A). Radioligand binding competition of tritiated mesulergine performed on surface membrane proteins (intact cells) from transfected COS-7 cells expressing 5-HT_{2B}-R with or without 5-HT_{1A}-R. Co-expression showed a decrease of the surface expression of the 5-HT_{2B}-R, which is represented by decreased Bmax. Data were analyzed using the Mann-Whitney unpaired t-test; n = 3 independent experiments, each performed in duplicate. (B). Surface biotinylation performed on COS-7 cells expressing 5-HT_{1A}-R and/or 5-HT_{2B}-R and analyzed by Western blotting. (C). Ratio of the surface/total protein expression for each receptor analyzed in the condition of simple or co-expression. Co-expression of the two receptors decreases 5-HT_{2B}-R but not 5-HT_{1A}-R surface expression. Bands intensity of each condition was quantified and represented graphically (n=5 independent experiments; *p<0,05).

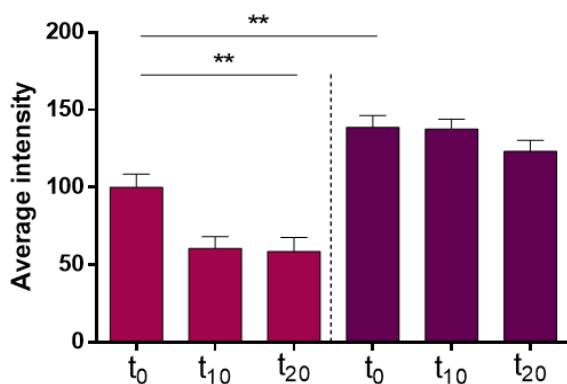
A



B



C



D

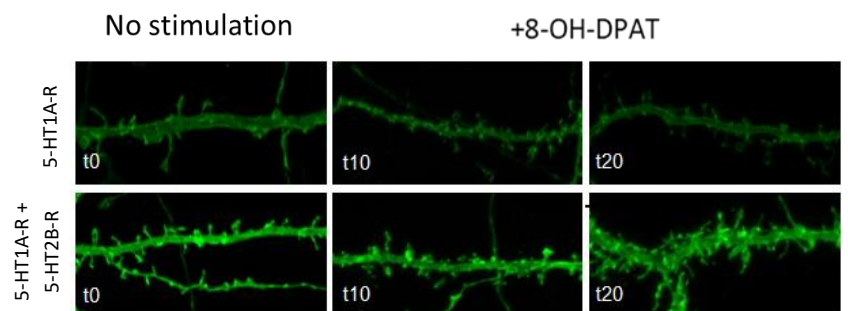


Figure 4: Co-expression of 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R increases 5-HT_{2B}-R surface clustering and maintains 5-HT_{1A}-R surface expression upon orthologous stimulation. (A). 5-HT_{2B}-R clustering at the dendritic surface 0, 10 or 20 min after BW723C86 stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of 5-HT_{1A}-R. Scale bars 5 μ m. **(B).** Quantification of 5-HT_{2B}-R surface clustering following agonist stimulation in the presence (or not) of 5-HT_{1A}-R.

Upon 5-HT_{2B}-R stimulation by BW723C86 (1 μ M), the number of 5-HT_{2B}-R clusters at the neuronal surface decreased from 0 to 20 min in the absence but not in the presence of 5-HT_{1A}-R. The treatment increased the size (area) but did not change the molecular density (integrated intensity) of 5-HT_{2B}-R clusters. **(C)**. Quantification of average intensity of 5-HT_{1A}-R surface expression following agonist stimulation in the presence (or not) of 5-HT_{2B}-R. Upon 5-HT_{1A}-R stimulation, the intensity of 5-HT_{1A}-R at the neuronal surface decreased from 0 to 20 min in the absence, and, although increased, was not modified in the presence of 5-HT_{2B}-R compared to t0, (number of cells = 44-50). **(D)**. 5-HT_{1A}-R expression at the dendritic surface 0, 10 or 20 min after 8-OH-DPAT stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of 5-HT_{2B}-R. Data, expressed as percentage of their respective values at T0, were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. ***p<0.0001, **p < 0.01, *p < 0.05. Number of cells = 44-50.

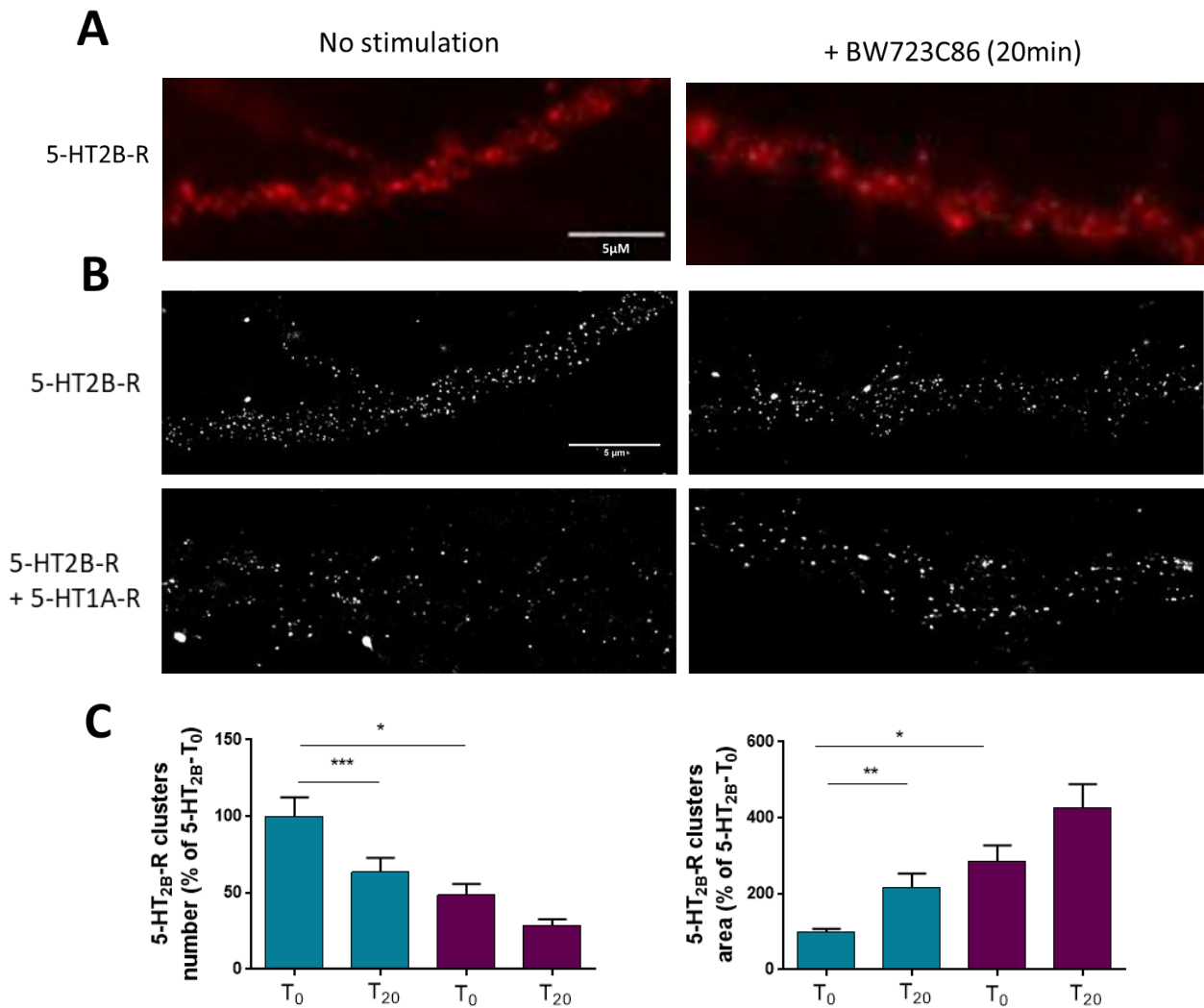


Figure 5: Super resolution confirmed that co-expression of 5-HT_{2B}-R /5-HT_{1A}-R increases 5-HT_{2B}-R surface clustering upon specific BW723C86 agonist stimulation. (A). Images examples of 5-HT_{2B}-R membrane clusters by epifluorescence microscopy. Note that clusters are not well-defined and diffuse compared to the images below acquired at super resolution. **(B).** 5-HT_{2B}-R clustering at the dendritic surface 0 (left panel) or 20 min (right panel) after BW723C86 stimulation in the absence (top) or presence (bottom) of 5-HT_{1A}-R. Images were acquired by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). **(C).** Quantification of 5-HT_{2B}-R surface clustering following agonist stimulation in the presence (or not) of 5-HT_{1A}-R. The number of 5-HT_{2B}-R clusters and their area are significantly decreased and increased, respectively, upon stimulation by the specific agonist of the 5-HT_{2B}-R (BW723C86) or co-expression with the 5-HT_{1A}-R. At this level of super resolution, there is also a tendency of a double effect (stimulation + coexpression) on 5-HT_{2B}-R clusters. Data, expressed as percentage of their respective values at T₀, were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. ***p<0.0001, **p < 0.01, *p < 0.05. Number of cells

=

16-20.

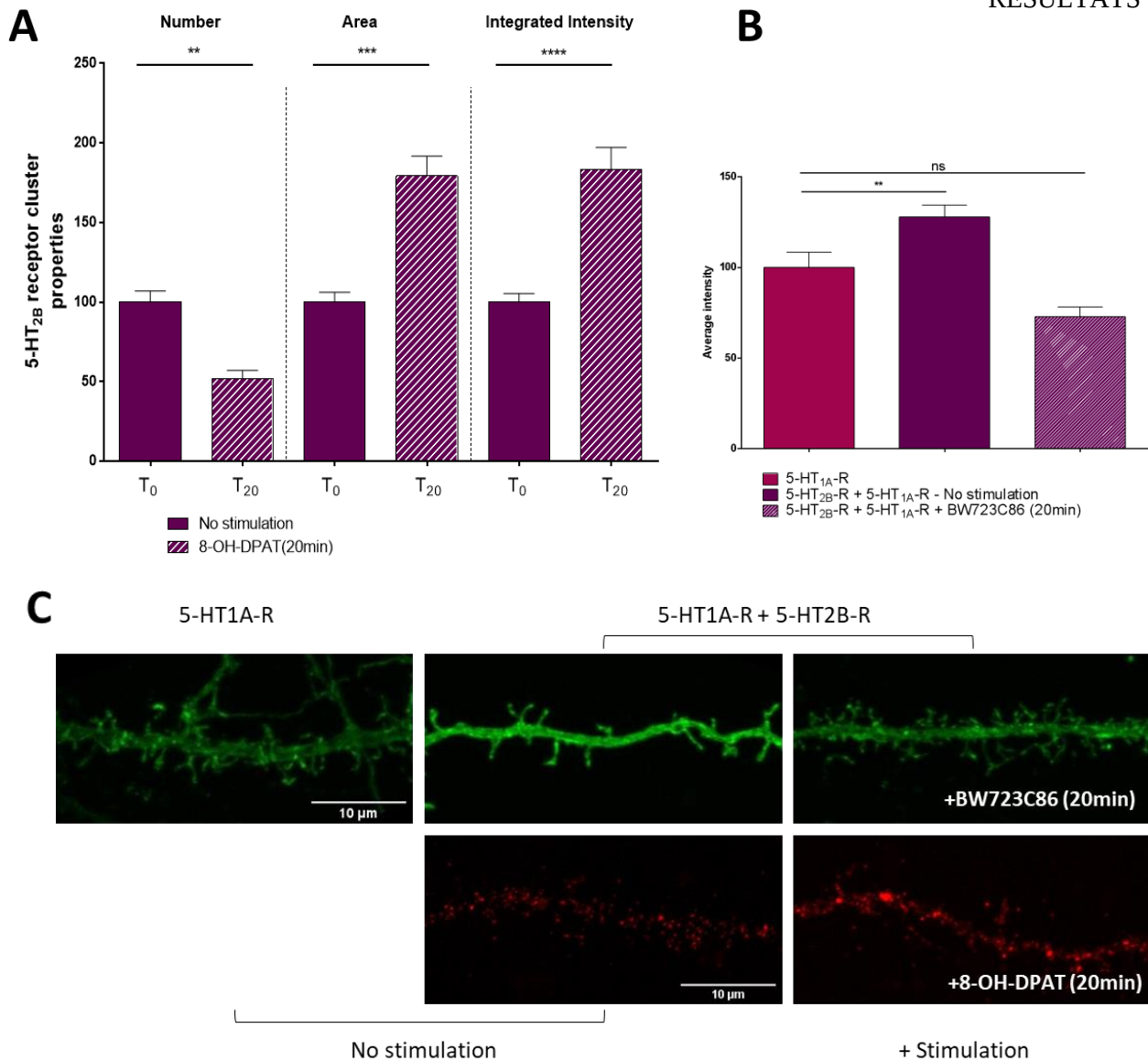


Figure 6: Effects of cross-stimulation of 5-HT_{2B}-R or 5-HT_{1A}-R on their respective surface expression. (A). Quantification of 5-HT_{2B}-R surface clustering in co-expression with the 5-HT_{1A}-R following stimulation of the 5-HT_{1A}-R. Upon stimulation by 8-OH-DPAT, the number of 5-HT_{2B}-R clusters is decreased and their area and molecular density (integrated intensity) are increased, suggesting an enhanced effect on 5-HT_{2B}-R clustering parameters by the 5-HT_{1A}-R. **(B).** Quantification of 5-HT_{1A}-R surface expression expressed alone without stimulation, in co-expression with or without specific stimulation of the 5-HT_{2B}-R by BW723C86. Whereas co-expression of the 5-HT_{2B}-R increases 5-HT_{1A}-R surface expression, 5-HT_{2B}-R stimulation abolishes this effect. **(C)** Surface expression of the 5-HT_{1A}-R alone or co-expressed with the 5-HT_{2B}-R, with or without stimulation by BW723C86. Note the change in the spine density and morphology between conditions (Top). 5-HT_{2B}-R clusters co-expressed with the 5-HT_{1A}-R with or without stimulation with 8-OH-DPAT (Bottom). Data, expressed as percentage of their respective values at T₀, were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. ****p<0.0001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

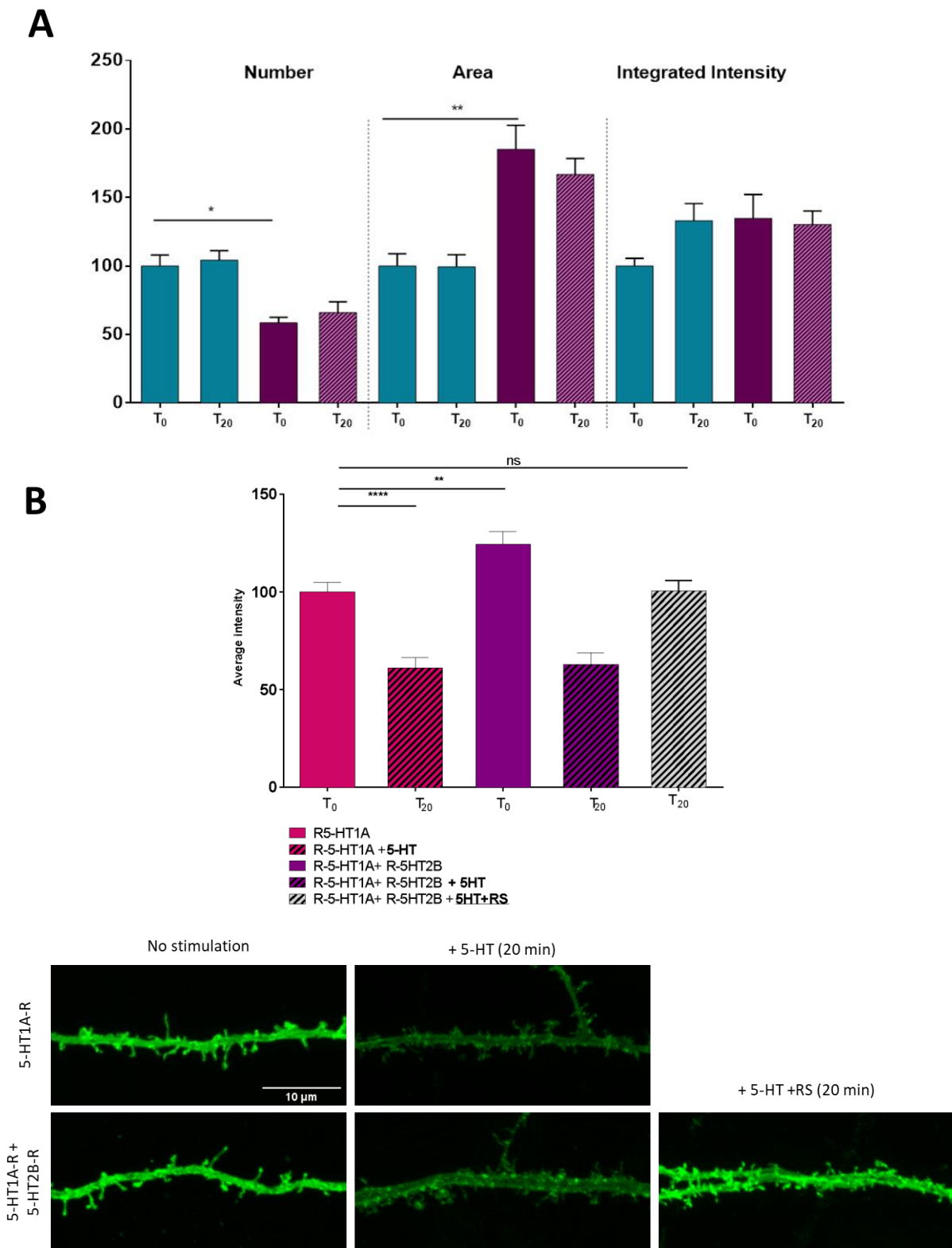


Figure 7: Effect of 5-HT stimulation 5-HT_{1A}-R and 5-HT_{2B}-R alone or coexpressed on their membrane targeting. (A). Quantification of 5-HT_{2B}-R surface clustering following 5-HT stimulation in the presence (or not) of 5-HT_{1A}-R. Upon stimulation by 5-HT (1 μ M), the number, area, and molecular density of 5-HT_{2B}-R clusters at the neuronal surface were not changed from 0 to 20 min in the absence or in the presence of 5-HT_{1A}-R (number of cells =

44-50). **(B)**. Quantification of 5-HT_{1A}-R expression at the dendritic surface after 5-HT stimulation in the absence or presence of 5-HT_{2B}-R. Upon 5-HT stimulation, the intensity of 5-HT_{1A}-R at the neuronal surface decreased with or without 5-HT_{2B}-R co-expression. This effect was completely reversed upon 5-HT_{2B}-R antagonist application (RS). Data, expressed as percentage of their respective values at T₀, were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

REFERENCES

- Albert, P.R., and Vahid-Ansari, F. (2019). The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior. *Biochimie* 161, 34–45.
- Andrade, R., Huereca, D., Lyons, J.G., Andrade, E.M., and McGregor, K.M. (2015). 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Autoinhibition and the Control of Serotonergic Cell Firing. *ACS Chem Neurosci* 6, 1110–1115.
- Arango, V., Huang, Y., Underwood, M.D., and Mann, J.J. (2003). Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *Journal of Psychiatric Research* 37, 375–386.
- Avesar, D., and Gullledge, A.T. (2012). Selective serotonergic excitation of callosal projection neurons. *Front Neural Circuits* 6, 12.
- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S.L., Guiard, B.P., Fernandez, S.P., Doly, S., Banas, S.M., Pitychoutis, P.M., Moutkine, I., Muzerelle, A., et al. (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology*.
- Benhadda, A., Quentin, E., Moutkine, I., Chanrion, B., Russeau, M., Marin, P., Levi, S., and Maroteaux, L. (2021). Serotonin 2B Receptor by Interacting with NMDA Receptor and CIPP Protein Complex May Control Structural Plasticity at Glutamatergic Synapses. *ACS Chem Neurosci* 12, 1133–1149.
- Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., et al. (2010). A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468, 1061–1066.
- Boroto-Escuela, D.O., Li, X., Tarakanov, A.O., Savelli, D., Narváez, M., Shumilov, K., Andrade-Talavera, Y., Jimenez-Beristain, A., Pomier, B., Díaz-Cabiale, Z., et al. (2017). Existence of Brain 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} Isoreceptor Complexes with Antagonistic Allosteric Receptor-Receptor Interactions Regulating 5-HT_{1A} Receptor Recognition. *ACS Omega* 2, 4779–4789.
- Bouaziz, E., Emerit, M.B., Vodjdani, G., Gautheron, V., Hamon, M., Darmon, M., and Masson, J. (2014). Neuronal Phenotype Dependency of Agonist-Induced Internalization of the 5-HT_{1A} Serotonin Receptor. *Journal of Neuroscience* 34, 282–294.
- Courtney, N.A., and Ford, C.P. (2016). Mechanisms of 5-HT_{1A} receptor-mediated transmission in dorsal raphe serotonin neurons. *The Journal of Physiology* 594, 953–965.
- Diaz, S.L., Narboux-Nême, N., Boutourlinsky, K., Doly, S., and Maroteaux, L. (2016). Mice lacking the serotonin 5-HT_{2B} receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *European Neuropsychopharmacology* 26, 265–279.
- Diaz, S.L., Doly, S., Narboux-Nême, N., Fernández, S., Mazot, P., Banas, S.M., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., and Roumier, A. 5-HT_{2B} receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions.
- Faron-Górecka, A., Szlachta, M., Kolasa, M., Solich, J., Górecki, A., Kuśmider, M., Żurawek, D., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2019). Understanding GPCR dimerization. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 155–178.
- Garcia-Garcia, A., Tancredi, A.N., and Leonardo, E.D. (2014). 5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 623–636.
- Herrick-Davis, K. (2013). Functional Significance of Serotonin Receptor Dimerization. *Exp Brain Res* 230, 375–386.
- Ju, A., Fernandez-Arroyo, B., Wu, Y., Jacky, D., and Beyeler, A. (2020). Expression of serotonin 1A and 2A receptors in molecular- and projection-defined neurons of the mouse insular cortex. *Mol Brain* 13, 99.
- Lavoie, C., Mercier, J.-F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.-R., Zhu, W.-Z., Xiao, R.-P., Lakatta, E.G., Bouvier, M., et al. (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic

- receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* 277, 35402–35410.
- Lin, S.L., Setya, S., Johnson-Farley, N.N., and Cowen, D.S. (2002). Differential coupling of 5-HT₁ receptors to G proteins of the Gi family. *Br J Pharmacol* 136, 1072–1078.
- Liu, X., and Fuentes, E.J. (2019). Emerging Themes in PDZ Domain Signaling: Structure, Function, and Inhibition. *Int Rev Cell Mol Biol* 343, 129–218.
- Llamosas, N., Bruzos-Cidón, C., Rodríguez, J.J., Ugedo, L., and Torrecilla, M. (2015). Deletion of GIRK2 Subunit of GIRK Channels Alters the 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Signaling and Results in a Depression-Resistant Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.
- Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 687–695.
- MacDonald, L., Baldini, G., and Storrie, B. (2015). Does Super Resolution Fluorescence Microscopy Obsolete Previous Microscopic Approaches to Protein Co-localization? *Methods Mol Biol* 1270, 255–275.
- Mann, J.J. (1999). Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior. *Neuropsychopharmacol* 21, 99–105.
- Marazziti, D. (2017). Understanding the role of serotonin in psychiatric diseases. *F1000Res* 6, 180.
- Maroteaux, L. (2021). Gene Structure, Expression, and 5-HT_{2B} Receptor Signaling. In *5-HT_{2B} Receptors. The Receptors*, Vol 35., pp. 1–32.
- Maroteaux, L., Béchade, C., and Roumier, A. (2019). Dimers of serotonin receptors: impact on ligand affinity and signaling. *Biochimie*.
- Mercier, J.-F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002). Quantitative Assessment of β ₁- and β ₂-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44925–44931.
- Montalbano, A., Corradetti, R., and Mlinar, B. (2015). Pharmacological Characterization of 5-HT_{1A} Autoreceptor-Coupled GIRK Channels in Rat Dorsal Raphe 5-HT Neurons. *PLoS ONE* 10, e0140369.
- Moutkine, I., Quentin, E., Guiard, B.P., Maroteaux, L., and Doly, S. (2017). Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers. *J. Biol. Chem.* 292, 6352–6368.
- Niu, Y., Tao, X., Touhara, K.K., and MacKinnon, R. (2020). Cryo-EM analysis of PIP₂ regulation in mammalian GIRK channels. *Elife* 9, e60552.
- Popova, N.K., and Naumenko, V.S. (2013). 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Rev Neurosci* 24, 191–204.
- Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Gorinski, N., Guseva, D., Abdel-Galil, D., Fröhlich, M., et al. (2012). Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci* 125, 2486–2499.
- Tikkanen, R., Tiihonen, J., Rautiainen, M.R., Paunio, T., Bevilacqua, L., Panarsky, R., Goldman, D., and Virkkunen, M. (2015). Impulsive alcohol-related risk-behavior and emotional dysregulation among individuals with a serotonin 2B receptor stop codon. *Transl Psychiatry* 5, e681.
- Yamanaka, M., Smith, N.I., and Fujita, K. (2014). Introduction to super-resolution microscopy. *Microscopy (Oxf)* 63, 177–192.

DISCUSSION

Les travaux précédemment réalisés par le laboratoire du Dr Luc Maroteaux ont permis de mettre en évidence la contribution du R-5-HT2B dans de nombreux comportements.

Tout d'abord, un polymorphisme induisant une perte de fonction dans le gène du R-5-HT2B dans une population finlandaise est associé à des comportements impulsifs et violents avec des tendances suicidaires, corrélant ainsi l'activité du R-5-HT2B à un contrôle de l'impulsivité (Bevilacqua et al., 2010; Tikkanen et al., 2015). Ensuite, la génération de souris knockout pour le R-5-HT2B a permis de caractériser les paramètres phénotypiques dû à l'absence de ce récepteur. Il apparaît chez ces souris que le R-5-HT2B est nécessaire au contrôle de l'impulsivité mais aussi à l'effet psychoactif de la MDMA, une drogue d'abus, et à l'effet antidépresseur des ISRS tant au niveau comportemental que cellulaire (Diaz et al., 2015; Doly et al., 2008, 2009a).

Ce travail de thèse a permis d'identifier deux partenaires protéiques du R-5-HT2B : CIPP, une protéine de pontage et le R-5-HT1A, un autorécepteur négatif des neurones sérotoninergiques. Dans cette conclusion, j'aborderai les principaux résultats et présenterai les problématiques et perspectives qu'ils soulèvent.

A. Le R-5-HT2B : un acteur de la plasticité synaptique ?

Les domaines PDZ, et plus généralement les protéines PDZ, permettent de rapprocher physiquement deux ou plusieurs protéines dans un même environnement membranaire. Or il est admis que la membrane plasmique, et notamment neuronale, contient des microdomaines. Enrichis en cholestérol et en sphingolipides, ces microdomaines stratégiquement distribués à la surface cellulaire (entre autres) vont permettre de concentrer un ensemble de protéines tant membranaire qu'intracellulaire favorisant les interactions et renforçant la signalisation associée (Björk et al., 2010).

L'un des membres de la famille des protéines PDZ est la protéine CIPP. Durant ce travail de thèse, il a été montré que CIPP interagit physiquement avec le R-5-HT2B et que cette interaction est à l'origine de plusieurs modifications de la distribution des R-5-HT2B. Premièrement, la présence de CIPP va augmenter l'agrégation, "clustering" des R-5-HT2B à la surface membranaire des neurones et augmenter la transduction du signal via une vague calcique plus importante qu'en absence de CIPP. CIPP favorise donc la signalisation du R-5-

HT2B en le concentrant et mime ainsi l'activation du R-5-HT2B. Par ailleurs, l'association de CIPP avec le R-5-HT2B diminue sa colocalisation avec les R-NMDA en augmentant leur dispersion. Ces résultats corroborent d'autres travaux dans un modèle de fibre C de la moelle épinière montrant que la stimulation des R-NMDA et R-5-HT2B augmentent significativement les potentiels d'action de ces fibres. En bloquant le R-5-HT2B par son antagoniste, le SB 204741, ou en bloquant la PKC γ , cet effet est aboli (Aira et al., 2013). En effet, la PKC γ après stimulation induit la phosphorylation des R-NMDA qui devraient donc quitter le complexe formé avec le R-5-HT2B.

Ces résultats soutiennent l'existence d'un complexe tripartite (R-NMDA/CIPP/R-5-HT2B) dynamique et permet de poser l'hypothèse de l'implication des R-5-HT2B dans la plasticité synaptique. Des phénomènes de LTP dont l'implication du système 5-HT a déjà été démontrée passent par les R-5-HT2A. En effet, l'activation des R-5-HT2A est associée à une augmentation de la transmission des R-NMDA, ce qui promeut l'induction de phénomènes de plasticité au niveau des synapses thalamocorticales. Les souris 5-HT2A^{-/-} présentent des altérations de la plasticité synaptique et des processus de mémoire. Cette modulation passe par l'activation de la PLC et de la PKC, dépendante de l'activation des R-NMDA, qui vont phosphoryler les R-NMDA et ainsi, les potentialiser (Barre et al., 2016). Le R-5-HT2B étant également couplé à ces deux protéines (PLC et PKC) via la protéine G α_q , il pourrait réguler l'activité des neurones postsynaptiques mais également la plasticité des neurones 5-HT où il est exprimé, agissant comme un autorécepteur.

Par ailleurs, il a été montré que le R-5-HT2B module l'activité de la sous unité NR1 des R-NMDA (Aira et al., 2013) alors que le R-5-HT1A quant à lui régule l'activité de la sous-unité NR2B (Yuen et al., 2005). Les effets de l'interaction des R-5-HT1A et R-5-HT2B (redistribution, internalisation, ancrage à la membrane, inhibition de la voie associée, etc.) pourraient participer à la mise en place de phénomènes de plasticité en agissant via deux sous-unités différentes d'un même R-NMDA.

Un autre élément permettant d'appuyer l'hypothèse de l'implication du R-5-HT2B dans la plasticité synaptique est que la stimulation de ce récepteur par du BW723C86 induit une augmentation rapide et significative des épines dendritiques ainsi que leur maturation (Benhadda et al., 2021). Or la plasticité structurale des épines dendritiques est fortement corrélée avec la formation de la mémoire (Borczyk et al., 2019) en favorisant la connectivité neuronale et donc la transmission de l'information. Des dysfonctionnements au niveau de la

plasticité des épines dendritiques sont d'ailleurs associés à certaines pathologies tel que la maladie d'Alzheimer (Reza-Zaldivar et al., 2020).

B. Comment le R-5-HT2B module-t-il l'activité et l'expression des R-5-HT1A ?

Actuellement, la signalisation intracellulaire attribuée au R-5-HT2B dans les neurones 5-HT n'est pas totalement connue. Comme observé dans les différents modèles *in vitro*, ce récepteur se couple probablement et majoritairement à la protéine $G\alpha_q$ et son activation induit une augmentation des taux intracellulaires d'inositol tri-phosphate et donc de calcium (Benhadda et al., 2021). Cette association entre un récepteur à 7 domaines transmembranaires (7DM) et la protéine $G\alpha$ est dynamique et peut évoluer selon l'environnement. En effet, la composition en lipide de la membrane plasmique au niveau de microdomaines peut affecter l'ancrage de la protéine $G\alpha$ au niveau de celle-ci ou même favoriser l'association à un récepteur 7DM d'une sous unité $G\alpha$ par rapport à une autre. C'est le cas par exemple du récepteur à la dopamine D2 dont l'association à la protéine $G\alpha_i1$ ou $G\alpha_i2$ est établie selon la composition des domaines lipidiques de la membrane plasmique, affectant ainsi la signalisation associée (Polit et al., 2020).

La composition en cholestérol de la membrane peut affecter les propriétés pharmacologiques des récepteurs. Une déplétion de cholestérol membranaire diminue de manière significative la liaison du R-5-HT1A à son agoniste ainsi que son couplage à la protéine $G\alpha_i$ (Pucadyil and Chattopadhyay, 2004). Le cholestérol peut également affecter le taux de PIP2, un élément important ancré à la membrane permettant, entre autres, l'activation des canaux GIRK. Or, une des cascades de signalisation attribuées à l'activation du R-5-HT2B est la voie $G\alpha_q/PLC/IP3$. Celle-ci engendre l'hydrolyse du PIP2 afin de produire de l'IP3 et du DAG. Si les R-5-HT1A et R-5-HT2B sont présents dans un même microdomaine, on peut supposer que l'activation du R-5-HT2B, en induisant une déplétion locale de PIP2, amoindrie ou inhibe la signalisation du R-5-HT1A. Un des moyens de vérifier si le R-5-HT2B exerce un rôle de dominant négatif sur l'activité du R-5-HT1A serait de co-exprimer ces deux récepteurs et d'étudier l'impact de leur activation sur leurs propriétés électrophysiologiques. En effet, en stimulant les deux récepteurs, l'activation du R-5-HT2B devrait inhiber ou diminuer l'hyperpolarisation du neurone associé aux GIRK via le R-5-HT1A.

Il est intéressant de noter que la dépolarisation du neurone 5-HT est dépendante de l'ouverture de canaux calcique dépendante de l'activation des R-5-HT₂ via la PLC. Cette signalisation va également fermer les canaux GIRK. Or, l'activation des R-5-HT_{1A} ouvre les canaux GIRK mais va aussi fermer les canaux calciques. Ces deux récepteurs, par leur signalisation, ont des effets opposés sur les effecteurs qui régulent l'activité du neurone 5-HT. Une balance fine entre activité dépendante du R-5-HT_{1A} et celle dépendante du R-5-HT_{2B} semble donc primordiale pour la modulation des neurones 5-HT.

Dans cette étude, j'ai observé que la co-expression du R-5-HT_{2B} avec le R-5-HT_{1A} augmente significativement son expression à la membrane et prévient son internalisation après stimulation. Le R-5-HT_{2B} semble donc maintenir le R-5-HT_{1A} à la surface membranaire et le rendre moins sensible à son agoniste, le 8-OH-DPAT. Il a été montré que la déplétion de PIP₂ empêche l'internalisation correcte de RCPG (Tóth et al., 2012). En supposant que l'hydrolyse de PIP₂ médiée par l'activation du R-5-HT_{2B} soit suffisante pour créer un déficit local, dans ce cas l'internalisation des R-5-HT_{1A} peut être affectée et insensible à des agonistes spécifiques.

Même si l'association des R-5-HT_{1A} et R-5-HT_{2B} ne modifie pas la production d'IP₃ associée au R-5-HT_{2B}, cette association pourrait affecter la signalisation du R-5-HT_{1A}. Des mesures de taux d'AMPc intracellulaire en réponse à la stimulation du R-5-HT_{1A} seul ou co-exprimé avec le R-5-HT_{2B} permettraient de répondre à cette interrogation.

L'association de deux récepteurs aux signalisations opposées a déjà été observée. En effet, les récepteurs D₁, associés à la protéine G_{αs} et les récepteurs D₂ associés à la protéine G_{αi} sont coexprimés par certains neurones dans le striatum de rat et d'humain. La coexpression de ces récepteurs n'affecte pas leur capacité de liaison à leurs ligands respectifs, en revanche leur co-activation induit une augmentation de calcium intracellulaire dépendante de l'activité de la PLC. Or, aucun de ces deux récepteurs n'est associé à cette enzyme attribuée à la signalisation de la protéine G_{αq} mais leurs effets individuels sont exclusivement attribués à l'activité de l'adénylate cyclase lorsqu'exprimés séparément (Lee et al., 2005; So et al., 2005, 2007).

Ainsi, il n'est pas exclu que l'association des R-5-HT_{1A} et R-5-HT_{2B} puisse donner lieu à une signalisation qui ne leur est pas associée usuellement (expression des récepteurs seuls). L'une méthode permettant de tester cette hypothèse serait de réaliser des expériences

utilisant des chélateurs de calcium fusionné à une protéine fluorescente (ex. GCaMP), qui permettent d'attester de l'activité du neurone (Akerboom et al., 2012). En effet, l'activation du R-5-HT_{2B} résulte en une vague calcique intracellulaire, ce qui n'est pas le cas pour le R-5-HT_{1A} selon la littérature. Si la co-expression des deux récepteurs affecte la signalisation du R-5-HT_{2B}, ces expériences nous permettront de montrer soit une augmentation soit une diminution de l'activité du R-5-HT_{2B}.

C. Le R-5-HT_{2B} et les ISRS

Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine soient les antidépresseurs les plus prescrits dans le cadre d'états dépressifs, cependant, leur mode d'action exacte n'est pas connu. Historiquement, on attribue les états dépressifs à une hypoactivité du système 5-HT (Coppen 1969; Lapin and Oxenkrug 1969; Coppen et al. 1972; Charney et al. 1981; Meltzer and Lowy 1987) et l'utilisation d'ISRS permettrait de contourner la diminution libération de 5-HT en prolongeant son effet sur les neurones cibles. Aujourd'hui, de nombreux éléments nous permettent d'affirmer que le mode d'action des ISRS est plus complexe.

Bien que l'internalisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} soit probablement un élément essentiel dans l'apparition des effets bénéfiques de la prise de ces médicaments, l'internalisation du SERT l'est tout autant. En effet, après 28 jours de traitement chronique aux ISRS, l'expression de SERT dans les neurones 5-HT diminue significativement, en corrélation avec une augmentation de la signalisation 5-HT (Benmansour et al., 1999, 2002). Ces observations sont corroborées par une étude utilisant un siRNA contre le transporteur à la sérotonine (siRNA-SERT). En inhibant l'expression de SERT, il a été observé une augmentation de la signalisation 5-HT au niveau du cortex préfrontal, une diminution de l'activité des autorécepteurs 5-HT_{1A} ainsi qu'une accélération de la prolifération cellulaire dans l'hippocampe, et ce, après 1 semaine de traitement contre 4 semaines pour un traitement aux ISRS. D'un point de vue comportemental, les phénotypes délétères, observés dans un modèle de dépression induite par un traitement chronique de corticostérone, sont abolis après une semaine de traitement au siRNA-SERT (Ferrés-Coy et al., 2013).

Dans le cadre d'un traitement aux ISRS, il est plausible que le R-5-HT_{2B} via sa régulation positive de l'activité des neurones 5-HT (Belmer et al., 2018) et sa modulation de

SERT (Launay et al., 2006) puisse, dans un premier temps, contribuer à l'augmentation de la signalisation 5-HT et dans un second temps, l'entretenir participant ainsi à leurs effets thérapeutiques.

Dans un modèle de stress social chronique induisant des comportements de types dépressifs, nous avons montré que l'absence de R-5-HT2B spécifiquement dans les neurones 5-HT (*Htr2b*^{5-HTKO}) était corrélée avec (i) une accélération de l'apparition des phénotypes dépressifs, (ii) une augmentation basale et durant le protocole de stress de corticostérone plasmatique par rapport aux souris contrôles et après un protocole de stress social aigu, (iii) une hypoactivation des neurones du raphé dorsale (via un marquage c-fos) à l'état basale et après stress. Une surexpression virale du R-5-HT2B permet de reverser le phénotype comportemental dans le cas de stress social chronique et les taux de corticostérone plasmatique. Ainsi, la dérégulation du système 5-HT par l'absence de l'autorécepteur 5-HT2B accentue significativement les conséquences délétères d'un stress chronique. Ces résultats soulignent l'interaction du R-5-HT2B avec la régulation de l'axe HHS (D'Andrea et al., en préparation ; Annexe 1).

Enfin, en mettant en évidence durant ce travail de thèse l'interaction des R-5-HT1A et R-5-HT2B, l'étude approfondie de leur modulation réciproque devrait permettre de mieux comprendre l'action des ISRS et l'apparition d'actions antidépressives. L'une des limitations principales à l'étude de ces récepteurs est l'absence d'anticorps spécifiques. L'utilisation de surexpression virale ou à l'aide plasmide a donc été indispensable. J'ai pu montrer, en injectant, dans le raphé dorsal de souris *Htr2b*^{5-HTKO}, deux constructions virales indépendantes contenant les séquences des R-5-HT1A et R-5-HT2B flanqués de sites lox (expression restreinte aux neurones 5-HT) que ces récepteurs sont exprimés, *in vivo*, dans le même compartiment neuronal (**Figure 24**). Il serait intéressant, notamment par surexpression virale, d'étudier la dimérisation des récepteurs *in vivo* dans différentes conditions. En utilisant par exemple des techniques d'essai de ligation par proximité, nous pourrions étudier la dynamique de l'association de ces récepteurs face à un stress important ou à un traitement d'ISRS. En effet, il a été montré que, par exemple, l'état des R-5-HT1A et R-5-HT2A est dynamique et répond aux stimulations extérieures soit en formant un dimère soit en favorisant la forme monomérique.

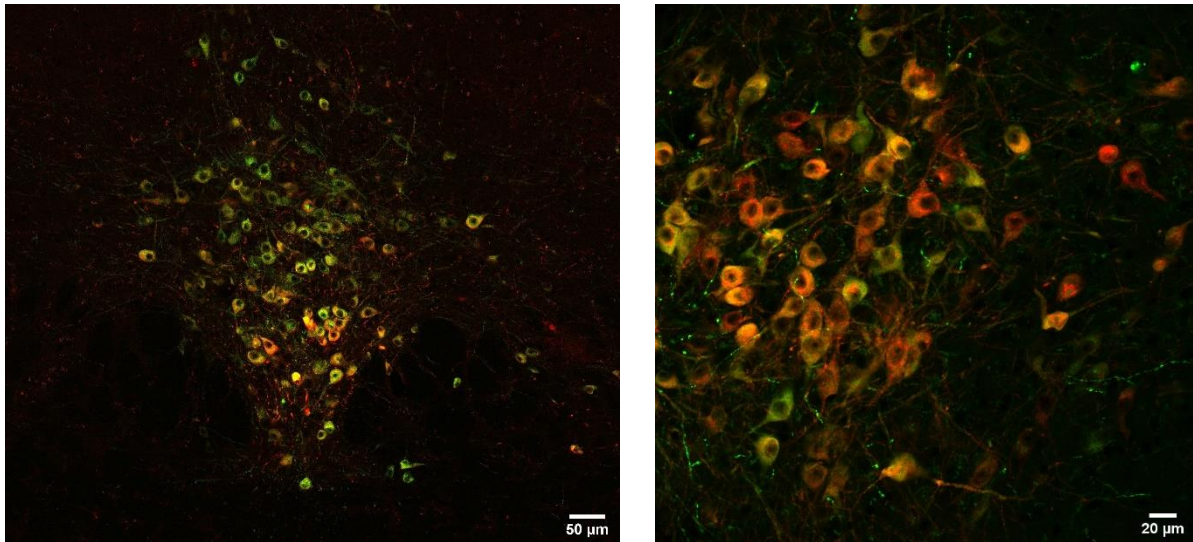


Figure 24 : Expression des R-5-HT1A (vert) et R-5-HT2B-HA (rouge) dans les neurones 5-HT. Injection stéréotaxique dans le noyau B7 du raphé dorsal de souris $\text{Pet1-CRE}^{+/0}$; RCE/RCE infectés avec des constructions virales AAV-DIO-5-HT1A-Flag et AAV-DIO-5-HT2B-HA. Objectif X20. Zoom x2 (à droite).

Ainsi ce projet de thèse s'inscrit dans la lignée des études du laboratoire visant à élucider le rôle du R-5-HT2B dans la régulation des neurones 5-HT (**Figure 25**) et devrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'action des antidépresseurs et donc indirectement des mécanismes sous-jacents à la dépression elle-même.

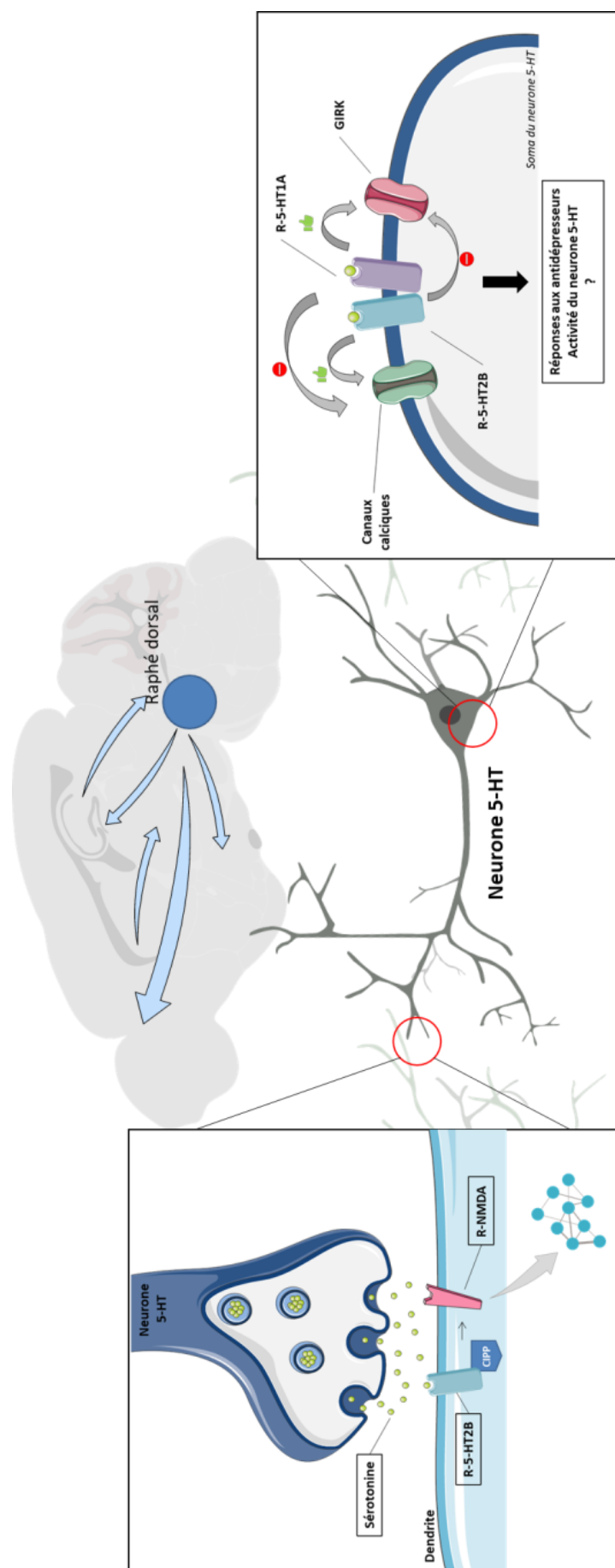


Figure 25 : Schéma récapitulatif des interactions du R-5-HT2B avec la protéine CIPP et le R-5-HT1A. A gauche, l'interaction de CIPP avec le R-5-HT2B induit une dispersion des R-NMDA colocalisant avec le R-5-HT2B. Cette association induit une augmentation de la signalisation associée au R-5-HT2B et est impliquée dans la formation et la maturation d'épines dendritiques, nécessaire à la mise en place de plasticité synaptique. Cette modulation pourrait également être observée au niveau des dendrites des neurones 5-HT. A droite, dans le compartiment somatodendritique du neurone 5-HT, l'activation du R-5-HT1A induit l'ouverture des canaux GIRK et la fermeture des canaux calciques. L'activation du R-5-HT2B a, quant à elle, des effets opposés : l'ouverture des canaux calciques et la fermeture des canaux GIRK via la PLC. Ainsi, l'équilibre entre inhibition dépendante de R-5-HT1A et activation dépendante du R-5-HT2B est essentiel à la régulation de l'activation des neurones 5-HT et la réponse aux ISRS.

ANNEXE

Rôle du R-5-HT2B dans la mise en place d'un phénotype dépressif induit par un stress social chronique

Article en préparation

A. Contexte

Bien que nécessaire à l'adaptation à notre environnement, une mauvaise gestion ou un excès de stress peut conduire à des troubles anxieux et dépressifs. Une implication des microglies, macrophages résidents du cerveau, dans ces troubles a été mise en évidence. En conditions physiologiques, les microglies participent au bon fonctionnement du SNC en sondant leur environnement (Nimmerjahn et al., 2005). En conditions pathologiques, elles participent à la neuroinflammation et leur activation se caractérise par une modification de leur morphologie, de leur densité ainsi qu'une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires (Kopp et al., 2013; Kreisel et al., 2014; Wohleb et al., 2014; Milior et al., 2016). Le système 5-HT joue également un rôle prépondérant dans la réaction face au stress (adaptabilité, fuite, confrontation, etc). L'équipe a montré que le R-5-HT_{2B} est le récepteur 5-HT majoritaire exprimé par les microglies et qu'il participe à la régulation des processus inflammatoires périnatales. En effet, dans un modèle de souris dont l'expression du R-5-HT_{2B} est abolie exclusivement dans les microglies à la naissance, les réponses inflammatoires à l'âge adulte sont dérégulées (Béchade et al., 2021). Il existe donc un lien entre activité microgliale et système 5-HT.

Le stress chronique social est un protocole qui consiste à présenter durant une période d'une à cinq semaines, une souris naïve à une souris agressive. Cela permettant d'induire un phénotype dépressif que l'on peut attester notamment par :

- Une anhédonie, via une diminution de la préférence au sucre,
- Une apathie, via une diminution de la fréquence et de la durée de toilettage
- Une baisse de poids corporel,
- Une baisse des interactions sociales

L'ensemble de ces comportements s'accompagnent d'une élévation plasmatique de corticostérone, témoignant d'une dérégulation de l'axe HHS.

Dans cette étude, l'objectif est de déterminer l'implication du R-5-HT_{2B} dans la mise en place et le maintien de ces phénotypes dépressifs. Trois modèles de souris ont été étudié pour cela.

B. Résultats principaux

Dans un premier temps, un modèle de souris knockout pour le R-5-HT2B (*Htr2b*^{-/-}) a été exposé à un stress de défaite sociale quotidiennement (session de 20 minutes) durant quatre semaines. On observe chez ces souris une diminution de la préférence au sucrose dès le deuxième jour de protocole alors que chez les souris contrôles, ce phénotype n'apparaît qu'à partir du neuvième jour. Ces souris transgéniques présentent également une perte de poids plus importante et un délai de rétablissement (préférence au sucrose de 75% minimum) supérieure à celui des souris contrôles (6 jours et >11 jours, respectivement).

Les interactions sociales sont également affectées d'une part par le génotype et d'autre part, par le protocole de stress social chronique. En effet, les souris *Htr2b*^{-/-} interagissent moins longtemps avec leurs congénères à l'état basal, ce qui est accentué après stress. Ce phénotype, observé chez les souris transgéniques en dehors de tout protocole de stress, peut être expliqué par un taux basal de corticostérone significativement plus élevée que chez les souris contrôles. Et, suite à un stress et après rétablissement, ce taux reste toujours supérieur.

Par ailleurs, des études par RT-PCR en temps réel a permis de montrer l'ablation totale affecte l'ARNm de certains gènes impliqués dans la régulation de l'axe HHS.

La disponibilité de deux modèles murins développés par l'équipe a permis d'approfondir cette étude : les souris dépourvues du R-5-HT2B uniquement dans les microglies (*Htr2b*^{μgliaKO}) et les souris dépourvues de ce récepteur exclusivement dans les neurones 5-HT (*Htr2b*^{5-HTKO}). En reproduisant les mêmes protocoles expérimentaux sur ces deux modèles, l'équipe a découvert que l'ensemble des phénotypes observés chez les souris *Htr2b*^{-/-} sont dû au R-5-HT2B dans les neurones 5-HT.

De plus, en étudiant l'activation de *c-fos*, un marqueur d'activité neuronale, après une session de stress social (stress aigu), on observe chez les souris *Htr2b*^{5-HTKO} une hypofonction basale et après stress des neurones 5-HT le long de l'axe rostro-caudal et dorso-ventral du raphé dorsal en comparaison aux souris contrôles.

Ces résultats démontrent l'implication du R-5-HT2B en tant qu'autorécepteur dans la régulation de l'axe HHS et des comportements dépressifs associés. Cette conclusion est corroborée par les expériences de sauvetages réalisées. En effet, après injection stéréotaxique

de virus contenant la séquence du R-5-HT2B, spécifiquement dans le raphé dorsal, on observe une diminution significative des taux plasmatiques de corticostérone.

C. Contribution personnelle

Dans cette étude, j'ai réalisé les injections stéréotaxiques, les tests de stress aigu ainsi que le marquage et l'analyse du *c-fos* dans les neurones 5-HT des souris *Htr2b*^{5-HTKO}.

Serotonin 2B receptors are required in serotonin neurons to prevent depression-like phenotype triggered by chronic social defeat stress

Ivana d'Andrea, Amina Benhadda, Maria-Teresa Gallo, Giulia Albertini, Anne Roumier, Luc Maroteaux

Institut du Fer à Moulin U1270 INSERM-Sorbonne Université, 17 rue du Fer à Moulin
75005, Paris, France

Abstract 337w

Several evidences implicate serotonin (5-HT) in the etiology of mood disorders, including major depressive disorders (MDDs) and 5-HT neurons are targets of serotonin selective reuptake inhibitors (SSRI) antidepressants. Independently, the brain resident macrophages, microglia, have been implicated in various psychiatric disorders including depression. However, how interactions between these two systems shape vulnerability to MDD remains unknown. Recently, we have shown that *Htr2b* gene encoding the 5-HT_{2B} receptor subtype is involved in response to SSRI, in psychotic-like behaviors, and in 5-HT neurons activity by acting as a positive autoreceptor in mice, and that this receptor is the main 5-HT receptor expressed by microglia. Here, we tested the hypothesis that interactions between these two systems participate to the vulnerability to depression. For this purpose, we tested whether the lack of this receptor in mice either following full inactivation of 5-HT_{2B} receptors, (*Htr2b*^{-/-}), selective inactivation in microglia (*Htr2b*^{μgliaKO}) or in 5-HT neurons (*Htr2b*^{5-HTKO}), could contribute to depressive-like phenotype induced by chronic social stress. Our results demonstrate that *Htr2b*^{-/-} mice develop depressive-like symptoms much earlier than control *Htr2b*^{+/+} mice in response to social stress. In particular, these mice develop anhedonia, loss of body weight, reduction in self-care behavior and impairment in social activity as early as 2 days of social stress. These behavioral phenotypes were associated with higher plasma levels of corticosterone in both basal and stress conditions. Interestingly, mice in which 5-HT_{2B} receptor was selectively inactivated in microglia or in 5-HT neurons, all responded to stress developing depressive-like symptoms. However, only *Htr2b*^{5-HTKO} mice displayed earlier depressive-like vulnerability, whereas *Htr2b*^{μgliaKO} mice responded as control mice with the same time-course as *Htr2b*^{+/+} mice. Finally, we show that re-expression of the 5-HT_{2B} receptor in raphe 5-HT neurons of *Htr2b*^{5-HTKO} mice is sufficient to lower corticosterone levels. Overall, these findings point to a selective role for 5-HT via 5-HT_{2B} receptors expressed by serotonergic neurons in preventing depressive-like phenotype induced by social defeat stress by acting at stress axis and corticosterone regulation. These results represent valuable tools for the interpretation of molecular mechanisms underlying depressive disorders.

INTRODUCTION 903w

Psychiatric disorders are a leading cause of disability and have a huge societal and economic impact. Major depressive disorder (MDD) is perhaps the most common of all mental health illnesses currently thought to affect up to 10% of the population worldwide and it is associated with a development of serious medical conditions such as heart diseases, diabetes and stroke (Goyvaerts et al., 2016). Unlike a physiological and transient feeling of sadness or bad mood, MDD is persistent and can heavily interfere with daily activities of individuals, ranging from emotional dyscontrol to inability to manage social relationships (Krishnan and Nestler, 2008). Unfortunately, despite decades of intensive research, there is still an unmet need to understand biological factors and neurobiological mechanisms underlying the etiology of such a disease, in order to develop more effective treatments and novel tools for early diagnosis. Chronic stress has been identified as an important vulnerability factor in triggering psychiatric disorders, including MDD. Indeed, although stress response commonly promotes adaptive plasticity, it may become maladaptive and harmful when the response is overused or dysregulated, like under chronic stress conditions. Repeated exposure to social defeat in rodents is an ethologically relevant stressor, able to induce many features of depressive-like phenotype including anhedonia, anxiety, metabolic alterations, and social avoidance (Berton and Nestler, 2006) as well as an immunological activation characterized by microglia activation and cytokine production (Reader et al., 2015). Furthermore, a peculiar aspect of social defeat stress is its ability to continuously activate the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis over repeated defeated social confrontations (Koolhaas et al., 1997).

Evidence from several years of research on this topic implicated serotonin (5-HT) in the etiology of mood disorders, including MDD. In the past years, it has been proposed that components of neuroinflammation, particularly microglia activation, also actively contributes to depression. This hypothesis is supported by data showing a strong increase in microglia activation and recruitment in prefrontal cortex, hippocampus and thalamus in post-mortem brains of depressed patients who died from suicide (Schnieder et al., 2014; Torres-Platas et al., 2014). Behavioral alterations related to microglia activity are usually transient, but may be long-lasting if the microglia changes endure, for examples, in association with chronic psychological stress (Calcia et al., 2016; Brisch et al., 2017). Many of these findings are corroborated in preclinical studies conducted on animal models showing that stress induces neuroinflammation, through activation of resident microglia that, in turn, produces or exacerbates depressive-like behavior in agreement with the type and time-course of stress (Tynan et al., 2012; Wohleb et al., 2012; Hinwood et al., 2013; Kreisel et al., 2014; Lehmann et al., 2016; Tian et al., 2017; Tong et al., 2017). Indeed, exposure (1 to 5 weeks) to Chronic Mild Unpredictable Stress, Restraint Stress, or Social Defeat Stress leads to depressive-like behavior (namely, anhedonia and social withdrawal, as assessed by decreased sucrose preference and social exploration), increases plasma corticosterone levels and alterations in microglia density and morphology along a number of brain regions such as hippocampus, amygdala, prefrontal cortex and nucleus accumbens (Kopp et al., 2013; Kreisel et al., 2014; Wohleb et al., 2014; Milior et al., 2016).

Among the poorly explored candidate pathways able to underlie the relation between microglia and MDD is their interaction with the 5-HT system since the main 5-HT receptor expressed by microglia is the 5-HT_{2B} subtype (Kolodziejczak et al., 2015; Béchade et al., 2021). This interaction may be critical to mediate pathological phenotypes such as impulsivity (Bevilacqua et al., 2010), or hyperactivity and social deficit (Pitychoutis et al.,

2015). Furthermore, by using selective inactivation of the 5-HT_{2B} receptor gene, *Htr2b* in microglia (*Htr2b^{μgliaKO}*), we recently showed that this microglial 5-HT receptor was acting postnatally to limit adult inflammatory responses (Béchade et al., 2021). In another hand, *Htr2b^{-/-}* mice can develop depressive-like behaviors when socially isolated during four weeks, but are resistant to the effects of SSRI fluoxetine, including behavioral or plastic effects (Diaz et al., 2012; Diaz et al., 2016). Human genetic studies revealed that a loss-of-function polymorphism of *HTR2B* gene, Q20*, segregates with impulsive-aggressive behavior and suicidality (Bevilacqua et al., 2010). Furthermore, the *Htr2b* gene is expressed in serotonergic neurons acting as a positive autoreceptor as shown using mice lacking selectively this gene in 5-HT neurons (*Htr2b^{5-HTKO}*) (Belmer et al., 2018). Many studies suggested that the serotonergic system may contribute to the physiological and behavioral adaptation to chronic stress, including social defeat, in rodent models. In particular a single exposure to social defeat increases serotonergic neuronal activity, as evidenced by increasing in *c-fos* expression in the dorsal raphe nucleus (DRN), a brainstem region that provides the majority of serotonergic projection to forebrain areas implicated in mood regulation and depressive-like disorders (Paul et al., 2011; Ehlinger and Commons, 2019).

Although several evidences suggest a role for both serotonergic system and microglia to shape the behavioral and physiological phenotype of depression-induced by stress, the possibility for these two systems to interact and shape vulnerability to depression remains unexplored. In order to address this issue, we investigated the behavioral and biochemical depressive-like phenotype induced by chronic social defeat stress in mice, using three different genetic line in which 5-HT_{2B} receptors gene is invalidated in whole body or selectively in microglia or in serotonergic neurons. Our hypothesis was that: i) the inactivation of 5-HT_{2B} receptors may render mice more vulnerable to social defeat stress, and ii) this effect could be shaped by a dual role of 5-HT_{2B} receptors in microglia and serotonergic neurons.

Acknowledgements

We thank the Cell and Tissue Imaging Facility of the Institut du Fer à Moulin (namely Mythili Savariradjane and Xavier Marquès), where all image acquisitions and analyses have been performed, the staff of the IFM animal facility (namely Baptiste Lecomte, Gaël Grannec, François Baudon, Anna-Sophia Mourenco, and Eloise Marsan), and Imane Moutkine for precious help in molecular studies.

This work has been supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE16-0008, ANR-11-IDEX-0004-02), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ2014039529) and the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC-2019-19F10).

Author contributions

I.A., A.B., M.T.G., G.A, A.R., and L.M. designed and performed the studies. I.A., A.B., A. R. and L.M. wrote the manuscript, all authors revised it. G.A. performed tamoxifen administration. I.A. performed the stress experiments. A.B., M.T.G., G.A. performed immunofluorescence, image acquisition and analysis. I.A., A.B. A. R. and L.M. performed data analysis.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design and statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.01 software. Starting from our experience in previous publications from our lab (Diaz et al., 2012; Pitychoutis et al., 2015) or from others (Vincent and Jacobson, 2014; Sachs et al., 2015), we calculated the standard deviation of each group of animals for each test as well as the differences between the means of these groups. By setting the type I and II error risks at 5 and 20%, respectively, the size of the groups were determined by calculating the statistical power using the G*Power software version 3.1.9.6. To ensure reproducibility, when relevant, experiments are performed at least three times independently. To avoid litter bias in the mouse experiments, experimental groups are composed of animals from different litters randomly distributed using Graphpad software. All analyses were conducted with blinding to the experimental condition. Putative outliers were determined by the ROUT method. Data are presented as a scatter dot plot with bar, and the line at the mean $\pm$ S.E.M. (standard error of the mean). Comparisons between two groups following a normal distribution were analyzed using two-tailed unpaired t-test with or without Welch's correction. Normality was assessed using the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. All data normally distributed for more than two groups were examined by either ordinary or repeated measure two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* comparisons.

Animals

The full *Htr2b*^{-/-} knockout mice (129S2.Cg-*Htr2b*^{tm1Lum}/*Htr2b*^{tm1Lum} RRID:IMSR_EM:05936) were generated and maintained on 129S2 background (Nebigil et al., 2000). Wild-type 129S2 littermate mice were used as control. *Htr2b*^{fl/fl}, the *Htr2b* floxed mice (*Htr2b*^{tm2Lum}/*Htr2b*^{tm2Lum} RRID:IMSR_EM:05939), were generated as described (Doly et al., 2017; Belmer et al., 2018) with backcrossing on 129S2 background for >10 generations. *Htr2b*^{fl/fl} mice were inactivated for *Htr2b* in 5-HT neurons as previously described (Belmer et al., 2018) by crossing with 129S2. Cg-*Tg(Fev-cre)*^{1Esd}/0 (RRID:IMSR_JAX:012712 *ePet1-Cre* BAC transgenic mice or *Pet1-Cre*^{+/0}) (Scott et al., 2005) generating 129S2.Cg-*Pet1-Cre*^{+/0}; *Htr2b*^{fl}/*Htr2b*^{fl} conditional knockout mice in 5-HT neurons (*Htr2b*^{5-HTKO}) and littermate controls (*Htr2b*^{fl/fl}). *Cx3cr1*^{CreERT2/+} mice (RRID:MGI:5528845), which express tamoxifen-inducible Cre recombinase in microglia under the control of the endogenous *Cx3cr1* promoter, have been previously described (Parkhurst et al., 2013) and were backcrossed on 129S2 background (with *Htr2b*^{fl/fl} mice) for >10 generations. Along the procedure, only *Cx3cr1*^{CreER/+} males were used for breeding, generating *Cx3cr1*^{CreER/+}; *Htr2b*^{fl/fl} conditional knockout mice in microglia (*Htr2b*^{μgliaKO}) that were compared to *Cx3cr1*^{+/+}; *Htr2b*^{fl/fl} littermates after tamoxifen treatment of both genotypes.

All mice were bred at our animal facility. Food and water were available *ad libitum*. The temperature was maintained at 21 $\pm$ 1°C, under 12/12h light/dark. Mice were moved to the experimental room in their home cage at least 5 days prior to testing to allow for habituation to the environment. Male mice of 3 months reared two per cages for all experimental procedures have been used in this study. Behavioral tests and animal care were conducted in accordance with the standard ethical guidelines (National Institutes of Health's 'Guide for the care and use of Laboratory animals' and European Directive 2010/63/ UE). All experiments involving mice were approved by the local ethical committee, Ethical Committee for Animal Experiments of the Sorbonne University, Charles Darwin C2EA - 05 (authorizations

N°APAFIS#28228-2020111218058898 v4, APAFIS#10921-2017051211423050 v9, and 01170.02).

Tamoxifen treatment

Induction of Cre-mediated recombination was performed as in (Parkhurst et al., 2013). Briefly, tamoxifen (Sigma-Aldrich) was given to pups mice by intragastric injection as described in (Pitulescu et al., 2010) at a dose of 50 mg per day for 3 consecutive days between P1 and P5.

Stress Procedures

Social defeat stress is an ethologically relevant paradigm used to understand the physiological and behavioral adaptations to repeated stress in relation to psychiatric disorders vulnerability (Golden et al., 2011). In this paradigm, an aggressive CD-1 mouse of the same sex and age was introduced in the cage of experimental subjects as an intruder for daily sessions of 30 minutes at random time for 21 consecutive days. In each stress session, experimental mice were exposed to a new aggressive intruder to counteract any habituation to the aggressor. During the entire period the number of attacks (identified as bite done and/or received) shown by both intruder and resident mice was recorded. When experimental mice were repeatedly injured without any attempt of defense for a total of 15 attacks, the stress session was immediately stopped. The health status of the mice (fur states, body weight etc.) was daily evaluated by the experimenter and mice showing symptoms of distress were excluded from the study.

Behavioral phenotyping

All behavioral tests were carried out between 9:30 am and 4:30 pm before the daily stress session. Sucrose preference was assessed every day for the entire stress period and during a recovery period of 11 days without stress. Anhedonic response, splash test, social interaction, body weight and plasma corticosterone levels, were measured before stress as basal condition, during stress period at 7, 14 and 21 days, and after 11 days of recovery without stress.

Sucrose preference test

To assess anhedonia behavior (i.e. incapacity to experience pleasure in response to positive stimuli, considered as a symptom of depression) mice were exposed to two bottles containing either water or a 4% sucrose solution, both freely available 24/24 h. Water and sucrose solution were renewed every day. Bottles position was switched every day in order to balance the effect of side preference in drinking behavior. Before starting the stress procedure, mice were trained for 10 days to reach the criterion of preference (75%) in order to avoid any differences due to the basal preference variability. Liquid consumption was monitored on a daily basis by weighing the bottles. Food was freely available. Sucrose preference was determined as follows: $(\text{sucrose solution consumed} / \text{sucrose solution consumed} + \text{water consumed}) \times 100$. For this test, it has been considered the total amount of liquid intake by both mice present in the cage, thus each cage has been treated as a statistic unit. This in order to have a daily index of anhedonic response, but avoiding in another hand to keep the mice in isolation for long time, producing an uncontrolled effect on depressive-like phenotype by isolation stress.

Splash test

The splash test, pharmacologically validated, demonstrates that chronic stress decreases grooming behavior (Spruijt et al., 1988; David et al., 2009; Denmark et al., 2010), a form of motivational and self-care behavior considered to parallel with some symptoms of depression (Kalueff et al., 2007). In this test, each mouse was sprayed with a 10 % sucrose solution on their back in their home cage. The sucrose solution dirties the coat and induces grooming. As it is an organized behavior, it is possible to describe different levels of fur state depending on whether the hairs remain stuck together on the rear, the neck, and/or the middle of the back and to assign them a specific score. A manipulator blind to the experimental conditions scored the fur state at different time points after the sucrose splash (after 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes and after 24 hours). Scores went from 3 –i.e. maximum amount of sucrose, observed just after splashing- to 0 -no sucrose left, fur as clean as before the sucrose splash.

Social interaction

Each experimental mouse was individually transferred in a novel cage. After 15 min of habituation, an unfamiliar juvenile mouse (7 weeks old) of the same sex and strain, used as a social stimulus, was introduced in the cage for 10 minutes. The number of juveniles was chosen in agreement with the total number of social encounters in order that each experimental mouse never meet the same juvenile. The total amount of social investigation in both frequency and duration has been measured. Social investigation was defined as the following behavioral patterns: anogenital sniff (sniffing the anogenital area of the partner); nose sniff (sniffing the head and the snout region of the partner); body sniff (sniffing any other area of the body of the partner); allogrooming (grooming the partner). Behavior was video recorded and scored by a blinded investigator using a video-tracking commercial system Top Scan (Clever System) and the free event recorder JWatcher software (Blumstein & Daniel <http://www.jwatcher.ucla.edu/>)

Body Weight

Mice were weighted at the same time (between 10:30 and 11.30 am) for each time point. As absolute weight loss significantly correlates with initial weight (data not shown), weight variation has been expressed as percentage of initial weight for a better accuracy.

Blood collection for Corticosterone analyses

Blood was collected from the tail between 8 and 10 am during the light phase. The bleeding procedure consisted in a small and superficial cut in the tail. Blood samples were collected individually in heparin-coated tubes (Sarstedt, Germany). All samples were kept on ice and later centrifuged at 3000 rpm for 15 min at + 4 °C. Blood plasma was transferred to Eppendorf tubes for corticosterone determination and stored at -80 °C until further analysis. Corticosterone levels were measured by a high-sensitivity ELISA kit (Enzo Life Sciences) following the manufacturer's instructions.

Brain Slice Preparation

Mice were sedated with a sublethal dose of pentobarbital, perfused transcardially with 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer (PB), then their brains were collected and immersed in 4%

PFA overnight, cryoprotected overnight in 30% sucrose in PB, and sectioned sagittally or coronally at 30 or 50 μm with a cryotome (MICROM HM 450, Thermo SCIENTIFIC).

Immunofluorescence for Iba1

Brain slices (30 μm) were washed one time in PB then incubated in permeabilizing and blocking solution (0.25% gelatin and 0.1% triton in PB) for 30 min. Primary antibodies (Rabbit anti-Iba1, Wako, Japan, 1:600) were diluted in PGT buffer (0.125% gelatin and 0.1% triton in PB). Samples were incubated for 24h at 4°C with gentle agitation. After rinsing three times with PGT 0.125% buffer, secondary fluorochrome-conjugated antibodies (goat anti-rabbit-Alexa488, Jackson Laboratories) were added in PGT buffer for 3.5h at room temperature. After rinsing three times with PGT 0.125% buffer and once with PB, sections were mounted in Mowiol with bis-benzimide (1:2000, Sigma). Samples were imaged using a Leica DM 6000B fluorescent microscope. Microglial density quantification expresses as number of Iba1+ cells, was performed on 10×images acquired on sagittal slices of Prefrontal Cortex (PFC), Dentate Gyrus (DG), Hippocampus (HP) and Basolateral Amygdala (BLA). The counting of microglia (as Iba1+ cells) has been done by the spot detector Icy software (de Chaumont et al., 2012). Microglia density has been determined by reporting the number of microglia Iba1+ in the ROI (region of interest) defined on each single image.

Immunofluorescence for *c-fos*

Immunofluorescence processing was performed on floating brain slices (50 μm) after a 60-min period of incubation in a block solution (0.05% BSA and 0.3% triton in PB). 5-HT neuron and *c-fos* co-labeling was detected by incubation in primary antibody for tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) and *c-fos* (Sheep anti-Tph2, from Millipore 1:1000 and Rabbit anti-*c-fos*, from Abcam 1:2000) diluted in blocking solution for 48h at 4°C with gentle agitation. After rinsing five times with PB-0.3% triton buffer, secondary fluorochrome-conjugated antibodies (donkey anti-goat-Alexa488, Jackson Laboratories; 1:500 and donkey anti-rabbit Cy3, Jackson Laboratories, 1:500) were added in blocking solution for 2h at room temperature. After rinsing three times with PB-0.3% triton buffer and once with PB, sections were mounted in Mowiol with bis-benzimide (1:2000, Sigma). Samples were imaged using a Leica DM 6000B fluorescent microscope. *c-fos* quantification expressed as number of *c-fos*+ cells, was performed on 10×images acquired on coronal slices of Prefrontal Cortex (PFC), Hippocampus Dentate Gyrus (DG) and CA1, and Basolateral Amygdala (BLA). The counting of *c-fos*+ cells has been done by the spot detector Icy software (de Chaumont et al., 2012), determined by reporting the number of *c-fos*+ in the ROI (region of interest) defined on each single image.

Quantification of *c-fos* in serotonergic neurons in DR

To assess the proportion of serotonergic/*c-fos* positive neurons in the subregions of the dorsal raphe nuclei, we categorized each slide as the rostral, median or caudal raphe according to previous studies (Commons, 2008) and the Mouse Brain Atlas as a reference (Paxinos and Franklin, 2001). For each part of the raphe, we identified the dorsal and the ventral part, plus the lateral wings for the median raphe. For each mouse brain, every third section was analyzed throughout the raphe (from the rostral to the caudal part). Tph2 staining was used for control mice (*Pet1cre*^{-/-}; *Htr2b*^{flox/flox}; RCE), whereas GFP was used as a reporter of 5-HT neurons for *Htr2b*^{5-HTKO} mice. Samples were imaged using a Leica DM 6000B fluorescent

microscope with 10x objective. Only neurons that were Tph2 (or GFP) and *c-fos* positive cells were counted manually using the double staining on ImageJ.

Antibodies

Primary

Species	Antigen	Conc	Company	Cat#	RRID
rabbit	Iba1	0.0013 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	FUJIFILM Wako	019-19741	AB_839504
rat	CD68	0.002 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Bio-Rad	MCA1957	AB_322219
rabbit	<i>c-fos</i>	0.001 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Abcam	ab190289	AB_2737414
sheep	Tph2		Millipore	AB1541	AB_90754

Secondary

Species	Antigen	Label	Conc	Company	Cat#	RRID
donkey	Rabbit IgG	Cy3	0.002 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Jackson Labs	11-165-152	AB_2307443
donkey	Rabbit IgG	AF488	0.002 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Mol Probes	A-21206	AB_2535792
donkey	Rat IgG	Cy3	0.002 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Millipore	AP189C	AB_92645
donkey	GoatIgG	AF488	0.003 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Jackson Labs	705-545-147	AB_2336933

Viral constructs and stereotaxic injection

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (150 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (Sigma-Aldrich Co., MO, USA), and thermoregulation was provided through a thermostat-regulated heating pad and monitored through a rectal thermometer. To express HA-tagged 5-HT_{2B} receptor specifically in 5-HT neurons, we use a double floxed inverse orientation (DIO) adeno-associated virus (AAV) construct that allows Cre-mediated expression of the transgene (pAAV-EF1A-DIO-WPRE-pA vector; Addgene). The viruses packaged into AAV2.9 serotype with titers of 10^{12} – 10^{13} viral particles/ml were obtained (UNC Vector Core, Chapel Hill, NC, USA). AAV2.9 DIO-TdTomato was used as a control. AAVs were injected in the B7 raphe nuclei of *Pet1-GFP* mice following described procedure (Muzerelle et al., 2016; Belmer et al., 2018). After surgery, mice were monitored in an incubator at a controlled temperature and were treated with antibiotic for prevention of post-operative infection. To assess the right site injection of the tagged HA-5-HT_{2B}-R construction, we performed immunostaining as previously described (Benhadda et al., 2021) using a primary antibody against HA (Millipore).

GR and CRH expression in Raphe, PFC, Hippocampus, PVN, pituitary and adrenal glands

WT and *Htr2b*^{-/-} mice in basal condition (2-month-old, age-matched) were killed by decapitation and their brains were immediately dissected out from the skull and frozen on dry ice. Microdiscs of tissue were punched out from frozen slices (500 μm thick) using a stainless-steel cylinder (1.4 mm diameter). Total RNA was isolated from punches using the RNeasy mini kit (Qiagen) and 500 ng of RNA from each punch were converted to cDNA. The first-strand cDNA was synthesized by reverse transcription of 2 μg of total RNA with Superscript-

II reverse transcriptase (Invitrogen, Illkirch, France). Reverse transcriptase was omitted in samples as negative controls. Primers were designed with PrimerBlast (NCBI; listed below). Relative expression levels of mRNAs were determined by real time RT-PCR using Absolute SYBR Green Mix (Thermoscientific) on a QuantStudio apparatus (Applied Biosystems). Efficiency of amplification for each primer pair was checked on a standard curve. Gene expression levels were normalized using the $2^{-\Delta C_t}$ method for *Nr3c1*, the gene that encodes GR, with reference gene *Hprt*, and *Crh* and *Pomc* with reference gene *Cyp*.

Nr3c1 5'-TGGAAGGACAGCACAATTACCTTTG-3'; 5'-AGACTCCTGCAGTGGCTTGC-3'

Crh 5'-GGAGGCATCCTGAGAGAAGTC-3'; 5'-CATGTTAGGGGCGCTCTCTTC-3'

Pomc 5'-CCTCGTTTCTCTGCGCATCT-3'; 5'-TTCCACGTGTCAGGCCTAGT-3'

Hprt 5'-TGCTCGAGATGTCATGAAGG-3'; 5'-TATGTCCCCCGTTGACTGAT-3'

Cyp 5'-CCATCGTGTCATCAAGGACTT-3'; 5'-TTGCCATCCAGCCAGGAGGTC-3'

RESULTS 2822w

Mice completely lacking *Htr2b* gene develop earlier depressive-like phenotype induced by chronic social defeat stress.

To investigate the contribution of the *Htr2b* gene in the development of depressive-like phenotype induced by chronic social defeat stress, we used a validated behavioral battery of tests, investigating first the core symptom of depression in humans, anhedonia and self-care behavior, assessed through sucrose preference and splash test, respectively. Then, we considered some secondary symptoms of depression affecting social skills and body weight. The exposure to social defeat stress differentially affected sucrose preference in the two genotypes during the 21 days of stress. In particular, *Htr2b*^{-/-} mice showed a significant decrease in sucrose preference as early as the 1st day of stress exposure, ($p=0.0258$ vs. d0 *Htr2b*^{-/-} mice, $n=5$ cages-10 mice, and $p=0.0482$ vs. *Htr2b*^{+/+} d2 mice $n=6$ cages-12 mice, two-way RM-ANOVA; **Fig. 1B**). *Htr2b*^{+/+} mice required 10 days of stress before developing significant anhedonia ($p=0.0036$ at d10 compared to d0) (**Fig. 1C**) and thus *Htr2b*^{-/-} mice are more vulnerable to stress. It is important to notice that the two experimental groups showed no difference in sucrose preference during habituation and at baseline before stress, reaching both the criterion of preference up to 75% (**Fig. S1A-B**).

We investigated grooming behavior after sucrose splash, a test used in animal models of depression and anxiety as an index of self-care behavior (Surget et al., 2008; David et al., 2009). We performed this test 7, 14, and 21 days after initiation of social defeat stress, scoring fur coat state visually on a scale from 3 - maximum amount of sucrose remaining- to 0 - no sucrose left. This analysis revealed a significant reduction of grooming efficacy in *Htr2b*^{-/-} stressed mice at d7 and d14 compared to either stressed *Htr2b*^{+/+} mice or non-stressed control group of the same genotype ($p=0.0028$ at d7 20 min, and $p=0.0379$ at d7 30 min *Htr2b*^{-/-} vs. *Htr2b*^{-/-} mice, $n=10-12$ mice, two-way RM-ANOVA; **Fig. 1D-E**). A significant effect of stress in reducing grooming behavior was observed in both genotype compared to respective non-stressed control groups only at day 21 ($p<0.0001$ for *Htr2b*^{ugliaKO} and *Htr2b*^{flox/flox} mice 20 minutes after sucrose splash compared to non-stress control mice **Fig. 1F**).

The depressive pathology also unveils poor social skills, mainly as a consequence of a state of social withdrawal induced by a general anhedonic personality. Thus, we investigated the time spent by experimental mice in social interaction with a juvenile conspecific of the same sex in a neutral cage. As expected, the stress procedure reduced the time of social interaction in both genotypes. However, *Htr2b*^{-/-} mice showed a significant reduction in social interaction after 14 days of stress, whereas this effect was visible in *Htr2b*^{+/+} mice only after the last week of stress at 21 days ($p=0.0017$ and $p<0.0001$, $n=10-12$ mice, respectively **Fig. 1H**). Furthermore, it is important to notice that *Htr2b*^{-/-} mice showed a strong reduction in social interaction overall, considering the basal condition (d0) before stress ($p<0.0001$ at d0, $n=8$, **Fig. 1H-I**).

One of the widely reported effects of chronic stress is body weight loss, observed as well in some forms of depressive disorders. We thus measured the weight variation of *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} mice before and after 7, 14 and 21 days of stress. We observed a significantly longer weight loss in *Htr2b*^{-/-} than in *Htr2b*^{+/+} mice during the stress procedure. In particular, while, in *Htr2b*^{+/+} mice, the weight loss was significant only at 7 days of stress ($p<0.0001$, $n=10$ mice) that normalized at d21, in *Htr2b*^{-/-} mice, it persisted for the entire stress period ($p<0.0001$, $n=12$ mice **Fig. 1J-K**).

To ensure that all mice were exposed to similar amount of stress, we also recorded the number of attacks received for each experimental mouse, balancing the intruders according to their rate of aggressiveness. No difference could be detected in the number of attacks during the 21 days of stress period between genotype in each single day (**Fig. S1C**).

To understand if this earlier and stronger vulnerability to chronic social defeat stress in *Htr2b*^{-/-} mice was associated with a different capacity to recover from stress, we assessed the same phenotypes during a recovery period of 11 days without stress. Regarding sucrose preference, we observed that *Htr2b*^{+/+} mice returned to the criterion sucrose preference in 11 washout days without stress. By contrast, *Htr2b*^{-/-} mice only partially recovered at that time, constantly remaining below the criterion of sucrose preference and significantly different from *Htr2b*^{+/+} mice ($p < 0.0001$ from R6 to R11, $n = 6$ mice, **Fig. 1C**). Accordingly, *Htr2b*^{-/-} mice presented higher coat state index in the splash test on day recovery 11 (R11), compared to both *Htr2b*^{+/+} mice and control non-stress groups ($p < 0.0001$ at 20 min after splash, **Fig. 1G**). A similar effect was observed for social behavior, comparing the time of social investigation before stress (d0), on day 21 of stress (d21) and on day recovery 11 (R11) in the two genotypes (**Fig. 1I**). Once the stress procedure was stopped, mice from both genotypes were able to recover from the body weight loss. However, the gain of body weight was slower in *Htr2b*^{-/-} mice compared to *Htr2b*^{+/+} mice and control non-stress groups ($p = 0.027$ and $p = 0.0102$, $n = 6$, **Fig. 1K**).

Clinical evidence indicates that, in depressed patients, emotional arousal and vulnerability to stress are associated with a hyperactive hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (de Kloet et al., 2008). We thus measured plasma corticosterone levels before and after 7, 14 and 21 days of stress as well as on recovery d11. The increase in corticosterone due to the stress was statistically significant in *Htr2b*^{-/-} mice starting from d7. By contrast, along stress procedure, two weeks were needed to induce a significant corticosterone increase in *Htr2b*^{+/+} mice. Although the effect of stress was visible in both genotype with an increase for each time point, corticosterone levels in *Htr2b*^{-/-} mice was overall higher compared *Htr2b*^{+/+} mice ($p < 0.0001$ at d14 and d21 vs. *Htr2b*^{+/+} mice, $n = 6$ mice; **Fig. 1K**). Furthermore, during the eleven days of recovery without stress, the corticosterone levels remained increased in *Htr2b*^{-/-} mice, while in *Htr2b*^{+/+} mice, corticosterone levels went back to basal condition ($p < 0.0001$ at R11 vs. *Htr2b*^{+/+} mice, $n = 6$ mice; **Fig. 1L**). To better understand the HPA axis activity in both genotypes, we considered corticosterone values before stress in an independent analysis. We found significantly higher corticosterone basal levels in *Htr2b*^{-/-} mice compared *Htr2b*^{+/+}, suggesting a hyperactivity of HPA axis in *Htr2b*^{-/-} mice already in physiological basal condition (Welsch's t-test, $p = 0.0004$, $n = 14$, **Fig. 1M**).

The basal expression of GR, POMC, and CRH is modulated in *Htr2b*^{-/-} mice.

Glucocorticoid levels are known to alter DRN expression of tryptophan hydroxylase 2 mRNA (*tph2*) levels as well as many other effectors in various brain regions. We therefore investigated putative consequences of the permanent elevated levels of corticosterone in *Htr2b*^{-/-} mice. For this purpose, we used punches from brain slices of WT and *Htr2b*^{-/-} mice in basal condition to isolate RNA from various brain areas involved in stress response. Relative expression levels of mRNAs were determined by real time RT-PCR for genes that encode GR, *Nr3c1*, *Crh* and *Pomc*. This experiment revealed that *Nr3c1* gene was down-regulated in PFC ($p = 0.0199$; $n = 8$), Hippocampus (trend, $p = 0.073$), raphe ($p = 0.404$), and paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) ($p = 0.0315$) and upregulated in pituitary gland (PG)

($p=0.0456$) whereas *Pomc*, the precursor encoding ACTH, was downregulated in pituitary gland ($p=0.0367$) and *Crh* was unchanged in PVN (**Fig. 2A-I**).

The role of neuroinflammation and particularly of microglia activation in depressive-like phenotypes induced by stress, has been increasingly recognized (Calcia et al., 2016; Tian et al., 2017). According to literature, an increase in microglia density, can be detected after twenty-one days of stress in different brain regions involved in depression. Although we reproduce this increase in microglia density in these brain regions, we did not find significant differences between genotype (**Fig. S2A-D**), suggesting that the microgliosis observed was a direct effect of the stress exposure, rather than a factor triggering depressive-like phenotype mediated by 5-HT signaling defects.

These experiments support a dysregulation of several aspects of the stress axis in the complete absence of 5-HT_{2B} receptors.

Depressive-like phenotype displayed by *Htr2b*^{-/-} mice is independent from the action of 5-HT_{2B} receptors in microglia

In order to investigate putative role of 5-HT in microglia activation associated to depressive phenotype induced by chronic social defeat stress, we generated a conditional knock out mouse, in which 5-HT_{2B} receptors were invalidated only in microglia (*Htr2b*^{μgliaKO}) (Béchéde et al., 2021), that we tested on the same social stress protocol. Interestingly, we found that *Htr2b*^{μgliaKO} mice responded to social defeat stress with the same time course as control *Htr2b*^{flox/flox} mice, developing a depressive-like phenotype between the second and third week of stress. In the sucrose preference test, no genotype differences were detected during the ten days of sucrose habituation (**Fig. S3A-B**). As well, during the stress period, a decrease in sucrose preference below the criterion of preference started at d8 of stress for both genotypes (**Fig. 3A**), with a similar recovery curve over the 11 days without stress (**Fig. 3B**).

The effect of stress on self-care behavior in splash test, did not reveal any difference between genotypes at d7 and d14, with statistical difference for both genotype appearing only at d21 vs. non-stressed control mice ($p<0.0001$ for *Htr2b*^{μgliaKO} and *Htr2b*^{flox/flox} mice from 7 to 20 minutes after sucrose splash compared to non-stress control mice **Fig. 3C-F**).

With regard to social interaction, it is interesting to note that, like full *Htr2b* knock-out mice, *Htr2b*^{μgliaKO} mice showed a decrease in the time spent socially investigating conspecific juveniles overall, compared to *Htr2b*^{flox/flox} control mice ($p<0.0001$ at d0, $n=8$, **Fig. 3G-H**). However, stress reduced social interaction duration after 14 and 21 days in *Htr2b*^{flox/flox} ($p=0.0003$, $n=8$) or *Htr2b*^{μgliaKO} ($p=0.0047$, $n=8$) mice, respectively (**Fig. 3G**). During the recovery period without stress the two-genotype showed the same time-course, although the decrease of social interaction in *Htr2b*^{μgliaKO} mice was still detected, compared to *Htr2b*^{flox/flox} ($p<0.0001$ at d0, **Fig. 3H**).

In agreement with sucrose preference, an effect of stress was found in body weight loss, affecting similarly *Htr2b*^{μgliaKO} and *Htr2b*^{flox/flox} mice (**Fig. 3I**). When the stress was stopped the recovery curve of body weight was identical for the two genotypes (**Fig. 3J**).

We also measured the total number of attacks received by intruder for each mouse during each single day, finding no differences between *Htr2b*^{μgliaKO} and *Htr2b*^{flox/flox} mice (**Fig. S3C**). This behavioral phenotype was associated with a similar profile regarding plasma corticosterone. Both genotypes showed increased levels of corticosterone under stress condition (**Fig. 2K**), rescued during eleven days without stress (**Fig. 3L**). No difference between *Htr2b*^{μgliaKO} and *Htr2b*^{flox/flox} mice was detected in basal corticosterone (**Fig. 3M**).

The restricted lack of *Htr2b* selectively to serotonergic neurons leads to increased susceptibility to behavioral depressive-like vulnerability.

Serotonin neurons have long been recognized as key contributors in mood regulation being the target of SSRI antidepressants. Furthermore, we have recently demonstrated that *Htr2b* gene is expressed in serotonergic neurons and 5-HT_{2B} receptors act as positive autoreceptors (Belmer et al., 2018). To better understand the contribution of this receptor to serotonergic system in stress regulation, we generated a mouse strain in which *Htr2b* gene was inactivated selectively in Pet1-positive serotonergic neurons (*Htr2b*^{5-HTKO}) (Belmer et al., 2018). We found that removing 5-HT_{2B} receptors only from serotonergic neurons, although all mice developed a clear sucrose preference during habituation (**Fig. S4A-B**), *Htr2b*^{5-HTKO} mice showed a significant decrease in sucrose preference after the 2nd day of stress exposure, ($p=0.0007$ vs. d0 *Htr2b*^{5-HTKO} mice, $n=4$ cages-8 mice, and $p=0.0032$ vs. *Htr2b*^{flx/flx} d3 mice, two-way RM-ANOVA; **Fig. 4A**). Furthermore, sucrose preference remained significantly lower in *Htr2b*^{5-HTKO} mice compared to *Htr2b*^{flx/flx} control during the eleven recovery days without stress ($p<0.0001$ vs. *Htr2b*^{flx/flx} mice, from R5 to R11, $n=8$, two-way RM-ANOVA; **Fig. 4A**). Again, no difference could be detected in the number of attacks during the 21 days of stress period between genotypes in each single day (**Fig. S4C**).

Splash test revealed a significant reduction of grooming efficacy in *Htr2b*^{5-HTKO} mice stressed mice at d7 and d14 compared to either stressed *Htr2b*^{flx/flx} mice or non-stressed control group of the same genotype ($p<0.0001$ at d7 20 min, and $p=0.0013$ at d14 30 min in *Htr2b*^{5-HTKO} mice compared to *Htr2b*^{flx/flx} mice, $n=8$ mice, two-way RM-ANOVA **Fig. 4C-D**). The effect of stress was similar for both genotypes only on d21 (**Fig. 4E**). Accordingly, *Htr2b*^{5-HTKO} still maintained self-care impairment at recovery d11 (R11) ($p<0.0001$ at 10 to 20 min after sucrose splash, $n=8$, **Fig. 4F**).

Regarding to social behavior, we again found a general impairment in social investigation in *Htr2b*^{5-HTKO} mice, further affected by stress, mice showed a significant reduction in social interaction after 14 days of stress, whereas this effect was visible in *Htr2b*^{flx/flx} mice only after the last week of stress at 21 days ($p=0.0016$ d0 vs. d14 in *Htr2b*^{5-HTKO} mice, and $p=0.0017$ d0 vs. d21 in *Htr2b*^{flx/flx} mice $n=8$ mice, two-way RM-ANOVA **Fig. 4G**). These deficits were still visible in *Htr2b*^{flx/flx} mice after eleven days of recovery without stress (**Fig. 4H**).

A stronger decrease in body weight during social defeat stress in *Htr2b*^{5-HTKO} mice, compared to *Htr2b*^{flx/flx} control, was found as well as the slower recovery once stress was stopped: while, in *Htr2b*^{flx/flx} mice, the weight loss was significant only at 7 days of stress that normalized at d21, in *Htr2b*^{5-HTKO} mice, it persisted for the entire stress period ($p=0.0365$ at d14 and $p<0.0001$ at p21 vs. *Htr2b*^{flx/flx} mice **Fig. 4I-J**).

Stress procedure affected plasma corticosterone in both genotype; however, the increase in corticosterone was higher in *Htr2b*^{5-HTKO} compared to *Htr2b*^{flx/flx} mice for all the stress period ($p<0.0001$ $n=6-8$, **Fig. 4L**). Furthermore, *Htr2b*^{5-HTKO} mice did not recover completely after eleven days without stress as control mice (**Fig. 4L**) and showed significantly higher corticosterone levels also in basal condition before stress (Welsch's t-test, $p=0.0087$, $n=6-8$, **Fig. 4M**).

Therefore, removing 5-HT_{2B} receptors only from serotonergic neurons, was enough to produce a phenotype of higher vulnerability to social defeat stress observed in *Htr2b*^{-/-} mice.

***c-fos* activation after stress**

Variations in *c-fos* expression is a reliable marker of neuronal activation. First to determine if *Htr2b* genotype modifies stress-induced *c-fos* expression within specific brain regions known to be responsive to social defeat experience, we examined stress-induced *c-fos* overexpression. The *c-fos* immunoreactivity was quantified as the number of *c-fos* positive cells observed on coronal slices from various brain regions 90 minutes after a single exposure (acute) to social defeat stress. The number of *c-fos*⁺ cells was found significantly elevated after stress without significant difference between *Htr2b*^{fl^{ox}/fl^{ox}} control mice and *Htr2b*^{5-HTKO} mice in para-ventricular nucleus of the thalamus (PVT) and hypothalamus (PVN), Hippocampus CA1 region, Basolateral Amygdala (BLA), or Prefrontal Cortex (PFC) using the spot detector Icy software (de Chaumont et al., 2012); only the dentate gyrus was not significantly overexpressing *c-fos* after stress (**Fig. 5A-E**)

To determine in detail if *Htr2b* genotype can alter *c-fos* expression within raphe nuclei known to be responsive to stress experience, we examined social stress-induced *c-fos* expression. The *c-fos* quantification, expressed as the number of *c-fos*⁺ cells, was performed on coronal slices of raphe nuclei. The counting of *c-fos*⁺ cells was determined by reporting the number of *c-fos*⁺ and Tph2⁺/GFP neurons in the ROI (region of interest) defined on each single image. Interestingly, the lack of 5-HT_{2B} receptor expression in the Pet1⁺ neurons was sufficient to change the pattern of activation of *c-fos* with raphe nuclei (**Fig. 5G-P**). At basal levels (without stress), there was a smaller number of *c-fos*⁺/5-HT neurons, reflecting a reduced basal activity of the 5-HT system for each region analyzed; we found a general trend of lower *c-fos*⁺/5-HT neurons from the rostral to the caudal raphe in *Htr2b*^{5-HTKO} mice brain compared to the control group. This may reflect an hypoactivity of the 5-HT neurons in conditional knock-out mice. After one session of social defeat stress, the amount of *c-fos*⁺/5-HT neurons was significantly increased especially in the medio-dorsal, lateral wings, and dorso-caudal parts of the raphe of the control group. In *Htr2b*^{5-HTKO} mice, the level of *c-fos*⁺/5-HT neurons was not significantly increased after stress, reaching the activation level of the control group at basal conditions (except in the rostro-dorsal part) (**Fig. 5G-P**).

Selective re-activation of 5-HT_{2B} in Raphe nucleus in *Htr2b*^{5-HTKO} partially rescues corticosterone levels in basal condition

In order to firmly establish if the role of 5-HT_{2B} receptors in raphe nuclei was sufficient to modulate HPA activity, we selectively re-expressed 5-HT_{2B} receptors into the Raphe nucleus using local raphe-expression in 3 weeks stressed *Htr2b*^{5-HTKO} mice with an adeno-associated viral (AAV) vector. This virus allowed Cre-mediated selective expression in 5-HT neurons (Pet1-positive) of either *Htr2b* or TdTomato as control, by bilateral stereotactic surgery during recovery phase following a full social defeat stress episode. Three weeks later, we obtained an effective expression of the viral vector. We found that corticosterone levels were better recovered in *Htr2b*^{5-HTKO AAVHtr2b} compared to *Htr2b*^{5-HTKO AAVTdTomato} supporting that the expression of 5-HT_{2B} receptors in Pet1⁺ neurons is sufficient to revert the effect of chronic stress on corticosterone regulation. (**Fig. 6A-B**).

DISCUSSION 1069_w

In the present work, we demonstrate that expression of 5-HT_{2B} receptors in 5-HT neurons is required to slow down the appearance of depressive-like phenotype triggered by chronic social defeat stress. In particular, we found that mice with an inactivation of *Htr2b* gene in either the whole organism or selectively in serotonergic neurons, are affected by chronic social defeat stress earlier than control mice. Depressive-like phenotype was revealed by increased anhedonia and impairment of self-care behavior since the early beginning the first week of stress exposure in these mutant mice. In addition, these mice exhibit deficits in body weight and social behavior in response to social defeat stress earlier than control mice. These phenotypes are associated with higher plasma levels of corticosterone during stress. As well, corticosterone is elevated in basal condition, reflecting alterations in the HPA axis in these mice. It is interesting to note that the recovery time was slower in either *Htr2b*^{-/-} or *Htr2b*^{5-HTKO} mice, compared to their control groups, during eleven days post stress. These behavioral and physiological phenotypes of higher vulnerability to social defeat stress, were not observed when *Htr2b* gene inactivation was performed selectively in microglia, suggesting that the underlying mechanism is independent of putative effect of 5-HT on microglia (Kolodziejczak et al., 2015; Béchade et al., 2021), but is only mediated by the action of 5-HT_{2B} receptors in serotonergic neurons (Belmer et al., 2018).

Previous data from our group (Diaz et al., 2016) showed the development of a depressive-like phenotype in *Htr2b*^{-/-} mice after four weeks of social isolation stress that was resistant to treatment by SSRIs. Here, we have further found a faster kinetic for the development of depressive-like phenotypes induced by stress. The social deficit already existing in basal condition in these mice only partially explains the faster response of *Htr2b*^{-/-} mice to social defeat stress compared *Htr2b*^{+/+} control group, since, *Htr2b*^{ugliaKO}, that exhibit similar social impairment, develop similar depressive-like behavior with the same time course as control mice. *Tph2*^{-/-} mice, similarly display stronger response to stress (Brivio et al., 2018). These findings support the role of 5-HT transmission to protect from depressive-like phenotype induced by stress. It remained debatable whether variations in the endogenous 5-HT system affect mood and emotional function. On this issue, we recently showed that the absence of 5-HT_{2B} receptors in serotonergic neurons is associated with a higher 5-HT_{1A}-autoreceptor reactivity and thus a lower firing activity of these neurons. In agreement, mice with overexpression of 5-HT_{1A} autoreceptor show decreased neuronal activity and increased depressive-like behavior that is resistant to SSRI treatment (Richardson-Jones et al., 2010; Vahid-Ansari et al., 2017). Furthermore, social stress affects the 5-HT system as well. For example, the firing rate of DRN is increased in tree shrews during encounters, producing aggressive behaviors aimed to manage social hierarchy and achieve the dominant role (Walletschek and Raab, 1982). Social defeat has been also shown to increase *c-fos* mRNA levels in DRN (Kollack-Walker et al., 1999) as well as *c-fos* immunoreactivity in serotonergic neurons within selective subregions of the DRN (Paul et al., 2011), suggesting that the 5-HT cells activity in the DRN modulates coping strategy against social stress. On this issue, we have found that stress-induced *c-fos* overexpression is strongly affected by the lack of 5-HT_{2B} receptors in 5-HT neurons in DRN. This is reminiscent of earlier findings showing that swim stress the presence of 5-HT_{1A} receptor antagonist increases *c-fos* expression in raphe 5-HT neurons, especially in rostral raphe and lateral wings (Commons, 2008). Together with our findings, these data support that the lack of 5-HT_{2B} receptors

disrupts both 5-HT neuron activation and HPA-dependent feedback activation across the caudal to rostral raphe.

DRN have been shown to express GR, which, upon deletion, increases HPA activity induced by social defeat stress (Vincent and Jacobson, 2014). The HPA axis and the serotonergic neurotransmission system act on a reciprocal regulatory mechanism (Guiard et al., 2008). On one side, 5-HT signaling modulates HPA axis in the hippocampus, which provides upstream neuronal feedback on the activity of the HPA axis, and where the expression of the GR is altered by 5-HT signaling (Lai et al., 2003), as we found here in *Htr2b*^{-/-} mice. Serotonergic neurons also innervate the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus affecting the release of the corticotropin-releasing hormone (CRH), which in turns stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the pituitary gland. We found here in *Htr2b* KO mice that *Crh* mRNA expression is not affected in PVN. On the other side, CRH signaling as well as the activity of GR influence 5-HT synthesis, release and uptake (Fairchild et al., 2003). Here, we found that the lack of 5-HT_{2B} receptors downregulates GR mRNA expression in most of the analyzed brain regions except in the pituitary gland. In turn, the pituitary gland shows reduced *Pomc* expression. It is therefore tempting to conclude that 5-HT_{2B} receptors selectively expressed in 5-HT neurons are able to modulated stress axis via a control of raphe neurons activity.

The ultimate goal of understanding the pathophysiology of depressive disorders is to develop therapeutic interventions, which would rescue the behavioral phenotype by improving or restoring physiological brain activity. On this issue, we have found here, for the first time, that reintroducing *Htr2b* gene through a selective genetic intervention obtained by a stereotaxic-driven inoculation of AAV in the raphe nucleus of *Htr2b*^{5-HTKO} mice, rescued corticosterone levels after stress. Numerous and robust evidence suggest that the HPA axis system is implicated in MDD and other stress-related conditions. However, up to date, there is no specific drug targeting HPA axis components that is approved.

Conclusions and perspectives

The diagnostic criteria in MDD are currently based on behavioral symptoms rather than on molecular or neuroanatomical indicators. Thus, the development of mouse models recapitulating behavioral features of such disease is crucial to study the molecular bases underlying MDD etiology. However, since MDD is a heterogeneous disorder, resulting from a combination of genetic and environmental factors (Klengel and Binder, 2015), we should be careful when translating behavioral data from animal models to humans. Murine models can mimic only certain aspects of the complex MDD symptomatology, but may provide new hypotheses regarding the underlying cause of specific symptoms. Our results may be a first indication along this way, although future and more detailed investigations are required. Novel insights into disease mechanism could be a means for the design of targeted therapeutic treatments that, so far, are mainly based on drugs that mildly relieve depressive symptoms.

References

- Béchade C, D'Andrea I, Etienne F, Verdonk F, Moutkine I, Banas SM, Kolodziejczak M, Diaz S, Parkhurst C, B GW, Maroteaux L, Roumier A (2021) Serotonin 2B receptor instructs neonatal microglia to limit neuroinflammation and sickness behavior in adulthood. *Glia* 69:638-654.
- Belmer A, Quentin E, Diaz SL, Guiard BP, Fernandez SP, Doly S, Banas SM, Pitychoutis PM, Moutkine I, Muzerelle A, Tchenio A, Roumier A, Mameli M, Maroteaux L (2018) Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* 43:1623-1632.
- Benhadda A, Quentin E, Moutkine I, Chanrion B, Russeau M, Marin P, Levi S, Maroteaux L (2021) Serotonin 2B Receptor by Interacting with NMDA Receptor and CIPP Protein Complex May Control Structural Plasticity at Glutamatergic Synapses. *ACS Chem Neurosci* 12:1133-1149.
- Berton O, Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7:137-151.
- Bevilacqua L, Doly S, Kaprio J, Yuan Q, Tikkanen R, Paunio T, Zhou Z, Wedenoja J, Maroteaux L, Diaz S, Belmer A, Hodgkinson C, Dell'Osso L, Suvisaari J, Coccaro E, Rose R, Peltonen L, Virkkunen M, Goldman D (2010) A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468:1061-1066.
- Brisch R, Steiner J, Mawrin C, Krzyżanowska M, Jankowski Z, Gos T (2017) Microglia in the dorsal raphe nucleus plays a potential role in both suicide facilitation and prevention in affective disorders. *Eur Arch Psychiat Clin Neur* 267:403-415.
- Brivio P, Sbrini G, Peeva P, Todiras M, Bader M, Alenina N, Calabrese F (2018) TPH2 Deficiency Influences Neuroplastic Mechanisms and Alters the Response to an Acute Stress in a Sex Specific Manner. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11:389.
- Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD (2016) Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology* 233:1637-1650.
- Commons KG (2008) Evidence for topographically organized endogenous 5-HT-1A receptor-dependent feedback inhibition of the ascending serotonin system. *Eur J Neurosci* 27:2611-2618.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang J-W, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux J-P, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62:479-493.
- de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin J-C (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* 9:690-696.
- de Kloet ER, Karst H, Joëls M (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29:268-272.
- Denmark A et al. (2010) The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behavioural brain research* 208:553-559.
- Diaz SL, Narboux-Nême N, Boutourlinsky K, Doly S, Maroteaux L (2016) Mice lacking the serotonin 5-HT2B receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:265-279.
- Diaz SL, Doly S, Narboux-Nême N, Fernandez S, Mazot P, Banas S, Boutourlinsky K, Moutkine I, Belmer A, Roumier A, Maroteaux L (2012) 5-HT2B receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol Psychiatry* 17:154-163.
- Doly S, Quentin E, Eddine R, Tolu S, Fernandez S, Bertran-Gonzalez J, Valjent E, Belmer A, Viñals X, Callebert J, Faure P, Meye F, Hervé D, Robledo P, Mameli M, Launay J, Maldonado R, Maroteaux L (2017) Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses. *J Neurosci* 37:10372-10388.
- Ehlinger DG, Commons KG (2019) Cav1.2 L-type calcium channels regulate stress coping behavior via serotonin neurons. *Neuropharmacology* 144:282-290.

- Fairchild G, Leitch MM, Ingram CD (2003) Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 45:925-934.
- Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ (2011) A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 6:1183-1191.
- Goyvaerts L, Schraenen A, Schuit F (2016) Serotonin competence of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia*.
- Guiard BP, David DJ, Deltheil T, Chenu F, Le Maitre E, Renoir T, Leroux-Nicollet I, Sokoloff P, Lanfumey L, Hamon M, Andrews AM, Hen R, Gardier AM (2008) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:79-92.
- Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR (2013) Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cerebral Cortex* 23:1784-1797.
- Kalueff AV, Ren-Patterson RF, Murphy DL (2007) The developing use of heterozygous mutant mouse models in brain monoamine transporter research. *Trends in Pharmacol Sci* 28:122-127.
- Klengel T, Binder EB (2015) Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene × Environment Interactions. *Neuron* 86:1343-1357.
- Kollack-Walker S, Don C, Watson SJ, Akil H (1999) Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat. *J Neuroendocrinol* 11:547-559.
- Kolodziejczak M, Bechade C, Gervasi N, Irinopoulou T, Banas SM, Cordier C, Rebsam A, Roumier A, Maroteaux L (2015) Serotonin modulates developmental microglia via 5-HT_{2B} receptors: potential implication during synaptic refinement of retinogeniculate projections. *ACS Chem Neurosci* 6:1219-1230.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B (1997) The temporal dynamics of the stress response. *Neuroscience Biobehav Rev* 21:775-782.
- Kopp BL, Wick D, Herman JP (2013) Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiology & Behavior* 122:246-252.
- Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, Maier SF, Yirmiya R (2014) Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry* 19:699-709.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
- Lai M, McCormick JA, Chapman KE, Kelly PAT, Seckl JR, Yau JLW (2003) Differential regulation of corticosteroid receptors by monoamine neurotransmitters and antidepressant drugs in primary hippocampal culture. *Neuroscience* 118:975-984.
- Lehmann ML, Cooper HA, Maric D, Herkenham M (2016) Social defeat induces depressive-like states and microglial activation without involvement of peripheral macrophages. *J Neuroinflammation* 13:224.
- Milior G, Lecours C, Samson L, Bisht K, Poggini S, Pagani F, Deflorio C, Lauro C, Alboni S, Limatola C, Branchi I, Tremblay M-E, Maggi L (2016) Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain Behav Immun* 55:114-125.
- Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, Soiza-Reilly M, Gaspar P (2016) Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Br Struct Function* 221:535-561.
- Nebigil CG, Choi D-S, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay J-M, Maroteaux L (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9508-9513.
- Parkhurst C N, Yang G, Ninan I, Savas J N, Iii J RY, Lafaille J J, Hempstead B L, Littman D R, Gan W-B (2013) Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155:1596-1609.
- Paul ED, Hale MW, Lukkes JL, Valentine MJ, Sarchet DM, Lowry CA (2011) Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior* 104:272-282.

- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH (2010) Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 5:1518-1534.
- Pitychoutis P, Belmer A, Moutkine I, Adrien J, Maroteaux L (2015) Mice lacking the serotonin Htr2B receptor gene present an antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotype. *Neuropsychopharm* 40:2764-2773.
- Reader BF, Jarrett BL, McKim DB, Wohleb ES, Godbout JP, Sheridan JF (2015) Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. *Neuroscience* 289:429-442.
- Richardson-Jones JW, Craig CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2010) 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65:40-52.
- Sachs BD, Ni JR, Caron MG (2015) Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:2557-2562.
- Schnieder TP, Trencevska I, Rosoklija G, Stankov A, Mann JJ, Smiley J, Dwork AJ (2014) Microglia of prefrontal white matter in suicide. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:880-890.
- Scott MM, Krueger KC, Deneris ES (2005) A differentially autoregulated Pet-1 enhancer region is a critical target of the transcriptional cascade that governs serotonin neuron development. *J Neurosci* 25:2628-2636.
- Spruijt BM, Welbergen P, Brakkee J, Gispen WH (1988) An ethological analysis of excessive grooming in young and aged rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 525:89-100.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64:293-301.
- Tian L, Hui CW, Bisht K, Tan Y, Sharma K, Chen S, Zhang X, Tremblay M-E (2017) Microglia under psychosocial stressors along the aging trajectory: Consequences on neuronal circuits, behavior, and brain diseases. *Prog Neuro-Psychopharma Biol Psy* 79:27-39.
- Tong L, Gong Y, Wang P, Hu W, Wang J, Chen Z, Zhang W, Huang C (2017) Microglia Loss Contributes to the Development of Major Depression Induced by Different Types of Chronic Stresses. *Neurochem Res* 42:2698-2711.
- Torres-Platas SG, Cruceanu C, Chen GG, Turecki G, Mechawar N (2014) Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain, behavior, and immunity* 42:50-59.
- Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, Cairns MJ, Day TA, Walker FR (2012) A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav Immun* 26:469-479.
- Vahid-Ansari F, Daigle M, Manzini MC, Tanaka KF, Hen R, Geddes SD, Béique J-C, James J, Merali Z, Albert PR (2017) Abrogated Freud-1/Cc2d1a Repression of 5-HT_{1A} Autoreceptors Induces Fluoxetine-Resistant Anxiety/Depression-Like Behavior. *J Neurosci* 37:11967-11978.
- Vincent MY, Jacobson L (2014) Glucocorticoid receptor deletion from the dorsal raphe nucleus of mice reduces dysphoria-like behavior and impairs hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis feedback inhibition. *Eur J Neurosci* 39:1671-1681.
- Walletschek H, Raab A (1982) Spontaneous activity of dorsal raphe neurons during defensive and offensive encounters in the tree-shrew. *Physiology & Behavior* 28:697-705.
- Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP (2012) Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology* 37:1491-1505.
- Wohleb ES, McKim DB, Shea DT, Powell ND, Tarr AJ, Sheridan JF, Godbout JP (2014) Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biol Psychiatry* 75:970-981.

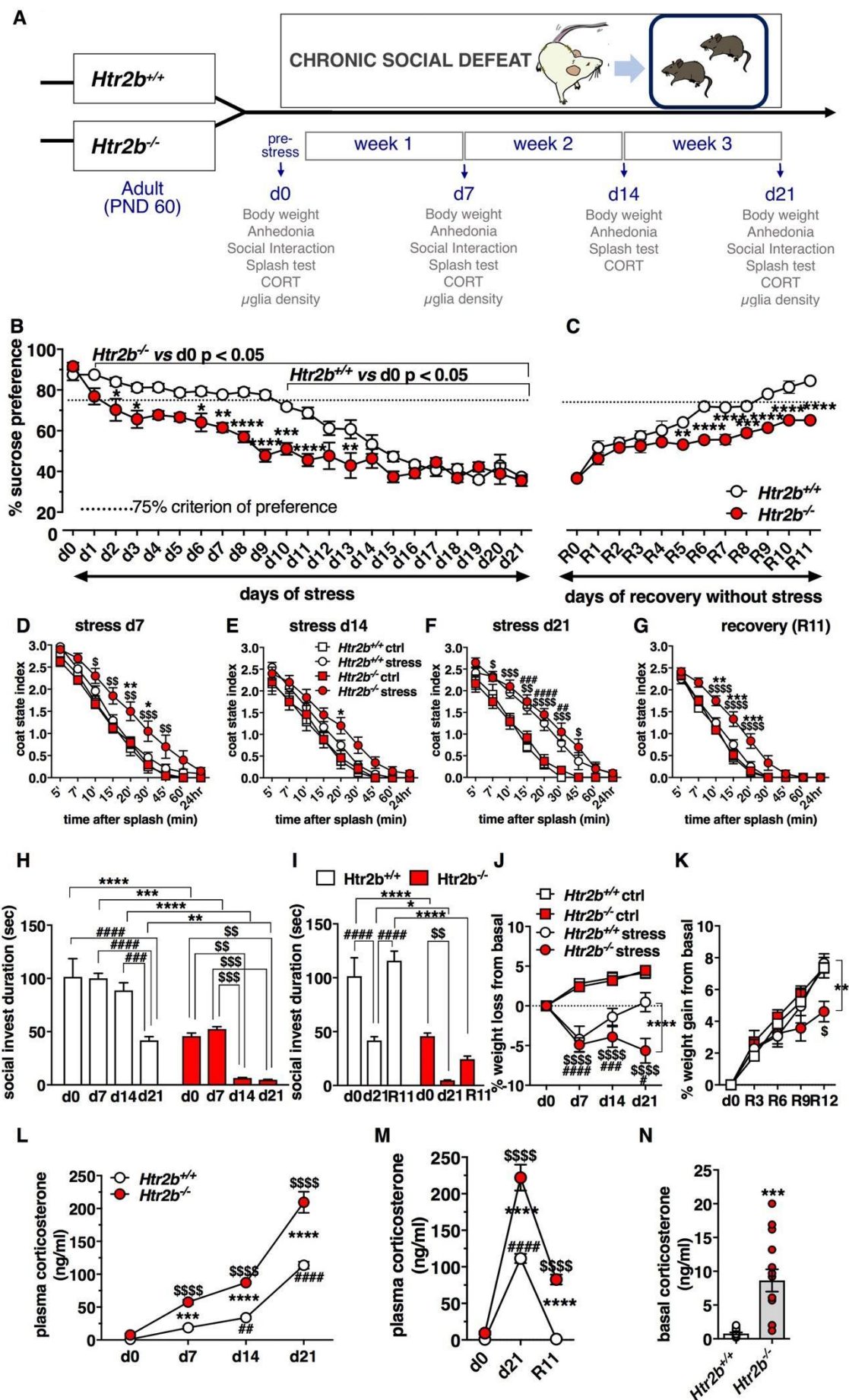


Figure 1. Mice totally lacking *Htr2b* develop depressive-like phenotype induced by chronic social defeat stress. (A) Timeline of the stress experiments. (B) Sucrose preference during 21 days of social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed an earlier reduction in sucrose preference compared to *Htr2b*^{+/+} mice (two-way RM-ANOVA, $F_{21,189} = 4.717$, $P < 0.0001$; $n = 6$ cages (12 mice) for *Htr2b*^{+/+} and $n = 5$ cages (10 mice) for *Htr2b*^{-/-}). (C) Sucrose preference during 11 days of recovery without social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice did not recovered compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($F_{11,44} = 4.884$, $P < 0.0001$); $n = 3$ cages (6 mice) for each group. (D-E-F-G) Coat state score after 7, 14, 21 days of stress and after 11 days of recovery. *Htr2b*^{-/-} mice showed an impairment in self-care behavior compared to *Htr2b*^{+/+} mice on d7, d14 and R11 (two-way RM-ANOVA $F_{24,336} = 2.220$, $P = 0.0010$; $F_{24,336} = 1.588$, $P = 0.0413$; $F_{24,336} = 4.564$, $P < 0.0001$; $F_{24,160} = 5.111$, $P < 0.0001$, at d7, d14, d21, and R11 respectively C, D, E, F; $n = 12-10$ mice for C-D-E and $n = 6$ mice for each group in F. (H) Social investigation during 21 days of social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed a general impairment in time spent in social interaction with a juvenile conspecific and were affected by social defeat stress after two weeks, compared to *Htr2b*^{+/+} mice, which were affected only at three weeks ($F_{3,80} = 3.183$, $P = 0.0283$); $n = 12-10$ mice. (I) Social investigation during 11 days of recovery without social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice did not increase time of social investigation after recovery, compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($F_{2,52} = 3.359$, $P = 0.0425$); $n = 6$ mice. (J) Body weight loss during 21 days of social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed a stronger reduction in body weight, compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($F_{9,120} = 13.02$, $P < 0.0001$); $n = 12-10$ mice. (K) Body weight gain during 11 days of recovery without social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed less body weight gain after 11 recovery days, compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($F_{12,80} = 2.913$, $P = 0.0022$); $n = 6$ mice. (L) Time course of plasma levels of corticosterone during 21 days of social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed higher increase in corticosterone, compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($F_{3,42} = 16.73$, $P < 0.0001$); $n = 8$ mice. (M) Plasma levels of corticosterone during 11 days of recovery without social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed slower reduction in corticosterone levels after recovery, compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($F_{2,20} = 23.86$, $P < 0.0001$); $n = 6$ mice. (N) Plasma levels of corticosterone at d0 before stress. *Htr2b*^{-/-} mice showed higher corticosterone levels also in basal condition, compared to *Htr2b*^{+/+} mice ($t\text{-test}_{13} = 5$), $P = 0.0004$; $n = 14$ mice. Data information: Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test and unpaired Welch's t-test. Data are means $\pm$ SEM. *, **, ***, **** $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed *Htr2b*^{-/-} vs. stressed *Htr2b*^{+/+}; \$, \$\$, \$\$\$, and \$\$\$\$ $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed *Htr2b*^{-/-} vs. *Htr2b*^{-/-} control; #, ##, ###, and #### $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively, stressed *Htr2b*^{+/+} vs. *Htr2b*^{+/+} control.

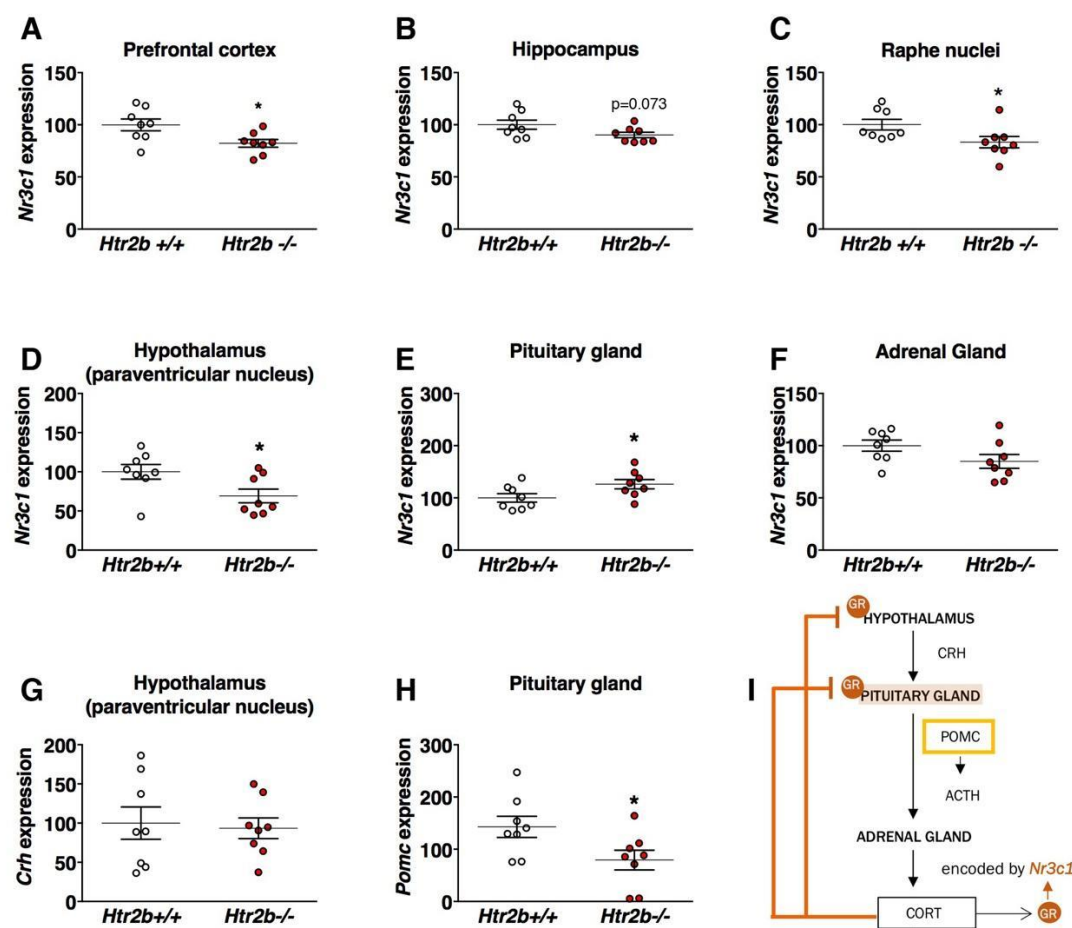


Figure 2. Total ablation of 5-HT_{2B} receptors modify stress axis.

Punches from brain slices of *Htr2b*^{+/+} and *Htr2b*^{-/-} mice in basal condition were used to isolate RNA from various brain areas involved in stress response. Relative expression levels of mRNAs were determined by real time RT-PCR for genes that encode GR, *Nr3c1*, and *Crh* and *Pomc*. (A-H) This experiment revealed that *Nr3c1* gene was down regulated in PFC (p=0.0199), Hippocampus (p=0.0734), raphe nucleus (p=0.0404), and paraventricular nucleus of the hypothalamus (p=0.0315) and upregulated in pituitary gland (p=0.0456), unchanged in the adrenal gland (p=0.0971) whereas *Pomc*, the precursor encoding ACTH was downregulated in pituitary gland (p=0.0367) and *Crh* was unchanged in PVN (p=0.791). (I) Summary of the relationships of the HPA axis. Data were analyzed by unpaired t-test; n=8.

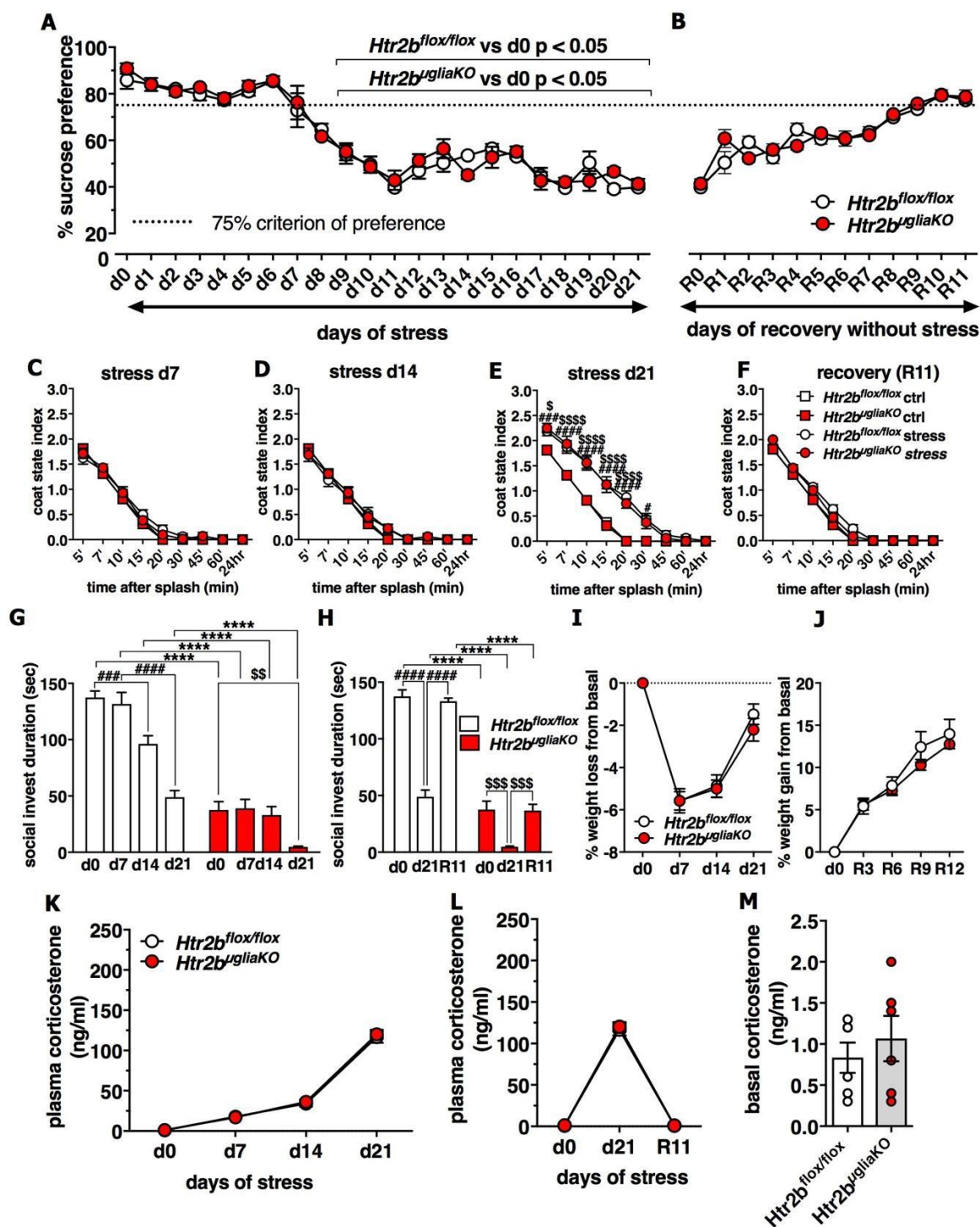


Figure 3. Chronic social stress-induced depressive-like phenotype is independent from the expression of 5-HT_{2B} receptors in microglia. (A-B) Sucrose preference during 21 days of social defeat stress (A) and during 11 days of recovery without stress (B). *Htr2b^{μgliaKO}* and *Htr2b^{flx/flx}* mice were affected to social defeat stress following the same time-course without significant effect of genotype (principal effect of stress $F_{21,126} = 68.05$ in A and $F_{11,66} = 49.53$, in B, $P < 0.0001$; $p < 0.05$ *Htr2b^{μgliaKO}* and *Htr2b^{flx/flx}* mice in each single time point vs. their own d0 in B; $n = 4$ cages -8 mice) for each group. (C-D-E-F) Coat state score after 7, 14, 21 days of stress and after 11 days of recovery. Social defeat stress affected both genotype only

on d21 (principal effect of stress at D7, $F_{8,216} = 547.9$, $P < 0.0001$, and at D14 $F_{8,224} = 454.3$, $P < 0.0001$; at D21 $F_{24,224} = 8.970$, $P < 0.0001$; at R11 $F_{24,224} = 1.858$, $P = 0.0110$; $n = 8$ mice for each group. **(G)** Social investigation during 21 days of social defeat stress. *Htr2b^{ugliaKO}* mice showed a general impairment in time spent to socially interact with a juvenile conspecific compared to *Htr2b^{flox/flox}* mice. Stress affected social behavior after two weeks in *Htr2b^{flox/flox}* mice and after three weeks in *Htr2b^{ugliaKO}* mice ($F_{3,42} = 8.244$, $P = 0.0002$); $n = 8$ mice. **(H)** Social investigation during 11 days of recovery without social defeat stress. Although basal social impairment was observed in *Htr2b^{ugliaKO}* mice compared to *Htr2b^{flox/flox}* mice, both showed the same rate recovery after social defeat stress ($F_{2,28} = 19.68$, $P < 0.0001$); $n = 8$ mice. **(I-J)** % of body weight loss/gain during 21 days of social defeat stress and during 11 days of recovery without social. Body weight of *Htr2b^{ugliaKO}* and *Htr2b^{flox/flox}* mice was affected in the same way by social defeat stress and recovery (Principal effect of Stress: $F_{3,43} = 102.2$, $P < 0.0001$ and $F_{4,56} = 137.9$, $P < 0.0001$ respectively in I and J); $n = 8$ mice for each group. **(K-L-M)** Plasma levels of corticosterone during 21 days of social defeat stress, during 11 days of recovery without stress and in basal condition before stress. *Htr2b^{ugliaKO}* and *Htr2b^{flox/flox}* mice responded in the same way to social stress and recovery in term of increased plasma corticosterone (K and L), no differences were found in basal condition (M) (Principal effect of Stress: $F_{3,30} = 542.9$, $P < 0.0001$ and $F_{2,20} = 688.9$, $P < 0.0001$; $t\text{-test}_{10} = 0.7$ $P = 0.4969$, respectively in K, L and M); $n = 6$ for each group. Data information: Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test and unpaired Student's *t*-test. Data are means $\pm$ SEM. *, **, ***, **** $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed *Htr2b^{ugliaKO}* vs. *Htr2b^{flox/flox}* mice; \$, \$\$, \$\$\$, and \$\$\$\$ $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed *Htr2b^{ugliaKO}* mice vs. *Htr2b^{ugliaKO}* control mice; #, ##, ###, and #### $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively, stressed *Htr2b^{flox/flox}* vs. *Htr2b^{flox/flox}* control mice.

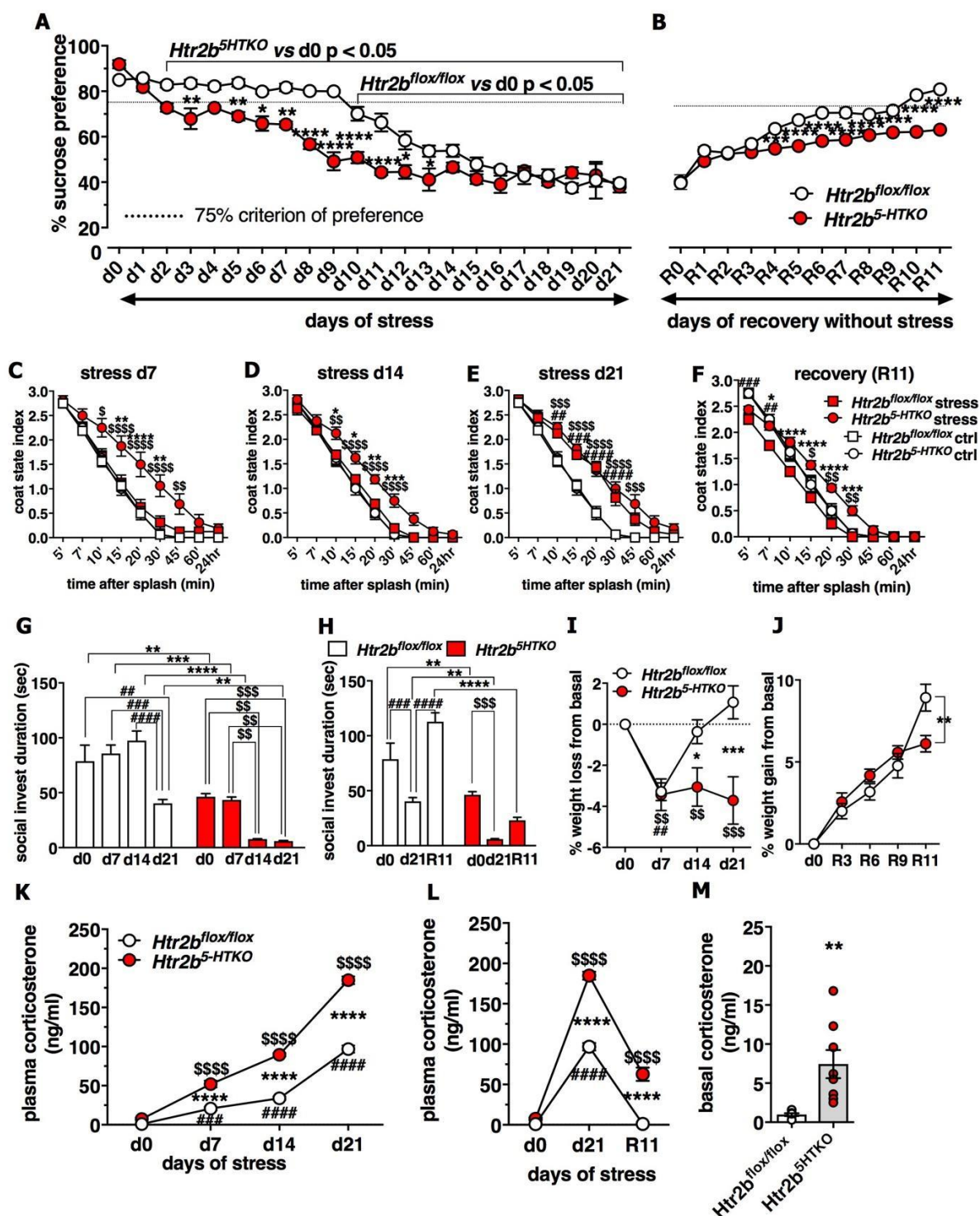


Figure 4. Lack of *Htr2b* selectively in *Pet1*⁺ serotonergic neurons leads to behavioral defects with higher depressive-like vulnerability. (A) Sucrose preference during 21 days of social defeat stress. *Htr2b*^{5-HTKO} mice showed earlier a reduction in sucrose preference compared to *Htr2b*^{flox/flox} control mice (two-way RM-ANOVA, $F_{21,126} = 6.279$, $P < 0.0001$); $n = 4$ cages (8 mice) for each group. (B) Sucrose preference during 11 days of recovery without social defeat stress. *Htr2b*^{5-HTKO} mice did not recover as fast as *Htr2b*^{flox/flox} mice ($F_{11,66} = 9.168$, $P < 0.0001$); $n = 4$ cages (8 mice) for each group. (C-D-E-F) Coat state score after 7, 14, 21 days of stress and after 11 days of recovery. *Htr2b*^{5-HTKO} mice showed an impairment in self-care behavior compared to *Htr2b*^{flox/flox} mice on d7, d14 and R11. ($F_{24,224} = 4.529$,

$P < 0.0001$; $F_{24,224} = 4.028$, $P < 0.0001$; $F_{24,224} = 7.601$, $P < 0.0001$; $F_{24,224} = 5.965$, $P < 0.0001$, respectively C, D, E, F); $n = 8$ mice for each group. **(G)** Social investigation during 21 days of social defeat stress $Htr2b^{5-HTKO}$ mice showed a general impairment in time spent to socially interact with a juvenile conspecific and were affected by social defeat stress after two weeks, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($F_{3,42} = 7.768$, $P = 0.0003$); $n = 8$ mice for each group. **(H)** Social investigation during 11 days of recovery without social defeat stress. $Htr2b^{5-HTKO}$ mice did not display an increase time of social investigation after recovery, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($F_{2,28} = 12.11$, $P = 0.0002$); $n = 8$ mice for each group. **(I)** Body weight loss during 21 days of social defeat stress. $Htr2b^{5-HTKO}$ mice showed a stronger reduction in body weight, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($F_{3,42} = 6.494$, $P = 0.0010$); $n = 8$ mice. **(J)** Body weight gain during 11 days of recovery without social defeat stress. $Htr2b^{5-HTKO}$ mice showed less body weight after 11 recovery days, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($F_{4,56} = 7.643$, $P < 0.0001$); $n = 8$ mice. **(K)** Plasma levels of corticosterone during 21 days of social defeat stress. $Htr2b^{5-HTKO}$ mice showed higher increase in corticosterone, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($F_{3,36} = 69.37$, $P < 0.0001$); $n = 8$ $Htr2b^{5-HTKO}$ and $n = 6$ $Htr2b^{flox/flox}$ mice. **(L)** Plasma levels of corticosterone during 11 days of recovery without social defeat stress. $Htr2b^{5-HTKO}$ mice showed persistent increased corticosterone levels also after recovery, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($F_{2,24} = 33.48$, $P < 0.0001$); $n = 8$ $Htr2b^{5-HTKO}$ and $n = 6$ $Htr2b^{flox/flox}$ mice. **(M)** Plasma levels of corticosterone at d0 before stress. $Htr2b^{5-HTKO}$ mice showed increased basal corticosterone level, compared to $Htr2b^{flox/flox}$ mice ($t\text{-test}_4 = 7$), $*** = P < 0.001$ $Htr2b^{5-HTKO}$ vs. $Htr2b^{flox/flox}$ mice; $n = 8$ $Htr2b^{5-HTKO}$ and $n = 6$ $Htr2b^{flox/flox}$ mice.

Data information: Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test or Welch's *t*-test. Data are means $\pm$ SEM. *, **, ***, **** $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed $Htr2b^{5-HTKO}$ mice vs. stressed $Htr2b^{flox/flox}$ mice; \$, \$\$, \$\$\$, and \$\$\$\$ $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed $Htr2b^{5-HTKO}$ mice vs. $Htr2b^{5-HTKO}$ control; #, ##, ###, and #### $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively, $Htr2b^{+/+}$ stressed $Htr2b^{flox/flox}$ mice vs. $Htr2b^{flox/flox}$ control.

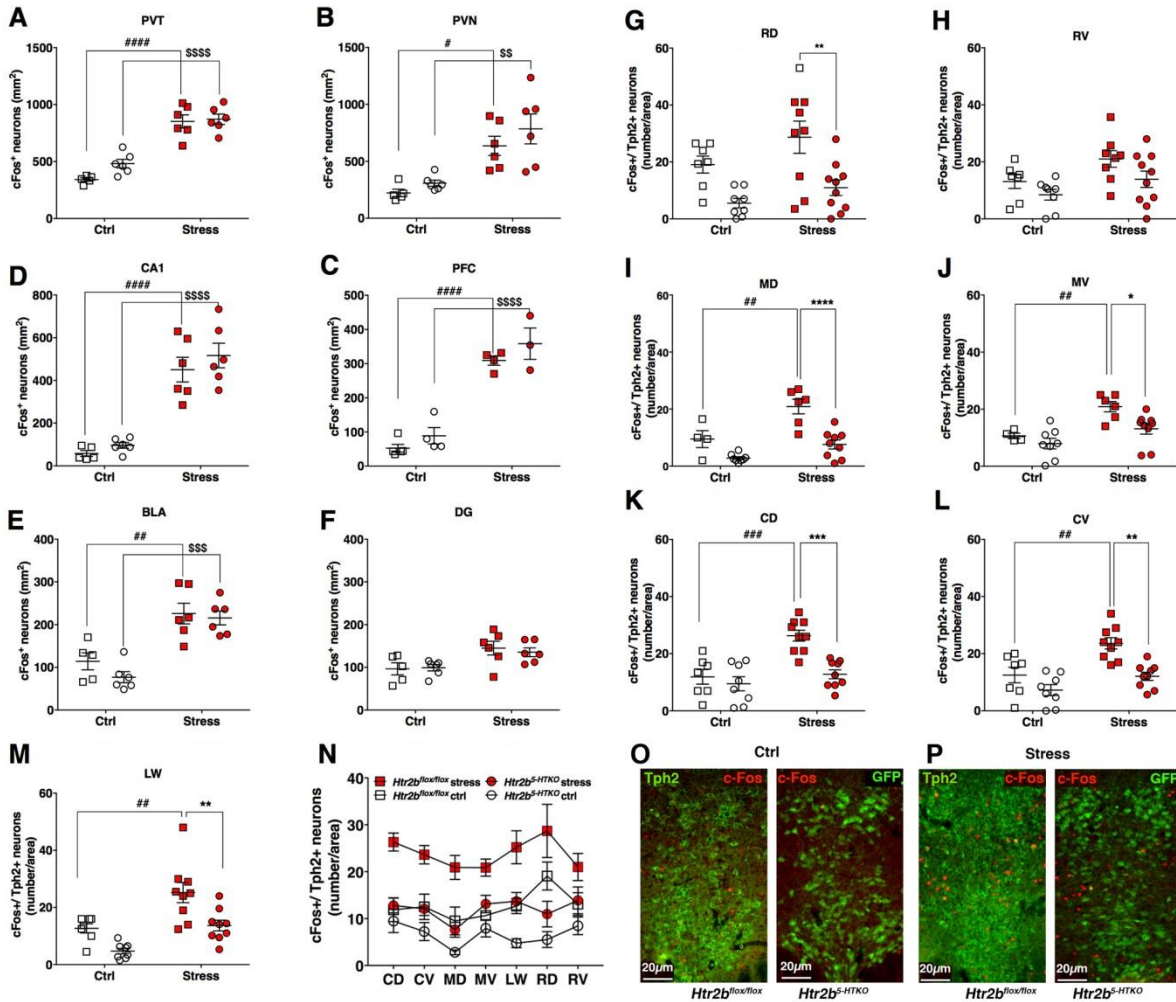


Figure 5 - *c-fos* activation after a single social stress exposure. Following a single exposure to social defeat stress, we analyzed *c-fos* expression in various brain regions of *Htr2b*^{flox/flox} mice and *Htr2b*^{5-HTKO} mice. (A-F) *c-fos* was significantly increased for both genotypes in PVN, PVT, CA1, BLA, and PFC, but not in DG after stress (two-way ANOVA, main effect of treatment for PVT $F_{1,19} = 105.6$, $P < 0.0001$; for PVN $F_{1,19} = 27.97$, $P < 0.0001$; for CA1 $F_{1,19} = 86.25$, $P < 0.0001$; for BLA $F_{1,19} = 44.11$, $P < 0.0001$; for PFC $F_{1,12} = 131.9$, $P < 0.0001$; for DG $F_{1,19} = 11.67$, $P = 0.0029$; $n = 3-6$ mice). (G-M) In raphe nuclei, a staining for Tph2 was performed in order to record only *c-fos* expression in serotonergic neurons. Here, there was a clear effect of stress in *Htr2b*^{flox/flox} mice in MD, MV, CD, CV, LW but no effect of stress could be detected in *Htr2b*^{5-HTKO} mice (two-way ANOVA, main effect of genotype for RD $F_{1,30} = 4.048$, $P = 0.0002$; for MD $F_{1,23} = 28.29$, $P < 0.0001$; for MV $F_{1,23} = 7.052$, $P = 0.0141$; for CV $F_{1,29} = 2.474$, $P = 0.0002$; for LW $F_{1,29} = 17.28$, $P = 0.0003$; for CD there is an interaction between genotype and treatment $F_{1,29} = 6.938$, $P = 0.00134$, but not for RV; $n = 4-10$ mice). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Data are means $\pm$ SEM. *, **, ***, **** $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed *Htr2b*^{5-HTKO} mice vs. stressed *Htr2b*^{flox/flox} mice; \$, \$\$, \$\$\$, and \$\$\$\$ $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively stressed *Htr2b*^{5-HTKO} mice vs. *Htr2b*^{5-HTKO} control; #, ##, ###, and #### $p < 0.05$, 0.01, 0.001, and 0.0001 respectively, *Htr2b*^{+/+} stressed *Htr2b*^{flox/flox} mice vs. *Htr2b*^{flox/flox} control. (N) Recapitulation of the *c-fos* expression across the raphe nuclei. (O-P)

Representative section of the raphe nuclei after staining with *c-fos* (red) and Tph2 (green) antibodies; scale bar = 20 μm .

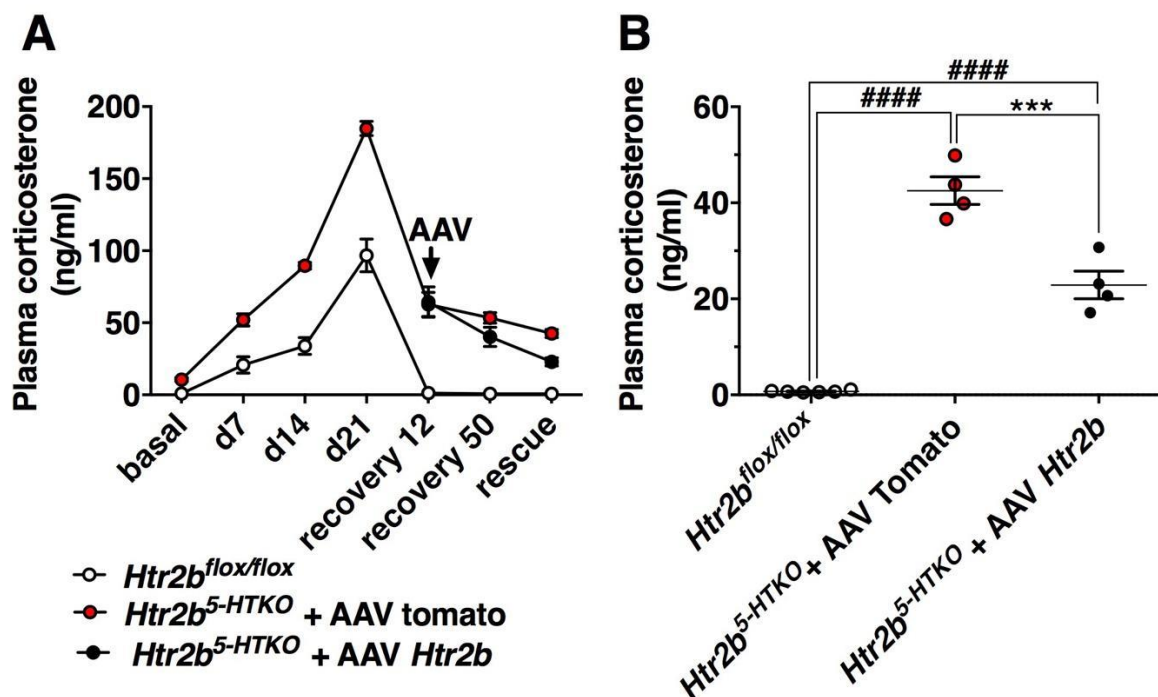


Figure 6. Selective re-activation of 5-HT_{2B} in Raphe nucleus in *Htr2b*^{5-HTKO} partially rescues corticosterone levels in basal condition. (A) Time course of the rescue experiments. *Htr2b*^{5-HTKO} and control *Htr2b*^{flox/flox} mice were exposed to social stress for three weeks then let recover for 11 days, and submitted to local raphe-expression with an adeno-associated viral (AAV) vector, allowing Cre-mediated selective expression in 5-HT neurons (Pet1-positive) of *Htr2b* or TdTomato as control. (B) After rescue, the corticosterone levels were significantly lower in *Htr2b*^{5-HTKO} AAV*Htr2b* compared to *Htr2b*^{5-HTKO} AAV*TdTomato* (one-way ANOVA, main effect of treatments $F_{2,11} = 119.2$, $P < 0.0001$; $n = 4-8$ and $n = 4-6$ mice for A and B respectively). Data were analyzed by one way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Data are means $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$, *Htr2b*^{5-HTKO} AAV*Htr2b* compared to *Htr2b*^{5-HTKO} AAV*TdTomato*, and #### $p < 0.0001$ *Htr2b*^{5-HTKO} AAV*Htr2b* and *Htr2b*^{5-HTKO} AAV*TdTomato*, compared to *Htr2b*^{flox/flox}.

FIGURE S1

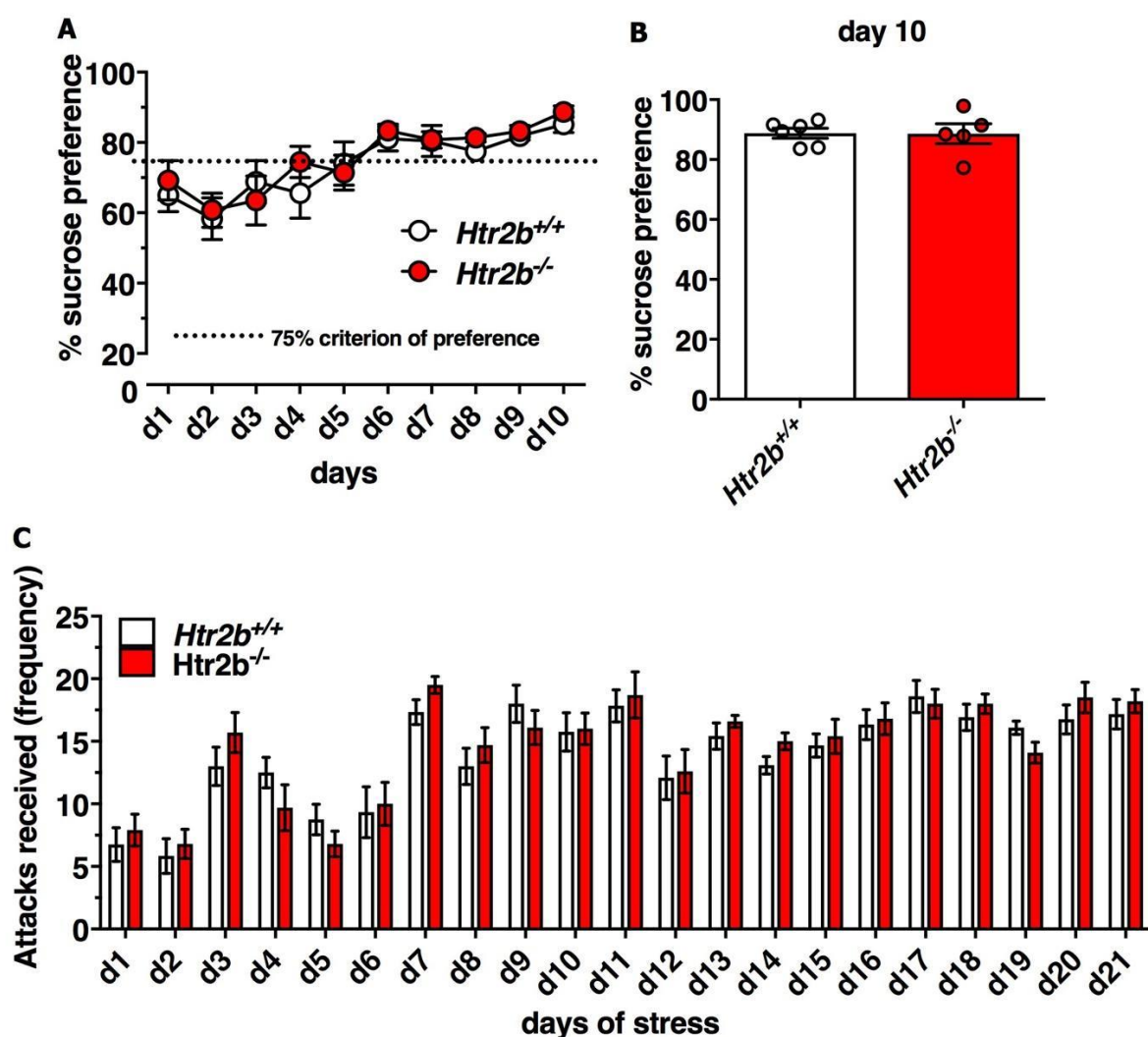


Figure S1.

(A-B) Sucrose preference before stress during ten days of habituation.

Htr2b^{-/-} and *Htr2b*^{+/+} mice developed a clear preference for sucrose solution, reaching a stable criterion of preference across ten days (A). No significant differences were found between the all four groups on day 10, representing the basal sucrose preference before stress (B). (two-way RM-ANOVA, $F_{9,189} = 0.5181$, $P=0.8604$ and $t\text{-test}_9 = 0.06027$, $P=0.9533$, respectively A and B); $n = 12$ cages (24 mice) for *Htr2b*^{+/+} and $n = 11$ cages (22 mice) for *Htr2b*^{-/-} A; $n=5$ cages (10 mice) for *Htr2b*^{-/-} stress and $n=6$ cages (12 mice).

(C) Attacks received (number) during 21 days of social defeat stress. *Htr2b*^{-/-} and *Htr2b*^{+/+} mice received a similar number of attacks in each single stress session ($F_{20,400} = 0.6573$, $P=0.8676$); $n=12-10$ mice.

Data information: Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test and unpaired t-test. Data are means $\pm$ SEM.

FIGURE S2

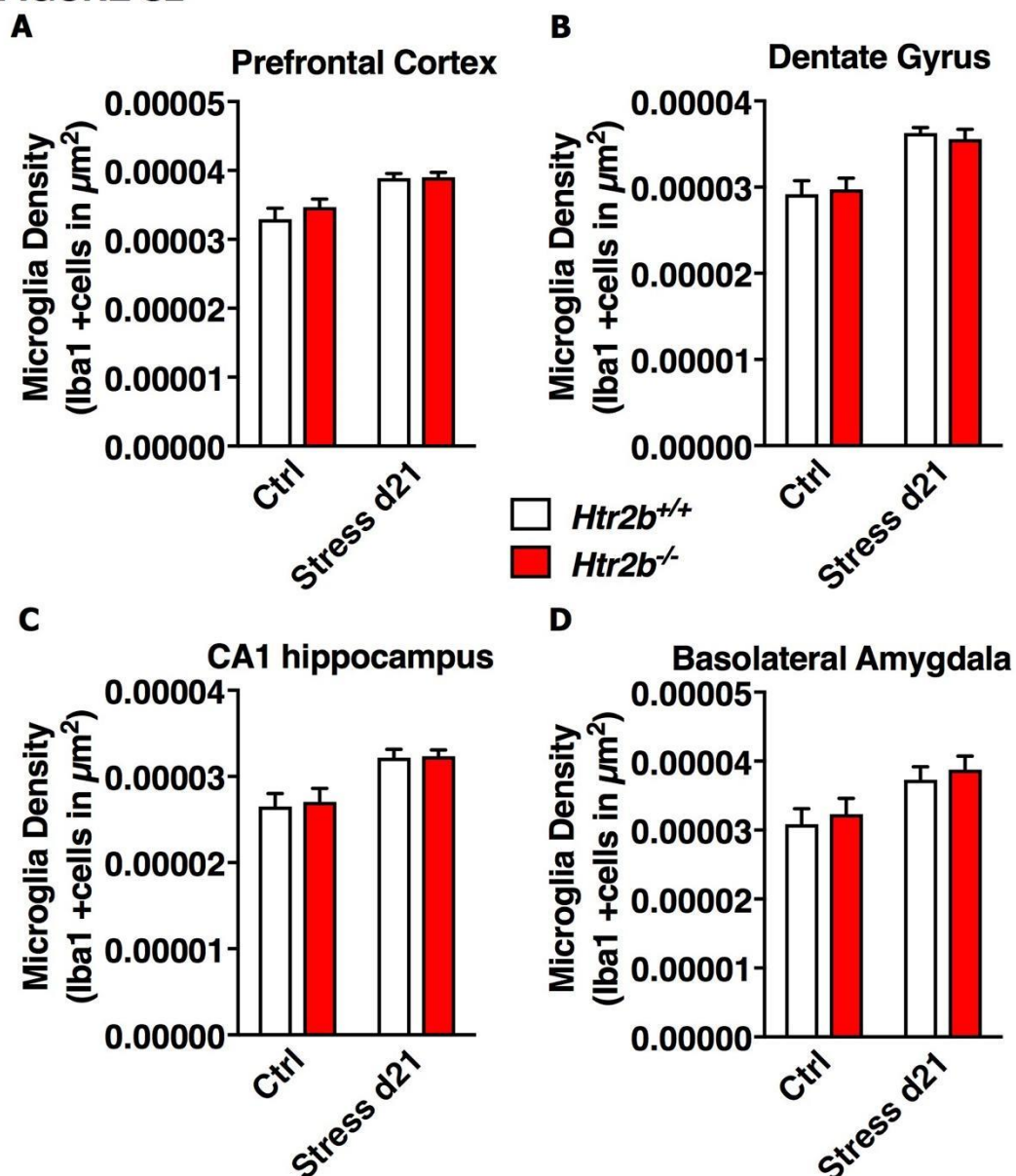


Figure S2

(A-B-C-D) Microglia density in brain regions before and after d21 stress. Social defeat stress increased microglia density after 21 days microglia in brain regions implicated in depressive-like disease, without differences between genotype (Principal effect of Stress: $F_{1,26} = 20.13$, $F_{1,26} = 26.94$, $P < 0.0001$, $F_{1,26} = 17.65$, $P = 0.0003$ and $F_{1,25} = 9.184$, $P = 0.0056$ respectively A, B, C and D); $n = 8-6$ mice. Data information: Two-way ANOVA ordinary followed by Bonferroni's *post hoc* test. Data are means $\pm$ SEM.

FIGURE S3

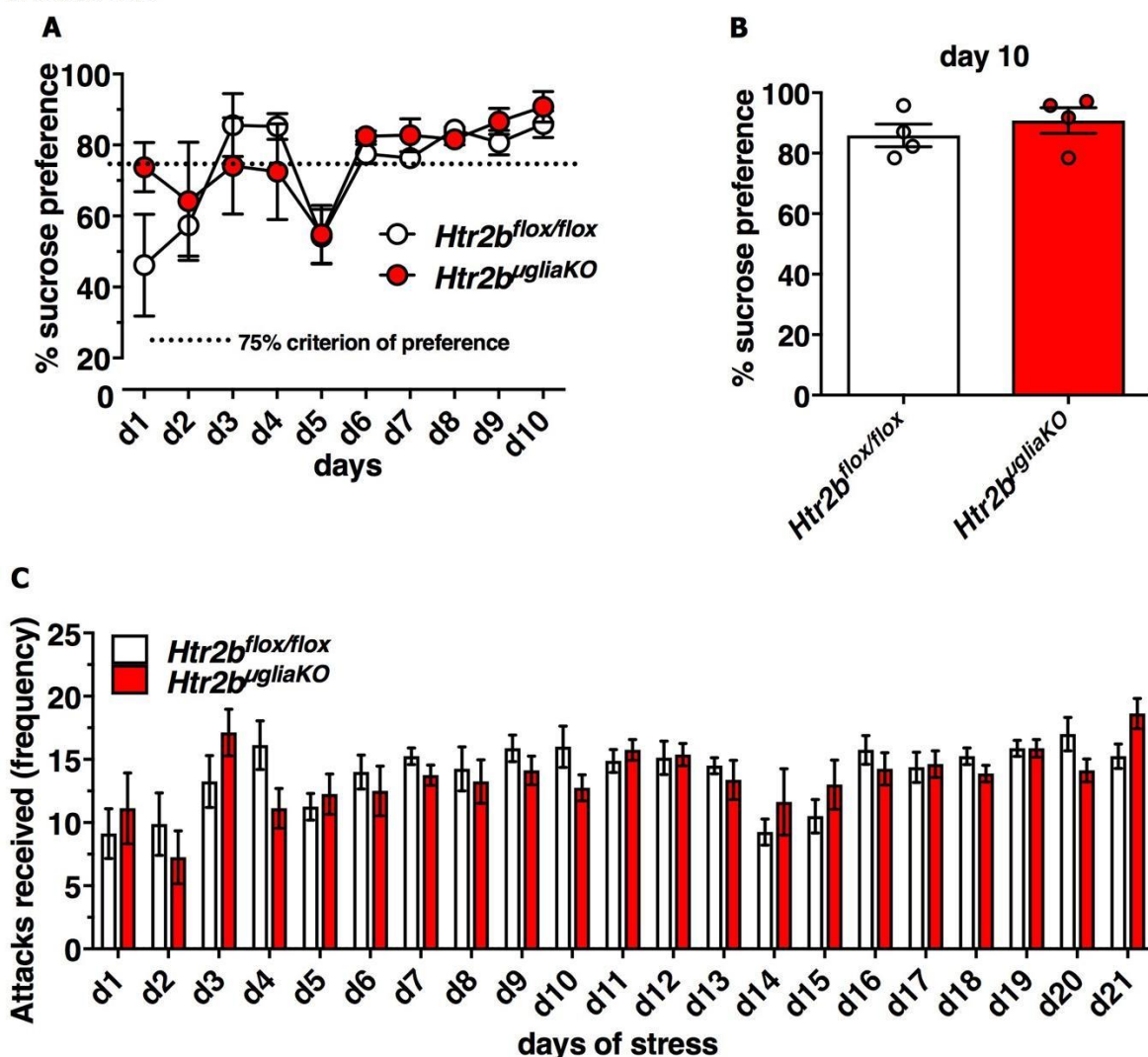


Figure S3.

(A-B) Sucrose preference before stress during ten days of habituation. *Htr2b^{ugliaKO}* and *Htr2b^{flx/flx}* mice developed a clear preference for sucrose solution, reaching a stable criterion of preference across ten days (A). No significant differences were found between the two groups on day 10 (B) (two-way RM-ANOVA, $F_{9,54} = 1.479$, $P = 0.1793$ and $t\text{-test}_6 = 0.9$, $P = 0.4212$ respectively A and B); $n = 4$ cages (8 mice) for all groups.

(C) Attacks received (number) during 21 days of social defeat stress. *Htr2b^{ugliaKO}* and *Htr2b^{flx/flx}* mice received a similar number of attacks in each single stress session ($F_{20,280} = 1.204$, $P = 0.2499$); $n = 8$ mice.

Data information: Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test and unpaired t-test. Data are means $\pm$ SEM.

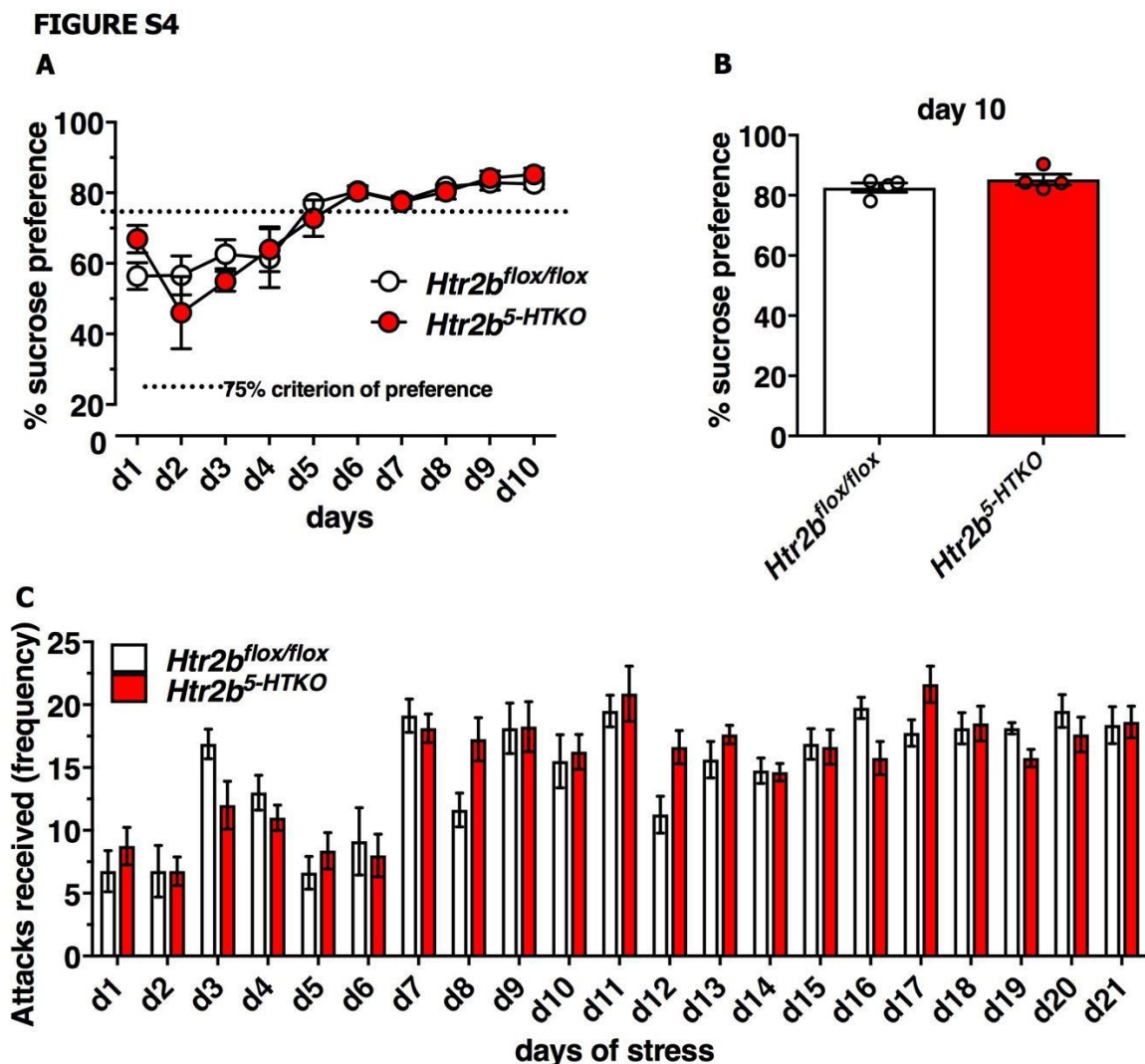


Figure S4.

(A-B) Sucrose preference before stress during ten days of habituation. *Htr2b^{5-HTKO}* and *Htr2b^{flox/flox}* mice developed a clear preference for sucrose solution, reaching a stable criterion of preference across ten days (A). No significant differences were found between the two groups on day 10, representing the basal sucrose preference before stress (indicated in the main graph as d0). ($F_{9,54} = 1.031$, $P = 0.4281$ and $t_6 = 1$, $P = 0.2967$ respectively A and B); $n = 4$ cages (8 mice) for all groups.

(C) Attacks received (number) during 21 days of social defeat stress. *Htr2b^{5-HTKO}* and *Htr2b^{flox/flox}* mice received a similar number of attacks in each single stress session ($F_{20,280} = 1.683$, $P = 0.0355$); $n = 8$ mice.

Data information: Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test and unpaired t-test. Data are means $\pm$ SEM.

BIBLIOGRAPHIE

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.-T., Salter, M.W., and Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846–850.

Abraham, R., Nirogi, R., and Shinde, A. (2014). Role of glutamate and advantages of combining memantine with a 5HT6 ligand in a model of depression. *Pharmacol Rep* 66, 394–398.

Acosta-Urquidi, J., Sahley, C.L., and Kleinhaus, A.L. (1989). Serotonin differentially modulates two K⁺ currents in the Retzius cell of the leech. *J Exp Biol* 145, 403–417.

Adayev, T., El-Sherif, Y., Barua, M., Penington, N.J., and Banerjee, P. (1999). Agonist stimulation of the serotonin1A receptor causes suppression of anoxia-induced apoptosis via mitogen-activated protein kinase in neuronal HN2-5 cells. *J Neurochem* 72, 1489–1496.

Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., et al. (2000). Molecular cloning of a novel brain-type Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74, 2622–2625.

Aira, Z., Buesa, I., García Del Caño, G., Bilbao, J., Doñate, F., Zimmermann, M., and Azkue, J.J. (2013). Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain* 154, 1865–1877.

Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T.J., Tian, L., Marvin, J.S., Mutlu, S., Calderón, N.C., Esposti, F., Borghuis, B.G., Sun, X.R., et al. (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci* 32, 13819–13840.

Albert, P.R. (2012). Transcriptional regulation of the 5-HT_{1A} receptor: implications for mental illness. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367, 2402–2415.

Albert, P.R., Zhou, Q.Y., Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., and Civelli, O. (1990). Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 265, 5825–5832.

Albert, P.R., Le François, B., and Vahid-Ansari, F. (2019). Genetic, epigenetic and posttranscriptional mechanisms for treatment of major depression: the 5-HT_{1A} receptor gene as a paradigm. *J Psychiatry Neurosci* 44, 164–176.

Albizu, L., Holloway, T., González-Maeso, J., and Sealfon, S.C. (2011). Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology* 61, 770–777.

Alenina, N., Bashammakh, S., and Bader, M. (2006). Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev* 2, 5–10.

- Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A., and Rasenick, M.M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8, 128–140.
- Alpi, E., Landi, E., Barilari, M., Serresi, M., Salvadori, P., Bachi, A., and Dente, L. (2009). Channel-interacting PDZ protein “CIPP” interacts with proteins involved in cytoskeletal dynamics. *Biochemical Journal* 419, 289–300.
- Amargós-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M.V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., Toth, M., Mengod, G., and Artigas, F. (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14, 281–299.
- Amilhon, B., Lepicard, È., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, C., Gardier, A.M., Gallego, J., et al. (2010). VGLUT3 (Vesicular Glutamate Transporter Type 3) Contribution to the Regulation of Serotonergic Transmission and Anxiety. *J. Neurosci.* 30, 2198–2210.
- Anderluh, A., Hofmaier, T., Klotzsch, E., Kudlacek, O., Stockner, T., Sitte, H.H., and Schütz, G.J. (2017). Direct PIP2 binding mediates stable oligomer formation of the serotonin transporter. *Nat Commun* 8.
- Andrade, R., Huereca, D., Lyons, J.G., Andrade, E.M., and McGregor, K.M. (2015). 5-HT1A Receptor-Mediated Autoinhibition and the Control of Serotonergic Cell Firing. *ACS Chem Neurosci* 6, 1110–1115.
- Awasthi, J.R., Tamada, K., Overton, E.T.N., and Takumi, T. (2021). Comprehensive topographical map of the serotonergic fibers in the male mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 529, 1391–1429.
- Azmitia, E.C. (2020). Evolution of serotonin: sunlight to suicide. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, (Elsevier), pp. 3–22.
- Azmitia, E.C., Dolan, K., and Whitaker-Azmitia, P.M. (1990). S-100B but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res* 516, 354–356.
- Babb, J.A., Linnros, S.E., and Commons, K.G. (2018). Evidence for intact 5-HT1A receptor-mediated feedback inhibition following sustained antidepressant treatment in a rat model of depression. *Neuropharmacology* 141, 139–147.
- Baki, L., Fribourg, M., Younkin, J., Eltit, J.M., Moreno, J.L., Park, G., Vysotskaya, Z., Narahari, A., Sealfon, S.C., Gonzalez-Maeso, J., et al. (2016). Cross-signaling in metabotropic glutamate 2 and serotonin 2A receptor heteromers in mammalian cells. *Pflugers Arch* 468, 775–793.
- Banas, S.M., Doly, S., Boutourlinsky, K., Diaz, S.L., Belmer, A., Callebort, J., Collet, C., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2011). Deconstructing Antiobesity Compound Action: Requirement of Serotonin 5-HT2B Receptors for Dexfenfluramine Anorectic Effects. *Neuropsychopharmacology* 36, 423–433.
- Bang, S.J., Jensen, P., Dymecki, S.M., and Commons, K.G. (2012). Projections and interconnections of genetically defined serotonin neurons in mice. *Eur J Neurosci* 35, 85–96.

- Barnes, N.M., and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.
- Barot, S.K., Ferguson, S.M., and Neumaier, J.F. (2007). 5-HT(1B) receptors in nucleus accumbens efferents enhance both rewarding and aversive effects of cocaine. *Eur J Neurosci* 25, 3125–3131.
- Barre, A., Berthoux, C., Bundel, D.D., Valjent, E., Bockaert, J., Marin, P., and Bécamel, C. (2016). Presynaptic serotonin 2A receptors modulate thalamocortical plasticity and associative learning. *PNAS* 113, E1382–E1391.
- Bayasgalan, T., Csemer, A., Kovacs, A., Pocsai, K., and Pal, B. (2021). Topographical Organization of M-Current on Dorsal and Median Raphe Serotonergic Neurons. *Front Cell Neurosci* 15, 614947.
- Bayliss, D.A., Li, Y.W., and Talley, E.M. (1997). Effects of serotonin on caudal raphe neurons: inhibition of N- and P/Q-type calcium channels and the afterhyperpolarization. *J Neurophysiol* 77, 1362–1374.
- Bécamel, C., Alonso, G., Galéotti, N., Demey, E., Jouin, P., Ullmer, C., Dumuis, A., Bockaert, J., and Marin, P. (2002). Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT_{2C} receptors: a proteomic approach. *EMBO J* 21, 2332–2342.
- Bécamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galéotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J., and Marin, P. (2004). The Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors Interact with Specific Sets of PDZ Proteins *. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20257–20266.
- Béchade, C., D’Andrea, I., Etienne, F., Verdonk, F., Moutkine, I., Banas, S.M., Kolodziejczak, M., Diaz, S.L., Parkhurst, C.N., Gan, W.B., et al. (2021). The serotonin 2B receptor is required in neonatal microglia to limit neuroinflammation and sickness behavior in adulthood. *Glia* 69, 638–654.
- Bellido, I., Hansson, A.C., Gómez-Luque, A.J., Andbjør, B., Agnati, L.F., and Fuxe, K. (2004). Corticosterone strongly increases the affinity of dorsal raphe 5-HT_{1A} receptors. *Neuroreport* 15, 1457–1459.
- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Freneau, R.T., and Edwards, R.H. (2000). Uptake of Glutamate into Synaptic Vesicles by an Inorganic Phosphate Transporter. *Science* 289, 957–960.
- Belmer, A., Klenowski, P.M., Patkar, O.L., and Bartlett, S.E. (2017). Mapping the connectivity of serotonin transporter immunoreactive axons to excitatory and inhibitory neurochemical synapses in the mouse limbic brain. *Brain Struct Funct* 222, 1297–1314.
- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S.L., Guiard, B.P., Fernandez, S.P., Doly, S., Banas, S.M., Pitychoutis, P.M., Moutkine, I., Muzerelle, A., et al. (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology*.
- Benhadda, A., Quentin, E., Moutkine, I., Chanrion, B., Rousseau, M., Marin, P., Levi, S., and Maroteaux, L. (2021). Serotonin 2B Receptor by Interacting with NMDA Receptor and CIPP Protein Complex May Control Structural Plasticity at Glutamatergic Synapses. *ACS Chem Neurosci* 12, 1133–1149.

Benmansour, S., Cecchi, M., Morilak, D.A., Gerhardt, G.A., Javors, M.A., Gould, G.G., and Frazer, A. (1999). Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci* 19, 10494–10501.

Benmansour, S., Owens, W.A., Cecchi, M., Morilak, D.A., and Frazer, A. (2002). Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter. *J Neurosci* 22, 6766–6772.

Berg, K.A., Stout, B.D., Cropper, J.D., Maayani, S., and Clarke, W.P. (1999). Novel Actions of Inverse Agonists on 5-HT_{2C} Receptor Systems. *Mol Pharmacol* 55, 863–872.

Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., and Krystal, J.H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47, 351–354.

Berthouze, M., Ayoub, M., Russo, O., Rivail, L., Sicsic, S., Fischmeister, R., Berque-Bestel, I., Jockers, R., and Lezoualc'h, F. (2005). Constitutive dimerization of human serotonin 5-HT₄ receptors in living cells. *FEBS Lett* 579, 2973–2980.

Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., et al. (2010). A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468, 1061–1066.

Björk, K., Sjögren, B., and Svenningsson, P. (2010). Regulation of serotonin receptor function in the nervous system by lipid rafts and adaptor proteins. *Exp Cell Res* 316, 1351–1356.

Boldrini, M., Underwood, M.D., Mann, J.J., and Arango, V. (2005). More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Res* 1041, 19–28.

Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X.-J., Kamme, F., Meurers, B., et al. (2002). Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Research* 943, 38–47.

Bonkale, W.L., Turecki, G., and Austin, M.C. (2006). Increased tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of alcohol-dependent, depressed suicide subjects is restricted to the dorsal subnucleus. *Synapse* 60, 81–85.

Borczyk, M., Śliwińska, M.A., Caly, A., Bernas, T., and Radwanska, K. (2019). Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Sci Rep* 9, 1693.

Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A.O., Marcellino, D., Ciruela, F., Agnati, L.F., and Fuxe, K. (2010). Dopamine D₂ and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochem Biophys Res Commun* 401, 605–610.

Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Mudó, G., Pérez-Alea, M., Ciruela, F., Tarakanov, A.O., Narvaez, M., Di Liberto, V., Agnati, L.F., Belluardo, N., et al. (2012).

Fibroblast growth factor receptor 1- 5-hydroxytryptamine 1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity. *Biol Psychiatry* 71, 84–91.

Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Narvaez, M., Oflijan, J., Agnati, L.F., and Fuxe, K. (2014). Hallucinogenic 5-HT_{2A} agonists LSD and DOI enhance dopamine D_{2R} protomer recognition and signaling of D₂-5-HT_{2A} heteroreceptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 443, 278–284.

Borroto-Escuela, D.O., Li, X., Tarakanov, A.O., Savelli, D., Narváez, M., Shumilov, K., Andrade-Talavera, Y., Jimenez-Beristain, A., Pomiermy, B., Díaz-Cabiale, Z., et al. (2017a). Existence of Brain 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} Isoreceptor Complexes with Antagonistic Allosteric Receptor-Receptor Interactions Regulating 5-HT_{1A} Receptor Recognition. *ACS Omega* 2, 4779–4789.

Borroto-Escuela, D.O., DuPont, C.M., Li, X., Savelli, D., Lattanzi, D., Srivastava, I., Narváez, M., Di Palma, M., Barbieri, E., Andrade-Talavera, Y., et al. (2017b). Disturbances in the FGFR1-5-HT_{1A} Heteroreceptor Complexes in the Raphe-Hippocampal 5-HT System Develop in a Genetic Rat Model of Depression. *Front Cell Neurosci* 11, 309.

Borroto-Escuela, D.O., Narváez, M., Ambrogini, P., Ferraro, L., Brito, I., Romero-Fernandez, W., Andrade-Talavera, Y., Flores-Burgess, A., Millon, C., Gago, B., et al. (2018). Receptor-Receptor Interactions in Multiple 5-HT_{1A} Heteroreceptor Complexes in Raphe-Hippocampal 5-HT Transmission and Their Relevance for Depression and Its Treatment. *Molecules* 23, E1341.

Borroto-Escuela, D.O., Ambrogini, P., Chruścicka, B., Lindskog, M., Crespo-Ramirez, M., Hernández-Mondragón, J.C., Perez de la Mora, M., Schellekens, H., and Fuxe, K. (2021). The Role of Central Serotonin Neurons and 5-HT Heteroreceptor Complexes in the Pathophysiology of Depression: A Historical Perspective and Future Prospects. *Int J Mol Sci* 22, 1927.

Bortolozzi, A., Castañé, A., Semakova, J., Santana, N., Alvarado, G., Cortés, R., Ferrés-Coy, A., Fernández, G., Carmona, M.C., Toth, M., et al. (2012). Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Molecular Psychiatry* 17, 612–623.

Bourson, A., Borroni, E., Austin, R.H., Monsma, F.J., and Sleight, A.J. (1995). Determination of the role of the 5-HT₆ receptor in the rat brain: a study using antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* 274, 173–180.

Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682–685.

Bruinvels, A.T., Palacios, J.M., and Hoyer, D. (1993). Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT_{1D} compared to 5-HT_{1B} binding sites in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347, 569–582.

Bruns, D., and Jahn, R. (1997). Monoamine Transmitter Release from Small Synaptic and Large Dense-Core Vesicles. In *Advances in Pharmacology*, D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, and R. McCarty, eds. (Academic Press), pp. 87–90.

- Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., and Jahn, R. (2000). Quantal release of serotonin. *Neuron* 28, 205–220.
- Bubar, M.J., Stutz, S.J., and Cunningham, K.A. (2011). 5-HT_{2C} Receptors Localize to Dopamine and GABA Neurons in the Rat Mesoaccumbens Pathway. *PLoS One* 6, e20508.
- Buritova, J., Berrichon, G., Cathala, C., Colpaert, F., and Cussac, D. (2009). Region-specific changes in 5-HT_{1A} agonist-induced Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 phosphorylation in rat brain: a quantitative ELISA study. *Neuropharmacology* 56, 350–361.
- Burns, C.M., Chu, H., Rueter, S.M., Hutchinson, L.K., Canton, H., Sanders-Bush, E., and Emeson, R.B. (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 387, 303–308.
- Calebiro, D., and Sungkaworn, T. (2018). Single-Molecule Imaging of GPCR Interactions. *Trends in Pharmacological Sciences* 39, 109–122.
- Calizo, L.H., Ma, X., Pan, Y., Lemos, J., Craige, C., Heemstra, L., and Beck, S.G. (2011). Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 61, 524–543.
- Cardenas, C.G., Del Mar, L.P., and Scroggs, R.S. (1997). Two parallel signaling pathways couple 5HT_{1A} receptors to N- and L-type calcium channels in C-like rat dorsal root ganglion cells. *J Neurophysiol* 77, 3284–3296.
- Carneiro-Nascimento, S., Powell, W., Uebel, M., Buerge, M., Sigrist, H., Patterson, M., Pryce, C.R., and Opacka-Juffry, J. (2021). Region- and receptor-specific effects of chronic social stress on the central serotonergic system in mice. *IBRO Neurosci Rep* 10, 8–16.
- Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C., and Gaspar, P. (1996). Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16, 297–307.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306–313.
- Chang, J.C., Tomlinson, I.D., Warnement, M.R., Ustione, A., Carneiro, A.M.D., Piston, D.W., Blakely, R.D., and Rosenthal, S.J. (2012). Single Molecule Analysis of Serotonin Transporter Regulation Using Antagonist-Conjugated Quantum Dots Reveals Restricted, p38 MAPK-Dependent Mobilization Underlying Uptake Activation. *Journal of Neuroscience* 32, 8919–8929.
- Chang, W.C., Ng, J.K., Nguyen, T., Pellissier, L., Claeysen, S., Hsiao, E.C., and Conklin, B.R. (2007). Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT₄ receptor. *PLoS One* 2, e1317.
- Chanrion, B., Cour, C.M. la, Bertaso, F., Lerner-Natoli, M., Freissmuth, M., Millan, M.J., Bockaert, J., and Marin, P. (2007). Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *PNAS* 104, 8119–8124.

- Choi, D.-S., and Maroteaux, L. (1996). Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Letters* 391, 45–51.
- Choi, D.S., Ward, S.J., Messaddeq, N., Launay, J.M., and Maroteaux, L. (1997). 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* 124, 1745–1755.
- Claeysen, S., Donneger, R., Giannoni, P., Gaven, F., and Pellissier, L.P. (2013). Serotonin type 4 receptor dimers. In *Methods in Cell Biology - Receptor-Receptor Interactions*, (Academic Press - Elsevier), pp. 123–139.
- Clarke, W.P., Yocca, F.D., and Maayani, S. (1996). Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 1259–1266.
- Coggeshall, R.E. (1972). Autoradiographic and chemical localization of 5-hydroxytryptamine in identified neurons in the leech. *Anat Rec* 172, 489–498.
- Colino, A., and Halliwell, J.V. (1987). Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature* 328, 73–77.
- Commons, K.G., and Linnros, S.E. (2019). Delayed Antidepressant Efficacy and the Desensitization Hypothesis. *ACS Chem Neurosci* 10, 3048–3052.
- Conductier, G., Dusticier, N., Lucas, G., Côté, F., Debonnel, G., Daszuta, A., Dumuis, A., Nieoullon, A., Hen, R., Bockaert, J., et al. (2006). Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT₄ receptor knock-out mouse. *Eur J Neurosci* 24, 1053–1062.
- Cooper, A., Woulfe, D., and Kilic, F. (2019). Post-translational modifications of serotonin transporter. *Pharmacol Res* 140, 7–13.
- Cottet, M., Faklaris, O., Maurel, D., Scholler, P., Doumazane, E., Trinquet, E., Pin, J.-P., and Durroux, T. (2012). BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 92.
- Czachura, J.F., and Rasmussen, K. (2000). Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362, 266–275.
- Day, M., Olson, P.A., Platzer, J., Striessnig, J., and Surmeier, D.J. (2002). Stimulation of 5-HT₂ receptors in prefrontal pyramidal neurons inhibits Ca_v1.2 L type Ca²⁺ currents via a PLC β /IP₃/calcineurin signaling cascade. *J Neurophysiol* 87, 2490–2504.
- De Deurwaerdère, P., Bharatiya, R., Chagraoui, A., and Di Giovanni, G. (2020). Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology* 107967.
- De-Miguel, F.F., and Trueta, C. (2005). Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cell Mol Neurobiol* 25, 297–312.
- De-Miguel, F.F., Santamaría-Holek, I., Noguez, P., Bustos, C., Hernández-Lemus, E., and Rubí, J.M. (2012). Biophysics of active vesicle transport, an intermediate step that couples excitation and exocytosis of serotonin in the neuronal soma. *PLoS One* 7, e45454.

- De-Miguel, F.F., Leon-Pinzon, C., Noguez, P., and Mendez, B. (2015). Serotonin release from the neuronal cell body and its long-lasting effects on the nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Deneris, E., and Gaspar, P. (2018). Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 7, 10.1002/wdev.301.
- Descarries, L., and Riad, M. (2012). Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2416–2425.
- Deurwaerdère, P.D., Navailles, S., Berg, K.A., Clarke, W.P., and Spampinato, U. (2004). Constitutive Activity of the Serotonin_{2C} Receptor Inhibits In Vivo Dopamine Release in the Rat Striatum and Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 24, 3235–3241.
- Diaz, S.L., Narboux-Nême, N., Boutourlinsky, K., Doly, S., and Maroteaux, L. (2015). Mice lacking the serotonin 5-HT_{2B} receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26, 265–279.
- Diaz, S.L., Doly, S., Narboux-Nême, N., Fernández, S., Mazot, P., Banas, S.M., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., and Roumier, A. 5-HT_{2B} receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions.
- Doly, S., Valjent, E., Setola, V., Callebert, J., Hervé, D., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2008). Serotonin 5-HT_{2B} Receptors Are Required for 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Hyperlocomotion and 5-HT Release In Vivo and In Vitro. *J. Neurosci.* 28, 2933–2940.
- Doly, S., Bertran-Gonzalez, J., Callebert, J., Bruneau, A., Banas, S.M., Belmer, A., Boutourlinsky, K., Hervé, D., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2009a). Role of serotonin via 5-HT_{2B} receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. *PLoS ONE* 4, e7952.
- Doly, S., Bertran-Gonzalez, J., Callebert, J., Bruneau, A., Banas, S.M., Belmer, A., Boutourlinsky, K., Hervé, D., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2009b). Role of serotonin via 5-HT_{2B} receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. *PLoS One* 4, e7952.
- Donaldson, Z.R., Piel, D.A., Santos, T.L., Richardson-Jones, J., Leonardo, E.D., Beck, S.G., Champagne, F.A., and Hen, R. (2014). Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior. *Neuropsychopharmacology* 39, 291–302.
- Donner, N.C., Montoya, C.D., Lukkes, J.L., and Lowry, C.A. (2012). Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology* 37, 645–661.
- Dosemeci, A., Burch, A., Loo, H., Toy, D., and Tao-Cheng, J.-H. (2017). IRSp53 accumulates at the postsynaptic density under excitatory conditions. *PLoS One* 12, e0190250.
- Dougherty, J.D., Maloney, S.E., Wozniak, D.F., Rieger, M.A., Sonnenblick, L., Coppola, G., Mahieu, N.G., Zhang, J., Cai, J., Patti, G.J., et al. (2013). The disruption of Celf6, a gene identified by translational profiling of serotonergic neurons, results in autism-related behaviors. *J Neurosci* 33, 2732–2753.

- Dumuis, A., Sebben, M., and Bockaert, J. (1988). Pharmacology of 5-hydroxytryptamine-1A receptors which inhibit cAMP production in hippocampal and cortical neurons in primary culture. *Mol Pharmacol* 33, 178–186.
- Duxon, M.S., Flanigan, T.P., Reavley, A.C., Baxter, G.S., Blackburn, T.P., and Fone, K.C.F. (1997). Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience* 76, 323–329.
- Eglen, R.M., Jasper, J.R., Chang, D.J., and Martin, G.R. (1997). The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends Pharmacol Sci* 18, 104–107.
- Ehlinger, D.G., and Commons, K.G. (2017). Altered Cav1.2 function in the Timothy syndrome mouse model produces ascending serotonergic abnormalities. *European Journal of Neuroscience* 46, 2416–2425.
- Ehlinger, D.G., and Commons, K.G. (2019). Cav1.2 L-type calcium channels regulate stress coping behavior via serotonin neurons. *Neuropharmacology* 144, 282–290.
- Engel, M., Smidt, M.P., and van Hooft, J.A. (2013). The serotonin 5-HT₃ receptor: a novel neurodevelopmental target. *Front Cell Neurosci* 7, 76.
- Fang, W., Wang, X., Cai, M., Liu, X., Wang, X., and Lu, W. (2021). Targeting GluN2B/NO Pathway Ameliorates Social Isolation-Induced Exacerbated Attack Behavior in Mice. *Front Pharmacol* 12, 700003.
- Feria-Velasco, A., del Angel, A.R., and Gonzalez-Burgos, I. (2002). Modification of dendritic development. *Prog Brain Res* 136, 135–143.
- Ferrero, H., Solas, M., Francis, P.T., and Ramirez, M.J. (2017). Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists in Alzheimer's Disease: Therapeutic Rationale and Current Development Status. *CNS Drugs* 31, 19–32.
- Ferrés-Coy, A., Santana, N., Castañé, A., Cortés, R., Carmona, M.C., Toth, M., Montefeltro, A., Artigas, F., and Bortolozzi, A. (2013). Acute 5-HT_{1A} autoreceptor knockdown increases antidepressant responses and serotonin release in stressful conditions. *Psychopharmacology* 225, 61–74.
- Filipenko, M.L., Beilina, A.G., Alekseyenko, O.V., Dolgov, V.V., and Kudryavtseva, N.N. (2002). Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice. *Neuroscience Letters* 321, 25–28.
- Galindo, L., Moreno, E., López-Armenta, F., Guinart, D., Cuenca-Royo, A., Izquierdo-Serra, M., Xicota, L., Fernandez, C., Menoyo, E., Fernández-Fernández, J.M., et al. (2018). Cannabis Users Show Enhanced Expression of CB1-5HT_{2A} Receptor Heteromers in Olfactory Neuroepithelium Cells. *Mol Neurobiol* 55, 6347–6361.
- Gardiner, K., and Du, Y. (2006). A-to-I editing of the 5HT_{2C} receptor and behaviour. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 37–42.
- Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 1002–1012.

- Gavarini, S., Bécamel, C., Altier, C., Lory, P., Poncet, J., Wijnholds, J., Bockaert, J., and Marin, P. (2006). Opposite Effects of PSD-95 and MPP3 PDZ Proteins on Serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2C} Receptor Desensitization and Membrane Stability. *MBoC* 17, 4619–4631.
- Geddes, S.D., Assadzada, S., Sokolovski, A., Bergeron, R., Haj-Dahmane, S., and Béique, J.-C. (2015). Time-dependent modulation of glutamate synapses onto 5-HT neurons by antidepressant treatment. *Neuropharmacology* 95, 130–143.
- Geldenhuys, W.J., and Van der Schyf, C.J. (2008). Serotonin 5-HT₆ receptor antagonists for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 8, 1035–1048.
- Gérard, C., Langlois, X., Gingrich, J., Doucet, E., Vergé, D., Kia, H.K., Raisman, R., Gozlan, H., el Mestikawy, S., and Hamon, M. (1994). Production and characterization of polyclonal antibodies recognizing the intracytoplasmic third loop of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor. *Neuroscience* 62, 721–739.
- Glatt, C.E., Snowman, A.M., Sibley, D.R., and Snyder, S.H. (1995). Clozapine: selective labeling of sites resembling 5HT₆ serotonin receptors may reflect psychoactive profile. *Mol Med* 1, 398–406.
- Glatz, K., Mössner, R., Heils, A., and Lesch, K.P. (2003). Glucocorticoid-regulated human serotonin transporter (5-HTT) expression is modulated by the 5-HTT gene-promotor-linked polymorphic region. *Journal of Neurochemistry* 86, 1072–1078.
- Goadsby, P.J. (1998). Serotonin 5-HT_{1B/1D} Receptor Agonists in Migraine. *Mol Diag Ther* 10, 271–286.
- González-Maeso, J., Ang, R.L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N.V., López-Giménez, J.F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L.F., Milligan, G., et al. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452, 93–97.
- Gozlan, H., El Mestikawy, S., Pichat, L., Glowinski, J., and Hamon, M. (1983). Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 305, 140–142.
- Grandjean, J., Corcoba, A., Kahn, M.C., Upton, A.L., Deneris, E.S., Seifritz, E., Helmchen, F., Mann, E.O., Rudin, M., and Saab, B.J. (2019). A brain-wide functional map of the serotonergic responses to acute stress and fluoxetine. *Nat Commun* 10.
- Grant, M., Collier, B., and Kumar, U. (2004). Agonist-dependent dissociation of human somatostatin receptor 2 dimers: a role in receptor trafficking. *J Biol Chem* 279, 36179–36183.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and Mestikawy, S.E. (2002). A Third Vesicular Glutamate Transporter Expressed by Cholinergic and Serotonergic Neurons. *J. Neurosci.* 22, 5442–5451.
- Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., Dumas, S., Tzavara, E.T., Wade, M.R., Nomikos, G.G., et al. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci* 11, 292–300.

- Gu, Z.-S., Zhou, A.-N., Xiao, Y., Zhang, Q.-W., and Li, J.-Q. (2018). Synthesis and antidepressant-like activity of novel aralkyl piperazine derivatives targeting SSRI/5-HT_{1A}/5-HT₇. *Eur J Med Chem* 144, 701–715.
- Guilloux, J.-P., David, D.J.P., Xia, L., Nguyen, H.T., Rainer, Q., Guiard, B.P., Repérant, C., Deltheil, T., Toth, M., Hen, R., et al. (2011). Characterization of 5-HT(1A/1B)^{-/-} mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology* 61, 478–488.
- Guscott, M., Bristow, L.J., Hadingham, K., Rosahl, T.W., Beer, M.S., Stanton, J.A., Bromidge, F., Owens, A.P., Huscroft, I., Myers, J., et al. (2005). Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology* 48, 492–502.
- Gutknecht, L., Araragi, N., Merker, S., Waider, J., Sommerlandt, F.M.J., Mlinar, B., Baccini, G., Mayer, U., Proft, F., Hamon, M., et al. (2012). Impacts of Brain Serotonin Deficiency following Tph2 Inactivation on Development and Raphe Neuron Serotonergic Specification. *PLOS ONE* 7, e43157.
- Hagena, H., and Manahan-Vaughan, D. (2017). The serotonergic 5-HT₄ receptor: A unique modulator of hippocampal synaptic information processing and cognition. *Neurobiology of Learning and Memory* 138, 145–153.
- Halberstadt, A.L., van der Zee, J.V.F., Chatha, M., Geyer, M.A., and Powell, S.B. (2019). Chronic treatment with a metabotropic mGlu2/3 receptor agonist diminishes behavioral response to a phenethylamine hallucinogen. *Psychopharmacology (Berl)* 236, 821–830.
- Hamon, M., Doucet, E., Lefèvre, K., Miquel, M.-C., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J., and Vergé, D. (1999). Antibodies and Antisense Oligonucleotide for Probing the Distribution and Putative Functions of Central 5-HT₆ Receptors. *Neuropsychopharmacol* 21, 68–76.
- Hansson, S.R., Mezey, E., and Hoffman, B.J. (1998). Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neuroscience* 83, 1185–1201.
- Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829–842.
- Heblinski, M., Bladen, C., and Connor, M. (2019). Regulation of heterologously expressed 5-HT_{1B} receptors coupling to potassium channels in AtT-20 cells. *Br J Pharmacol* 176, 451–465.
- Hendricks, T.J., Fyodorov, D.V., Wegman, L.J., Lelutiu, N.B., Pehek, E.A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., and Deneris, E.S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* 37, 233–247.
- Hernández-Carballo, G., Ruíz-Luna, E.A., López-López, G., Manjarrez, E., and Flores-Hernández, J. (2020). Changes in Serotonin Modulation of Glutamate Currents in Pyramidal Offspring Cells of Rats Treated With 5-MT during Gestation. *Brain Sci* 10, E221.

Herrick-Davis, K. (2013). Functional Significance of Serotonin Receptor Dimerization. *Exp Brain Res* 230, 375–386.

Herrick-Davis, K., Grinde, E., and Niswender, C.M. (1999). Serotonin 5-HT_{2C} receptor RNA editing alters receptor basal activity: implications for serotonergic signal transduction. *J Neurochem* 73, 1711–1717.

Herrick-Davis, K., Grinde, E., Harrigan, T.J., and Mazurkiewicz, J.E. (2005). Inhibition of Serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2C} Receptor Function through Heterodimerization: RECEPTOR DIMERS BIND TWO MOLECULES OF LIGAND AND ONE G-PROTEIN *. *Journal of Biological Chemistry* 280, 40144–40151.

Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21, RC181.

Heydendaal, W., and Jacobson, L. (2010). Widespread hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis-relevant and mood-relevant effects of chronic fluoxetine treatment on glucocorticoid receptor gene expression in mice. *European Journal of Neuroscience* 31, 892–902.

Hirst, W.D., Stean, T.O., Rogers, D.C., Sunter, D., Pugh, P., Moss, S.F., Bromidge, S.M., Riley, G., Smith, D.R., Bartlett, S., et al. (2006). SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆ receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. *Eur J Pharmacol* 553, 109–119.

Horton, Y.M., Lubbert, H., and Houslay, M.D. (1996). Localization of the gene for the human serotonin 5-HT_{2B} receptor to chromosome 2. *Mol Membr Biol* 13, 29–31.

Houwing, D.J., Buwalda, B., van der Zee, E.A., de Boer, S.F., and Olivier, J.D.A. (2017). The Serotonin Transporter and Early Life Stress: Translational Perspectives. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11, 117.

Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 533–554.

Hsiung, S., Adlersberg, M., Arango, V., Mann, J.J., Tamir, H., and Liu, K. (2003). Attenuated 5-HT_{1A} receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 87, 182–194.

Hu, X.-Z., Lipsky, R.H., Zhu, G., Akhtar, L.A., Taubman, J., Greenberg, B.D., Xu, K., Arnold, P.D., Richter, M.A., Kennedy, J.L., et al. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 78, 815–826.

Ibarra-Lecue, I., Mollinedo-Gajate, I., Meana, J.J., Callado, L.F., Diez-Alarcia, R., and Urigüen, L. (2018). Chronic cannabis promotes pro-hallucinogenic signaling of 5-HT_{2A} receptors through Akt/mTOR pathway. *Neuropsychopharmacology* 43, 2028–2035.

Jaffré, F., Bonnin, P., Callebert, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Monassier, L., Mettauer, B., Blaxall, B.C., Launay, J.-M., et al. (2009). Serotonin and angiotensin receptors

in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ Res* 104, 113–123.

Janoshazi, A., Deraet, M., Callebort, J., Setola, V., Guenther, S., Saubamea, B., Manivet, P., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2007). Modified Receptor Internalization upon Coexpression of 5-HT_{1B} Receptor and 5-HT_{2B} Receptors. *Molecular Pharmacology* 71, 1463–1474.

Jennings, K.A., Loder, M.K., Sheward, W.J., Pei, Q., Deacon, R.M.J., Benson, M.A., Olverman, H.J., Hastie, N.D., Harmar, A.J., Shen, S., et al. (2006). Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci* 26, 8955–8964.

Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.-J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.-Y., et al. (1998). GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABABR1 and GABABR2. *Nature* 396, 674–679.

Jones, K.A., Srivastava, D.P., Allen, J.A., Strachan, R.T., Roth, B.L., and Penzes, P. (2009). Rapid modulation of spine morphology by the 5-HT_{2A} serotonin receptor through kalirin-7 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19575–19580.

Kasai, R.S., and Kusumi, A. (2014). Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 27, 78–86.

Kaski, S.W., Brooks, S., Wen, S., Haut, M.W., Siderovski, D.P., Berry, J.H., Lander, L.R., and Setola, V. (2019). Four single nucleotide polymorphisms in genes involved in neuronal signaling are associated with Opioid Use Disorder in West Virginia. *J Opioid Manag* 15, 103–109.

Kaushalya, S.K., Desai, R., Arumugam, S., Ghosh, H., Balaji, J., and Maiti, S. (2008). Three-photon microscopy shows that somatic release can be a quantitatively significant component of serotonergic neurotransmission in the mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3469–3480.

Kemp, A., and Manahan-Vaughan, D. (2005). The 5-hydroxytryptamine₄ receptor exhibits frequency-dependent properties in synaptic plasticity and behavioural metaplasticity in the hippocampal CA1 region in vivo. *Cereb Cortex* 15, 1037–1043.

Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771–781.

Kim, H.S., Park, I.S., Lim, H.K., and Choi, H.S. (1999). NMDA receptor antagonists enhance 5-HT₂ receptor-mediated behavior, head-twitch response, in PCPA-treated mice. *Arch Pharm Res* 22, 113–118.

Kim, J.-Y., Kim, A., Zhao, Z.-Q., Liu, X.-Y., and Chen, Z.-F. (2014). Postnatal maintenance of the 5-Ht_{1a}-Pet1 autoregulatory loop by serotonin in the raphe nuclei of the brainstem. *Mol Brain* 7, 48.

Kiyasova, V., Fernandez, S.P., Laine, J., Stankovski, L., Muzerelle, A., Doly, S., and Gaspar, P. (2011). A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J Neurosci* 31, 2756–2768.

- Kohen, R., Metcalf, M.A., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J.E., Meltzer, H.Y., Sibley, D.R., Roth, B.L., and Hamblin, M.W. (1996). Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT₆ Serotonin Receptor. *Journal of Neurochemistry* 66, 47–56.
- Koike, H., Saito, H., and Matsuki, N. (1994). 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of N-type calcium current in acutely isolated ventromedial hypothalamic neuronal cells. *Neurosci Res* 19, 161–166.
- Kolodziejczak, M., Béchade, C., Gervasi, N., Irinopoulou, T., Banas, S.M., Cordier, C., Rebsam, A., Roumier, A., and Maroteaux, L. (2015). Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT_{2B} Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1219–1230.
- Kurrasch-Orbaugh, D.M., Parrish, J.C., Watts, V.J., and Nichols, D.E. (2003). A complex signaling cascade links the serotonin_{2A} receptor to phospholipase A₂ activation: the involvement of MAP kinases. *J Neurochem* 86, 980–991.
- Kurschner, C., Mermelstein, P.G., Holden, W.T., and Surmeier, D.J. (1998). CIPP, a novel multivalent PDZ domain protein, selectively interacts with Kir4.0 family members, NMDA receptor subunits, neurexins, and neuroligins. *Mol Cell Neurosci* 11, 161–172.
- Kusek, M., Sowa, J., Kamińska, K., Gołębiewska, K., Tokarski, K., and Hess, G. (2015). 5-HT₇ receptor modulates GABAergic transmission in the rat dorsal raphe nucleus and controls cortical release of serotonin. *Front Cell Neurosci* 9, 324.
- Kushwaha, N., and Albert, P.R. (2005). Coupling of 5-HT_{1A} autoreceptors to inhibition of mitogen-activated protein kinase activation via G beta gamma subunit signaling. *Eur J Neurosci* 21, 721–732.
- Lacoste, J., Lamy, S., Ramoz, N., Ballon, N., Jehel, L., Maroteaux, L., and Thibaut, F. (2020). A positive association between a polymorphism in the HTR2B gene and cocaine-crack in a French Caribbean population. *World Journal of Biological Psychiatry* 21, 784–789.
- Lanfume, L., and Hamon, M. (2000). Central 5-HT_{1A} receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nuclear Medicine and Biology* 27, 429–435.
- Lauder, J.M., and Krebs, H. (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci* 1, 15–30.
- Lauder, J.M., Towle, A.C., Patrick, K., Henderson, P., and Krebs, H. (1985). Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: a quantitative immunocytochemical study. *Brain Res* 352, 107–114.
- Launay, J.-M., Schneider, B., Loric, S., Da Prada, M., and Kellermann, O. (2006). Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT_{2B} receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *The FASEB Journal* 20, 1843–1854.
- Le Coniat, M., Choi, D.S., Maroteaux, L., Launay, J.M., and Berger, R. (1996). The 5-HT_{2B} receptor gene maps to 2q36.3-2q37.1. *Genomics* 32, 172–173.

- Le François, B., Zhang, L., Mahajan, G.J., Stockmeier, C.A., Friedman, E., and Albert, P.R. (2018). A Novel Alternative Splicing Mechanism That Enhances Human 5-HT_{1A} Receptor RNA Stability Is Altered in Major Depression. *J Neurosci* 38, 8200–8210.
- Lecouflet, P., Roux, C.M., Potier, B., Leger, M., Brunet, E., Billard, J.-M., Schumann-Bard, P., and Freret, T. (2021). Interplay between 5-HT₄ Receptors and GABAergic System within CA1 Hippocampal Synaptic Plasticity. *Cereb Cortex* 31, 694–701.
- Lee, I., Jerman, T.S., and Kesner, R.P. (2005). Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 84, 138–147.
- Leon-Pinzon, C., Cercós, M.G., Noguez, P., Trueta, C., and De-Miguel, F.F. (2014). Exocytosis of serotonin from the neuronal soma is sustained by a serotonin and calcium-dependent feedback loop. *Front Cell Neurosci* 8.
- Li, Y.-C., Wang, F.-M., Pan, Y., Qiang, L.-Q., Cheng, G., Zhang, W.-Y., and Kong, L.-D. (2009). Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 435–449.
- Lin, K.J., Yen, T.C., Wey, S.P., Hwang, J.J., Ye, X.X., Tzen, K.Y., Fu, Y.K., and Chen, J.C. (2004). Characterization of the binding sites for 123I-ADAM and the relationship to the serotonin transporter in rat and mouse brains using quantitative autoradiography. *J Nucl Med* 45, 673–681.
- Lin, S.L., Johnson-Farley, N.N., Lubinsky, D.R., and Cowen, D.S. (2003). Coupling of neuronal 5-HT₇ receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *J Neurochem* 87, 1076–1085.
- Lipton, R.B., Bigal, M.E., and Goadsby, P.J. (2004). Double-blind clinical trials of oral triptans vs other classes of acute migraine medication - a review. *Cephalalgia* 24, 321–332.
- Liu, X., and Fuentes, E.J. (2019). Emerging Themes in PDZ Domain Signaling: Structure, Function, and Inhibition. *Int Rev Cell Mol Biol* 343, 129–218.
- Llamosas, N., Bruzos-Cidón, C., Rodríguez, J.J., Ugedo, L., and Torrecilla, M. (2015). Deletion of GIRK2 Subunit of GIRK Channels Alters the 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Signaling and Results in a Depression-Resistant Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.
- Llamosas, N., Ugedo, L., and Torrecilla, M. (2017). Inactivation of GIRK channels weakens the pre- and postsynaptic inhibitory activity in dorsal raphe neurons. *Physiol Rep* 5, e13141.
- Lohse, M.J., Nuber, S., and Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* 64, 299–336.
- López-Figueroa, A.L., Norton, C.S., López-Figueroa, M.O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., López, J.F., and Watson, S.J. (2004). Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 55, 225–233.

- Luckhart, C., Philippe, T.J., Le François, B., Vahid-Ansari, F., Geddes, S.D., Béique, J.-C., Lagace, D.C., Daigle, M., and Albert, P.R. (2016). Sex-dependent adaptive changes in serotonin-1A autoreceptor function and anxiety in Deaf1-deficient mice. *Molecular Brain* 9, 77.
- Łukasiewicz, S., Polit, A., Kędracka-Krok, S., Wędzony, K., Maćkowiak, M., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010). Hetero-dimerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 1347–1358.
- Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 687–695.
- Maddaloni, G., Bertero, A., Pratelli, M., Barsotti, N., Boonstra, A., Giorgi, A., Migliarini, S., and Pasqualetti, M. (2017). Development of Serotonergic Fibers in the Post-Natal Mouse Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11, 202.
- Manivet, P., Mouillet-Richard, S., Callebert, J., Nebigil, C.G., Maroteaux, L., Hosoda, S., Kellermann, O., and Launay, J.M. (2000). PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem* 275, 9324–9331.
- Mannoury la Cour, C., El Mestikawy, S., Hanoun, N., Hamon, M., and Lanfumey, L. (2006). Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* 70, 1013–1021.
- Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Schmid, L., Vatteroni, E., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., et al. (2012). Distribution of Serotonin Receptor of Type 6 (5-HT₆) in Human Brain Post-mortem. A Pharmacology, Autoradiography and Immunohistochemistry Study. *Neurochem Res* 37, 920–927.
- Marek, G.J., Wright, R.A., Schoepp, D.D., Monn, J.A., and Aghajanian, G.K. (2000). Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine(2A) and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 76–87.
- Marin, P., Bécamel, C., Chaumont-Dubel, S., Vandermoere, F., Bockaert, J., and Claeysen, S. (2020). Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors: toward the concept of 5-HT reeptosomes. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, (Elsevier), pp. 91–120.
- Maroteaux, L., Béchade, C., and Roumier, A. (2019). Dimers of serotonin receptors: impact on ligand affinity and signaling. *Biochimie* 161, 23–33.
- Martín-Cora, F.J., and Pazos, A. (2004). Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [3H]mesulergine: comparison to other mammalian species. *Br J Pharmacol* 141, 92–104.
- Martinez, D., Broft, A., and Laruelle, M. (2000). Pindolol augmentation of antidepressant treatment: recent contributions from brain imaging studies. *Biol. Psychiatry* 48, 844–853.
- Masson, J., Emerit, M.B., Hamon, M., and Darmon, M. Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 1, 685–713.

- Mattson, M.P., Maudsley, S., and Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* 27, 589–594.
- el Mestikawy, S., Riad, M., Laporte, A.M., Vergé, D., Daval, G., Gozlan, H., and Hamon, M. (1990). Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 118, 189–192.
- Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 10, 23–29.
- Mochizuki, H., Amano, T., Seki, T., Matsubayashi, H., Mitsuhata, C., Morita, K., Kitayama, S., Dohi, T., Mishima, H.K., and Sakai, N. (2005). Role of C-terminal region in the functional regulation of rat serotonin transporter (SERT). *Neurochem Int* 46, 93–105.
- Montalbano, A., Corradetti, R., and Mlinar, B. (2015). Pharmacological Characterization of 5-HT_{1A} Autoreceptor-Coupled GIRK Channels in Rat Dorsal Raphe 5-HT Neurons. *PLoS ONE* 10, e0140369.
- Montalvo-Ortiz, J.L., Zhou, H., D’Andrea, I., Maroteaux, L., Lori, A., Smith, A., Ressler, K.J., Nuñez, Y.Z., Farrer, L.A., Zhao, H., et al. (2018). Translational studies support a role for serotonin 2B receptor (HTR2B) gene in aggression-related cannabis response. *Mol Psychiatry* 23, 2277–2286.
- Moreno, J.L., Holloway, T., Albizu, L., Sealfon, S.C., and González-Maeso, J. (2011). Metabotropic glutamate mGlu2 receptor is necessary for the pharmacological and behavioral effects induced by hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists. *Neurosci Lett* 493, 76–79.
- Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J.P., Vallée, A., Umbriaco, D., Geffard, M., and Doucet, G. (1997). Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience* 76, 1159–1171.
- Moutkine, I., Quentin, E., Guiard, B.P., Maroteaux, L., and Doly, S. (2017). Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers. *J. Biol. Chem.* 292, 6352–6368.
- Muller, J.F., Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2007). Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol* 505, 314–335.
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., and Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Structure and Function* 221, 535–561.
- Naito, K., Tanaka, C., Mitsuhashi, M., Moteki, H., Kimura, M., Natsume, H., and Ogihara, M. (2016). Signal Transduction Mechanism for Serotonin 5-HT_{2B} Receptor-Mediated DNA Synthesis and Proliferation in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 39, 121–129.

- Narboux-Nême, N., Pavone, L.M., Avallone, L., Zhuang, X., and Gaspar, P. (2008). Serotonin transporter transgenic (SERT^{Cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology*.
- Naumenko, V.S., Popova, N.K., Lacivita, E., Leopoldo, M., and Ponimaskin, E.G. (2014). Interplay between Serotonin 5-HT 1A and 5-HT 7 Receptors in Depressive Disorders. *CNS Neurosci Ther* 20, 582–590.
- Nautiyal, K.M., and Hen, R. (2017). Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Res* 6, 123.
- Nautiyal, K.M., Tritschler, L., Ahmari, S.E., David, D.J., Gardier, A.M., and Hen, R. (2016). A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. *Neuropsychopharmacology* 41, 2941–2950.
- Navailles, S., Moison, D., Ryczko, D., and Spampinato, U. (2006). Region-dependent regulation of mesoaccumbens dopamine neurons in vivo by the constitutive activity of central serotonin_{2C} receptors. *Journal of Neurochemistry* 99, 1311–1319.
- Nebigil, C.G., Choi, D.-S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9508–9513.
- Nebigil, C.G., Etienne, N., Schaerlinger, B., Hickel, P., Launay, J.M., and Maroteaux, L. (2001a). Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci* 19, 365–372.
- Nebigil, C.G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J.-L., Douchet, M.P., Monassier, L., György, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P., et al. (2001b). Ablation of Serotonin 5-HT_{2B} Receptors in Mice Leads to Abnormal Cardiac Structure and Function. *Circulation* 103, 2973–2979.
- Neumaier, J.F., Vincow, E.S., Arvanitogiannis, A., Wise, R.A., and Carlezon, W.A. (2002). Elevated expression of 5-HT_{1B} receptors in nucleus accumbens efferents sensitizes animals to cocaine. *J Neurosci* 22, 10856–10863.
- Niederkofler, V., Asher, T.E., Okaty, B.W., Rood, B.D., Narayan, A., Hwa, L.S., Beck, S.G., Miczek, K.A., and Dymecki, S.M. (2016). Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior. *Cell Reports* 17, 1934–1949.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.
- Noguez, P., Rubí, J.M., and De-Miguel, F.F. (2019). Thermodynamic Efficiency of Somatic Exocytosis of Serotonin. *Front Physiol* 10, 473.
- Okaty, B.W., Freret, M.E., Rood, B.D., Brust, R.D., Hennessy, M.L., deBairos, D., Kim, J.C., Cook, M.N., and Dymecki, S.M. (2015). Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron* 88, 774–791.
- Okaty, B.W., Commons, K.G., and Dymecki, S.M. (2019). Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat Rev Neurosci* 20, 397–424.

- Olivier, B., Soudijn, W., and van Wijngaarden, I. (1999). The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Prog Drug Res* 52, 103–165.
- Olusakin, J., Moutkine, I., Dumas, S., Ponimaskin, E., Paizanis, E., Soiza-Reilly, M., and Gaspar, P. (2020). Implication of 5-HT₇ receptor in prefrontal circuit assembly and detrimental emotional effects of SSRIs during development. *Neuropsychopharmacology* 45, 2267–2277.
- Opal, M.D., Klenotich, S.C., Morais, M., Bessa, J., Winkle, J., Doukas, D., Kay, L.J., Sousa, N., and Dulawa, S.M. (2014). Serotonin 2C receptor antagonists induce fast-onset antidepressant effects. *Mol Psychiatry* 19, 1106–1114.
- Ou, X.M., Storrington, J.M., Kushwaha, N., and Albert, P.R. (2001). Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT_{1A} receptor gene. *J Biol Chem* 276, 14299–14307.
- Palacios, J.M., Pazos, A., and Hoyer, D. (2017). A short history of the 5-HT_{2C} receptor: from the choroid plexus to depression, obesity and addiction treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 234, 1395–1418.
- Pälvimäki, E.P., Roth, B.L., Majasuo, H., Laakso, A., Kuoppamäki, M., Syvälahti, E., and Hietala, J. (1996). Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with the serotonin 5-HT_{2c} receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 126, 234–240.
- Park, L., Hochrainer, K., Hattori, Y., Ahn, S.J., Anfray, A., Wang, G., Uekawa, K., Seo, J., Palfini, V., Blanco, I., et al. (2020). Tau induces PSD95-neuronal NOS uncoupling and neurovascular dysfunction independent of neurodegeneration. *Nat Neurosci* 23, 1079–1089.
- Parker, L.L., Backstrom, J.R., Sanders-Bush, E., and Shieh, B.-H. (2003). Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. *J Biol Chem* 278, 21576–21583.
- Pathos, E.N., and Sulzer, D. (1997). Modulation of Quantal Dopamine Release by Psychostimulants. In *Advances in Pharmacology*, D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, and R. McCarty, eds. (Academic Press), pp. 198–202.
- Pellissier, L.P., Barthet, G., Gaven, F., Cassier, E., Trinquet, E., Pin, J.-P., Marin, P., Dumuis, A., Bockaert, J., Banères, J.-L., et al. (2011). G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: evidence that turning on two protomers is more efficient. *J Biol Chem* 286, 9985–9997.
- Penington, N.J., and Kelly, J.S. (1990). Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron. *Neuron* 4, 751–758.
- Perrier, J.-F., and Cotel, F. (2008). Serotonin differentially modulates the intrinsic properties of spinal motoneurons from the adult turtle. *J Physiol* 586, 1233–1238.
- Philippe, T.J., Vahid-Ansari, F., Donaldson, Z.R., Le François, B., Zahrai, A., Turcotte-Cardin, V., Daigle, M., James, J., Hen, R., Merali, Z., et al. (2018). Loss of MeCP2 in adult 5-HT neurons induces 5-HT_{1A} autoreceptors, with opposite sex-dependent anxiety and depression phenotypes. *Scientific Reports* 8.

- Phillips, J.L., Batten, L.A., Tremblay, P., Aldosary, F., Du, L., and Blier, P. (2015). Impact of monoamine-related gene polymorphisms on hippocampal volume in treatment-resistant depression. *Acta Neuropsychiatr* 27, 353–361.
- Polit, A., Rysiewicz, B., Mystek, P., Błasiak, E., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2020). The Gαi protein subclass selectivity to the dopamine D2 receptor is also decided by their location at the cell membrane. *Cell Commun Signal* 18, 189.
- Pompeiano, M., Palacios, J., and Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. In *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, p.
- Ponimaskin, E.G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D.W., and Voino-Yasenetskaya, T.A. (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J Biol Chem* 277, 20812–20819.
- Popa, D., Cerdan, J., Repérant, C., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., David, D.J., and Gardier, A.M. (2010). A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur. J. Pharmacol.* 628, 83–90.
- Prakash, N., Stark, C.J., Keisler, M.N., Luo, L., Der-Avakian, A., and Dulcis, D. (2020). Serotonergic Plasticity in the Dorsal Raphe Nucleus Characterizes Susceptibility and Resilience to Anhedonia. *J Neurosci* 40, 569–584.
- Prasad, S., Ponimaskin, E., and Zeug, A. (2019). Serotonin receptor oligomerization regulates cAMP-based signaling. *J Cell Sci* 132, jcs230334.
- Pucadyil, T.J., and Chattopadhyay, A. (2004). Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin(1A) receptors from bovine hippocampus. *Biochim Biophys Acta* 1663, 188–200.
- Purkayastha, S., Ford, J., Kanjilal, B., Diallo, S., Del Rosario Inigo, J., Neuwirth, L., El Idrissi, A., Ahmed, Z., Wieraszko, A., Efrain, C., et al. (2012). Clozapine Functions Through the Prefrontal Cortex Serotonin 1A Receptor to Heighten Neuronal Activity via Calmodulin Kinase II-NMDA Receptor Interactions. *J Neurochem* 120, 396–407.
- Qu, W., Liu, N.-K., Wu, X., Wang, Y., Xia, Y., Sun, Y., Lai, Y., Li, R., Shekhar, A., and Xu, X.-M. (2020). Disrupting nNOS-PSD95 Interaction Improves Neurological and Cognitive Recoveries after Traumatic Brain Injury. *Cereb Cortex* 30, 3859–3871.
- Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Crystalline Serotonin. *Science* 108, 329–330.
- Ren, J., Friedmann, D., Xiong, J., Liu, C.D., Ferguson, B.R., Weerakkody, T., DeLoach, K.E., Ran, C., Pun, A., Sun, Y., et al. (2018). Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. *Cell*.
- Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Gorinski, N., Guseva, D., Abdel-Galil, D., Fröhlich, M., et al. (2012). Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci* 125, 2486–2499.

- Reza-Zaldivar, E.E., Hernández-Sápiens, M.A., Minjarez, B., Gómez-Pinedo, U., Sánchez-González, V.J., Márquez-Aguirre, A.L., and Canales-Aguirre, A.A. (2020). Dendritic Spine and Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease: A Focus on MicroRNA. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 255.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K.C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., el Mestikawy, S., Hamon, M., and Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 417, 181–194.
- Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Guiard, B.P., Stephen, A., Metzger, K.L., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Beck, S.G., et al. (2010). 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65, 40–52.
- Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Nguyen, T.H., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Guiard, B.P., Beck, S.G., Hen, R., et al. (2011). Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J. Neurosci* 31, 6008–6018.
- Rood, B.D., Calizo, L.H., Piel, D., Spangler, Z.P., Campbell, K., and Beck, S.G. (2014). Dorsal Raphe Serotonin Neurons in Mice: Immature Hyperexcitability Transitions to Adult State during First Three Postnatal Weeks Suggesting Sensitive Period for Environmental Perturbation. *J. Neurosci.* 34, 4809–4821.
- Rosenzweig-Lipson, S. (2011). New Horizons for Selective 5-HT_{2C} Receptor Ligands in Psychiatric/Neurological Disorders. *Neuropsychopharmacology* 36, 363–364.
- Salaciak, K., and Pytko, K. (2021). Biased agonism in drug discovery: Is there a future for biased 5-HT_{1A} receptor agonists in the treatment of neuropsychiatric diseases? *Pharmacology & Therapeutics* 227, 107872.
- Sarkar, B., Das, A.K., Arumugam, S., Kaushalya, S.K., Bandyopadhyay, A., Balaji, J., and Maiti, S. (2012). The dynamics of somatic exocytosis in monoaminergic neurons. *Front Physiol* 3, 414.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., and Tymianski, M. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284, 1845–1848.
- Savitz, J., Lucki, I., and Drevets, W.C. (2009). 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog. Neurobiol.* 88, 17–31.
- Selvaraj, S., Mouchlianitis, E., Faulkner, P., Turkheimer, F., Cowen, P.J., Roiser, J.P., and Howes, O. (2015). Presynaptic Serotonergic Regulation of Emotional Processing: A Multimodal Brain Imaging Study. *Biol Psychiatry* 78, 563–571.
- Sengupta, A., Bocchio, M., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2017). Control of Amygdala Circuits by 5-HT Neurons via 5-HT and Glutamate Cotransmission. *J Neurosci* 37, 1785–1796.
- Serrats, J., Mengod, G., and Cortés, R. (2005). Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 29, 83–91.

- So, C.H., Varghese, G., Curley, K.J., Kong, M.M.C., Alijanian, M., Ji, X., Nguyen, T., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2005). D1 and D2 Dopamine Receptors Form Heterooligomers and Cointernalize after Selective Activation of Either Receptor. *Mol Pharmacol* 68, 568–578.
- So, C.H., Verma, V., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2007). Desensitization of the dopamine D1 and D2 receptor hetero-oligomer mediated calcium signal by agonist occupancy of either receptor. *Mol Pharmacol* 72, 450–462.
- Sørensen, L., Strømgaard, K., and Kristensen, A.S. (2014). Characterization of intracellular regions in the human serotonin transporter for phosphorylation sites. *ACS Chem Biol* 9, 935–944.
- Southard, R.C., Haggard, J., Crider, M.E., Whiteheart, S.W., and Cooper, R.L. (2000). Influence of serotonin on the kinetics of vesicular release. *Brain Research* 871, 16–28.
- Spaethling, J.M., Piel, D., Dueck, H., Buckley, P.T., Morris, J.F., Fisher, S.A., Lee, J., Sul, J.-Y., Kim, J., Bartfai, T., et al. (2014). Serotonergic neuron regulation informed by in vivo single-cell transcriptomics. *FASEB J* 28, 771–780.
- Sprouse, J.S., and Aghajanian, G.K. (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT1A and 5-HT1B agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27, 707–715.
- Stamm, S., Gruber, S.B., Rabchevsky, A.G., and Emeson, R.B. (2017). The activity of the serotonin receptor 2C is regulated by alternative splicing. *Hum Genet* 136, 1079–1091.
- Su, Y.-S., Chiu, Y.-Y., Lin, S.-Y., Chen, chih-cheng, and Sun, W.-H. (2016). Serotonin Receptor 2B Mediates Mechanical Hyperalgesia by Regulating Transient Receptor Potential Vanilloid 1. *Journal of Molecular Neuroscience* 59.
- Sullivan, N.R., Crane, J.W., Damjanoska, K.J., Carrasco, G.A., D'Souza, D.N., Garcia, F., and Van de Kar, L.D. (2005). Tandospirone activates neuroendocrine and ERK (MAP kinase) signaling pathways specifically through 5-HT1A receptor mechanisms in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371, 18–26.
- Szlachta, M., Kuśmider, M., Pabian, P., Solich, J., Kolasa, M., Żurawek, D., Dziedzicka-Wasylewska, M., and Faron-Górecka, A. (2018). Repeated Clozapine Increases the Level of Serotonin 5-HT1AR Heterodimerization with 5-HT2A or Dopamine D2 Receptors in the Mouse Cortex. *Front Mol Neurosci* 11.
- Tecott, L.H., Maricq, A.V., and Julius, D. (1993). Nervous system distribution of the serotonin 5-HT3 receptor mRNA. *PNAS* 90, 1430–1434.
- Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5, 30–34.
- Thompson, A.J., and Lummis, S.C.R. (2006). 5-HT3 Receptors. *Curr Pharm Des* 12, 3615–3630.
- Tikkanen, R., Tiihonen, J., Rautiainen, M.R., Paunio, T., Bevilacqua, L., Panarsky, R., Goldman, D., and Virkkunen, M. (2015). Impulsive alcohol-related risk-behavior and

emotional dysregulation among individuals with a serotonin 2B receptor stop codon. *Transl Psychiatry* 5, e681.

Toneatti, R., Shin, J.M., Shah, U.H., Mayer, C.R., Saunders, J.M., Fribourg, M., Arsenovic, P.T., Janssen, W.G., Sealton, S.C., López-Giménez, J.F., et al. (2020). Interclass GPCR heteromerization affects localization and trafficking. *Sci Signal* 13, eaaw3122.

Tóth, D.J., Tóth, J.T., Gulyás, G., Balla, A., Balla, T., Hunyady, L., and Várnai, P. (2012). Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci* 125, 2185–2197.

Tournois, C., Mutel, V., Manivet, P., Launay, J.M., and Kellermann, O. (1998). Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 273, 17498–17503.

Trudeau, L.-É. (2004). Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J Psychiatry Neurosci* 29, 296–310.

Trueta, C., Kuffler, D.P., and De-Miguel, F.F. (2012). Cycling of Dense Core Vesicles Involved in Somatic Exocytosis of Serotonin by Leech Neurons. *Frontiers in Physiology* 3.

Turcotte-Cardin, V., Vahid-Ansari, F., Luckhart, C., Daigle, M., Geddes, S.D., Tanaka, K.F., Hen, R., James, J., Merali, Z., Béïque, J.-C., et al. (2019). Loss of Adult 5-HT1A Autoreceptors Results in a Paradoxical Anxiogenic Response to Antidepressant Treatment. *J. Neurosci.* 39, 1334–1346.

Twarkowski, H., Hagen, H., and Manahan-Vaughan, D. (2016). The 5-hydroxytryptamine4 receptor enables differentiation of informational content and encoding in the hippocampus. *Hippocampus* 26, 875–891.

Vahid-Ansari, F., Daigle, M., Manzini, M.C., Tanaka, K.F., Hen, R., Geddes, S.D., Béïque, J.-C., James, J., Merali, Z., and Albert, P.R. (2017). Abrogated Freud-1/Cc2d1a Repression of 5-HT1A Autoreceptors Induces Fluoxetine-Resistant Anxiety/Depression-Like Behavior. *J Neurosci* 37, 11967–11978.

Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Aubier, B., Greengard, P., Hervé, D., and Girault, J.-A. (2010). Mechanisms of Locomotor Sensitization to Drugs of Abuse in a Two-Injection Protocol. *Neuropsychopharmacol* 35, 401–415.

Van Hartesveldt, C., Moore, B., and Hartman, B.K. (1986). Transient midline raphe glial structure in the developing rat. *Journal of Comparative Neurology* 253, 175–184.

Varghese, F.P., and Brown, E.S. (2001). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder: A Brief Primer for Primary Care Physicians. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 3, 151–155.

Viñals, X., Moreno, E., Lanfumey, L., Cordoní, A., Pastor, A., de La Torre, R., Gasperini, P., Navarro, G., Howell, L.A., Pardo, L., et al. (2015). Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT2A Receptors. *PLoS Biol* 13, e1002194.

- Vincent, M.Y., Donner, N.C., Smith, D.G., Lowry, C.A., and Jacobson, L. (2018a). Dorsal raphé nucleus glucocorticoid receptors inhibit tph2 gene expression in male C57BL/6J mice. *Neuroscience Letters* 665, 48–53.
- Vincent, M.Y., Donner, N.C., Smith, D.G., Lowry, C.A., and Jacobson, L. (2018b). Dorsal raphé nucleus glucocorticoid receptors inhibit tph2 gene expression in male C57BL/6J mice. *Neurosci Lett* 665, 48–53.
- Voisin, A.N., Mnie-Filali, O., Giguère, N., Fortin, G.M., Vigneault, E., El Mestikawy, S., Descarries, L., and Trudeau, L.-É. (2016). Axonal Segregation and Role of the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT3 in Serotonin Neurons. *Front Neuroanat* 10, 39.
- Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R.M., Lunzer, M.M., Sharma, S.K., Kostenis, E., Portoghese, P.S., and Whistler, J.L. (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9050–9055.
- Werry, T.D., Loiacono, R., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2008). RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther* 119, 7–23.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., and Marshall, F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679–682.
- Winter, J.C., Eckler, J.R., and Rabin, R.A. (2004). Serotonergic/glutamatergic interactions: the effects of mGlu_{2/3} receptor ligands in rats trained with LSD and PCP as discriminative stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 172, 233–240.
- Wu, Q.J., and Tymianski, M. (2018). Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Mol Brain* 11, 15.
- Wu, X., Kushwaha, N., Banerjee, P., Albert, P.R., and Penington, N.J. (2013). Role of protein kinase C in agonist-induced desensitization of 5-HT_{1A} receptor coupling to calcium channels in F11 cells. *Eur J Pharmacol* 706, 84–91.
- Wylie, C.J., Hendricks, T.J., Zhang, B., Wang, L., Lu, P., Leahy, P., Fox, S., Maeno, H., and Deneris, E.S. (2010). Distinct transcriptomes define rostral and caudal serotonin neurons. *J Neurosci* 30, 670–684.
- Xia, Z., Gray, J.A., Compton-Toth, B.A., and Roth, B.L. (2003). A direct interaction of PSD-95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem* 278, 21901–21908.
- Xie, Z., Lee, S.P., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (1999). Serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Letters* 456, 63–67.
- Xu, J., He, J., Castleberry, A.M., Balasubramanian, S., Lau, A.G., and Hall, R.A. (2003). Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 278, 10770–10777.

- Yammamoto, H., Tanaka, S., Tanaka, A., Hide, I., Seki, T., and Sakai, N. (2013). Long-term exposure of RN46A cells expressing serotonin transporter (SERT) to a cAMP analog up-regulates SERT activity and is accompanied by neural differentiation of the cells. *J Pharmacol Sci* 121, 25–38.
- Yao, Y., Bergold, P.J., and Penington, N.J. (2010). Acute Ca(2+)-dependent desensitization of 5-HT(1A) receptors is mediated by activation of protein kinase A (PKA) in rat serotonergic neurons. *Neuroscience* 169, 87–97.
- Yuen, E.Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J., and Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT1A Receptors Regulate NMDA Receptor Channels through a Microtubule-Dependent Mechanism. *J. Neurosci.* 25, 5488–5501.
- Yuen, E.Y., Jiang, Q., Chen, P., Feng, J., and Yan, Z. (2008). Activation of 5-HT2A/C Receptors Counteracts 5-HT1A Regulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Channels in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. *Journal of Biological Chemistry* 283, 17194–17204.
- Zander, J.-F., Münster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gómez-Lira, G., Heinemann, U., Gutiérrez, R., Laube, G., and Ahnert-Hilger, G. (2010). Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 30, 7634–7645.
- Zhang, G., and Stackman, R.W. (2015). The role of serotonin 5-HT2A receptors in memory and cognition. *Frontiers in Pharmacology* 6, 225.
- Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H.N., Cohen, S.J., Munchow, A.H., Barrera, M.P., and Stackman, R.W. (2013). Stimulation of serotonin 2A receptors facilitates consolidation and extinction of fear memory in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology* 64, 403–413.
- Zhang, J., Fan, Y., Li, Y., Zhu, H., Wang, L., and Zhu, M.-Y. (2012). Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *J Neurochem* 123, 1054–1068.
- Zhou, F.C., Sari, Y., and Zhang, J.K. (2000). Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 119, 33–45.