

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I
U.F.R. SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I

Discipline : Sciences Pharmaceutiques

Par **Cécile Mahé**

Récepteur sérotonergique 5-HT₇ et induction d'interleukine-6: étude *in vitro* sur cellules gliales et *in vivo* chez le rat.

Soutenue le 04 février 2005 devant la commission d'examen :

Professeur Alain Beretz	Rapporteur interne
Professeur Eric Tschirhart	Rapporteur externe
Professeur Klaus Starke	Rapporteur externe
Docteur Bernard Bucher	Directeur de thèse
Docteur Philippe Schoeffter	Examineur

SOMMAIRE

Remerciements	4
Abréviations	5
Liste des publications et posters	8
INTRODUCTION:	
1. La sérotonine	9
1.1. Généralités	9
1.2. Neurobiochimie de la sérotonine	9
1.3. Physiologie et principales fonctions centrales	10
1.4. Sérotonine et dépression	12
1.5. Les récepteurs de la sérotonine	14
1.5.1. La famille des récepteurs 5-HT ₁	14
1.5.2. La famille des récepteurs 5-HT ₂	14
1.5.3. Le récepteur 5-HT ₃	15
1.5.4. Les récepteurs 5-HT ₄	15
1.5.5. Les récepteurs 5-HT ₅	15
1.5.6. Le récepteur 5-HT ₆	16
1.5.7. Les récepteurs 5-HT ₇	16
2. Le récepteur 5-HT₇	16
2.1. Découverte et structure	16
2.2. Isoformes du récepteur 5-HT₇ humain	17
2.3. Pharmacologie	20
2.4. Signalisation intracellulaire induite par le récepteur 5-HT₇	24
2.5. Distribution du récepteur 5-HT₇ dans le cerveau	25
2.6. Rôles possibles du récepteur 5-HT₇ dans le système nerveux central	26
2.7. Régulation des fonctions neuroendocrines par le récepteur 5-HT₇	28
3. Les cellules gliales	29
3.1. Les astrocytes	29
3.1.1. Morphologie	29
3.1.2. Principaux rôles des astrocytes	30

3.1.3. Sécrétion de facteurs neurotrophiques et de cytokines	34
3.1.4. Récepteurs sérotoninergiques exprimés par les astrocytes	35
3.2. Les microglies	36
3.2.1. Morphologie	36
3.2.2. Principaux rôles des microglies	37
3.2.3. Sécrétion de facteurs neurotrophiques et de cytokines	39
3.2.4. Récepteurs aux neurotransmetteurs exprimés par les microglies	40
4. L'Interleukine-6	40
4.1. Gène	40
4.2. Structure	41
4.3. Récepteurs de l'IL-6 et transduction du signal	41
4.4. Production et sécrétion	43
4.5. Principaux rôles physiologiques de l'IL-6 dans le SNC	43
4.6. Régulation de la production d'IL-6 par les astrocytes	44
4.7. Régulation de la production d'IL-6 par les microglies	45
4.8. Effets pathologiques de l'IL-6 dans le SNC	46
5. Conclusion	47

PARTIE EXPERIMENTALE:

1. Objectifs de la thèse	49
2. Résultats	50
Chapitre I : Expression du récepteur 5-HT₇ dans divers lignées de glioblastomes humains et implication dans la modulation de la synthèse de l'IL-6	52
1. Etude de l'expression fonctionnelle du récepteur 5-HT ₇ dans des glioblastomes humains (publication n°1)	53
2. Etude de l'effet de l'activation du récepteur 5-HT ₇ sur l'expression et la sécrétion de l'IL-6 dans les lignées de glioblastomes humains (publication n°2)	61
Chapitre II : Implication du récepteur 5-HT₇ dans l'expression de l'IL-6 dans une lignée microgliale humaine (MC-3) (publication n°3)	104
Chapitre III : Etude de la relation stimulation du récepteur 5-HT₇/induction de l'IL-6 dans des cultures primaires d'astrocytes de rat et <i>in vivo</i> chez le rat.	133
1. Etude de l'expression du récepteur 5-HT ₇ dans des cultures primaires d'astrocytes de rat.	134

1.1. Objectifs	134
1.2. Matériels et méthodes	134
1.3. Résultats et discussion	135
2. Impact de la stimulation du récepteur 5-HT ₇ sur le taux plasmatique circulant d'IL-	
6.	138
2.1. Objectifs	138
2.2. Matériels et méthodes	138
2.3. Résultats	140
2.4. Discussion	143
DISCUSSION GENERALE	146
CONCLUSION – PERSPECTIVES	155
BIBLIOGRAPHIE	156

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Philippe Schoeffter qui m'a donné l'opportunité d'effectuer ma thèse dans l'industrie en m'accueillant dans son laboratoire, pour sa grande disponibilité et pour les collaborations qu'il a su établir durant mon travail de thèse.

J'exprime également ma reconnaissance au Docteur Bernard Bucher qui a accepté de prendre la responsabilité de ce travail vis-à-vis de l'université, ainsi que pour ses conseils et sa disponibilité.

Je tiens à remercier les Professeurs Alain Beretz, Klaus Starke et Eric Tschirhart qui ont accepté de consacrer leur précieux temps au jugement de ce travail.

Un grand merci à Ionel Bobirnac pour tous ses conseils éclairés tant sur le plan scientifique que humain, son soutien et pour avoir supporté mes humeurs.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont participé à mon travail, aux Drs. Erika Loetscher, Kumlesh K. Dev, Uwe Otten, Daniel Hoyer, Conrad Gentsch, Dominik Feuerbach et Antonio Silva, ainsi que pour leurs expertises techniques, Geneviève Kuntzelmann, Fabienne Walther et Christian Kohler.

Un grand merci à tous ceux que j'ai eu l'opportunité de rencontrer lors de mon travail à Novartis avec une mention particulière à Stéphanie Neurdin, Michel Bernhard et Valérie Guez, pour leur amitié et leur soutien, à tous les bons moments passés ensemble au cours de ces 3 dernières années.

Un grand merci à mes parents et à mes frères, qui m'ont toujours soutenue et encouragée, à tous mes amis toujours disponibles avec une mention particulière à Amar et Aline Bennisroune, et à Olivier.

Abréviations

AC:	adénylate cyclase
ACTH :	Adrenocorticotropic hormone
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc :	adénosine-3':5'-monophosphate cyclique
AP-1:	activator protein-1
ARNm:	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
ATPase :	adénosine triphosphate synthétase
BDNF :	brain-derived neurotrophic factor
bFGF :	basic fibroblast growth factor
BME:	basal medium Eagle's
BSA:	bovine serum albumine
CA :	Corne d'Ammon (hippocampe)
Ca ²⁺ :	ion calcium
CHO :	chinese hamster ovary cells
Cl ⁻ :	ion chlorure
CLC :	cardiotrophin-like cytokine
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CNTF :	ciliary neurotrophic factor
COS-7 :	lignée cellulaire immortalisée issue de fibroblaste de singe
CRE :	cAMP response element
CRH :	corticotrophin-releasing hormone
CT-1:	cardiotrophine-1
5-CT :	5-carboxyamidotryptamine
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO :	diméthylsulfoxyde
dpm:	désintégrations par minute
DR-4004 :	2a-[4-(4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridyl)butyl]-2,3,4,5-tetrahydrobenzo[<i>c,d</i>]indol-2(1 <i>H</i>)-one
DR-4365 :	2a-[4-(9-Dimethylcarbamoylmethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrido[3,4- <i>b</i>]indol-2-yl)butyl]-2a,3,4,5-tetrahydrobenz[<i>cd</i>]indol-2(1 <i>H</i>)-one
DR-4485 :	2a-[4-[4-(4-Chlorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridyl]butyl]-6-chloro-2a,3,4,5-tetrahydrobenzo[<i>cd</i>]indol-2(1 <i>H</i>)-one
EC ₅₀ :	concentration produisant 50% de l'effet maximal
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
E _{max} :	effet maximal
Epac :	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors (cAMP-GEFs)
ERK1/2 :	extracellular signal-regulated kinase 1 et 2
FCS :	foetal calf serum
GABA :	gamma-aminobutyric acid
GDNF :	glial-derived neurotrophic factor
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
gp :	glycoprotéine
Grb2 :	growth factor receptor binding peptide 2
GRE :	glucocorticoïde responsive element
³ H :	tritium
H89 :	N-[2-(p- bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide

HEK293 :	human embryonic kidney 293 cells
HGF :	hepatocyte growth factor
5-HIAA :	5-hydroxyindole acetic acid
HHS :	axe hypothalamo-hypophysio-surrénal
5-HT :	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
5-HTP :	5-hydroxytryptophane
IBMX :	isobuthylmethylxanthine
IFN- γ :	interféron gamma
IGF-1 :	insulin-like growth factor 1
IL-1 β :	interleukine-1 beta
IL-6 :	interleukine-6
MAO :	inhibiteur de l'enzyme monoamine oxydase-A
i.p. :	intrapéritonéal
JAK:	Janus kinase
K ⁺ :	ion potassium
kb :	kilobase
K _B :	concentration d'antagoniste qui déplace de deux fois la valeur de l'EC ₅₀ de l'agoniste
kDa :	kiloDalton
kg :	kilogramme
K _i :	concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés
KT-5720 :	(9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4i][1,6]benzodiazine -10-carboxylic acid hexyl ester
LHRH :	luteinizing hormone-releasing hormone
LIF :	leukemia inhibitory factor
LSD:	lysergic acid diethylamide
LPS:	lipopolysaccharide
M:	mole par litre
MAO-A:	monoamine oxydase-A
MAPkinase:	mitogen activated protein kinase
MEM:	minimum essential medium
5-MeOT:	5-méthoxytryptamine
mg :	milligramme
μ g :	microgramme
min :	minute
mL :	millilitre
mM:	millimole par litre
μ M:	micromole par litre
Na ⁺ :	ion sodium
NADH:	nicotinamide adenine dinucleotide
NF-IL-6 :	nuclear factor of IL-6
NF- κ B :	nuclear factor kappa B
NGF:	nerve growth factor
NMDA:	N-methyl-D-aspartate
nM :	nanomole par litre
NO:	monoxyde d'azote
NSC:	noyau suprachiasmique
NT-3:	neurotrophine 3
NT4/5:	neurotrophine 4/5

8-OH-DPAT:	(±)-8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide
PACAP :	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
pb:	paire de bases
PC12 :	pheochromocytoma cells
PCR :	polymerase chain reaction
PDE :	phosphodiesterase
pEC ₅₀ :	logarithme changé de signe de l'EC ₅₀
PGE :	prostaglandine
PKA :	protéine kinase A
pK _B :	logarithme changé de signe du K _B
PKC :	protéine kinase C
pK _i :	logarithme changé de signe du K _i
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acétate
PVDF :	polyvinylidène difluoride
RCPG :	récepteur couplé à une protéine G
REM :	rapid eye movement
RIA :	radioimmunoassay
rpm :	rotations par minute
RT-PCR :	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SB-258719 :	(R)-3, <i>N</i> -diméthyl- <i>N</i> -[1-méthyl-3-(4-méthyl-piperidin-1-yl)propyl]benzène sulfonamide
SB-258741 :	<i>R</i> -(+)-1-(toluène-3-sulfonyl)-2-[2-(4-méthylpiperidin-1-yl)éthyl]-pyrrolidine
SB-269970 :	(<i>R</i>)-3-(2-(2-(4-méthylpiperidin-1-yl)éthyl)-pyrrolidine-1-sulfonyl)-phénol
SB-656104 :	6-((<i>R</i>)-2-[2-[4-(4-Chloro-phénoxy)-piperidin-1-yl]-éthyl]-pyrrolidine-1-sulphonyl)-1 <i>H</i> -indole hydrochloride
SB-691673 :	2-{2-[4-(5-fluoro-2-oxo-2,3-dihydro-benzoimidazol-1-yl)-piperidin-1-yl]-éthyl}-2,3,4,5-tetrahydro-benzo[<i>c</i>]azépin-1-one
SBP :	serotonin binding protein
SEM :	erreur standard sur la moyenne
SHP2 :	Src-homology tyrosine phosphatase
sIL-6R :	récepteur soluble de l'IL-6
SNC :	système nerveux central
Sos :	son of sevenless (guanine nucleotide exchange factor of Ras)
SSRI :	selective serotonin reuptake inhibitor
STAT :	signal transducer and activator of transcription
SV40:	Simian virus 40
TGF-β :	transforming growth factor-beta
TNF-α :	tumor necrosis factor-alpha
Trk:	récepteur à activité tyrosine kinase
VIP :	vasoactive intestinal peptide

Listes des publications et posters

Publications:

Mahé C., Loetscher E., Feuerbach D., Müller W., Seiler M., Schoeffter P. (2004). Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **495**, 97-102.

Mahé C., Bernhard M., Bobirnac I., Keser C., Loetscher E., Feuerbach D., Dev K.K., Schoeffter P. (2004). Functional expression of serotonin 5-HT₇ receptors in human glioblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.*, **143**, 404-410.

Mahé C., Loetscher E., Schoeffter P. (en soumission pour publication). 5-HT₇ receptor activation leads to increased IL-6 synthesis in human glioblastoma cells.

Mahé C., Loetscher E., Dev K.K., Bobirnac I., Otten U., Schoeffter P. (2005). Serotonin 5-HT₇ receptors are coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells, accepté pour publication dans *Neuropharmacology*.

Posters:

Mahé C., Bernhard M., Bobirnac I., Keser C., Loetscher E., Feuerbach D., Dev K.K., Schoeffter P. (2004). Functional expression of serotonin 5-HT₇ receptors in human glioblastoma cells. Abstracts of the 8th Annual Meeting of the Société Française de Pharmacologie, Strasbourg, 26-28 April 2004 (P-180). *Fund. and Clinical Pharmacol.* **18**, 215-269.

Mahé C., Loetscher E., Schoeffter P. (2004). 5-HT₇ receptor activation leads to increased IL-6 synthesis in human glioblastoma cells. Abstracts of the 4th congress of the federation of the European pharmacological societies (EPHAR), Porto 13-17 July 2004 (P 05.22). *Fund. and Clinical Pharmacol.* **18 Supp. 1**, 23-126.

INTRODUCTION

1. La sérotonine

1.1. Généralités

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine dérivant de l'acide aminé tryptophane et ayant un rôle de neurotransmetteur. Elle fut découverte à la fin des années 1940. La présence d'un facteur vasotonique dans le sang était pressentie dès le début du siècle, mais ce n'est qu'en 1935 qu'Erspamer montre l'existence d'une substance capable de contracter les muscles lisses; le fait qu'il l'ait trouvée dans les cellules chromaffines de l'intestin l'amène à l'appeler "entéramine". En 1948, le groupe de Rapport isole un tel facteur à partir du sérum du sang et l'appelle en conséquence "sérotonine" (Rapport *et al.*, 1948) puis détermine la structure du composé commun comme étant la 5-HT (Rapport, 1949). En 1953, Twarog et Page démontrent que cette amine est aussi un neurotransmetteur du cerveau des mammifères. Woolley (1968) présente l'hypothèse que cette amine peut être impliquée dans certaines maladies mentales. Cette hypothèse sera précisée ensuite, notamment par Coppen en 1969 proposant que la sérotonine joue un rôle dans la dépression. Les 30 dernières années ont vu une multiplication impressionnante du nombre des travaux expérimentaux et observations cliniques démontrant l'implication de la sérotonine non seulement dans la dépression mais aussi l'anxiété, la conduite suicidaire, les désordres alimentaires, le trouble obsessionnel compulsif et l'alcoolisme. En parallèle, il était aussi montré que la sérotonine exerçait un rôle important dans des fonctions physiologiques telles que le sommeil, l'appétit, le rythme circadien, la régulation de l'humeur, les fonctions cognitives et le développement du cerveau.

1.2. Neurobiochimie de la sérotonine

La sérotonine est synthétisée en deux étapes à partir du L-tryptophane circulant qui peut traverser la barrière hémato-encéphalique contrairement à la 5-HT. La synthèse a lieu dans le cerveau au niveau du raphé dans les neurones sérotoninergiques (où la demi-vie de la sérotonine est de quelques minutes) et également en périphérie (où la demi-vie est d'une

dizaine d'heures) : cette dernière a lieu essentiellement dans les cellules entérochromaffines (dites de Kultchisky-Masson) du tractus digestif et également dans les plaquettes. Le tryptophane est tout d'abord hydroxylé en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) sous l'influence de la tryptophane hydroxylase, ce qui est l'étape limitante de la synthèse. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en 5-HT par la décarboxylase des acides aminés L-aromatiques (figure 1).

Dans le système nerveux central, la sérotonine est stockée dans des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons présynaptiques des neurones sérotoninergiques. La sérotonine stockée est associée à l'ATP et à une protéine de liaison spécifique de la 5-HT (SBP) (Hertz *et al.*, 1981). La SBP se lie à la 5-HT avec une haute affinité pour former un complexe : le 5-HT-SBP. La libération de ce complexe des vésicules est dépendante d'ions comme le calcium et le sodium, et l'augmentation du calcium intracellulaire induit la libération du complexe 5-HT-SBP dans la fente synaptique. Un changement des conditions ioniques dans la fente synaptique entraîne la désintégration du complexe 5-HT-SBP et ainsi la libération de la 5-HT (Gershon *et al.*, 1984).

Le recaptage du neurotransmetteur par le neurone présynaptique et/ou les cellules gliales est la principale voie conduisant à l'inactivation de la sérotonine. Le recaptage de la sérotonine est médié par un transporteur Na^+/Cl^- spécifique de la 5-HT localisé dans la membrane présynaptique (Briley, 1985 ; Dawson *et al.*, 1983). L'enzyme primaire impliquée dans l'inactivation de la sérotonine est la monoamine oxydase-A (MAO-A), elle métabolise la 5-HT en 5-hydroxy-indole-acétaldéhyde, qui est ensuite oxydé en acide 5-hydroxy-indole-acétique (5-HIAA) (figure 1). Dans l'épiphyse, dans laquelle la concentration en sérotonine est 50 fois plus élevée que dans le cerveau entier, la 5-HT est métabolisée en N-acétylsérotonine puis en N-acétyl-5-méthoxytryptamine (la mélatonine).

1.3. Physiologie et principales fonctions centrales

La sérotonine est surtout présente dans le tractus gastro-intestinal (95 % du total de l'organisme), les plaquettes sanguines et le cerveau, mais on la retrouve dans la plupart des tissus de l'organisme.

Le système sérotonergique cérébral a été décrit notamment par Tork (1990) et par Jacobs et Azmitia (1992). Il est avant tout caractérisé par sa centralisation très marquée puisque tous les corps cellulaires neuronaux sont centralisés dans le raphé, une région du tronc cérébral, où

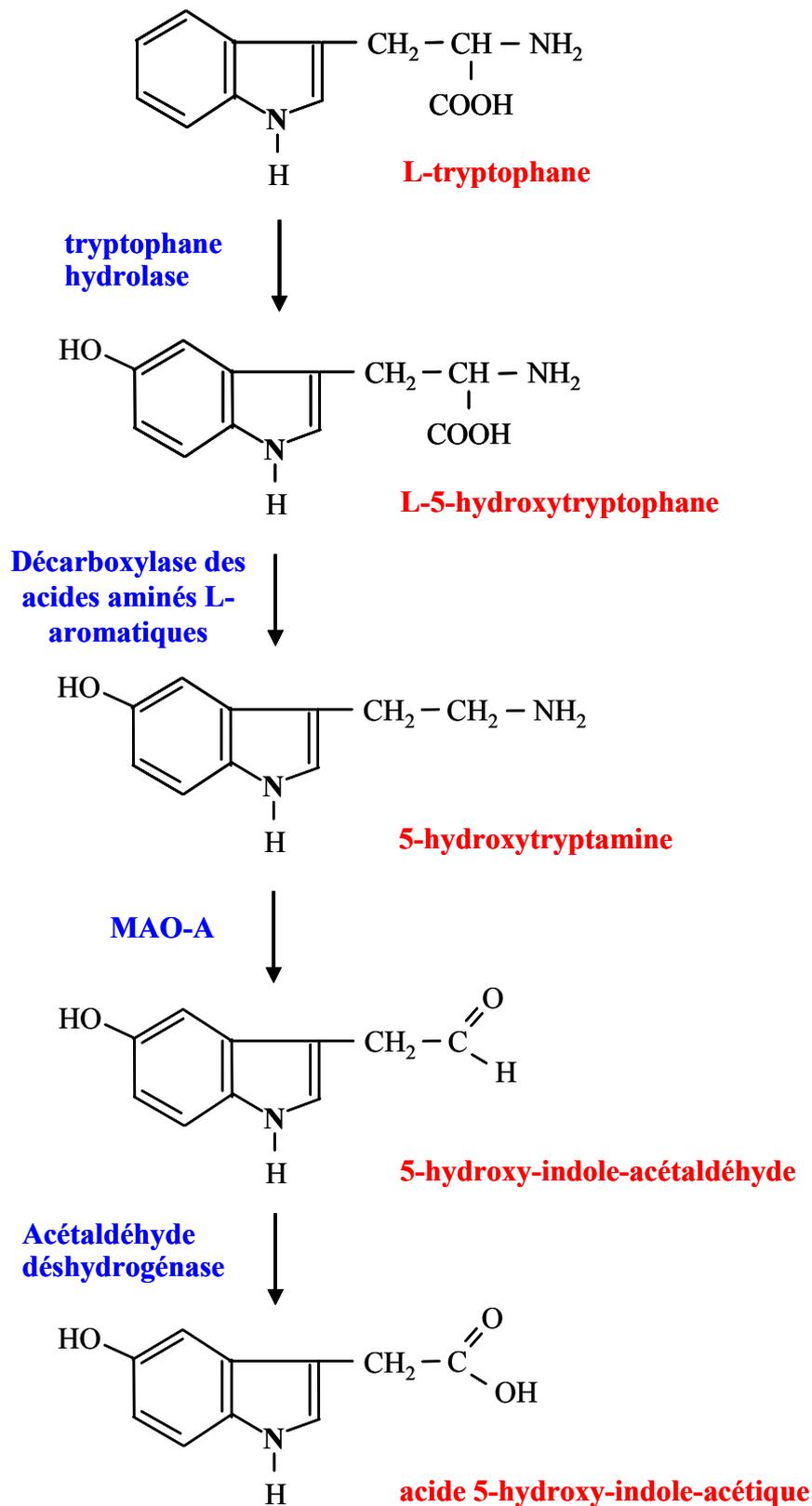


Figure 1. Biosynthèse et dégradation de la sérotonine

ils sont regroupés dans 5-6 noyaux; ces neurones se projettent dans pratiquement tout l'ensemble du cerveau à partir de 2 noyaux majeurs (raphé dorsal et raphé médian) (figure 2).

La sérotonine, très largement distribuée dans le cerveau, est impliquée dans le contrôle de l'humeur et de l'impulsion (Young *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1998). De plus, la sérotonine joue un rôle majeur dans la régulation de la fonction neuroendocrine. La sérotonine est un régulateur de l'humeur et de la vigilance. Elle régule en outre les rythmes circadiens et saisonniers. Elle inhibe la douleur en libérant de l'enképhaline qui a des effets analgésiques. Elle agit sur le système ortho- (active les actions et pertes d'énergie) et para-sympathique (favorise la récupération d'énergie et la digestion) du système nerveux végétatif.

1.4. Sérotonine et dépression

La sérotonine intervient dans de nombreux désordres psychiatriques : la dépression, la schizophrénie, l'autisme, l'anxiété, les troubles du comportement, ainsi que dans la maladie d'Alzheimer, la migraine, la douleur, l'obésité et les troubles du sommeil (pour revue voir Jones & Blackburn, 2002).

La théorie monoaminergique de la dépression date du milieu des années 1960. Selon cette théorie, une déficience de l'activité monoaminergique (en particulier sérotoninergique et noradrénergique) dans le cerveau serait à l'origine de la dépression mentale et cette maladie pourrait être traitée par des médicaments qui augmentent cette activité (Schildkraut, 1965). Plusieurs études ont montré que des anomalies du système sérotoninergique du cerveau étaient associées à des comportements dépressifs et suicidaires.

Il existe sur le marché plusieurs types de médicaments antidépresseurs visant à restaurer un taux de sérotonine synaptique normal. Ils agissent sur le taux de sérotonine soit en inhibant sa recapture par les neurones, soit son catabolisme. Les SSRI (inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine) sont la fluoxétine (Prozac[®]), la fluvoxamine (Floxyfral[®]), le citalopram (Seropram[®]), la paroxétine (Deroxat[®]) et la sertraline (Zoloft[®]). Le Prozac[®] est l'antidépresseur le plus utilisé aujourd'hui. Les médicaments qui inhibent le catabolisme de la sérotonine, les IMAO (inhibiteurs de l'enzyme MAO-A) sont également des antidépresseurs. Les IMAO commercialisés sont la toloxatone (Humoryl[®]) et la moclobémide (Moclamine[®]).

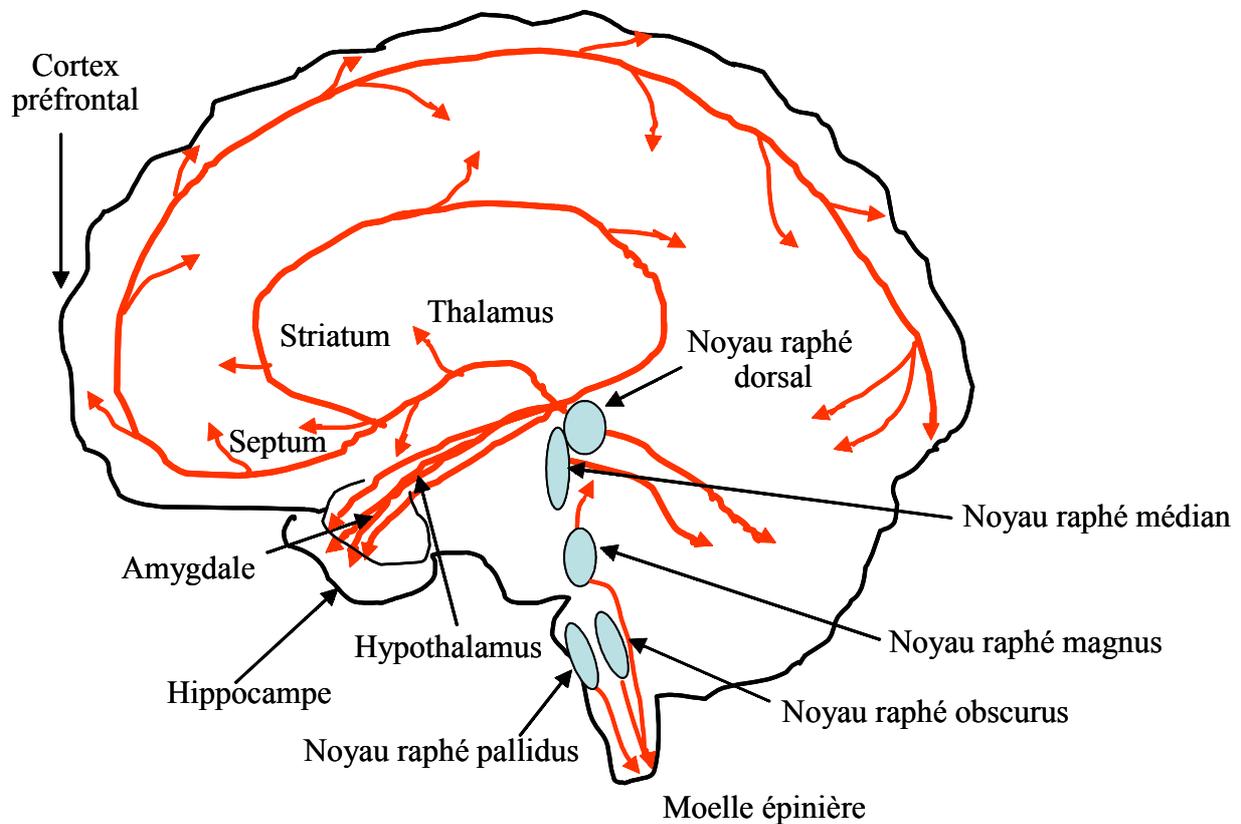


Figure 2. Localisation des voies sérotoninergiques du système nerveux central chez les mammifères.

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont rassemblés en 5 noyaux (représentés en bleu sur la figure). Les noyaux du raphé magnus, pallidus et obscurus contiennent des neurones dont les axones se terminent dans la moelle épinière. Les noyaux du raphé dorsal et médian sont composés de neurones dont les fibres se terminent dans de nombreuses régions du cerveau: le cortex cérébral, le septum, l'hippocampe, le striatum, le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale.

1.5. Les récepteurs de la sérotonine

L'action de la sérotonine est médiée par sept classes de récepteurs différents (5-HT₁₋₇) basées sur des critères structurels, fonctionnels et pharmacologiques (Hoyer *et al.*, 1994). Il y a en tout 14 sous-types de récepteurs sérotoninergiques distincts structurellement et par leur pharmacologie. Ce sont des récepteurs à sept segments transmembranaires, récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G excepté le récepteur 5-HT₃, qui est un récepteur canal ionique. Tous les récepteurs sérotoninergiques sont à la fois situés aux niveaux pré- et post-synaptique.

1.5.1. La famille des récepteurs 5-HT₁

Cette famille est composée de 5 membres issus de 5 gènes différents : 5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E et 1F, possédant une forte homologie de séquence entre eux et sont tous couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine G_i ou G_o.

L'activation des récepteurs 5-HT_{1D} et 5-HT_{1B} induit une vasoconstriction des vaisseaux cérébraux, ainsi des agonistes de ces récepteurs sont utilisés en thérapeutique comme anti-migraineux, c'est le cas du sumatriptan, du zolmitriptan, du naratriptan et du rizatriptan. De plus, une activation des récepteurs 5-HT_{1A} pourrait avoir des effets anxiolytiques et antidépresseurs, en effet, la buspirone, un agoniste partiel de ces récepteurs est utilisé comme anxiolytique et antidépresseur.

Les récepteurs 5-HT_{1A} agissent sur la synthèse de facteurs neuroendocriniens et leur stimulation entraîne une augmentation plasmatique d'ACTH, de corticostéroïdes et de prolactine.

1.5.2. La famille des récepteurs 5-HT₂

Cette famille est composée de 3 membres issus de 3 gènes différents: 5-HT_{2A}, 2B et 2C, possédant une forte homologie de séquence dans leurs sept domaines transmembranaires mais sont structurellement différents des autres récepteurs 5-HT. Ils sont couplés positivement à la phospholipase C via une protéine G_q et induisent une augmentation de l'accumulation des inositol phosphates et du calcium intracellulaire.

Les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} sont impliqués dans la schizophrénie et la dépression. En effet, un nombre important d'antipsychotiques de type neuroleptiques atypiques, comme la

clozapine, la loxapine, l'olanzapine, la rispéridone, la ritansérine et l'amoxapine, sont de puissants antagonistes de ces récepteurs. Ils sont également impliqués dans la migraine : les antimigraineux, le pizotifène, l'oxétorone et le méthysergide, sont des antagonistes de ces récepteurs.

1.5.3. Le récepteur 5-HT₃

Le récepteur 5-HT₃ est un récepteur canal, qui est perméable aux cations. Il y a 2 gènes identifiés pour ce récepteur : 5-HT_{3A} et 3B. Il est trouvé impliqué dans l'anxiété et la cognition.

Les antagonistes de ce récepteur sont de puissants anti-émétiques utilisés en complément dans la chimiothérapie anti-cancéreuse. Ils semblent également posséder des propriétés anxiolytiques et antipsychotiques.

1.5.4. Les récepteurs 5-HT₄

Cette famille possède 4 sous-types issus de l'épissage alternatif d'un même gène nommés 5-HT_{4a}, 4b, 4c et 4d. Ils sont tous couplés positivement à l'adénylate cyclase via une protéine G_s.

Ce récepteur modulerait le comportement, les performances cognitives et serait impliqué dans l'anxiété. Ce récepteur est également présent dans le tractus gastro-intestinal et des agonistes de ce récepteur sont utilisés dans le traitement du reflux gastro-oesophagien et de la constipation (tegaserod ou Zelmac[®]).

1.5.5. Les récepteurs 5-HT₅

Cette famille est composée de 2 membres issus de 2 gènes différents : le 5-HT_{5A} et 5B. Le récepteur cloné 5-HT_{5A} serait couplé négativement à l'AMPC. Ces récepteurs ont été très peu caractérisés jusqu'à maintenant et ils n'ont pas été trouvés à l'état de protéine fonctionnelle.

1.5.6. Le récepteur 5-HT₆

Le récepteur 5-HT₆ est couplé positivement à l'adénylate cyclase via une protéine G_s. Le manque de ligand spécifique, jusqu'à ces dernières années, n'a pas encore permis de proposer réellement un rôle fonctionnel pour ce récepteur.

Il pourrait représenter une cible importante pour des traitements psychiatriques, avec un faible potentiel d'effets secondaires dû à l'absence de ce récepteur dans les tissus périphériques. De plus, plusieurs antipsychotiques typiques et atypiques possèdent une affinité élevée pour ce récepteur (Roth *et al.*, 1994).

1.5.7. Les récepteurs 5-HT₇

Cette famille possède 4 sous-types issus de l'épissage alternatif d'un même gène nommés 5-HT_{7a}, _{7b} et _{7c} chez le rat et 5-HT_{7a}, _{7b} et _{7d} chez l'homme. Ils sont tous couplés positivement à l'adénylate cyclase via une protéine G_s.

Les fonctions et le potentiel thérapeutique de ce récepteur sont exposés dans la partie suivante.

2. Le récepteur 5-HT₇

2.1. Découverte et structure

Le récepteur 5-HT₇ est le dernier récepteur sérotoninergique découvert. Baptisé dans un premier temps récepteur '5-HT₁-like', il a été trouvé impliqué dans le relâchement des muscles lisses vasculaires. Il a ensuite été identifié à partir d'une banque d'ADNc de cerveau en montrant une homologie de séquence avec les autres récepteurs sérotoninergiques. Depuis, le récepteur 5-HT₇ a été cloné chez la souris (Plassat *et al.*, 1993), le rat (Lovenberg *et al.*, 1993, Meyerhof *et al.*, 1993 ; Ruat *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993), le cochon d'Inde (Tsou *et al.*, 1994), le porc (Bhalla *et al.*, 2002) et l'homme (Bard *et al.*, 1993). Il possède une faible homologie de séquence (inférieure à 40%) avec les autres récepteurs sérotoninergiques mais possède une forte homologie de séquence inter-espèce (95%). Le récepteur 5-HT₇ de mammifère a une masse moléculaire d'environ 45-50 kDa, comporte sept hélices

transmembranaires et fait partie des récepteurs semblables à la rhodopsine. Le récepteur 5-HT₇ contient des sites potentiels de N-glycosylation à son extrémité N-terminale extracellulaire et plusieurs sites de phosphorylation pour la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) dans la troisième boucle intracellulaire et la région C-terminale (Boess & Martin, 1994).

2.2. Isoformes du récepteur 5-HT₇ humain

Le gène du récepteur 5-HT₇ est localisé sur le chromosome 10q23.3-q24.4 et possède deux introns dans sa région codante : l'un localisé après le troisième domaine transmembranaire et l'autre proche de l'extrémité C-terminale (Heidmann *et al.*, 1997). L'épissage alternatif du gène du récepteur 5-HT₇ humain conduit à la génération de trois isoformes : 5-HT_{7a}, 5-HT_{7b}, et 5-HT_{7d} (figure 3). Les isoformes 5-HT_{7a} et 5-HT_{7b} résultent de l'utilisation alternative de 2 sites donneurs d'épissage arrangés en tandem à la fin de l'exon II. L'utilisation du deuxième site d'épissage, qui engendre l'isoforme b, entraîne l'insertion d'une séquence de 5 pb, ce qui crée un codon stop prématuré dans le cadre ouvert de lecture. L'isoforme 5-HT_{7d} résulte de la conservation d'une séquence de 98 pb, nommée exon D, située dans la zone intronique entre l'exon II et III. Les protéines 5-HT_{7a}, 5-HT_{7b} et 5-HT_{7d} comportent respectivement 445, 432 et 479 acide aminés. Les isoformes diffèrent l'une de l'autre seulement par la longueur de leurs extrémités C-terminales, ainsi le récepteur 5-HT_{7d} possède la plus longue et le 5-HT_{7b} la plus courte (figure 4).

Des études comparatives dans des systèmes recombinants montrent que les trois sous-types du récepteurs 5-HT₇ possèdent le même profil pharmacologique avec des affinités comparables pour divers ligands de ce récepteur (Krobert *et al.*, 2001 & 2002). De plus aucune différence significative n'a été montrée quant à l'efficacité de couplage avec l'adénylate cyclase (Krobert *et al.*, 2001 & 2002). Par contre, la variation dans la longueur de la queue C-terminale pourrait entraîner des différences dans la signalisation intracellulaire induite par ces récepteurs et également dans les phénomènes de désensibilisation suite à l'activation de ces isoformes.

L'isoforme la plus abondante est l'isoforme 5-HT_{7a} et la plus rare l'isoforme 5-HT_{7d}. Par des études comparatives d'analyse par PCR avec des sondes d'oligonucléotides radiomarquées, il a été montré que les isoformes 5-HT_{7a} et 5-HT_{7b} sont exprimées aussi bien dans de nombreux tissus périphériques que dans le cerveau alors que l'isoforme 5-HT_{7d} est

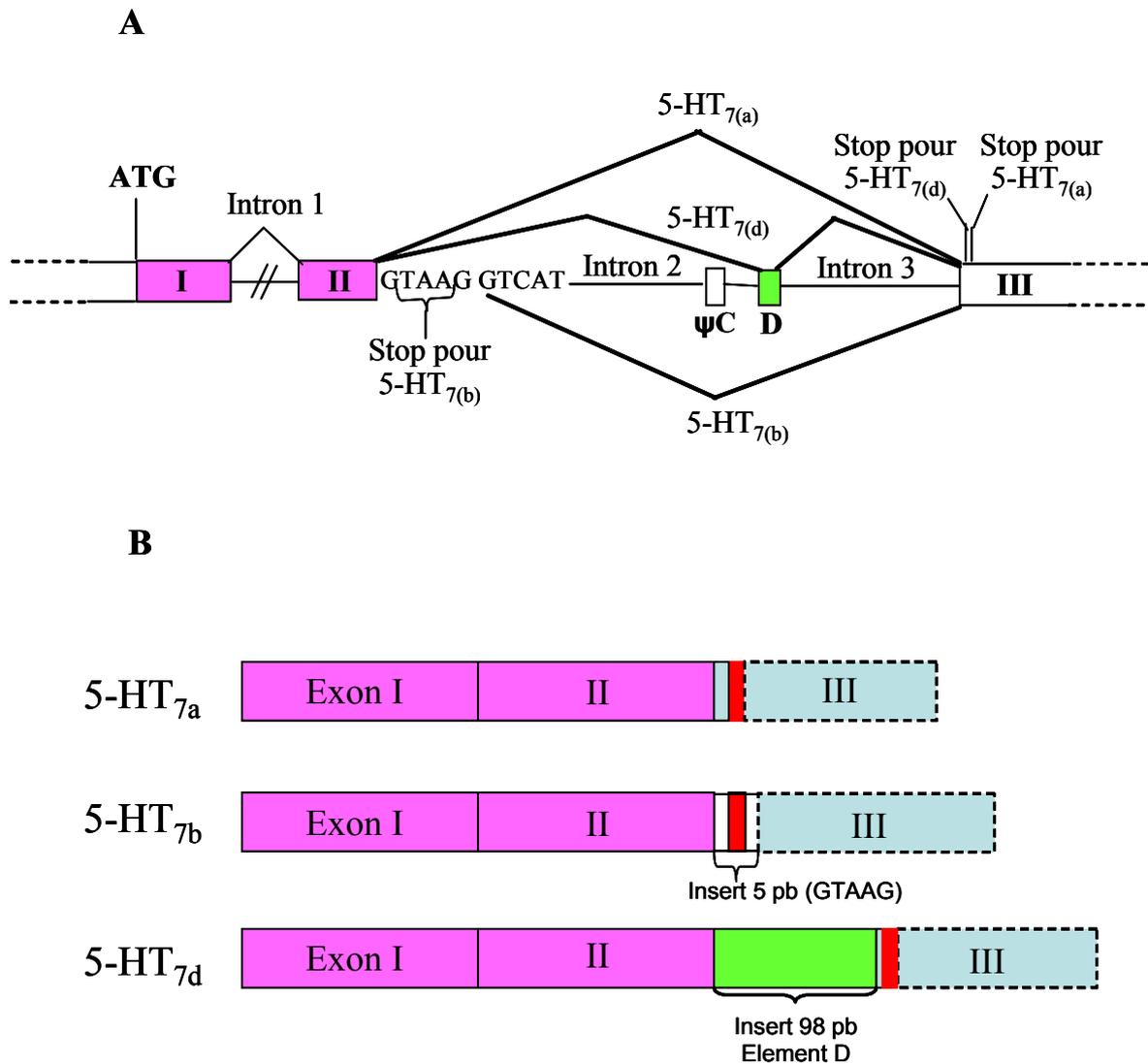


Figure 3. Variants d'épissage du récepteur 5-HT₇ humain.

A. Représentation du processus d'épissage alternatif du gène du récepteur 5-HT₇ humain engendrant les trois différents sous-types de ce récepteur (schéma reproduit d'après Vanhoenacker *et al.*, 2000).

B. Représentation schématique des ARNm des différentes isoformes du récepteur 5-HT₇ humain issues d'un épissage alternatif de son gène. Les codons stop sont représentés par des boîtes rouges.

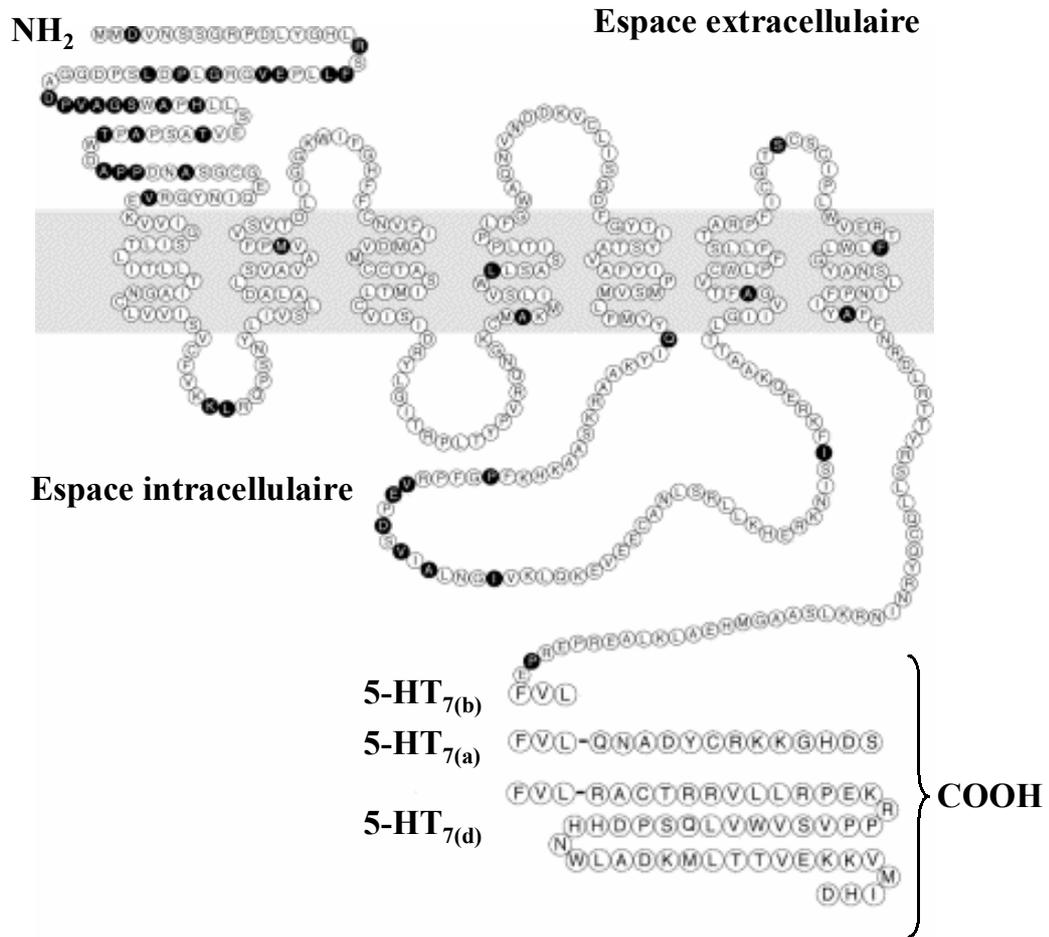


Figure 4. Séquences et structures prédites des différentes isoformes du récepteur 5-HT₇ humain.

La partie supérieure de la figure donne la séquence complète de l'isoforme 5-HT_{7b} humaine. Les acides aminés en noir sont ceux variables entre les mammifères (schéma adapté de Vanhoenacker *et al.*, 2000).

très peu exprimée dans le cerveau et seulement dans certains tissus périphériques (Krobert *et al.*, 2001). Dans l'hippocampe humain, l'isoforme 5-HT_{7a} représente 55% du contenu en ARNm du récepteur 5-HT₇ alors que l'isoforme 5-HT_{7d} représente moins de 4% du contenu en ARNm du récepteur 5-HT₇ dans le cerveau (Heidmann *et al.*, 1997 ; Vanhoenacker *et al.*, 2000).

2.3. Pharmacologie

Le récepteur 5-HT₇ est couplé positivement à l'adénylate cyclase via une protéine G_{αs}, il augmente donc la production d'AMPc après stimulation. Des études de liaison avec des radioligands ont montré un profil pharmacologique unique conservé d'une espèce à l'autre (Eglen *et al.*, 1997). Le profil pharmacologique typique des agonistes pour le récepteur 5-HT₇ est : 5-carboxyamidotryptamine (5-CT) > 5-méthoxytryptamine (5-MeOT) ≥ 5-hydroxytryptamine (5-HT) > 8-OH-DPAT et celui des antagonistes est : méthiothépine > métergoline > mésulergine ≥ clozapine ≥ spipérone ≥ ritansérine ~ méthysergide ≥ kétansérine (tableau 1).

Aucun agoniste sélectif pour le récepteur 5-HT₇ n'a été décrit jusqu'à récemment (pour revue voir Slassi *et al.*, 2004). Par contre, il existe des antagonistes sélectifs pour le récepteur 5-HT₇. Le premier à être identifié a été l'aryl sulphonamide, SB-258719 montrant une affinité relativement forte pour le 5-HT₇ (pKi 7.5) et possédant une sélectivité d'au moins 100 fois pour les autres récepteurs sérotoninergiques et non sérotoninergiques (Forbes *et al.*, 1998). Par la suite, la synthèse d'une nouvelle série de tétrahydrobenzindoles a été décrite, dont l'antagoniste DR-4004 (pKi 8.7), qui est sélectif par rapport aux autres récepteurs sérotoninergiques mais possède une affinité relativement forte pour le récepteur dopaminergique D₂ et les adrénorécepteurs α₁ (Kikuchi *et al.*, 1999 ; Kogan *et al.*, 2002). Une série de dérivés du SB-258719 a ensuite été synthétisée et 2 composés montrant une meilleure affinité que le SB-258719 ont été sélectionnés : le SB-258741 et le SB-269970 (Lowell *et al.*, 2000). Ces deux composés montrent la même sélectivité que le SB-258719 pour le récepteur 5-HT₇ par rapport aux autres récepteurs sérotoninergiques excepté pour le récepteur 5-HT_{5A} pour lequel la sélectivité n'est que de 50 fois. Plus récemment, d'autres antagonistes ont été synthétisés : le SB-656104-A, dérivé du SB-269970-A (Forbes *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2003), le SB-691673 (Forbes *et al.*, 2003), le DR-4365 (Kikuchi *et al.*, 2002) et le DR-4485 (Kikuchi *et al.*, 2003) (tableau 2).

Ligands	pK_i	pEC₅₀	pK_B
Agonistes			
5-CT	9.03 ^a	8.40	
5-HT	8.09 ^a	7.35	
5-MeOT	8.3 ^a	7.47	
8-OH-DPAT	6.33 ^a	6.39	
Antagonistes			
méthiothépine	9.36		9.33
métergoline	8.57		8.53
mésulergine	8.11		8.15
clozapine	7.66		7.73
spipérone	7.57		7.91
ritansérine	6.82		7.66
méthysergide	7.58		7.71
kétansérine	6.33		6.95

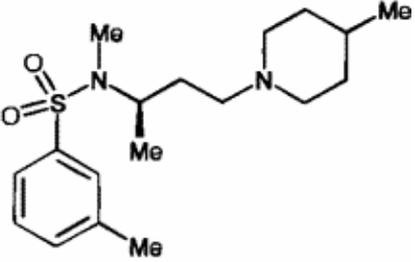
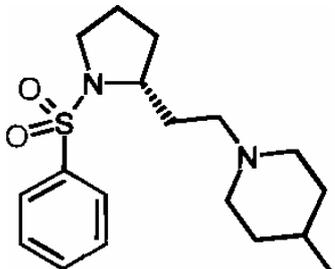
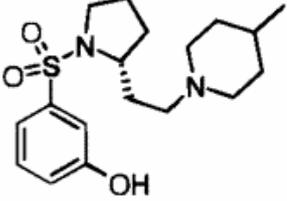
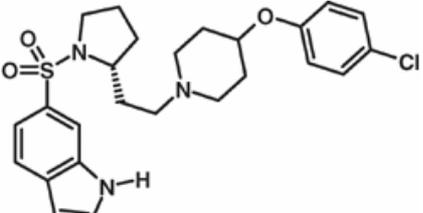
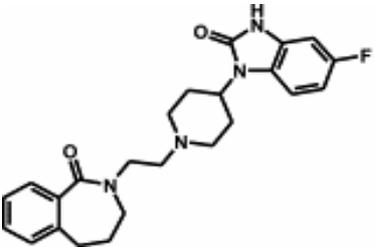
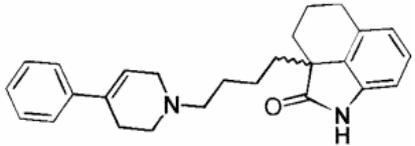
Tableau 1. Affinités des principaux ligands non sélectifs du récepteur 5-HT₇ humain.

Les valeurs de pK_i représentent le logarithme changé de signe des constantes d'inhibition obtenues par déplacement de la [³H]5-HT dans des membranes provenant de cellules HEK293 (Krobert *et al.*, 2001) ou Cos-7^a (Bard *et al.*, 1993) exprimant le récepteur 5-HT_{7a} humain.

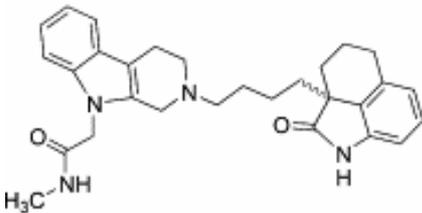
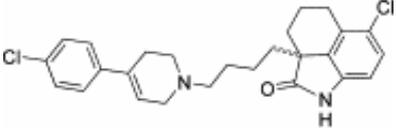
Les valeurs de pEC₅₀ représentent le logarithme changé de signe des concentrations efficaces induisant une augmentation de 50 % de la stimulation maximale de l'adénylate cyclase (Krobert *et al.*, 2001).

Les valeurs de pK_B représentent le logarithme changé de signe des constantes d'inhibition de différents agonistes sur l'activité de l'adénylate cyclase (Krobert *et al.*, 2001).

Tableau 2. Antagonistes spécifiques du récepteur 5-HT₇.

Composé	Source	Structure	pK _i 5-HT ₇	Sélectivité	Références
SB-258719	GSK		7.5 (pK _B 7.0) (pA ₂ 7.2)	100 fois versus autres récepteurs 5-HT	Forbes <i>et al.</i> , 1998 Thomas <i>et al.</i> , 1998
SB-258741	GSK		8.5 (pK _B 8.3)	> 100 fois versus autres récepteurs excepté 5-HT _{5A} (50 fois)	Lovell <i>et al.</i> , 2000
SB-269970	GSK		8.9	> 100 fois versus autres récepteurs 5-HT excepté 5-HT _{5A} (50 fois)	Lovell <i>et al.</i> , 2000
SB-656104	GSK		8.7 (pA ₂ 8.3)	100 fois versus autres récepteurs 5-HT excepté 5-HT _{1D} (10 fois) 5-HT _{2A} (30 fois)	Forbes <i>et al.</i> , 2002
SB-691673	GSK		8.7 (pK _B 7.9)	100 fois versus autres récepteurs 5-HT	Forbes <i>et al.</i> , 2003
DR-4004	Meiji Seika		8.7	Possède une affinité pour les récepteurs alpha ₁ et D ₂	Kikuchi <i>et al.</i> , 1999

Suite tableau 2. Antagonistes spécifiques du récepteur 5-HT₇.

Composé	Source	Structure	pK _i 5-HT ₇	Sélectivité	Références
DR-4365	Meiji Seika		8.5	100 fois versus 5-HT _{1B,1D,2A,2C,3,4,6} 30 fois versus 5-HT _{1A}	Kikuchi <i>et al.</i> , 2002
DR-4485	Meiji Seika		8.14	100 fois versus 5-HT _{1B,1D,2A,2C,3,4,6} 30 fois versus 5-HT _{1A}	Kikuchi <i>et al.</i> , 2003

Récemment, plusieurs travaux ont montré que le récepteur 5-HT₇ possède une activité constitutive quand il est exprimé dans des cellules HEK293 et CHO-K1 (Thomas *et al.*, 1998; Hagan *et al.*, 2000; Lovell *et al.*, 2000; Krobert et Levy, 2002 ; Mahé *et al.*, 2004b). En effet, un grand nombre d'antagonistes du récepteur 5-HT₇ montrent une activité d'agonistes inverses, ils inhibent l'activité du récepteur en absence d'agoniste. C'est le cas de tous les antagonistes non sélectifs excepté la mésulergine qui est un antagoniste neutre (Thomas *et al.*, 1998; Krobert et Levy, 2002 ; Mahé *et al.*, 2004b). Dans une étude comparative de trois antagonistes sélectifs du récepteur 5-HT_{7a} humain cloné dans des cellules CHO-K1, nous avons montré que le composé SB-269970 se comportait également comme un agoniste inverse, le composé SB-258741, un agoniste inverse partiel quant au composé SB-258719, il montre un profil proche d'un antagoniste neutre (Mahé *et al.*, 2004b). Par contre, aucune activité constitutive du récepteur 5-HT₇ n'a été rapportée dans un système natif.

2.4. Signalisation intracellulaire induite par le récepteur 5-HT₇

Le récepteur 5-HT₇ active l'adénylate cyclase par couplage avec G_{αs}. Il n'a jamais été montré aucun autre couplage pour le récepteur 5-HT₇, ni une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, ni une activation de la phospholipase C. La stimulation du récepteur 5-HT_{7a} entraîne l'activation des adénylate cyclases 1, 5 et 8 dans les cellules HEK293 (Baker *et al.*, 1998). L'adénylate cyclase 5 est activée par G_{αs} alors que les adénylates cyclase 1 et 8 sont activées par la calmoduline dépendante du calcium et sont insensibles à G_{αs} *in vivo*. Les adénylate cyclases 1 et 8 sont spécifiques des neurones et sont exprimées dans les zones du cerveau où le récepteur 5-HT₇ est exprimé, notamment l'hippocampe et l'hypothalamus. Ces résultats suggèrent que dans certaines zones du cerveau, la sérotonine serait capable de stimuler la production d'AMPC par mobilisation du calcium intracellulaire, après activation des récepteurs 5-HT_{7a}. Cette activation n'est médiée ni par un couplage avec la protéine G_i ou l'activation de la PKC, ni par une stimulation du turnover du phosphatidylinositol. Un autre mécanisme possible serait une interaction directe entre le récepteur 5-HT₇ et un canal calcique.

La signalisation induite par l'activation du récepteur 5-HT₇ a été peu étudiée et seulement dans des systèmes recombinants ou dans diverses cultures de cellules neuronales et non-neuronales. L'utilisation du H89, un inhibiteur de PKA, a montré que le récepteur 5-HT₇ active la PKA dans des cellules COS-7 et HEK293 transfectées (Norum *et al.*, 2003). Ceci a

également été montré dans les cellules glomérulées de rat exprimant le récepteur 5-HT₇ natif (Lenglet *et al.*, 2002) et dans des neurones thalamiques sur coupes de cerveau (Goaillard *et al.*, 2002). Par contre une étude plus récente, utilisant deux inhibiteurs de PKA, le H89 et le KT5720, suggère que la signalisation induite par l'activation du récepteur 5-HT₇ n'implique pas la PKA mais les protéines Epac, également activées par l'AMPc dans les cellules PC12 (Lin *et al.*, 2003). Dans des neurones d'hippocampe en culture, la sérotonine active les kinases ERK1 et ERK2 (MAP kinases p42/p44) par l'intermédiaire du récepteur 5-HT₇ (Errico *et al.*, 2001). De même dans les cellules HEK293, l'activation du récepteur 5-HT₇ conduit également à la stimulation de l'activité des kinases ERK 1 et 2 (Norum *et al.*, 2003). L'activation de la PKA dans ces cellules active la protéine Ras, qui lui-même active la protéine Raf et ainsi active la voie des MAP kinases. Dans les cellules glomérulées de rat exprimant le récepteur 5-HT₇, la sérotonine est également capable de stimuler les kinases ERK 1 et 2 par l'intermédiaire de la PKA et des canaux calciques de type T (Lenglet *et al.*, 2002). Il a également été montré dans l'hippocampe de rat que le récepteur 5-HT₇ est capable d'inhiber directement les canaux potassiques activés par le calcium (Gill *et al.*, 2002).

Très peu de travaux ont été réalisés dans le but de connaître les phosphodiésterases (PDE) impliquées dans la régulation des niveaux stimulés d'AMPc par l'activation du récepteur 5-HT₇. Dans les cellules glomérulées de rat, il a été montré que les PDEs 2 et 4 mais pas les PDEs 5 et 6 étaient activées pour la métabolisation de l'AMPc formé après stimulation du récepteur 5-HT₇ (Lenglet *et al.*, 2002). Deux autres travaux ont également montré l'implication de la PDE 4 après stimulation du récepteur 5-HT₇ (Kitazawa *et al.*, 1998 ; Inoue *et al.*, 2003).

2.5. Distribution du récepteur 5-HT₇ dans le cerveau

La distribution du récepteur 5-HT₇ a été étudiée aussi bien au niveau protéique par des études autoradiographiques et immunohistochimiques qu'au niveau transcriptionnel par des études d'hybridation *in situ* ainsi que des analyses par Northern-Blot et par RT-PCR.

Divers radioligands ont été utilisés pour les études autoradiographiques de la localisation tissulaire du récepteur 5-HT₇ : le [²⁵I]LSD (Kalkman *et al.*, 1986), la [³H]5-CT (To *et al.*, 1995 ; Stowe *et al.*, 1998), la [³H]8-OH-DPAT (Bonaventure *et al.*, 2002), la [³H]mésulergine (Hemedah *et al.*, 1999) ou le [³H]SB-269970 (Thomas *et al.*, 2002).

L'ARN messager du récepteur 5-HT₇ a été trouvé aussi bien dans les tissus périphériques que dans le système nerveux central (pour revue voir Slassi *et al.*, 2004). Les études d'hybridation *in situ* ont confirmé que l'ARNm du récepteur 5-HT₇ est trouvé de façon prédominante dans le thalamus, l'hypothalamus (dont le noyau suprachiasmatique), le cortex cérébral, l'hippocampe et l'amygdale chez le rat (Lovenberg *et al.*, 1993; Ruat *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993), le cochon d'Inde (To *et al.*, 1995) et l'homme (Bard *et al.*, 1993; Hagan *et al.*, 2000). Des résultats équivalents ont été obtenus par des études autoradiographiques avec entre autres la [³H]5-CT chez le rat (Gustafson *et al.*, 1996) et le cochon d'Inde (pour revue voir Vanhoenacker *et al.*, 2000). Des études immunocytochimiques dans le cerveau de rat ont confirmé l'expression neuronale du récepteur 5-HT₇ dans les neurones pyramidaux des régions CA₁ et CA₃ de l'hippocampe, le cortex cérébral ainsi que les noyaux thalamiques, hypothalamiques et amygdaloïdes (Neumaier *et al.*, 2001). Outre sa localisation neuronale, le récepteur 5-HT₇ a également été trouvé exprimé dans les cellules gliales, notamment dans des cultures primaires d'astrocytes de rat (Shimizu *et al.*, 1996; Hirst *et al.*, 1997) et d'Homme (Cohen *et al.*, 1999). Chez le rat, les astrocytes exprimant le plus le récepteur 5-HT₇ sont les cultures d'astrocytes provenant de l'hypothalamus (Hirst *et al.*, 1997). Des études immunocytochimiques ont également montré l'expression du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes du noyau suprachiasmatique de souris (Belenky & Pickard, 2001).

2.6. Rôles possibles du récepteur 5-HT₇ dans le système nerveux central (SNC)

La localisation du récepteur dans le cerveau permet d'émettre des hypothèses quant à ses fonctions dans le SNC. Par exemple, son expression dans l'hypothalamus peut corrélérer avec son implication dans le rythme circadien, la thermorégulation et une régulation endocrine. De plus, les récepteurs 5-HT₇ thalamiques et corticaux pourraient jouer un rôle dans la régulation du sommeil et de l'humeur. Les récepteurs présents dans l'hippocampe pourraient être impliqués dans la mémoire et l'apprentissage.

Le récepteur 5-HT₇ module l'excitabilité neuronale dans les zones du cerveau dans lesquelles il est exprimé. Dans la région CA₃ de l'hippocampe, ce récepteur est impliqué dans la diminution de la post-hyperpolarisation par inhibition directe des canaux sodiques activés par le calcium (Bacon *et al.*, 2000).

Du fait de sa localisation dans le noyau suprachiasmatique (NSC), le récepteur 5-HT₇ pourrait intervenir dans le contrôle des rythmes circadiens (Edgar *et al.*, 1993 ; Ehlen *et al.*, 2001). Le récepteur 5-HT₇ est impliqué dans la régulation des cycles du sommeil, en particulier du sommeil REM (sommeil avec mouvements oculaires rapides). En effet, l'administration du SB-269970, antagoniste sélectif du récepteur 5-HT₇, induit une inhibition du sommeil REM chez le rat (Hagan *et al.*, 2000). De même le SB-656104-A, autre antagoniste sélectif du récepteur 5-HT₇, inhibe le sommeil REM et retarde le début de ce sommeil (Thomas *et al.*, 2003). Du fait de son rôle dans la régulation des rythmes circadiens, il a été supposé que le récepteur 5-HT₇ serait impliqué dans la pathophysiologie de la dépression. De plus, plusieurs médicaments antidépresseurs possèdent une haute affinité pour ce récepteur (Ruat *et al.*, 1993 ; Plassat *et al.*, 1993 ; Roth *et al.*, 1994 ; Luccheli *et al.*, 2000). Un traitement antidépresseur induit une diminution de l'expression des récepteurs 5-HT₇ localisés dans l'hypothalamus, c'est le cas de la fluoxétine, un inhibiteur spécifique du recaptage de la sérotonine (Sleight *et al.*, 1995). Plusieurs antidépresseurs tricycliques, inhibiteurs spécifiques de recaptage de la sérotonine, induisent une expression de cFos chez le rat, de manière compatible avec l'activation du récepteur 5-HT₇ dans le noyau suprachiasmatique (Mullins *et al.*, 1999). Le récepteur 5-HT₇ aurait aussi un rôle important dans la régulation du stress. En effet, l'expression de son ARNm est augmenté par un stress aigu mais pas chronique dans l'hippocampe de rat (Yau *et al.*, 2001).

L'injection de 5-CT ou de 8-OH-DPAT induit une hypothermie chez les rongeurs. L'effet hypothermique est similaire, que l'administration soit réalisée en périphérie ou dans le cerveau, suggérant que le mécanisme d'action est central. L'utilisation de deux antagonistes spécifiques du récepteur 5-HT₇, le SB-269970 (Hagan *et al.*, 2000) et le SB-656104-A (Thomas *et al.*, 2003) a montré l'implication de ce récepteur dans la régulation de la température corporelle. En effet ces deux composés antagonisent l'effet hypothermique induit par l'administration de la 5-CT chez le cochon d'Inde. L'utilisation de souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur 5-HT₇ a confirmé le rôle de ce récepteur dans l'hypothermie : en effet, chez ces souris l'administration de 5-CT (0.5 mg/kg) n'induit aucune hypothermie (Hedlund *et al.*, 2003).

L'implication du récepteur 5-HT₇ dans le comportement lié à l'apprentissage et à la mémoire a été étudiée dans un premier temps par l'utilisation d'oligonucléotides visant à inhiber la synthèse de ce récepteur chez le rat (Clemett *et al.*, 1998). Dans cette étude, ce traitement n'a révélé aucun effet sur l'activité locomotrice et exploratoire. Une autre étude utilisant des souris transgéniques n'exprimant plus le récepteur 5-HT₇ a montré que ce

récepteur est impliqué dans l'apprentissage contextuel dépendant de l'hippocampe, de par une diminution à long terme de la plasticité neuronale dans la région CA1 (Roberts *et al.*, 2004). Ces animaux ne sont plus capables d'associer un environnement avec un stimulus désagréable.

2.7. Régulation des fonctions neuroendocrines par le récepteur 5-HT₇

Le système endocrinien constitue un lien entre le SNC et la périphérie.

L'injection intraveineuse de sérotonine induit une stimulation de la sécrétion de l'ACTH et l'implication du récepteur 5-HT₇ dans cet effet, parmi les récepteurs sérotoninergiques, a été suggéré (Jorgensen *et al.*, 1999). Mais des études avec des substances plus sélectives pour le récepteur 5-HT₇ sont nécessaires pour confirmer son implication dans l'effet stimulateur de la sérotonine sur l'activité des cellules corticotropes. Dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat, le récepteur 5-HT₇ est exprimé et induit la sécrétion d'aldostérone (Contesse *et al.*, 1999). Par contre, chez l'homme, cet effet serait médié par le récepteur 5-HT₄.

L'ablation de la glande surrénale chez le rat entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT₇ dans l'hippocampe (Le Corre *et al.*, 1997). De plus, l'activation du récepteur 5-HT₇ augmente l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes dans des cultures primaires de cellules d'hippocampe (Laplante *et al.*, 2002). Il a également été montré que la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, induit une diminution de l'expression du récepteur 5-HT₇ dans des cultures primaires d'astrocytes provenant du cortex frontal de rat (Shimizu *et al.*, 1997). Ainsi, le récepteur 5-HT₇ pourrait être un médiateur dans l'interaction entre la sérotonine et les corticostéroïdes. Cependant, la réduction de l'expression du récepteur 5-HT₇ dans l'hypothalamus de rat, par l'administration d'oligonucléotides antisens, n'affecte pas les taux plasmatiques de corticostérone et de prolactine (Clemett *et al.*, 1998).

Les dysfonctionnements de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénal (HHS) jouent un rôle important dans la pathophysiologie de la dépression. Une hypersecrétion d'ACTH et de corticoïdes a été trouvée chez des patients souffrant de dépression majeure. De plus, un traitement antidépresseur augmente l'expression des récepteurs des glucocorticoïdes qui est diminuée en cas de dépression (pour revue voir Barden, 2003). Ainsi, comme le récepteur 5-

HT₇ semble réguler le système neuroendocrinien, il pourrait être impliqué, de façon indirecte, dans la pathophysiologie de la dépression.

3. Les cellules gliales

Considérées comme de simples cellules de soutien dans le SNC, on a longtemps négligé le rôle des cellules gliales dans la transmission synaptique et le fonctionnement même du cerveau. Le nom de cellule "gliale" vient de "glu". En culture, ces cellules remplissent les espaces vides, afin de guider le réseau nerveux qui s'installe. Elles sont beaucoup plus nombreuses que les neurones. Les cellules gliales sont essentielles au bon fonctionnement du neurone : elles lui servent de support, de protection et d'isolation. Mais ces cellules peuvent également avoir des effets pathogènes. Dans le SNC, il existe 4 types de cellules gliales : les astrocytes qui forment une barrière contrôlant les échanges entre les neurones et le sang (barrière hémato-encéphalique) et qui recaptent les neurotransmetteurs pour les inactiver ; un second type de cellules gliales, les microglies, dérivées des précurseurs des cellules immunitaires, est responsable de l'élimination par phagocytose des débris, aussi bien les cellules mortes que les agents étrangers ; il y a également les cellules épendymaires possédant des cils à leur surface qui aident à la circulation du liquide céphalo-rachidien et les oligodendrocytes qui forment la gaine de myéline permettant l'isolation du neurone dans le SNC.

3.1. Les astrocytes

3.1.1. Morphologie

Les astrocytes dérivent des précurseurs neuraux primaires multipotents comme les neurones et les oligodendrocytes. Les astrocytes se présentent sous deux formes: les astrocytes protoplasmiques, de grande taille, localisés dans la substance grise et les astrocytes fibreux, de plus petite taille, observés dans la substance blanche. De forme étoilée, les astrocytes protoplasmiques sont formés d'un corps cellulaire contenant le noyau et de prolongements cytoplasmiques diversement ramifiés. En microscopie électronique, ils se caractérisent par l'abondance, dans le cytoplasme du corps cellulaire et des prolongements, de filaments intermédiaires (gliofilaments) riches en GFAP (protéine glio-fibrillaire acide), spécifique des astrocytes, et de grains de glycogène. Ce stock glycogénique constitue la

principale réserve énergétique cérébrale. Les nombreux prolongements cytoplasmiques des astrocytes sont de 4 grands types :

- un grand nombre de prolongements cytoplasmiques forment une sorte de réseau qui joue un rôle de support structural au sein du parenchyme du SNC

- de petites languettes partant des prolongements cytoplasmiques précédents entourent étroitement les synapses et permettent ainsi la sélectivité de la transmission nerveuse en empêchant la diffusion des neurotransmetteurs hors de la fente synaptique

- certains prolongements cytoplasmiques (ou pieds vasculaires des astrocytes) entourent complètement les capillaires sanguins et les séparent des neurones, ces prolongements créent un contact important avec les cellules endothéliales des capillaires

- la surface du névraxe est formée par la juxtaposition de prolongements cytoplasmiques astrocytaires réalisant le revêtement astrocytaire marginal du SNC

La membrane astrocytaire contient de nombreux canaux ioniques voltage-dépendants (canaux- Na^+ , canaux- K^+ , canaux- Ca^{2+} , canaux- Cl^-). La présence prédominante de canaux potassiques par rapport aux autres canaux ioniques contribue à leur inexcitabilité. On y trouve également un certain nombre de transporteurs ioniques actifs (pompes et échangeurs) et des récepteurs membranaires pour de nombreux ligands (neurotransmetteurs, neuropeptides, cytokines, etc). Enfin, les astrocytes sont interconnectés entre eux et avec les neurones par des jonctions gap. Les astrocytes synthétisent et sécrètent des neurostéroïdes. Ils contiennent des récepteurs pour les corticostéroïdes surrénaliens.

3.1.2. Principaux rôles des astrocytes

- Etablissement de l'architecture cérébrale au cours du développement :

Lors du développement du SNC, des cellules gliales étendent des prolongements cytoplasmiques entre la zone germinale et la surface du tube neural, constituant ainsi des guides qui serviront à conduire la migration ultérieure des autres cellules (cellules gliales radiaires). Les astrocytes embryonnaires de la glie radiaire servent de 'rails' lors de la migration des neurones immatures de l'espace périventriculaire vers les couches externes du cortex cérébral. L'astrocyte est également nécessaire à la formation de la barrière hémato-encéphalique. De plus, les astrocytes sont responsables de la formation massive des synapses après la naissance.

- Supports métaboliques pour les neurones (Tsacopoulos *et al.*, 1996):

Les neurones, étant étroitement entourés par des astrocytes, sont séparés des capillaires sanguins, source de glucose (figure 5A). Par conséquent, le glucose est transporté à partir des capillaires sanguins et métabolisé essentiellement dans les astrocytes. Le glucose est ensuite transformé en lactate puis libéré par les astrocytes dans le milieu extracellulaire. Le lactate est ensuite capté par les neurones qui vont le transformer en pyruvate par la lactate deshydrogénase. Le pyruvate entre alors dans le cycle de Krebs mitochondrial. Ce cycle assure la production des équivalents rédox (NADH) qui alimentent la chaîne respiratoire pour la production d'ATP, mais aussi des acides aminés comme le glutamate, principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC. Les neurones sont également capables de capter le glucose et de le métaboliser, mais le substrat préféré pour le cycle des acides tricarboxyliques neuronaux est le lactate. Le glucose prélevé par les neurones est utilisé par d'autres voies métaboliques comme la glycolyse ou le cycle des pentoses phosphates (figure 5B).

Dans les synapses glutamatergiques, la libération présynaptique de glutamate entraîne une dépolarisation des neurones post-synaptiques par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. L'action du glutamate est terminée par un captage du glutamate essentiellement astrocytaire. Le glutamate est cotransporté avec des ions sodiques, qui vont activer l'ATPase Na^+/K^+ , qui entraîne la stimulation de la glycolyse et la production de lactate, qui sera ensuite libéré puis capté par les neurones (figure 5B).

Dans le cerveau, le glycogène est presque exclusivement stocké dans les astrocytes et la glycogénolyse est régulée par l'activité synaptique et par certains neurotransmetteurs : les monoamines (noradrénaline, sérotonine et histamine) ainsi que le VIP (vasoactive intestinal peptide) et l'adénosine.

- Régulation de la formation de synapses dans le cerveau :

Les synapses ne peuvent pas se développer correctement sans astrocytes. En effet, les astrocytes régulent la formation, la maturation et la maintenance des synapses. La vie d'une nouvelle connexion synaptique peut être divisée en trois phases importantes. La première phase constitue l'établissement d'un premier contact physique entre deux partenaires neuronaux, la seconde d'un processus de maturation pendant laquelle chaque connexion acquiert ses propres caractéristiques et la dernière est une phase de stabilisation ou d'élimination de la connexion synaptique. Seuls les contacts les plus robustes sont conservés.

Plusieurs études ont montré que les astrocytes induisent une augmentation de la formation de synapse (pour revue voir Slezac & Pfrieder, 2003). Les astrocytes régulent

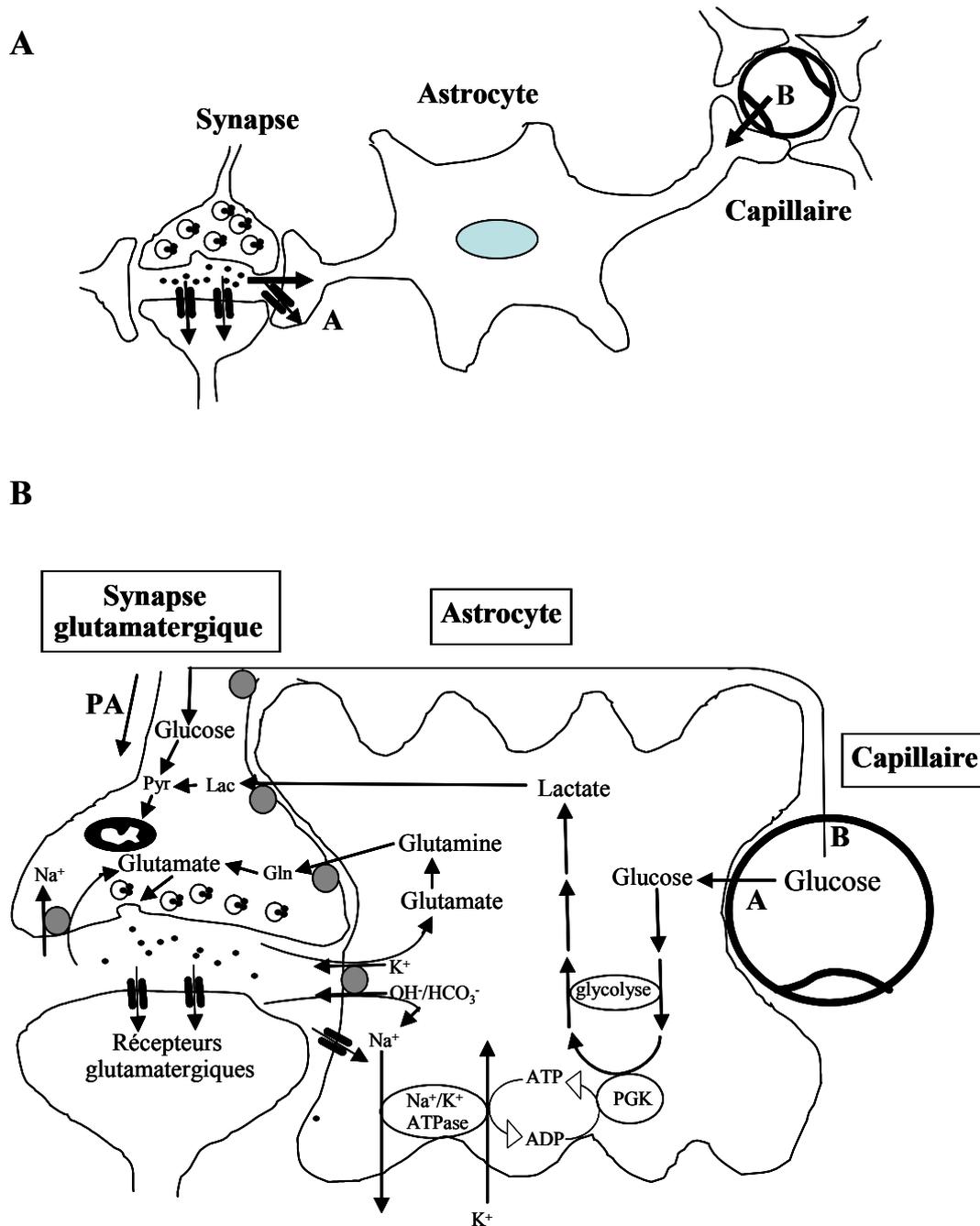


Figure 5. Représentation du couplage métabolique entre astrocytes et neurones.

A. Représentation de la synapse “tripartite” : les prolongements cytoplasmiques des astrocytes entourent à la fois les capillaires intraparenchymaires et la synapse. Les astrocytes jouent un rôle de senseur de l’activité synaptique (A) et la couple avec le pompage ou le métabolisme de certains substrats énergétiques (B).

B. Mécanisme de la glycolyse astrocytaire induite par le glutamate lors d’une activation synaptique. (explications voir texte) (PA=potentiel d’action). (schémas reproduits d’après Tsacopoulos *et al.*, 1996)

également la maturation pré- et post-synaptique, telles la densité en récepteurs et l'efficacité de libération des transmetteurs. Ceci se fait par l'intermédiaire de divers transmetteurs libérés par les astrocytes.

- Régulation de la transmission synaptique :

Récemment, le concept de 'synapse tripartite' a été introduit, composée par 3 éléments fonctionnels : les terminaux neuronaux pré- et post-synaptiques ainsi que les astrocytes environnants (Araque *et al.*, 1999). Les astrocytes expriment un grand nombre de récepteurs de divers neurotransmetteurs (Kimelberg, 1995 ; Porter et McCarthy, 1997). L'activation de ces récepteurs entraîne un grand nombre possible de réponse dans les astrocytes : une augmentation de la concentration en calcium, en AMPc ainsi que la libération de transmetteurs comme le glutamate ou l'ATP. L'activité neuronale entraîne une augmentation de la concentration en calcium dans les astrocytes, ce qui conduit à la libération de glutamate. Cette libération de glutamate réduit les courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs engendrés par une stimulation électrique des neurones présynaptiques (Araque *et al.*, 1998). Ainsi, les astrocytes peuvent moduler la transmission synaptique par la libération de glutamate. Un autre mécanisme possible de modulation de la transmission synaptique est la régulation des taux en ions extracellulaires par les astrocytes. En effet, l'activité neuronale conduit à des variations dans les concentrations en ions K^+ et H^+ dans l'espace extracellulaire, qui altèrent la transmission synaptique. L'augmentation en ions potassiques dépolarise les terminaux synaptiques et les ions H^+ bloquent les canaux calciques présynaptiques et les récepteurs glutamatergiques NMDA.

Ainsi les transmetteurs libérés par les astrocytes après une stimulation neuronale (entre autres : acides aminés, ATP, cytokines et facteurs de croissance) peuvent agir sur les terminaux présynaptiques pour inhiber ou activer la libération de neurotransmetteurs. Ils peuvent également directement stimuler les neurones postsynaptiques (pour revue voir Araque & Perea, 2004). Les astrocytes peuvent également moduler la transmission synaptique en captant les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique.

- Régulation de la neurogénèse :

La neurogénèse dans le cerveau adulte a lieu dans les zones sous-ventriculaire et sous-granulaire de l'hippocampe. Ces deux zones contiennent des cellules souches neurales qui peuvent engendrer de nouveaux neurones tout au long de la vie. Les cellules souches neurales peuvent se différencier soit en neurone, soit en astrocyte ou encore en oligodendrocyte.

Récemment, on a montré le rôle des astrocytes dans la neurogénèse hippocampale à partir de cellules souches neurales (Song *et al.*, 2002). En présence d'une monocouche uniquement constituée d'astrocytes prélevés dans l'hippocampe d'animaux nouveau-nés, les cellules souches se différencient en neurones. Par contre, la présence d'une monocouche constituée d'un mélange d'astrocytes et de neurones diminue cette différenciation neuronale et la présence de neurones seuls entraîne une différenciation en oligodendrocytes. De plus, cet effet a une spécificité régionale : seuls les astrocytes d'hippocampe sont capables de stimuler la neurogénèse. Ainsi, les astrocytes produisent un ensemble de facteurs solubles qui favorisent la différenciation des cellules souches adultes en neurones.

- Inflammation et réponse immunitaire:

Les astrocytes peuvent exprimer les antigènes du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II et sont capables de présenter l'antigène *in vitro*. L'expression du CMH de classe II peut être induite ou régulée par des cytokines, des neurotransmetteurs et des neuropeptides. Ces cellules induisent la réponse immunitaire primaire aux lymphocytes T, en favorisant plutôt l'apoptose des lymphocytes T que leur prolifération. Ainsi, ces cellules peuvent participer à la réponse immunitaire après infection (pour revue voir Dong & Benveniste, 2001).

La protection contre toute infection par les astrocytes se fait également par un contrôle de l'entrée de substances par la barrière hémato-encéphalique délimitée par les prolongements astrocytaires.

3.1.3. Sécrétion de facteurs neurotrophiques et de cytokines

Les astrocytes exercent leurs fonctions dans le SNC par la libération d'un grand nombre de facteurs neurotrophiques et de cytokines.

Les principaux facteurs neurotrophiques libérés par les astrocytes sont le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), les neurotrophines NT-3 et NT-4/5 (Otten *et al.*, 2001). Ces facteurs exercent leur actions sur des récepteurs de haute affinité : les récepteurs trk, des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs tyrosine-kinases. La sécrétion de ces neurotrophines peut être induite par des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance ou des cytokines. Ces facteurs neurotrophiques participent au développement, à la maintenance et aux réponses à un traumatisme du système nerveux central. Ces facteurs sont impliqués dans la survie et la fonction de certaines populations de neurones et également dans

la neurogénèse hippocampale du cerveau adulte. Le BDNF joue un rôle important dans la croissance neuronale, la différenciation, la connection synaptique et la réparation neuronale (Lewin & Barde, 1996). Le NGF est un facteur trophique des neurones cholinergiques. La neurotrophine NT-3 joue un rôle essentiel dans le développement du SNC et favorise la différenciation des précurseurs neuronaux en neurones matures (Lewin & Barde, 1996). Cette neurotrophine est exprimée très tôt au cours du développement du système nerveux. Un autre facteur neurotrophique libéré par les astrocytes est la protéine S100 β (calcium binding protein). Cette protéine favorise de façon sélective la croissance des neurones sérotonergiques en développement (Liu *et al.*, 1992) et représente l'un des plus puissants facteurs neurotrophiques pour ces neurones. Il a été montré plus récemment que la protéine S100 β agirait plus spécifiquement sur la modulation de la plasticité des neurones sérotonergiques (Nishiyama *et al.*, 2002a), plutôt que sur leur développement (Nishiyama *et al.*, 2002b).

Les astrocytes libèrent également un certain nombre de cytokines inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 1 β (IL-1 β) et le tumor necrosis factor α (TNF- α). Ces cytokines interviennent non seulement dans la réponse immunitaire et dans l'inflammation mais aussi dans la dégénération et la régénération neuronale. L'IL-6 joue un rôle dans la différenciation et la survie neuronale (pour revue voir Gadiant & Otten, 1997). L'IL-1 β intervient dans la croissance et la survie neuronale durant le développement du cerveau, induit la production de NGF par les cellules gliales et module la plasticité neuronale dans le cerveau adulte (pour revue voir Zhao & Schwartz, 1998). Le TNF- α influence de façon importante l'efficacité de la transmission synaptique (Beattie *et al.*, 2002). De plus, le TNF- α stimulerait de façon sélective la neurotransmission sérotonergique hippocampale (Pauli *et al.*, 1998) et pourrait prévenir son dysfonctionnement en renormalisant le niveau de sérotonine (Mossner *et al.*, 1998).

3.1.4. Récepteurs sérotoninergiques exprimés par les astrocytes

De nombreux récepteurs de divers neurotransmetteurs ou neuropeptides sont exprimés à la surface des astrocytes. Il s'agit des récepteurs adrénergiques, muscariniques, sérotoninergiques, histaminiques, GABAergiques, glutamatergiques, purinergiques, à l'angiotensine II, à la somatostatine, aux endothélines, aux bradykinines, à la substance P, au neuropeptide Y, au VIP et aux opiacés (Kimmelberg, 1995 ; Porter & McCarthy, 1997). Ces récepteurs interviennent à divers niveaux des fonctions astrocytaires dans le SNC (Kimmelberg *et al.*, 1995). Ils sont fonctionnellement couplés à des changements dans le potentiel

membranaire ou dans les voies de signalisation intracellulaire comme l'activation de la phospholipase C ou de l'adénylate cyclase (Porter & McCarthy, 1997).

Les astrocytes peuvent constituer une cible pour la sérotonine libérée par les neurones (Kimelberg, 1995). En effet, la sérotonine augmente la prolifération, la migration et l'invasion des glioma (Merzak *et al.*, 1996). De plus, la sérotonine stimule l'expression de l'ARNm de l'IL-6, du TGF- β et du TNF- α dans des astrocytes primaires d'hippocampe (Pousset *et al.*, 1996). Plusieurs sous-types de récepteurs sérotoninergiques sont exprimés dans les astrocytes.

Tout d'abord, le récepteur 5-HT_{1A} a été identifié dans les astrocytes *in situ*. Des anticorps dirigés contre ce récepteur révèlent sa présence dans les astrocytes de plusieurs régions du cerveau de primates : l'hippocampe, le septum, l'amygdale, le striatum et le cortex (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993 ; Azmitia *et al.*, 1996). Ce récepteur serait impliqué dans la régulation de la libération de la protéine S100 β lors du développement des neurones sérotoninergiques (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993). Cette protéine favorise de façon sélective la croissance des neurones sérotonergiques en développement (Liu *et al.*, 1992) et représente l'un des plus puissants facteurs neurotrophiques pour ces neurones.

Par la suite, une étude réalisée par des analyses de RT-PCR a montré que les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₇ sont les récepteurs sérotoninergiques prédominants dans les astrocytes humains en culture (Cohen *et al.*, 1999). L'activation du récepteur 5-HT_{2A} entraîne une augmentation de la glycolyse dans des cultures primaires d'astrocytes (Plobete & Azmitia, 1995). Le récepteur 5-HT_{2A} a également été identifié dans les glioma C6 de rat ; ce type de cellules possède un phénotype astrocytaire et est utilisé comme modèle d'étude des astrocytes (Elliott *et al.*, 1995). L'activation de ce récepteur entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm du facteur neurotrophique BDNF (Meller *et al.*, 2002a) et une augmentation dans la libération du glutamate dans ces cellules (Meller *et al.*, 2002b).

Le rôle du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes n'est pas élucidé pour l'instant.

3.2. Les microglies

3.2.1. Morphologie

Les microglies sont de petites cellules ovoïdes possédant des prolongements ramifiés épineux et représentant 5 à 20 % des cellules gliales, elles sont moins nombreuses dans la substance blanche que dans la substance grise. À l'état de repos, ces prolongements entrent en

contact avec des neurones avoisinants permettant ainsi leur surveillance. Ces cellules sont d'origine immunitaire, elles proviennent de la lignée des monocytes/macrophages originaires de la moelle osseuse, qui ont infiltré le parenchyme cérébral durant les tout premiers stades embryonnaires et qui se sont développés ensuite dans le cerveau. Les microglies adaptent la morphologie de leur corps cellulaire et de leurs prolongements en fonction de leur microenvironnement.

Lorsque les microglies ramifiées détectent une anomalie ou une lésion, elles se transforment morphologiquement en cellules avec des prolongements réduits et un corps cellulaire élargi et augmentent en nombre au niveau du site infecté. Sous cette forme particulière, elles sont appelées microglies activées ou réactives. Ces microglies activées peuvent également se transformer en macrophages pour phagocyter et digérer les micro-organismes et les débris de neurones morts.

3.2.2. Principaux rôles des microglies

Dans le cerveau en développement, les microglies participent à la différenciation des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes, à la formation de synapses et à l'épuration (clearance) des tissus. Dans le cerveau adulte, les microglies ramifiées au repos jouent le rôle de senseurs pour détecter des anomalies ou des changements à l'intérieur du cerveau.

- Fonctions immunitaire et inflammatoire (pour revue voir Aloisi, 2001) :

Les microglies sont les macrophages résidents du SNC et ce sont les premières cellules du SNC qui sont activées lors d'une infection ou d'un traumatisme (Kreutzberg, 1995). Ces cellules expriment les antigènes du CMH de classe I et II et lors de leur activation, l'expression de plusieurs marqueurs antigéniques identiques à ceux des monocytes circulants est augmentée, dont les antigènes du CMH de type II. Elles expriment également les récepteurs aux Fc (région constante des anticorps) et aux molécules du complément ainsi que le marqueur CD4.

Lors d'une infection dans le SNC ou une exposition à des stimuli inflammatoires, les microglies sont activées pour exercer leurs fonctions immunitaires comprenant la libération de cytokines pro-inflammatoires, la cytotoxicité et la régulation des réponses médiées par les lymphocytes T par présentation de l'antigène. Les microglies activées peuvent également se transformer en macrophages et phagocyter les éléments étrangers et les débris cellulaires.

- Fonctions de neuroprotection :

Le rôle neuroprotecteur des microglies se manifeste au niveau de l'élimination du glutamate, du fer et par la sécrétion de neurotrophines.

Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur, qui, lorsqu'il est présent en grande quantité dans la synapse, peut entraîner la mort des cellules neuronales. Ainsi, les microglies, comme les astrocytes, jouent un rôle important dans l'élimination du glutamate libéré dans les synapses par recaptage. De plus, les microglies sont impliquées dans le métabolisme du fer dans le cerveau. En effet, le fer est essentiel dans le métabolisme mais peut être délétère pour le SNC s'il n'est pas éliminé rapidement. Les microglies promeuvent la survie neuronale lors d'une lésion par la sécrétion de neurotrophines (Nakajima *et al.*, 2001).

Ainsi, les microglies semblent constituer une population cellulaire nécessaire au maintien d'un environnement favorable pour les neurones. Cependant, des travaux récents (Monje *et al.*, 2003) suggèrent que les microglies pourraient aussi jouer un rôle néfaste dans la neurogénèse via la libération de l'IL-6.

- Fonctions neurotrophiques:

L'addition d'un milieu conditionné par les microglies dans des cellules neuronales embryonnaires conduit à la survie et au développement des neurones corticaux (Nagata *et al.*, 1993b). Les microglies ont donc la capacité de sécréter des molécules neurotrophiques spécifiques.

- Implication dans la neurodégénération :

Lors d'une lésion cérébrale, les microglies activées peuvent soit induire la mort cellulaire par la sécrétion de cytotoxines comme le glutamate ou le NO (monoxyde d'azote), soit promouvoir la croissance et la survie neuronale. Ainsi, les microglies possèdent la capacité de détruire les cellules nerveuses trop détériorées tout en favorisant la survie des neurones encore viables.

Avec l'âge, le nombre de microglies augmente et leur phénotype est modifié, elles expriment des antigènes qui sont très peu exprimés voire inexistantes dans le cerveau juvénile en particulier le CMH de type II. Ces modifications du phénotype, induisant une activation constitutive des microglies, entraîne une neurodégénération cérébrale.

3.2.3. Sécrétion de facteurs neurotrophiques et de cytokines

Les microglies activées ou réactives exercent leurs fonctions immunitaires lors d'une infection ou de neuroprotection lors d'une lésion par la sécrétion de divers facteurs comme des neurotrophines, des facteurs de croissance et des cytokines.

Les microglies expriment les ARNm des neurotrophines NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5. A l'état de repos, elles secrètent uniquement le BDNF et la neurotrophine NT-4/5 en faible quantité. Après une stimulation des microglies par le LPS (lipopolysaccharide), la sécrétion de ces neurotrophines est augmentée et celle de NGF est induite. Par contre, la libération de NT-3 n'est pas détectable (Nakajima *et al.*, 2001).

Les microglies activées libèrent également des facteurs de croissance : le bFGF (basic fibroblast growth factor), le plasminogène, l'HGF (hepatocyte growth factor) et l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Le bFGF promeut la survie des neurones corticaux cérébraux et la formation de neurites (Morrison *et al.*, 1986). Il exerce également une action neurotrophique sur les neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Le plasminogène produit par les microglies augmente la formation de neurites et la maturation des neurones dopaminergiques mésencéphaliques (Nagata *et al.*, 1993a). De même, le facteur de croissance HGF exerce un effet neurotrophique sur les neurones dopaminergiques. La production du facteur IGF-1 est fortement augmentée suite à une lésion cérébrale et constitue un facteur important pour la différenciation et la survie neuronales ainsi que pour la protection des neurones contre les neurotoxines (Aberg *et al.*, 2000 ; Heck *et al.*, 1999).

Outre les neurotrophines et les facteurs de croissance, les microglies activées libèrent diverses cytokines, qui sont soit des régulateurs des réponses immunitaires lors d'une infection soit neurotrophiques. Les microglies sont les principales sources de cytokines, à la fois pro- et anti-inflammatoires. Les principales cytokines pro-inflammatoires libérées par les microglies sont l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6, elles sont toutes impliquées dans le rôle inflammatoire des microglies et à l'origine de maladies neurodégénératives dans le SNC. Les principales cytokines anti-inflammatoires secrétées par les microglies sont le TGF- β et le GDNF. Ces cytokines jouent un rôle important dans la survie de nombreux types de neurones (pour revue voir Nakajima & Kohsaka, 2004).

3.2.4. Récepteurs aux neurotransmetteurs exprimés par les microglies

De nombreux récepteurs de divers neurotransmetteurs sont exprimés à la surface des microglies. Il s'agit des récepteurs adrénérgiques (Mori *et al.*, 2002), GABAérgiques (Kuhn *et al.*, 2004), glutamatergiques (Noda *et al.*, 2000), purinergiques (Boucein *et al.*, 2003), nicotiniques $\alpha 7$ (Shytle *et al.*, 2004), à l'adénosine (Fiebich *et al.*, 1996), à la somastostatine (Feindt *et al.*, 1998), aux bradykinines (Noda *et al.*, 2004), à la substance P, au VIP (Delgado *et al.*, 2003), au PACAP (Delgado *et al.*, 2003), aux prostaglandines (Minghetti *et al.*, 1997) et aux opiacés (Hu *et al.*, 1998). Ces récepteurs modulent la production des médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6 entre autres) induite par un traitement avec le LPS. Ces neurotransmetteurs, en modulant les indicateurs de l'activation microgliale, pourraient ainsi jouer un rôle important dans la régulation de l'inflammation et dans la neurodégénération. Aucun récepteur sérotoninergique n'a été identifié jusqu'à présent dans les microglies.

4. L'Interleukine-6

L'interleukine-6 (IL-6) appartient à la famille des cytokines neuropoïétiques. Cette famille comprend le CNTF (ciliary neurotrophic factor), le LIF (leukemia inhibitory factor), l'oncostatine M, la cardiotrophine-1 (CT-1), le CLC (cardiotrophin-like cytokine) et les interleukines-6 et -11. L'homologie de séquence entre les membres de cette famille est très faible et n'excède pas 30 %.

4.1. Gène

Le gène d'IL-6 est situé sur le chromosome 7 humain (7p21) sur une longueur d'environ 5 kb. Il est constitué de 5 exons et possède de nombreux sites de régulation de sa transcription en amont, en particulier une séquence reconnue par le facteur nucléaire NF- κ B, le facteur nucléaire d'IL-6 (NF-IL-6), un site CRE (cAMP response element), une séquence AP-1 et deux sites de fixation pour les glucocorticoïdes GRE 1 et 2 (glucocorticoïde responsive element).

4.2. Structure

L'IL-6 est une glycoprotéine soluble de 184 acides aminés avec une masse moléculaire de 26 kDa. Il existe deux sites de N-glycosylation (résidus 45 et 144) et de nombreux sites de O-glycosylation. La forme de 26 kDa est O-glycosylée, tandis que la forme de 30 kDa est O- et N-glycosylée. La glycosylation d'IL-6 n'a aucune influence ni sur sa sécrétion ni sur son activité. Il existe également deux ponts disulfures dont l'un est essentiel à l'activité biologique d'IL-6. La structure tridimensionnelle d'IL-6 est hélicoïdale à 67 %, contient 15 % de structure β et 18 % d'angle et d'enroulement.

4.3. Récepteurs de l'IL-6 et transduction du signal

L'IL-6 produit ses effets biologiques en se fixant sur son récepteur spécifique, le récepteur d'IL-6, en synergie avec un peptide transmembranaire gp130. Le récepteur pour l'IL-6 est formé de deux chaînes, l'une contenant le site de liaison de haute affinité pour l'IL-6 (récepteur de l'IL-6) et l'autre permettant la transduction du signal (gp130). La liaison entre IL-6 et son récepteur entraîne une interaction avec la protéine gp130 conduisant à un hexamère constitué de 2 molécules d'IL-6, de 2 récepteurs d'IL-6 et de 2 molécules de la protéine gp130. Cette homodimérisation des sous-unités gp130 entraîne l'activation des tyrosine-kinases de la famille JAK, associées de façon constitutive à la protéine gp130. Les JAK phosphorylent les résidus tyrosine kinase hautement conservés des chaînes gp130, ce qui permet le recrutement des protéines tyrosine-phosphatase intracellulaires contenant un domaine SH-2 (les SHP2). La phosphorylation des SHP2 par les JAK conduit à l'activation de la cascade Ras-ERK1/2 MAP kinases par l'intermédiaire de Grb2/Sos. Une autre voie de signalisation passe par l'activation des facteurs de transcription STAT 1 et 3 (Ernst & Jenkins, 2004) (figure 6). La signalisation par STAT 1 et 3 serait impliquée dans la modulation de la différenciation cellulaire, l'apoptose et le passage G1-S du cycle cellulaire, alors que la signalisation par ERK1/2 médierait la progression dans le cycle cellulaire.

Deux formes du récepteur de l'IL-6 ont été identifiées : une forme avec une région transmembranaire ancrée dans la membrane et une forme soluble résultant d'une protéolyse limitée de la région transmembranaire ou d'un épissage alternatif du gène du récepteur de l'IL-6. Les 2 formes sont capables de fixer l'IL-6 avec les mêmes capacités de transduction du signal par fixation avec la glycoprotéine transmembranaire gp130, qui est également utilisée

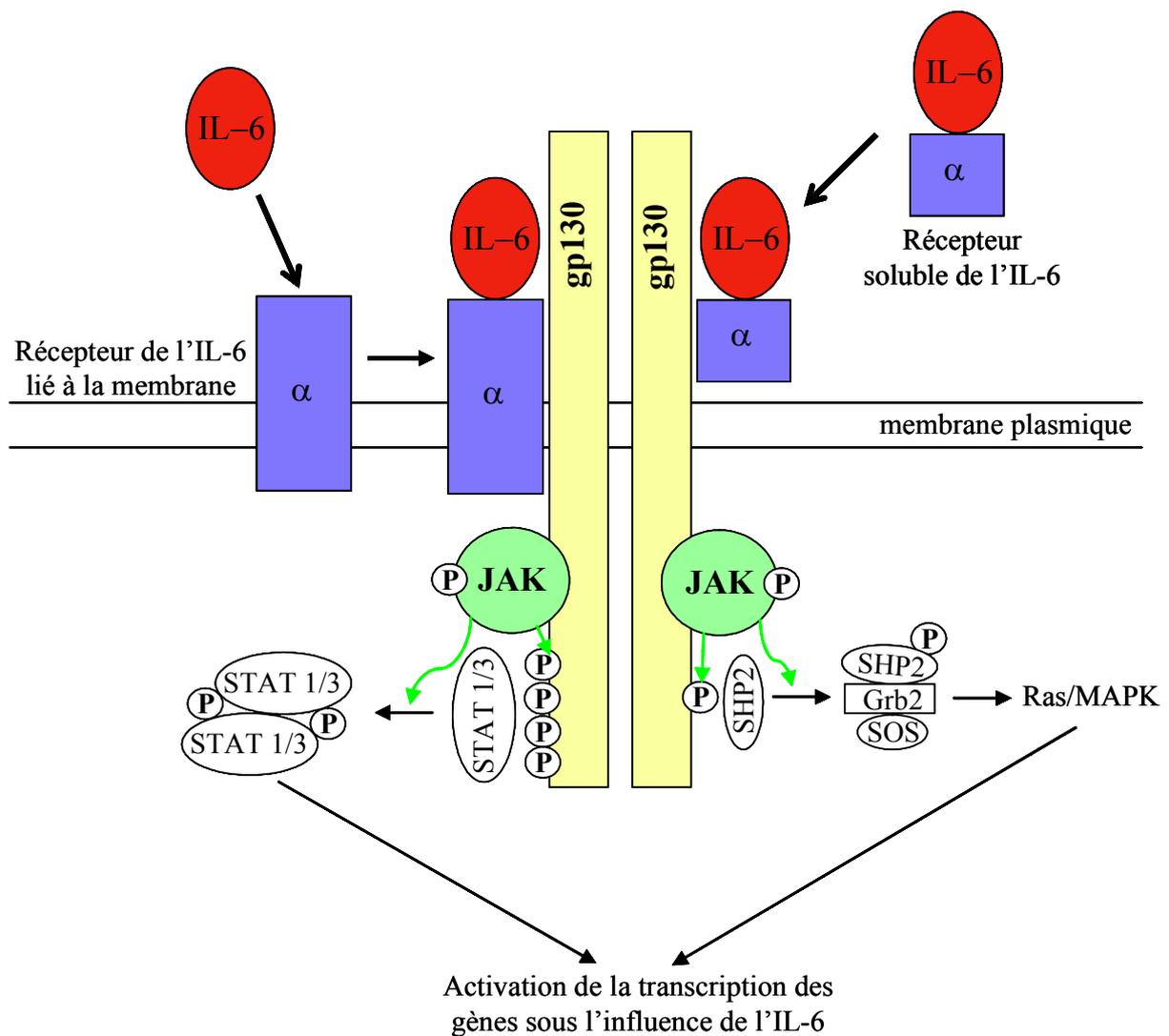


Figure 6. Voies de signalisation intracellulaire induites par l'IL-6.

La fixation de l'IL-6 sur la sous-unité α de son récepteur transmembranaire induit la dimérisation de 2 sous-unités gp130. La formation d'un complexe hexamérique: 2 molécules d'IL-6, 2 sous-unités α de son récepteur et 2 molécules gp130 entraîne l'activation des tyrosine kinases JAK constitutivement associées à gp130, qui phosphorylent gp130. Ces phosphorylations permettent l'ancrage et l'activation de divers facteurs comme STAT1/3 et SHP2. Alternativement, le complexe, formé par l'IL-6 et son récepteur soluble, peut activer les molécules gp130 et induire la même signalisation intracellulaire.

par les autres cytokines de la famille d'IL-6. L'IL-6 ne semble pas avoir la capacité de se fixer directement sur la gp130.

4.4. Production et sécrétion

De nombreuses cellules secrètent de l'IL-6 : les cellules du système immunitaire, les astrocytes, les microglies, les cellules vasculaires des muscles lisses, les cellules endothéliales et les neurones. Dans le SNC, les sources majeures de production de l'IL-6 sont les microglies et les astrocytes.

Le niveau d'IL-6 dans le cerveau adulte (parenchyme et liquide céphalo-rachidien) est très faible voir indétectable dans les conditions physiologiques, mais peut être fortement augmenté après une infection, une inflammation ou probablement lors d'une maladie psychiatrique (Navikas *et al.*, 1996 ; Sun *et al.*, 2003). Les sources majeures d'IL-6 dans ces conditions sont les astrocytes et les microglies dans le SNC.

L'IL-6 emprunte la voie classique de sécrétion des peptides contenant une séquence signal N-terminale hydrophobique. La protéine précurseur emprunte l'appareil de Golgi, puis est stockée dans des granules de sécrétion, la libération de la protéine mature dans l'espace extracellulaire se fait par fusion entre les granules et la membrane plasmique.

4.5. Principaux rôles physiologiques de l'IL-6 dans le SNC

La fonction physiologique de l'IL-6 dans le SNC est complexe. L'IL-6 exerce à la fois des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs et peut également avoir des fonctions de médiateur dans l'inflammation, la démyélinisation et la prolifération d'astrocytes (pour revue voir Gadiant & Otten, 1997 ; Gruol & Nelson, 1997). Ainsi, l'IL-6 peut avoir des effets positifs et négatifs dans le SNC.

L'IL-6 agit sur les neurones en favorisant leur survie, en les protégeant contre tout dommage et en induisant leur différenciation (pour revue voir Gadiant & Otten, 1997 ; Gruol & Nelson, 1997). Elle agit également sur les astrocytes en induisant leur prolifération et leur différenciation (März *et al.*, 1999). IL-6 induit également la libération du facteur de croissance NGF et des neurotrophines NT-3 et NT-4/5 par les astrocytes de rat (März *et al.*, 1999).

L'IL-6 peut également agir sur la biosynthèse de certains neurotransmetteurs, en particulier la sérotonine. En effet, une injection intraveineuse ou intrapéritonéale d'IL-6

entraîne une augmentation de la concentration du tryptophane, précurseur de la synthèse de la sérotonine, et du rapport 5-HIAA/5-HT (le 5-HIAA est le principal métabolite de la sérotonine) dans le cerveau de souris (Wang & Dunn, 1998). Un taux plus élevé de tryptophane corrèle avec une augmentation de la synthèse de la sérotonine et un taux plus élevé de 5-HIAA pourrait révéler avec une augmentation de la libération de la sérotonine. Ceci a été partiellement confirmé par une étude de microdialyse qui a montré des taux extracellulaires élevés de sérotonine et de 5-HIAA dans l'hypothalamus de rat après une injection intrapéritonéale d'IL-6 (Barkhudaryan & Dunn, 1999). Ainsi, l'IL-6 pourrait influencer la neurotransmission en agissant sur la biosynthèse et la libération de certains neurotransmetteurs.

Une injection intraveineuse ou intrapéritonéale d'IL-6 de souris entraîne une augmentation plasmatique d'ACTH et de corticostérone chez la souris, indiquant que l'IL-6 stimule l'axe HHS (Wang & Dunn, 1998). L'IL-6 humain augmente également les concentrations plasmatiques d'ACTH et de corticostérone chez le rat, la souris et l'homme et l'IL-6 de souris est efficace chez le rat et la souris. L'IL-6 est un puissant stimulateur de la production du CRH (corticotrophin-releasing hormone), qui entraîne une augmentation de l'activité de l'axe HHS caractérisée par une sécrétion importante d'ACTH et de cortisol. En retour, les glucocorticoïdes inhibent la libération d'IL-6, ce qui permet un rétrocontrôle négatif d'IL-6 et un retour aux conditions normales de fonctionnement du cerveau après une inflammation ou un stress.

L'IL-6 a également un effet hyperthermique et serait impliqué dans la douleur (pour revue voir Gadiant & Otten, 1997 ; Gruol & Nelson, 1997).

4.6. Régulation de la production d'IL-6 par les astrocytes

L'expression de l'IL-6 dans les astrocytes est régulée par divers facteurs : des cytokines pro-inflammatoires, des neurotransmetteurs et des neuropeptides. Diverses voies de signalisation intracellulaire permettent d'augmenter la synthèse et la libération de l'IL-6 par les astrocytes.

Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IFN- γ sont des puissants stimulants de la production d'IL-6 dans les astrocytes (Norris *et al.*, 1994). Les neurotransmetteurs et les neuropeptides peuvent également moduler l'expression d'IL-6 dans les astrocytes. C'est le cas de la noradrénaline (Maimone *et al.*, 1993), du peptide intestinal vasoactif (VIP) (Grimaldi *et al.*, 1994), du polypeptide activant l'adénylate cyclase

hypophysaire (PACAP) (Gottschall *et al.*, 1994), de l'adénosine (Schwaninger *et al.*, 1997), de l'histamine (Lieb *et al.*, 1998), de la substance P (Lieb *et al.*, 1998), de la calcitonine (Kiriyaama *et al.*, 1997), de la prostaglandine E₂ (Fiebich *et al.*, 1997) et de la sérotonine (Pousset *et al.*, 1996). La régulation de l'expression d'IL-6 a été montrée à plusieurs niveaux.

Le principal messenger intracellulaire impliqué dans la stimulation de la production d'IL-6 induite par ces neuropeptides est l'AMPc. En effet, la calcitonine, le VIP, la noradrénaline, le PACAP et la prostaglandine PGE₂ induisent la production d'IL-6 par une augmentation intracellulaire d'AMPc. De plus, des inducteurs de l'adénylate cyclase comme la forskoline et les analogues d'AMPc augmentent l'expression d'IL-6 dans les astrocytes de rat (Maimone *et al.*, 1993). Il a également été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de PKA, le KT-5720, bloque l'induction de l'expression de l'IL-6 par le VIP (Grimaldi *et al.*, 1994).

Une autre voie de transduction du signal est impliquée dans la stimulation de l'expression d'IL-6, c'est la PKC stimulée par le calcium et le diacylglycérol. En effet, l'activateur de la PKC, l'ester de phorbol PMA et les ionophores de calcium augmentent l'expression d'IL-6 (Norris *et al.*, 1994). De plus, l'IL-1 β et le TNF- α induisent l'expression de l'IL-6 par activation de la PKC et non de la PKA (Norris *et al.*, 1994). De même, la substance P et l'histamine induisent la transcription du gène de l'IL-6 par activation de la PKC (Lieb *et al.*, 1998).

Ainsi, la régulation de la production de l'IL-6 par les astrocytes peut se faire par deux voies distinctes, la voie de la PKA et celle de la PKC. De plus, ces deux voies peuvent agir en synergie pour augmenter la production de l'IL-6. En effet, la production de l'IL-6 est encore plus importante lorsque les astrocytes sont co-stimulés avec le VIP, le PACAP ou la noradrénaline et l'IL-1 β (Gottschall *et al.*, 1994 ; Maimone *et al.*, 1993).

4.7. Régulation de la production d'IL-6 par les microglies

Les signaux qui activent les microglies, tels que les agents pathogènes viraux et bactériens de même que les médiateurs inflammatoires, induisent la synthèse et la libération de l'IL-6 par les microglies.

De plus, les neurotransmetteurs modulent la production de l'IL-6 par les microglies. L'activation des récepteurs purinergiques et GABAergiques ainsi que le VIP et le PACAP (qui augmentent l'AMPc) réduisent la production de l'IL-6 induite par le LPS dans les microglies (Boucein *et al.*, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004 ; Delgado *et al.*, 2003). Cependant, le

rôle activateur ou inhibiteur de l'AMPc sur l'expression de l'IL-6 dans les microglies fait actuellement l'objet d'un débat (Woo *et al.*, 2004).

Les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans ces réponses sont identiques à celles activées dans les astrocytes pour la production de l'IL-6.

4.8. Effets pathologiques de l'IL-6 dans le SNC

Des dérèglements dans la production de l'IL-6 ont été rapportés dans un grand nombre de maladies ; en particulier dans certains cancers, dans des maladies autoimmunes telles que l'arthrite rhumatoïde ainsi que dans des maladies psychiatriques et neurodégénératives.

La génération de souris transgéniques, qui permet de cibler spécifiquement une expression chronique faible de l'IL-6 dans les astrocytes par l'utilisation du gène GFAP comme vecteur d'expression, a montré que cette cytokine entraîne une diminution progressive des capacités d'apprentissage, dépendante de la dose du transgène GFAP-IL-6 et de l'âge des souris, ainsi que des dysfonctionnements dans l'axe HHS et dans l'hippocampe (Campbell, 1998). De plus, cette expression chronique de l'IL-6 dans le SNC entraîne une réponse neuroinflammatoire progressive qui serait à l'origine de maladies neurodégénératives et de troubles cognitifs. L'utilisation de ces souris transgéniques a montré qu'une exposition à long terme du cerveau avec cette cytokine entraîne une forte diminution de la neurogénèse hippocampale (Vallières *et al.*, 2002). Il a également été observé dans ces souris une augmentation progressive de l'angiogénèse, ainsi l'IL-6 pourrait jouer un rôle important dans la progression d'une tumeur dans le SNC (Campbell, 2002).

Des taux élevés en IL-6 dans le liquide céphalo-rachidien ont été détectés chez les patients souffrant de la sclérose en plaques (Navikas *et al.*, 1996) ainsi que de la maladie d'Alzheimer (Sun *et al.*, 2003). De plus, des taux élevés en IL-6 ont été mesurés dans le plasma de patients atteints par ces mêmes pathologies (Frei *et al.*, 1991 ; Singh *et al.*, 1997 ; Licastro *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2003). De même, l'IL-6 et son récepteur soluble (sIL-6R) ont été retrouvés surexprimés dans le plasma de patients souffrant d'une dépression majeure (Maes *et al.*, 1995 ; Frommberger *et al.*, 1997 ; Kubera *et al.*, 2000) et leurs taux reviennent à la normale après rémission (Frommberger *et al.*, 1997 ; Kubera *et al.*, 2000). L'augmentation simultanée de l'IL-6 et de sIL-6R souligne l'importance de l'IL-6 dans la dépression : en effet IL-6 et sIL-6R forme un complexe permettant une augmentation de l'activité biologique d'IL-6 par un couplage direct avec la protéine de transduction gp130 (Maes *et al.*, 1995). Il a été

montré qu'un stress chronique augmente le taux d'IL-6 plasmatique chez l'Homme (Kiecolt-Glaser *et al.*, 2003).

5. Conclusion

Toutes ces données bibliographiques suggèrent que le récepteur sérotoninergique 5-HT₇ joue un rôle important dans la pathophysiologie du SNC. Il représente une cible thérapeutique potentielle dans divers désordres d'origine centrale.

Ce récepteur est trouvé exprimé aussi bien dans les neurones que dans les astrocytes. Dans les astrocytes humains, c'est l'un des récepteurs sérotoninergiques le plus exprimé, mais sa fonction reste inconnue. Longtemps négligé, le rôle primordial des cellules gliales dans le bon fonctionnement du cerveau, en particulier au niveau du développement neuronal et de la neurotransmission, est actuellement largement reconnu. Mais, ces cellules peuvent également avoir un rôle pathologique de par leur implication dans l'inflammation par la libération d'un grand nombre de cytokines. Ainsi, un récepteur exprimé dans ces cellules, pourrait jouer un rôle majeur aussi bien bénéfique que pathologique pour le SNC.

L'IL-6 est une cytokine capable d'avoir aussi bien des effets bénéfiques que pathologiques pour le SNC, elle est retrouvée surexprimée dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma de patients souffrant de désordres psychiatriques. Elle serait régulée entre autres dans les astrocytes par la sérotonine agissant sur un récepteur non identifié. Cette cytokine est aussi bien sécrétée par les astrocytes que les microglies. Ainsi, le récepteur 5-HT₇ exprimé dans les cellules gliales pourrait être impliqué dans l'effet modulateur de la sérotonine sur la libération de l'IL-6 dans les cellules gliales.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués à Novartis (NIBR), à Bâle au sein du département de Recherche en Neurosciences sous tutelle du laboratoire de pharmacologie et physicochimie des interactions cellulaires et moléculaires (UMR 7034) à la faculté de pharmacie de Strasbourg.

1. Objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse est (1)- d'identifier des modèles d'étude de lignées humaines de cellules gliales exprimant le récepteur 5-HT₇ ; (2)- de montrer que l'activation de ce récepteur est capable de moduler l'expression et la libération de l'IL-6 dans ces cellules ; (3)- d'étendre ces résultats à des systèmes plus physiologiques : des astrocytes de rat en culture primaire et mesure d'IL-6 plasmatique chez le rat.

Dans un premier temps, nous avons testé l'expression fonctionnelle de ce récepteur dans des lignées cellulaires de glioblastomes humains commercialisées. Ces cellules constituent des modèles d'astrocytes facilement cultivables, par rapport aux cultures d'astrocytes primaires, et elles sécrètent constitutivement l'IL-6. Le détail des techniques utilisées ainsi que les résultats et la discussion sont exposés dans la publication n°1 (Chapitre I).

Ensuite, nous avons testé le rôle de ce récepteur sur la synthèse et la sécrétion de l'IL-6 dans trois lignées de glioblastomes humains qui répondent le mieux à la stimulation du récepteur 5-HT₇. C'est l'objet de la publication n°2 (Chapitre I).

Nous avons ensuite étudié la présence fonctionnelle de ce récepteur dans des lignées de microglies, provenant de cultures primaires immortalisées par infection avec le virus SV40 (Janabi *et al.*, 1995) et de son rôle dans la modulation de l'expression de l'IL-6. Les détails techniques, les résultats et la discussion sont exposés dans la publication n°3 (Chapitre II).

Nous avons ensuite décidé de compléter ces résultats par des études plus physiologiques. Tout d'abord, nous avons étudié l'expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans des astrocytes en cultures primaires de rat provenant du cortex frontal et de l'hippocampe. Enfin, nous avons examiné l'impact de la stimulation du récepteur 5-HT₇ sur le taux d'IL-6 plasmatique circulant chez le rat Sprague Dawley. Ces derniers résultats ainsi que la procédure expérimentale correspondante sont exposés dans le chapitre III.

2. Résultats

Chapitre I : Expression du récepteur 5-HT₇ dans divers lignées de glioblastomes humains et implication dans la modulation de la synthèse de l'IL-6.

1. Etude de l'expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans des glioblastomes humains.

Publication n°1 : Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines.

(Expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans des lignées cellulaires de glioblastomes humains).

2. Etude de l'effet de l'activation du récepteur 5-HT₇ sur l'expression et la sécrétion de l'IL-6 dans les lignées de glioblastomes humains.

Publication n°2 : Serotonin 5-HT₇ receptor activation increases interleukin-6 mRNA expression and interleukin-6 release in human glioblastoma cells: Involvement of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase.

(L'activation du récepteur sérotoninergique 5-HT₇ augmente l'expression de l'ARNm de l'interleukine-6 et la libération de l'interleukine-6 dans les cellules de glioblastomes humains : implication de la protéine kinase A et de MAPkinase p38).

Chapitre II : Implication du récepteur 5-HT₇ dans l'expression de l'IL-6 dans une lignée microgliale humaine (MC-3).

Publication n°3 : Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells.

(Le récepteur sérotoninergique 5-HT₇ couplé à l'induction de l'interleukine-6 dans les cellules microgliales humaines MC-3).

Chapitre III : Etude de la relation stimulation du récepteur 5-HT₇/induction de l'IL-6 dans des cultures primaires d'astrocytes de rat et *in vivo* chez le rat.

1. Etude de l'expression du récepteur 5-HT₇ dans des cultures primaires d'astrocytes de rat.

2. Impact de la stimulation du récepteur 5-HT₇ sur le taux plasmatique circulant d'IL-6.

Chapitre I :

Expression du récepteur 5-HT₇ dans divers lignées de glioblastomes humains et implication dans la modulation de la synthèse de l'IL-6.

1. Etude de l'expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans des glioblastomes humains.

Publication n°1 :

Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines.
British Journal of Pharmacology (2004) **143**, 404-410.

(Expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans des lignées cellulaires de glioblastomes humains).

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Cécile Mahé, Michel Bernhard, Ionel Bobirnac, Corinna Keser, Erika Loetscher, Dominik Feuerbach, Kumlesh K. Dev & Philippe Schoeffter

Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines.

British Journal of Pharmacology, volume 143 (2004), Pages 404-410

Pages 404-410 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

2. Etude de l'effet de l'activation du récepteur 5-HT₇ sur l'expression et la sécrétion de l'IL-6 dans les lignées de glioblastomes humains.

Publication n°2 :

Serotonin 5-HT₇ receptor activation increases interleukin-6 mRNA expression and interleukin-6 release in human glioblastoma cells: Involvement of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. (en soumission).

(L'activation du récepteur sérotoninergique 5-HT₇ augmente l'expression de l'ARNm de l'interleukine-6 et la libération de l'interleukine-6 dans les cellules de glioblastomes humains : implication de la protéine kinase A et de MAPkinase p38).

**Serotonin 5-HT₇ Receptor Activation Increases Interleukin-6 mRNA
Expression and Interleukin-6 Release in Human Glioblastoma Cells:
Involvement of Protein Kinase A and p38 Mitogen-Activated Protein
Kinase**

Cécile Mahé¹, Erika Loetscher¹, Rochdi Bouhelal² and Philippe Schoeffter¹

¹Neuroscience Research and ²Discovery Technologies, Novartis Institutes for BioMedical
Research, Novartis Pharma AG, WSJ-386.7.44, CH-4002 Basel, Switzerland

Running title: 5-HT₇ receptors and IL-6 in human glioblastoma cells

Author for correspondence:

Philippe Schoeffter, Ph.D.
Neuroscience Research
Novartis Institutes for BioMedical Research
Novartis Pharma AG
WSJ-386.7.44
CH-4002 Basel
Switzerland
tel. 00 41 61 324 92 61
fax 00 41 61 324 64 58

E-mail: philippe.schoeffter@pharma.novartis.com

Number of text pages: 16

Number of tables: 2

Number of figures: 7

Number of references: 65

Number of words in the Abstract: 245

Number of words in the Introduction: 501

Number of words in the Discussion: 1333

Abbreviations: 5-HT, 5-hydroxytryptamine, serotonin; 5-CT, 5-carboxamidotryptamine; IL-6, interleukin-6; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PCR, polymerase chain reaction; PD 98,059, 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; PKA, protein kinase A; Rp-8-Br-cAMPS, 8-bromoadenosine-3', 5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer; Rp-8-CPT-cAMPS, 8-(4-chlorophenylthio)adenosine-3', 5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer; SB-202190, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-

(4-pyridyl)-1H-imidazole; SB-269970, (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol.

Abstract

We previously identified 5-HT₇ receptors functionally coupled to cAMP stimulation in several human glioblastoma cell lines. We now report that 5-HT₇ receptor stimulation induces interleukin-6 (IL-6) mRNA expression and IL-6 release in three of these cell lines (H4, U-373 MG and DBTRG05-MG). In Real-Time polymerase chain reaction experiments, the 5-HT₇ receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine (5-CT) increased IL-6 mRNA expression with pEC₅₀ values of 7.97, 7.88 and 8.13 in H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells, respectively. The effect of 5-CT was inhibited in a concentration-dependent manner by the selective 5-HT₇ receptor antagonist, (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol hydrochloride (SB-269970) with pK_B values of 9.26, 9.46 and 9.44, respectively. 5-CT-induced stimulation of IL-6 mRNA expression was followed by increase in the release of IL-6 in the three cell lines after 24 h incubation. Concentration-response curves for 5-CT-stimulated IL-6 release yielded pEC₅₀ values very close to those obtained for stimulation of IL-6 mRNA expression. Furthermore, SB-269970 potently antagonized 5-CT-induced IL-6 release, with pK_I values close to pK_B values obtained for inhibition of IL-6 mRNA expression. The effect of 5-CT (1 μM) on IL-6 mRNA expression was decreased by inhibitors of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not by an inhibitor of p44/p42 MAPK. These results show for the first time that 5-HT₇ receptor activation leads to stimulation of IL-6 expression/release in human glioblastoma cells, via a process involving PKA and p38 MAPK, but not p44/p42 MAPK. They might be of therapeutic relevance in the fields of inflammation and cancer.

Fourteen different receptor subtypes have been described for the neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), grouped in seven families (5-HT₁₋₇) on the basis of structural, functional and pharmacological criteria (Hoyer et al., 2002). The 5-HT₇ receptor, cloned from mouse (Plassat et al., 1993), rat (Lovenberg et al., 1993; Meyerhof et al., 1993; Ruat et al., 1993; Shen et al., 1993), guinea-pig (Tsou et al., 1994), pig (Bhalla et al., 2002) and human (Bard et al., 1993), is positively coupled to adenylyl cyclase and cAMP accumulation through the stimulatory G_s protein and displays a unique pharmacological profile. Whereas several splice variants of the 5-HT₇ receptor have been described, both in man and rat, they appear to display the same pharmacology (Heidmann et al., 1997; Krobert et al., 2001).

5-HT₇ receptor mRNA has been found in the brain, where it is located in the thalamus, hypothalamus and various limbic and cortical regions in rat (Lovenberg et al., 1993; Ruat et al., 1993; Shen et al., 1993), guinea-pig (To et al., 1995) and man (Bard et al., 1993; Hagan et al., 2000), as well as in smooth muscles of the cardiovascular and gastrointestinal systems (Bard et al., 1993; Schoeffter et al., 1996; Hagan et al., 2000). Immunocytochemical studies have essentially confirmed 5-HT₇ receptor mRNA distribution in rat brain (Neumaier et al., 2001). Receptor distribution and pharmacological studies have suggested that 5-HT₇ receptors may play a role in the control of circadian rhythms (Lovenberg et al., 1993; Ying and Rusak, 1997) and smooth muscle tone (Eglen et al., 1997). Selective 5-HT₇ receptor ligands may have potential therapeutic applications in sleep disorders, depression, migraine and pain (for a review, see Thomas and Hagan, 2004).

Whereas a number of electrophysiological studies point to brain 5-HT₇ receptors being present in neurons (Bacon and Beck, 2000; Chapin and Andrade, 2001; Gill et al., 2002; Goillard and Vincent, 2002), evidence has been presented that these receptors are also expressed in glial cells. They have been detected by immunostaining in astrocytes of the mouse suprachiasmatic nucleus (Belenky and Pickard, 2001) and shown to be functionally

coupled to cAMP accumulation in rat and human brain astrocytes in primary culture (Shimizu et al., 1996; Hirst et al., 1997; Cohen et al., 1999). We recently described the presence of such 5-HT₇ receptors in several human glioblastoma cell lines (Mahé et al., 2004). Although the role of these receptors in glial cells remains unknown, we hypothesized that cellular events associated with the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway in glial cells might be considered as candidate functions. The release of neurotrophic factors and/or inflammatory cytokines is known to be driven by this pathway in astrocytes (Huneycutt and Benveniste, 1995).

In the present study, we show that 5-HT₇ receptor activation increases the expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA and the release of IL-6 in three human glioblastoma and neuroglioma cell lines (H4, U-373 MG and DBTRG-05MG). We further bring evidence that this effect is mediated by PKA and also by p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), but not p44/p42 MAPK.

Materials and Methods

Drugs and Chemicals. 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT) and 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (PD 98,059) were obtained from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). 8-(4-Chlorophenylthio)adenosine-3', 5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer (Rp-8-CPT-cAMPS) and 8-bromoadenosine-3', 5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer (Rp-8-Br-cAMPS) were purchased from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany). 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole (SB-202190) was obtained from BioSource International, Inc. (Camarillo, CA). (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol hydrochloride (SB-269970) was synthesized at Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland. Millimolar stock solutions of test compounds were made on the day of the experiment in dimethylsulfoxide or in distilled water. Further dilutions were made in distilled water.

Cell culture. The human glioblastoma or neuroglioma cell lines, H4, U-373 MG, and DBTRG-05MG were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), minimum essential medium (MEM) and non-essential amino-acids were purchased from Gibco BRL Life Technologies (Rockville, MD). H4 cells were maintained in DMEM, U-373 MG and DBTRG-05MG cells in MEM containing non-essential amino-acids. All media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. They were subcultured in 24-well and 6-well plates for measurements of IL-6 levels and Real-Time polymerase chain reaction (PCR) analysis, respectively. They were deprived of FCS 24 h before the experiments.

Primers for Real-Time PCR Analysis. Primers and probes were designed using Primer Designer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The probes were labeled with the reporter dye, fluorophore-6-carboxy-fluorescein, at the 5' end and the dye quencher, 6-

carboxytetramethylrhodamine, at the 3' end. Primers and probes were synthesized commercially (Microsynth, Balgach, Switzerland). The 18S Genomic Endogenous Control Kit was purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium).

<u>Gene name</u>	<u>Accession number</u>	<u>Primer/Probe</u>	<u>Sequence</u>
IL-6	NM_000600	Forward	5'CCAGGAGCCCAGCTATGAAC 3'
		Reverse	5'CCCAGGGAGAAGGCAACTG 3'
		Probe	5'CCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGT 3'

RNA Extraction and Real-Time PCR Analysis. Cells were incubated with 5-CT for the indicated periods of time. Where indicated, the 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970, was added just before 5-CT. Protein kinase inhibitors were added 15 min before 5-CT. At the end of the incubation period, lysis buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added and the plates were stored at -20°C until isolation of RNA. Total RNA was isolated by using the SNAPTM Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The quantity of total RNA was determined by Ribogreen[®] staining (RibogreenTM RNA Quantitation Kit; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). The quality of the RNA was checked by electrophoretic separation of the RNA on a 1.2% SeaKem LE agarose gel (Karlan, Santa Rosa, CA). For each RNA sample, 400 ng of total RNA were first digested with DNase I (Qiagen, Hilden, Germany) in order to remove traces of genomic DNA contamination. The DNase I enzyme was inactivated by addition of EDTA and heating up to 65°C for 2 min. DNase I-treated total RNA was reverse transcribed into cDNA for 60 min at 42°C with 300 ng of random hexamer primers and 50 U of StrataScriptTM Reverse Transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA). The reaction was stopped by heating up to 95°C for 5 min. As template for the Real-Time PCR reaction, 5 ng of RNA reverse transcribed into cDNA was used. The Real-Time PCR reaction was performed in a final volume of 20 µl containing 300 nM of forward and reverse primers, 175 nM of probe and qPCRTM Mastermix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgium). The thermal cycler conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 40 cycles with the following profile:

95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each sample was run in triplicate. The relative expression of specific transcripts was determined after normalization to 18S rRNA by using the so-called ‘comparative C_T method’ as described in Livak and Schmittgen (2001).

Measurements of IL-6 levels. Cells were incubated for 24 h with 5-CT. Where indicated, the 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970, was added 30 min prior to the addition of 5-CT. At the end of the incubation period, cell supernatants were collected, particles removed by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min, and aliquots stored at -20°C until being assayed using an immunoassay kit (human IL-6 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN). Each sample was measured in duplicate.

Analysis of data. Concentration-response curves were fitted to the nonlinear logistic function of the Origin 7 software package (OriginLab Corporation, Northampton, MA). E_{max} and pEC₅₀ values were derived from these analyses. The pA₂ value of the antagonist compound SB-269970 was estimated from Schild analyses (Arunlakshana and Schild, 1959). Values of pK_B and pK_I were calculated according to Furchgott (1972) and Cheng and Prusoff (1973), respectively. Results are given as mean ± S.E. of the indicated *n* number of experiments. The Student’s *t* test was used for statistical comparisons, a *p* value less than 0.05 being considered significant.

Results

Time course of 5-CT and forskolin-induced IL-6 mRNA expression in H4 neuroglioma cells. We previously reported the presence of 5-HT₇ receptors functionally coupled to cAMP stimulation in several human neuroglioma and glioblastoma cells (Mahé et al., 2004). Among these, H4 neuroglioma cells were the most responsive to agonist stimulation and were therefore used for exploring a possible effect on IL-6 mRNA expression by Real-Time PCR analysis. Incubation of H4 cells with the 5-HT₇ receptor agonist, 5-CT (1 µM) up to 12 h led to time-dependent increases in IL-6 mRNA expression levels peaking at about 9 times the basal levels after 1 h (Fig. 1). The cAMP elevating agent forskolin (10 µM) also induced time-dependent increases in IL-6 mRNA expression, with a maximum of 19-fold over baseline after 3 h of incubation (Fig. 1).

Pharmacological characterization of the effect of 5-CT on IL-6 mRNA expression in H4 neuroglioma cells. Concentration-response curves of the effect of 5-CT (1 nM-10 µM) on IL-6 mRNA expression levels were obtained after 1 h incubation with H4 cells. 5-CT stimulated IL-6 mRNA expression in a concentration-dependent manner with a mean pEC₅₀ value of 7.97 (Fig. 2A; Table 1). In the presence of increasing concentrations (10 nM, 0.1 µM and 1 µM) of the selective 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970 (Lovell et al., 2000), there were incremental shifts in the concentration-response curve of 5-CT to the right in a parallel manner (Fig. 2A). Schild analysis of the antagonism yielded a slope factor close to unity (0.995) and a pA₂ value of 9.30 (Table 1).

Effects of 5-CT and SB-269970 on IL-6 mRNA expression in U-373 MG and DBTRG-05MG glioblastoma cells. Similar to what was observed in H4 cells, 5-CT induced IL-6 mRNA expression in U-373 MG and DBTRG-05MG cells, two human glioblastoma cell lines in which a strong 5-HT₇ receptor-mediated cAMP accumulation was previously reported (Mahé et al., 2004). 5-CT (1 nM-10 µM) induced concentration-dependent increases in IL-6

mRNA expression levels in U-373 MG and DBTRG-05MG cells after 1 h incubation, with mean pEC₅₀ values of 7.88 and 8.13, respectively (Fig. 2B and 2C; Table 1). Maximal stimulation (E_{max}) was somewhat smaller in U-373 MG cells than in DBTRG-05MG cells (Table 1). In both cell lines, the concentration-response curves of 5-CT were shifted to the right in a parallel manner in the presence of SB-269970 (0.1 μM) and respective pK_B values of 9.46 and 9.44 were derived (Fig. 2B and 2C; Table 1).

Effect of 5-CT on IL-6 release from H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells. We next investigated whether increases in IL-6 mRNA expression levels induced by 5-CT in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells were followed by IL-6 protein release from these cells. 5-CT (1 nM-10 μM) stimulated IL-6 release from all three cell lines in a concentration-dependent manner (Fig. 3). Maximal stimulation varied between 2.4- and 5.7-fold over baseline levels and mean pEC₅₀ values of 5-CT ranged between 7.88 and 8.15 (Table 2).

Inhibitory effect of SB-269970 on 5-CT-induced IL-6 release in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells. The selective 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970 (0.1 nM-1 μM) induced concentration-dependent inhibitions of 5-CT (1 μM)-stimulated IL-6 release in the supernatants of H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells (Fig. 4). The mean pK_I values of SB-269970 ranged between 8.99 and 9.37 (Table 2).

Intracellular signaling pathways involved in 5-CT-induced IL-6 mRNA expression in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells. We set out to explore the pathways mediating 5-CT-induced stimulation of IL-6 expression in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells using Real-Time PCR analysis. The 5-HT₇ receptor is positively coupled to cAMP accumulation in these three cell lines (Mahé et al., 2004). In addition, no intracellular [Ca²⁺] response was observed in these cells upon stimulation with 5-CT, 5-HT and 5-methoxytryptamine, whereas substance P used as a positive control elicited a robust [Ca²⁺] response in the same experiments (data not shown). This guided our investigations toward cAMP-dependent protein kinase (PKA) but not Ca²⁺-dependent protein kinases, such as

protein kinase C. Also, because of known interactions between PKA and some mitogen-activated protein kinases (MAPK), like p44/p42 and p38 MAPK (see Discussion), we examined the involvement of the latter kinases.

In the presence of the PKA inhibitors, Rp-8-CPT-cAMPS and Rp-8-Br-cAMPS (each 0.1 mM; Gjertsen et al., 1995), the stimulation of IL-6 expression induced by 5-CT (1 μ M) was reduced in all three cell lines (Fig. 5). The inhibition was most pronounced and reached the level of statistical significance in U-373 MG cells (Fig. 5B). In H4 cells, 5-CT-induced stimulation of IL-6 expression was inhibited by 44 % and 27 % by Rp-8-CPT-cAMPS and Rp-8-Br-cAMPS, respectively (Fig. 5A). These figures were 51 % and 66 % in DBTRG05-MG cells (Fig. 5C).

The inhibitor of p44/p42 MAPK activation, PD 98,059 (50 μ M; Alessi et al., 1995) had no inhibitory effect on the stimulation of IL-6 expression induced by 5-CT (1 μ M) in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells (Fig. 6).

With SB-202190 (10 μ M), a p38 MAPK inhibitor (Lee and Young, 1996), a trend for inhibition of 5-CT (1 μ M)-induced IL-6 mRNA expression was observed in H4 cells (-23 %; Fig. 7A) and U-373 MG cells (-26 %; Fig. 7B). In DBTRG-05MG cells, SB-202190 abolished the effect of 5-CT (Fig. 7C).

Discussion

Our recent discovery that 5-HT₇ receptors are present and positively coupled to cAMP accumulation in several human glioblastoma and neuroglioma cell lines (Mahé et al., 2004) prompted us to explore the function of these receptors. Some other G_S coupled receptors are known to mediate increases in IL-6 mRNA expression and/or IL-6 release in human glioblastoma (Fiebich et al., 1996; Fiebich et al., 1997; Kiriya et al., 1997) and primary cultures of rat astrocytes (see Benveniste et al., 1995). This background directed our attention toward this cytokine. We now bring evidence that 5-HT₇ receptor stimulation induces IL-6 mRNA expression and IL-6 release in three glioblastoma and neuroglioma cell lines among the most responsive in terms of cAMP accumulation (H4, U-373 MG and DBTRG05-MG).

Real-Time PCR analyses allowed the quantitation of changes in IL-6 mRNA expression in these cell lines, in a time and concentration-dependent manner. H4 cells gave the most robust response, as was previously the case with respect to cAMP levels (Mahé et al., 2004). The 5-HT₇ receptor agonist, 5-CT increased IL-6 mRNA expression maximally after 1 h incubation in H4 cells. The cAMP activating agent forskolin also induced a strong, longer-lasting IL-6 mRNA increase in the same cells. Construction of concentration-response curves for 5-CT using data from Real-Time PCR analyses in H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells yielded pEC₅₀ values in line with this 5-HT analog being a potent 5-HT₇ receptor agonist (Thomas et al., 1998; Krobert et al., 2001). 5-CT-induced increases in IL-6 mRNA expression were followed by increases in the release of IL-6 protein in the three cell lines after 24 h incubation. Concentration-response curves for 5-CT-stimulated IL-6 release could be obtained in the three cell lines. Again, H4 cells were the most responsive cells in terms of maximal stimulation of IL-6 release. Values of pEC₅₀ of 5-CT for the stimulation of IL-6 mRNA expression and IL-6 release were almost identical in the three cell lines (compare data from Table 1 and Table 2). Interestingly, these pEC₅₀ values (7.88-8.15) were about one order of

magnitude higher than their corresponding counterparts for cAMP accumulation in the same cells (6.98-7.22; Mahé et al., 2004), suggesting an amplification step between cAMP stimulation and activation of IL-6 gene expression.

5-CT is a potent 5-HT₇ receptor agonist, but also acts on other 5-HT receptors, e.g. 5-HT₁ receptors (Hoyer et al., 2002). Definitive evidence that the effects of 5-CT on IL-6 mRNA expression and IL-6 release were mediated by 5-HT₇ receptors in H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells was shown in antagonist studies with SB-269970. This compound is a selective 5-HT₇ receptor antagonist, with nanomolar potency (Hagan et al., 2000; Lovell et al., 2000). It has a high selectivity profile (>250-fold) over other 5-HT receptors, apart from the 5-HT_{5A} (50-fold). The high pA₂, pK_B and pK_I values found for SB-269970 as an antagonist of 5-CT-mediated stimulation of IL-6 mRNA expression and IL-6 release in H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells point to a 5-HT₇ receptor-mediated effect.

This is the first demonstration that 5-HT₇ receptor stimulation can trigger the release of a cytokine. Although 5-HT₇ receptors have been linked to the production of some hormones like luteinizing hormone-releasing hormone (Héry et al., 1997), aldosterone (Contesse et al., 1999) and progesterone (Graveleau et al., 2000), there was no evidence so far to suggest that they could be involved in the release of cytokines. We recently reported that 5-HT₇ receptors are present and functionally coupled to cAMP accumulation in a series of human glioblastoma and neuroglioma cell lines, including H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells (Mahé et al., 2004). The present findings are in agreement with the known role of cAMP as a second messenger activating IL-6 gene expression in rat astrocytes and human glioblastoma (Benveniste et al., 1995; Kiriya et al., 1997).

Another second messenger possibly used for the activation of IL-6 synthesis in astrocytes is intracellular [Ca²⁺], regulating the activation of PKC and synergizing with the cAMP pathway (Benveniste et al., 1995). 5-HT₇ receptor activation has been shown to increase intracellular [Ca²⁺], either in a recombinant system (Baker et al., 1998) or in a native

environment (Lenglet et al., 2002). However, we found no increase in intracellular $[Ca^{2+}]$ in H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells upon stimulation by 5-HT₇ receptor agonists. 5-HT₇ receptor-mediated activation of IL-6 gene expression in these cells is therefore unlikely to be ascribed to Ca^{2+} -dependent events and the main signaling pathway probably goes through cAMP.

Cellular changes induced by cAMP are generally mediated by PKA. In few instances only, cAMP-dependent processes have been reported that do not require PKA but rather cAMP-activated guanine-nucleotide exchange factors (Kawasaki et al., 1998; de Rooij et al., 1998). The fact that 5-CT-induced stimulation of IL-6 expression was reduced by the PKA inhibitors, Rp-8-CPT-cAMPS and Rp-8-Br-cAMPS in H4, U-373 MG and DBTRG05-MG cells indicates that PKA plays a role in 5-HT₇ receptor-mediated induction of IL-6 expression in these cells. This is congruent with previous data on PKA-dependent IL-6 release in astrocytes or glioblastoma (Grimaldi et al., 1994; Kiriya et al., 1997). Some other 5-HT₇ receptor-mediated effects are also markedly sensitive to PKA inhibitors (Goaillard and Vincent, 2002; Lenglet et al., 2002; Norum et al., 2003). The inhibitory effect of Rp-8-CPT-cAMPS and Rp-8-Br-cAMPS was particularly evident in U-373 MG cells. In H4 and DBTRG05-MG cells, however, a significant part of 5-CT-induced effect appeared to be resistant to PKA inhibition. It might be that a cAMP-dependent, PKA-independent pathway is also utilized in these cells for 5-HT₇ receptor-mediated IL-6 expression.

PKA-mediated effects on extracellular-regulated kinases 1/2 (also known as p44/42 MAPK) are cell specific. PKA inhibits p44/42 MAPK activation in several cell types (Cook and McCormick, 1993; Wu et al., 1993), but appears to activate this pathway in other cell types (Vossler et al., 1997). Coupling of native and recombinant 5-HT₇ receptors to activation of the p44/42 MAPK has been reported, via both PKA-dependent or -independent pathways (Errico *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003; Norum *et al.*, 2003). We found however no evidence for such a process in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells, as the inhibitor of p44/p42

MAPK activation, PD 98,059 (Alessi et al., 1995) did not attenuate 5-CT-induced stimulation of IL-6 expression in these cells. Along these lines, it is pertinent to notice that PKA-dependent IL-6 release is also resistant to PD 98,059 in murine macrophages (Chio et al., 2004).

A signaling cascade abundantly reported to be activated by PKA is the p38 MAPK pathway. This has been described in cells as diverse as human SK-N-MC neuroblastoma cells (Zhen et al., 1998), rat ovarian granulosa cells (Maizels et al., 1998), mouse cardiomyocytes (Zheng et al., 2000), mouse 3T3-L1 adipocytes (Mizuno et al., 2002), rat PC12 pheochromocytoma cells (Hansen et al., 2000), murine macrophages (Chio et al., 2004), as well as Chinese hamster ovary cells expressing the adenosine A_{2B} receptor (Schulte and Fredholm, 2003). In line with these data, we found that the p38 MAPK inhibitor, SB-202190 (Lee and Young, 1996) attenuated 5-CT-induced IL-6 mRNA expression in H4 and U-373 MG cells and abolished this effect in DBTRG-05MG cells. These results suggest that the p38 MAPK pathway is involved in 5-HT₇ receptor-mediated IL-6 expression, particularly in DBTRG-05MG cells. The p38 MAPK has been recognized as an important signaling pathway in inflammatory processes, such as induction of proinflammatory cytokines (for reviews, see Ono and Han, 2000; Kumar et al., 2003). Thus, it is no surprise that the stimulation of IL-6 expression/release by activation of 5-HT₇ receptors in human glioblastoma and neuroglioma cells involves this pathway.

In conclusion, we showed for the first time in the present study that 5-HT₇ receptor activation leads to stimulation of IL-6 expression/release in human glioblastoma and neuroglioma cells. This process involves PKA (at least in U-373 MG cells) and the p38 MAPK signaling pathway (at least in DBTRG-05MG cells), but not p44/p42 MAPK. These results might be of therapeutic relevance in the field of inflammation and also in cancer, because IL-6 can act as an autocrine growth factor in glioblastoma (Goswami et al., 1998).

Acknowledgements. The authors are indebted to Dr. Daniel Hoyer (Novartis Pharma, NIBR Basel, Switzerland) and to Dr. Bernard Bucher (CNRS UMR 7034, France) for helpful discussions and carefully reading the manuscript.

References

- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT and Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**:27489-27494.
- Arunlakshana O and Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* **14**:48-58.
- Bacon WL and Beck SG (2000) 5-Hydroxytryptamine₇ receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:672-679.
- Baker LP, Nielsen MD, Impey S, Metcalf MA, Poser SW, Chan G, Obrietan K, Hamblin MW and Storm DR (1998) Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the G_s-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT_{7A} receptor. *J Biol Chem* **273**:17469-17476.
- Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA and Weinshank RL (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* **268**:23422-23426.
- Belenky MA and Pickard GE (2001) Subcellular distribution of 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Compar Neurol* **432**:371-388.

Bhalla P, Saxena PR and Sharma HS (2002) Molecular cloning and tissue distribution of mRNA encoding porcine 5-HT₇ receptor and its comparison with the structure of other species. *Mol Cell Biochem* **238**:81-88.

Benveniste EN, Huneycutt BS, Shrikant P and Ballestas ME (1995) Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav Immun* **9**:304-314.

Chapin EM and Andrade R (2001) A 5-HT₇ receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. I. Pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **297**:395-402.

Cheng YC and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.

Chio CC, Chang YH, Hsu YW, Chi KH and Lin WW (2004) PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP. *Cell Signal* **16**:565-575.

Cohen Z, Bouchelet I, Olivier A, Villemure JG, Ball R, Stanimirovic DB and Hamel E (1999) Multiple microvascular and astroglial 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human brain: molecular and pharmacologic characterization. *J Cerebr Blood Flow Metabol* **19**:908-917.

Contesse V, Lenglet S, Grumolato L, Anouar Y, Lihmann I, Lefebvre H, Delarue C and Vaudry H (1999) Pharmacological and molecular characterization of 5-hydroxytryptamine₇ receptors in the rat adrenal gland. *Mol Pharmacol* **56**:55-561.

Cook SJ and McCormick F (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science (Wash DC)* **262**:1069-1072.

Eglen RM, Jasper JR, Chang DJ and Martin GR (1997) The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends Pharmacol Sci* **18**:104-107.

Errico M, Crozier RA, Plummer MR and Cowen DS (2001) 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **102**:361-367.

Fiebich BL, Biber K, Gyufko K, Berger M, Bauer J and van Calker D (1996) Adenosine A_{2b} receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J Neurochem* **66**:1426-1431.

Fiebich BL, Hüll M, Lieb K, Gyufko K, Berger M and Bauer J (1997) Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J Neurochem* **68**:704-709.

Furchgott RF (1972) The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory, in *Catecholamines* (Blaschko H and Muscholl E eds) pp 283-335, Springer Verlag, Berlin.

Gill HC, Soffin EM, Hagan JJ and Davies CH (2002) 5-HT₇ receptors modulate synchronized network activity in rat hippocampus. *Neuropharmacology* **42**:82-92.

Gjertsen BT, Mellgren G, Otten A, Maronde E, Genieser HG, Jastorff B, Vintermyr OK, McKnight GS and Døskeland SO (1995) Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. *J Biol Chem* **270**:20599-20607.

Goaillard JM and Vincent P (2002) Serotonin suppresses the slow afterhyperpolarization in rat intralaminar and midline neurones by activating 5-HT₇ receptors. *J Physiol* **541**:453-465.

Goswami S, Gupta A and Sharma SK (1998) Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* **71**:1837-1845.

Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D and Mukhopadhyay AK (2000) Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:1277-1286.

Grimaldi M, Pozzoli M, Navarra P, Preziosi P and Schettini G (1994) Vasoactive intestinal peptide and forskolin stimulate interleukin-6 production by rat cortical astrocytes in culture via a cyclic AMP-dependent, prostaglandin-independent mechanism. *J Neurochem* **63**:344-350.

Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, Smith MI, Upton N, Medhurst AD, Middlemiss DN, Riley GJ, Lovell PJ, Bromidge SM and Thomas DR (2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **130**:539-548.

Hansen TVO, Rehfeld JF and Nielsen FC (2000) Cyclic AMP-induced neuronal differentiation via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* **75**:1870-1877.

Heidmann DEA, Metcalf MA, Kohen R and Hamblin MW (1997) Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* **68**:1372-1381.

Héry M, François-Bellan AM, Héry F, Deprez P and Becquet D (1997) Serotonin directly stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from GT-1 cells via 5-HT₇ receptors. *Endocrine* **7**:261-265.

Hirst WD, Price GW, Rattray M and Wilkin GP (1997) Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* **120**:509-515.

Hoyer D, Hannon JP and Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**:533-544.

Huneycutt B.S. and Benveniste EN (1995) Regulation of astrocyte cell biology by the cAMP/protein kinase A signaling pathway. *Adv Neuroimmunol* **5**:261-269.

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science (Wash DC)* **282**:2275-2279.

Kiriyama Y, Murayama T, Tokumitsu Y and Nomura Y (1997) Protein kinase A-dependent IL-6 production induced by calcitonin in human glioblastoma A172 cells. *J Neuroimmunol* **76**:139-144.

Krobert AK, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM and Levy FO (2001) The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363**:620-632.

Kumar S, Boehm J and Lee JC (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2**:717-726.

Lee JC and Young PR (1996) Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukocyte Biol* **59**:152-157.

Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H and Contesse V (2002) Activation of 5-HT₇ receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology* **143**:1748-1760.

Lin SL, Johnson-Farley NN, Lubinsky DR and Cowen DS (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.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**:402-408.

Lovell PJ, Bromidge SM, Dabbs S, Duckworth DM, Forbes IT, Jennings AJ, King FD, Middlemiss DN, Rahman SK, Saunders DV, Collin LL, Hagan JJ, Riley GJ and Thomas DR (2000) A novel, potent, and selective 5-HT₇ antagonist: (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol (SB-269970). *J Med Chem* **43**:342-345.

Lovenberg TW, Baron BM, De Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea M.A., Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Danielson PE, Sutcliffe JG and Erlander MG (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* **11**:449-458.

Mahé C, Bernhard M, Bobirnac I, Keser C, Loetscher E, Feuerbach D, Dev KK and Schoeffter P (2004) Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cells. *Br J Pharmacol* **143**:404-410.

Maizels ET, Cottom J, Jones JCR and Hunzicker-Dunn M (1998) Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **139**:3353-3356.

Meyerhof W, Obermüller F, Fehr S and Richter D (1993) A novel rat serotonin receptor: primary structure, pharmacology, and expression pattern in distinct brain regions. *DNA Cell Biol* **12**:401-409.

Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y, Nishio M and Watanabe Y (2002) Stimulation of β_3 -adrenoceptors causes phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase via a

stimulatory G protein-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Br J Pharmacol* **135**:951-960.

Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM and Brownfield M (2001) Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanatomy* **21**:63-73.

Norum JH, Hart K and Levy FO (2003) Ras-dependent ERK activation by the human G_s-coupled serotonin receptors 5-HT_{4(b)} and 5-HT_{7(a)}. *J Biol Chem* **278**:3098-3104.

Ono K and Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**:1-13.

Plassat JL, Amlaiki N and Hen R (1993) Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* **44**:229-236.

de Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A and Bos JL (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature (Lond)* **396**:474-477.

Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM and Schwartz JC (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8547-8551.

Schoeffter P, Ullmer C, Bobirnac I, Gabbiani G and Lübbert H (1996) Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **117**:993-994.

Schulte G and Fredholm BB (2003) The G_S-coupled adenosine A_{2B} receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. *Exp Cell Res* **290**:168-176.

Shen Y, Monsma FJJr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW and Sibley DR (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem* **268**:18200-18204.

Shimizu M, Nishida A, Zensho H and Yamawaki S (1996) Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine₇ receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **279**:1551-1558.

Thomas DR, Gittins SA, Collin, LL, Middlemiss DN, Riley G, Hagan J, Gloger I, Ellis CE, Forbes IT and Brown AM (1998) Functional characterisation of the human cloned 5-HT₇ receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. *Br J Pharmacol* **124**:1300-1306.

Thomas DR and Hagan JJ (2004) 5-HT₇ receptors. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders* **3**:81-90.

To ZP, Bonhaus DW, Eglen RM and Jakeman LB (1995) Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* **115**:107-116.

Tsou AP, Kosaka A, Bach C, Zuppan P, Yee C, Tom L, Alvarez R, Ramsey S, Bonhaus DW, Stefanich E, Jakeman L, Eglen RM and Chan HW (1994) Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase. *J Neurochem* **63**:456-464.

Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJS (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**:73-82.

Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ and Sturgill TW (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science (Wash DC)* **262**:1065-1069.

Ying SW and Rusak B (1997) 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* **755**:246-254.

Zhen X, Uryu K, Wang HY and Friedman E (1998) D₁ dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* **54**:453-458.

Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka BK and Xiao RP (2000) β_2 -adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than G_i or G $\beta\gamma$ in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem* **275**:40635-40640.

Footnotes

Part of this work has been presented as a Poster Communication at the 4th European Congress of Pharmacology, Porto, Portugal, 14-17 July 2004.

Send reprint requests to: Philippe Schoeffter, Ph.D., Neuroscience Research, Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG, WSJ-386.7.44, CH-4002 Basel, Switzerland.

E-mail: philippe.schoeffter@pharma.novartis.com

¹Neuroscience Research and ²Discovery Technologies, Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG, WSJ-386.7.44, CH-4002 Basel, Switzerland

Legends for Figures

Fig. 1. Time course of 5-CT- and forskolin-stimulated IL-6 mRNA expression in H4 cells. Cells were incubated with 5-CT (1 μ M) or forskolin (FSK; 10 μ M) for the indicated periods of time. IL-6 mRNA expression was measured by Real-Time PCR analysis and expressed as fold increase over untreated cells (basal). Points represent the mean \pm S.E. of 2 independent experiments, each run in triplicate.

Fig. 2. Concentration-response curves of 5-CT in the absence and in the presence of SB-269970 (10 nM, 0.1 μ M or 1 μ M) for stimulation of IL-6 mRNA expression in H4 (A), U-373 MG (B) and DBTRG-05MG cells (C). Cells were treated with the indicated concentrations of 5-CT for 1 h in the absence and in the presence of SB-269970 added just before 5-CT. IL-6 mRNA expression was measured by Real-Time PCR analysis and normalized to the effect of 5-CT (10 μ M) in control curves. Points represent the mean \pm S.E. of 3 independent experiments, each run in triplicate.

Fig. 3. Concentration-response curves of 5-CT for stimulation of IL-6 release from H4 (A), U-373 MG (B) and DBTRG-05MG cells (C). Cells were treated with 5-CT (1 nM- 10 μ M) for 24 h and IL-6 levels were measured in cell supernatants using an immunoassay kit. Points represent the mean \pm S.E. of 3-4 independent experiments, each run in duplicate. Circles represent the basal levels of IL-6.

Fig. 4. Concentration-response curves of SB-269970 for inhibition of 5-CT-induced IL-6 release from H4 (A), U-373 MG (B) and DBTRG-05MG cells (C). Cells were treated with SB-269970 (0.1 nM-1 μ M), added 30 min prior to 5-CT (1 μ M) and then with both drugs for

24 h. IL-6 levels were measured in cell supernatants using an immunoassay kit. Points represent the mean \pm S.E. of 3 independent experiments (with the exception of n=2 for DBTRG-05MG cells), each run in duplicate. Squares represent the IL-6 levels stimulated by 5-CT alone.

Fig. 5. Effect of Rp-8-CPT-cAMPS and Rp-8-Br-cAMPS on 5-CT-stimulated IL-6 mRNA expression in H4 (A), U-373 MG (B) and DBTRG-05MG cells (C). Cells were treated with 5-CT (1 μ M) for 1 h in the absence or in the presence of Rp-8-CPT-cAMPS or Rp-8-Br-cAMPS (each 0.1 mM), added 15 min prior to 5-CT. IL-6 mRNA expression was measured by Real-Time PCR analysis and normalized to the effect of 5-CT alone. Bars represent the mean \pm S.E. of 3 independent experiments, each run in triplicate. * p<0.05 versus 5-CT alone.

Fig. 6. Effect of PD 98,059 on 5-CT-stimulated IL-6 mRNA expression in H4 (A), U-373 MG (B) and DBTRG-05MG cells (C). Cells were treated with 5-CT (1 μ M) for 1 h in the absence or in the presence of PD 98,059 (50 μ M), added 15 min prior to 5-CT. IL-6 mRNA expression was measured by Real-Time PCR analysis and normalized to the effect of 5-CT alone. Bars represent the mean \pm S.E. of 3 or 4 independent experiments, each run in triplicate.

Fig. 7. Effect of SB-202190 on 5-CT-stimulated IL-6 mRNA expression in H4 (A), U-373 MG (B) and DBTRG-05MG cells (C). Cells were treated with 5-CT (1 μ M) for 1 h in the absence or in the presence of SB-202190 (10 μ M), added 15 min prior to 5-CT. IL-6 mRNA expression was measured by Real-Time PCR analysis and normalized to the effect of 5-CT alone. Bars represent the mean \pm S.E. of 3 independent experiments, each run in triplicate. ** p<0.01 versus 5-CT alone.

Table 1. Pharmacological parameters of 5-HT₇ receptor agonist and antagonist action on IL-6 mRNA expression in H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells.

Given are maximal effects (E_{\max} ; expressed as fold increase over basal) and pEC_{50} values for 5-CT-induced stimulation of IL-6 mRNA expression and pK_B or pA_2 values (calculated as described under *Materials and Methods*) for SB-269970-induced antagonism of 5-CT. IL-6 mRNA expression was measured by Real-Time PCR analysis after 1 h incubation. Values are mean \pm S.E. of 3-4 individual experiments, corresponding to data from Fig. 2.

Cells	E_{\max} (5-CT)	pEC_{50}	pK_B	pA_2
	fold over basal	5-CT	SB-269970	SB-269970
H4	14.8 \pm 1.7	7.97 \pm 0.05	9.26 \pm 0.04	9.30 \pm 0.22
U-373 MG	7.1 \pm 2.4	7.88 \pm 0.15	9.46 \pm 0.23	/
DBTRG-05MG	12.5 \pm 1.9	8.13 \pm 0.11	9.44 \pm 0.13	/

Table 2. Pharmacological parameters of 5-HT₇ receptor agonist and antagonist action on IL-6 release from H4, U-373 MG and DBTRG-05MG cells.

Given are maximal effects (E_{\max} ; expressed as fold increase over basal) and pEC_{50} values for 5-CT-induced stimulation of IL-6 release and pK_I values derived from IC_{50} values (as described under *Materials and Methods*) for SB-269970-induced inhibition of 5-CT (1 μ M)-stimulated effect after 24 h incubation. Values are means \pm S.E. of 3-4 individual experiments (with the exception of n=2 for pK_I values in DBTRG-05MG cells), corresponding to data from Fig. 3 and 4.

Cells	E_{\max} (5-CT) fold over basal	pEC_{50} 5-CT	pK_I SB-269970
H4	5.7 \pm 1.2	7.88 \pm 0.17	9.14 \pm 0.07
U-373 MG	2.6 \pm 0.2	7.90 \pm 0.20	9.37 \pm 0.14
DBTRG-05MG	2.4 \pm 0.1	8.15 \pm 0.33	8.99 (8.43; 9.55)

Figure 1

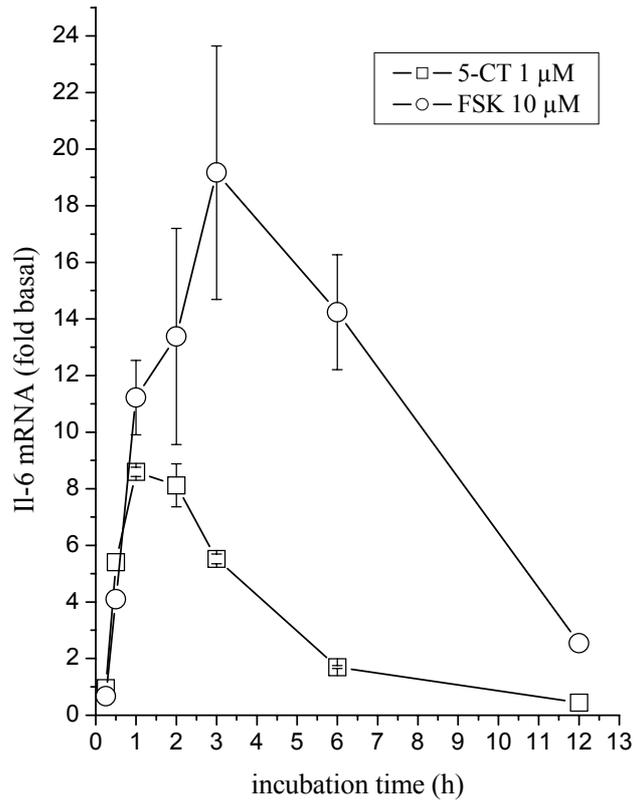


Figure 2

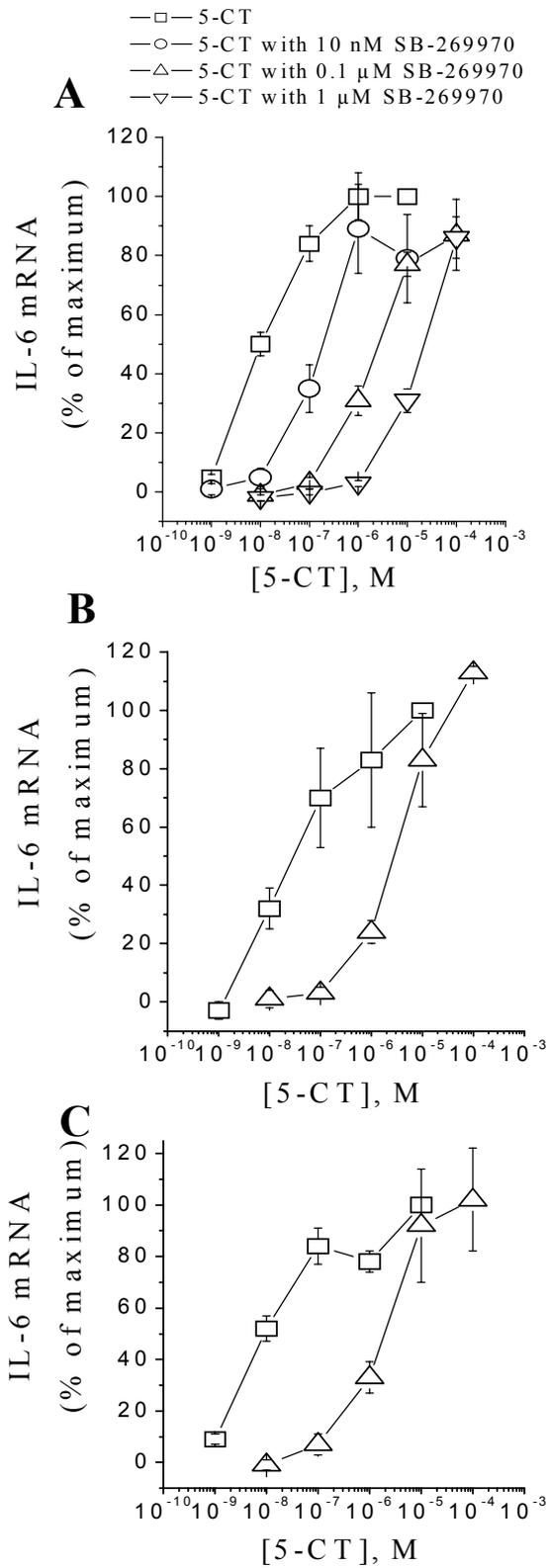


Figure 3

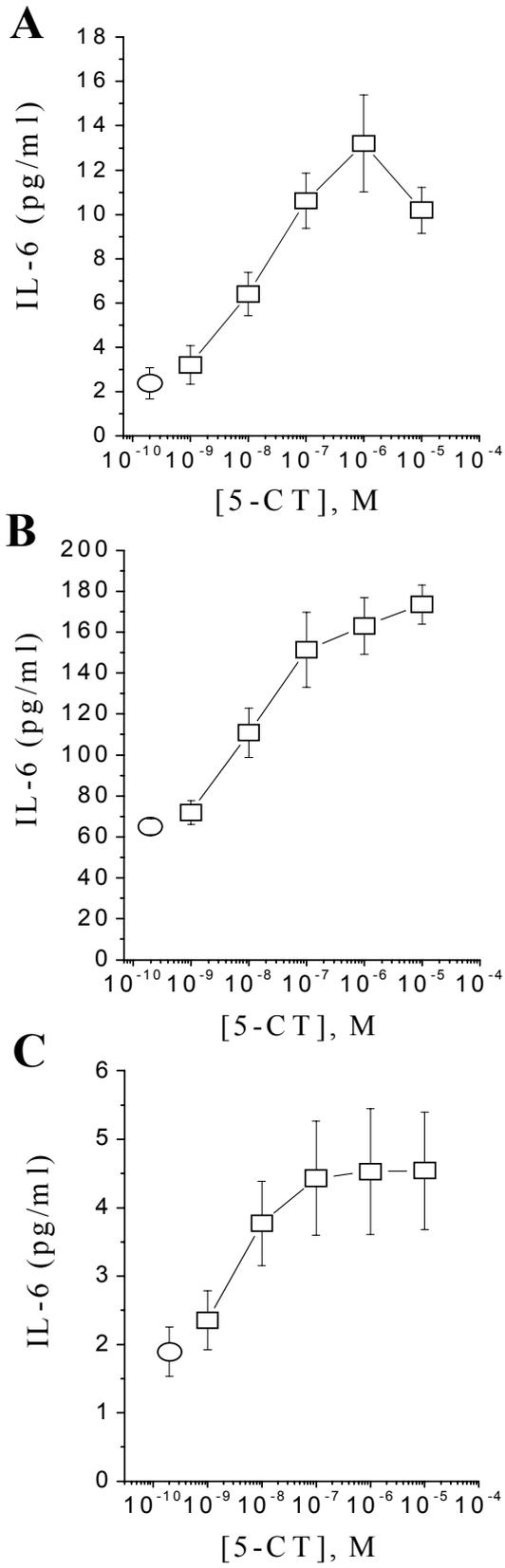


Figure 4

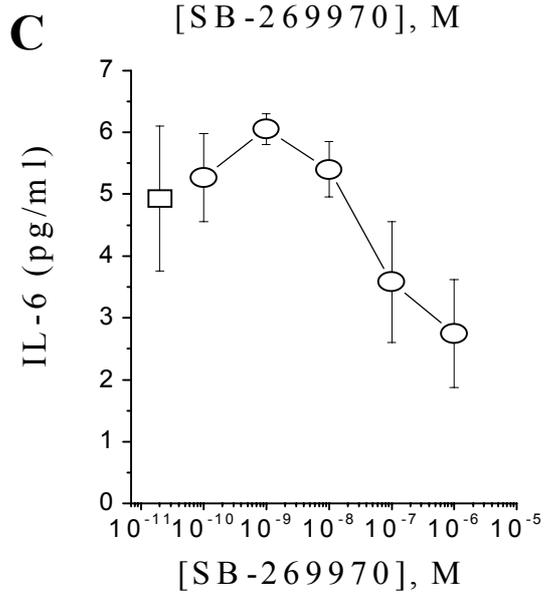
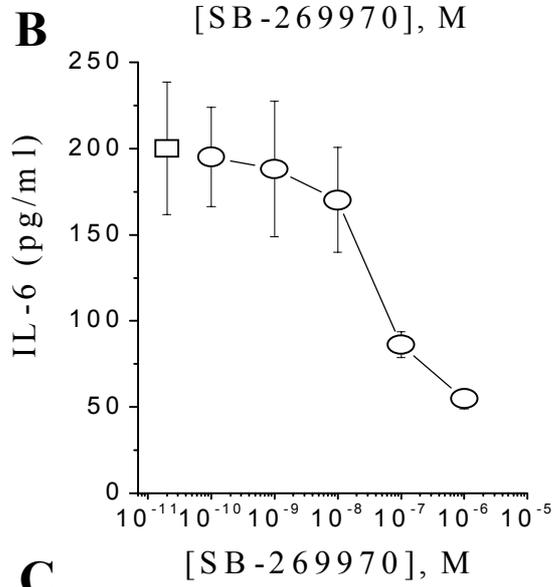
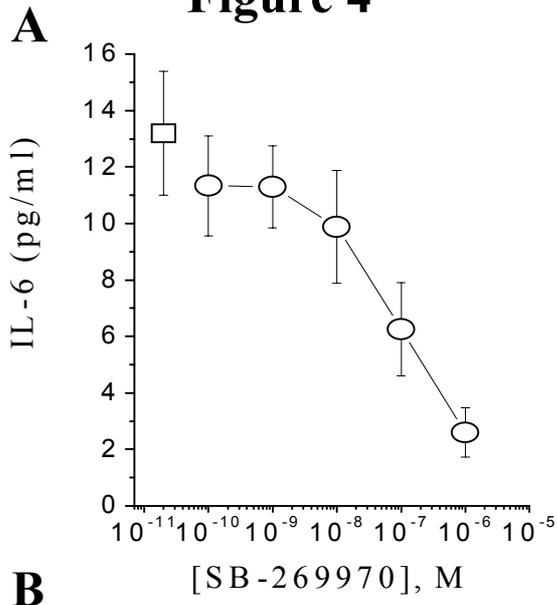
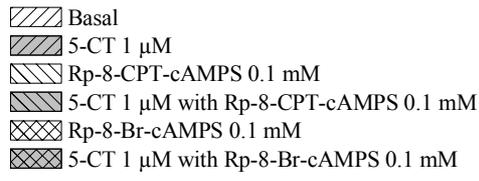
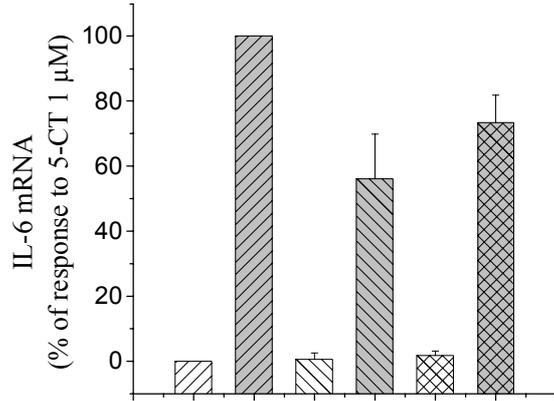


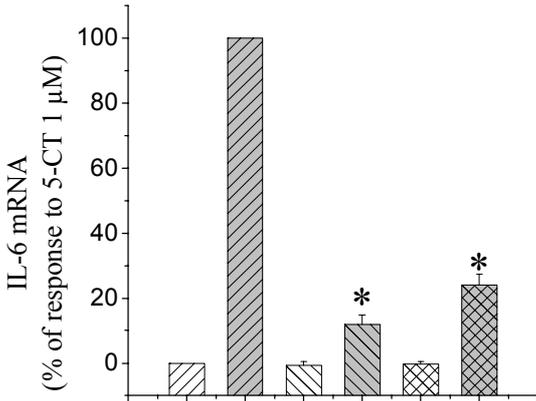
Figure 5



A



B



C

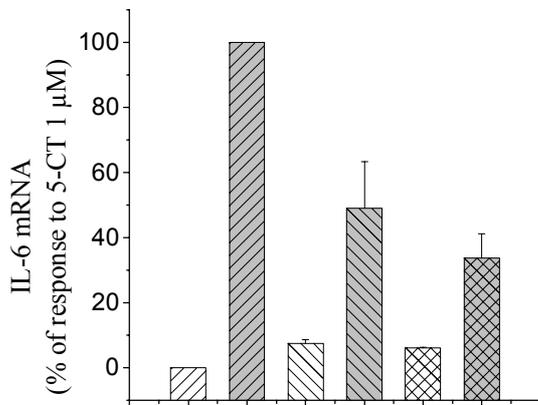


Figure 6

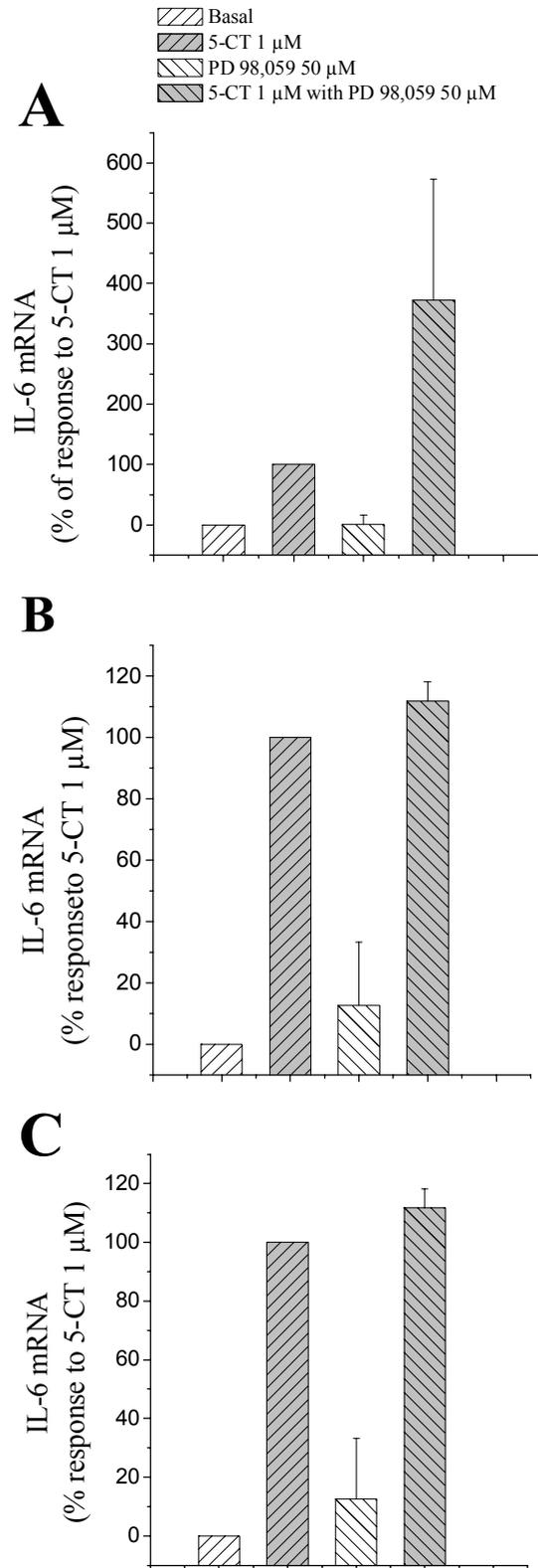
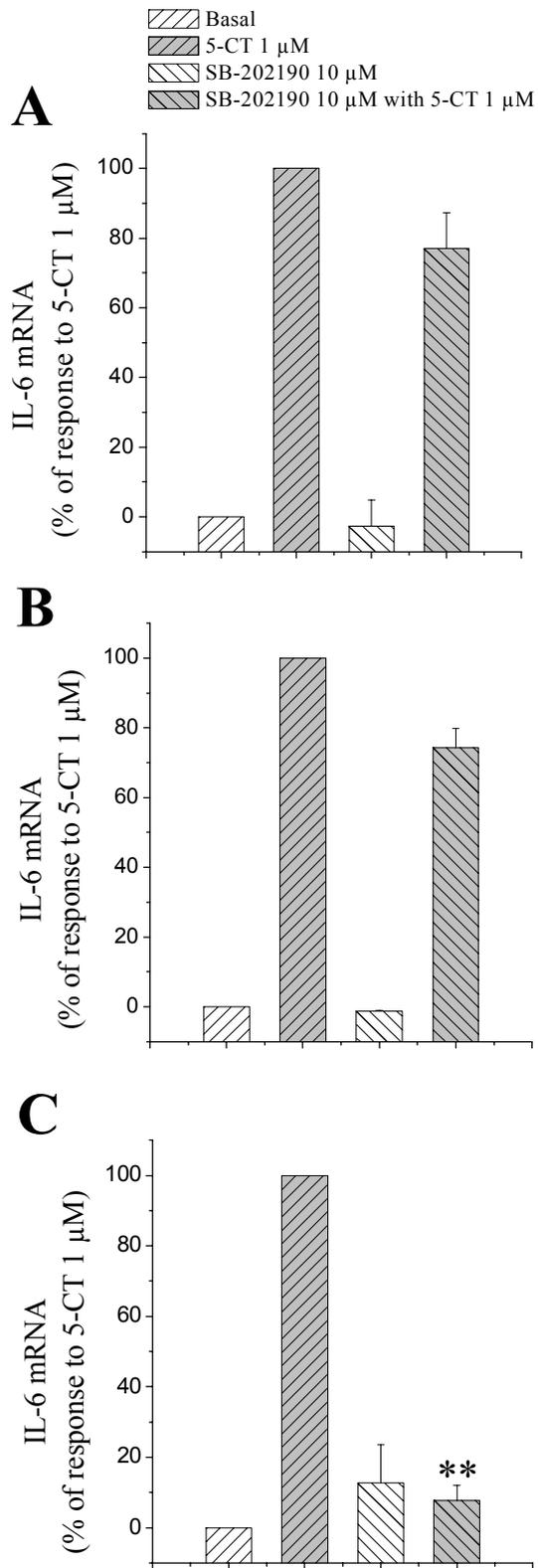


Figure 7



Résumé et discussion complémentaire des publications 1 et 2

1. Etude de l'expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans des glioblastomes humains (publication n°1).

Le but de ce travail est de trouver un modèle d'étude pour caractériser le rôle du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes.

Nous avons choisi de travailler avec des lignées de glioblastomes humains car ce sont des cellules facilement cultivables et propageables par rapport à des cultures primaires d'astrocytes de rat ou humains. Ces cellules, si elles expriment le récepteur 5-HT₇, constitueraient des modèles d'études de la fonction de ces récepteurs dans les astrocytes, comme le sont par exemple les glioma C₆ de rat pour le récepteur 5-HT_{2A} (Elliott *et al.*, 1995).

Dans un premier temps, nous avons montré la présence, dans huit lignées de glioblastomes humains (U-373 MG, U-138 MG, U-87 MG, DBTRG-05MG, T98G, H4, CCF-STTG1 et Hs 683), du récepteur 5-HT₇, par des études fonctionnelles de mesure de l'accumulation de l'AMPC après stimulation par divers agonistes: la sérotonine, la 5-carboxyamidotryptamine (5-CT), la 5-méthoxytryptamine et la 8-OH-DPAT. Le profil pharmacologique obtenu est caractéristique du récepteur 5-HT₇ (5-CT > 5-HT = 5-méthoxytryptamine >> 8-OH-DPAT). De plus, le composé sélectif SB-269970 (Lovell *et al.*, 2000) se comporte comme un antagoniste compétitif de la 5-CT, avec un pA₂ voisin de 9, ce qui confirme que l'effet agoniste est bien de type 5-HT₇.

Dans une seconde partie, nous avons confirmé l'expression de ce récepteur au niveau protéique par Western-blot dans toutes les lignées de glioblastomes. Au niveau transcriptionnel, la présence des trois sous-types du récepteur (a, b et d) a été montrée par RT-PCR.

Ainsi, les lignées de glioblastomes humains testées expriment de façon fonctionnelle le récepteur 5-HT₇ et peuvent constituer des modèles d'étude de ce récepteur dans les astrocytes.

2. Etude de l'effet de l'activation du récepteur 5-HT₇ sur l'expression et la sécrétion de l'IL-6 dans les lignées de glioblastomes humains (publication n°2).

Le but de ce travail est de déterminer si le récepteur 5-HT₇ est capable de moduler l'expression et la libération de l'IL-6 dans les glioblastomes humains comme modèles d'astrocytes. Plusieurs récepteurs couplés à Gs et à la stimulation d'AMPc sont en effet responsables d'une augmentation de l'expression et de la libération de cette cytokine dans les astrocytes en culture primaire et dans les glioblastomes.

Parmi les différentes lignées de glioblastomes humains, nous en avons choisi trois dont le niveau de stimulation de l'adénylate cyclase induite par la 5-HT et la 5-CT est le plus élevé. Il s'agit des cellules H4, U-373 MG et DBTRG-05MG.

Nous avons tout d'abord montré qu'un traitement d'1 h par la 5-CT entraîne une augmentation concentration-dépendante de l'expression de l'ARNm d'IL-6 mesurée par des expériences de TaqMan ('PCR en temps réel') dans ces 3 lignées cellulaires. L'ajout de SB-269970 inhibe l'effet stimulant de la 5-CT sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6. Les valeurs de pEC₅₀ de la 5-CT et de pK_B du SB-269970 sont en accord avec un effet sur le récepteur 5-HT₇. Ensuite, nous avons confirmé que l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 était suivie d'une sécrétion accrue de celle-ci. En effet, à l'aide d'un ELISA spécifique, nous avons montré qu'un traitement de 24 h avec la 5-CT augmente le contenu en IL-6 dans le surnageant de culture de ces 3 lignées cellulaires. L'ajout de SB-269970 induit une inhibition de façon concentration-dépendante de l'effet de la 5-CT sur la libération de l'IL-6 par ces cellules. A nouveau, les valeurs de pEC₅₀ de la 5-CT et pK_i du SB-269970 sont en accord avec un effet sur le récepteur 5-HT₇ et sont identiques à celles déterminées sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6. Ainsi, le récepteur 5-HT₇ augmente la synthèse et la sécrétion de l'IL-6 dans des cellules de glioblastomes humaines.

Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans l'effet de la 5-CT sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6 après activation du récepteur 5-HT₇. Seul, l'AMPc semble être impliqué dans l'effet de la 5-CT sur la modulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6. En effet, nous n'obtenons aucune augmentation du calcium intracellulaire après stimulation par la 5-CT. Par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PKA (Rp-8-CPT-cAMPS et Rp-8-Br-cAMPS à 100 µM), de la MAPK p44/p42 (PD-98059 à 50 µM) et de la MAPK p38 (SB-202190 à 10 µM), nous avons montré que cet effet passerait par l'activation de la PKA (au moins dans le cas des cellules U-373MG) et de la MAPK p38 (au moins dans les cellules DBTRG-05MG).

Expériences complémentaires:

Nous avons également testé l'effet d'un traitement d'1 h avec la 5-CT (1 μ M) seule ou en présence de SB-269970 (1 μ M) sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans les autres lignées cellulaires. Nous avons trouvé que la 5-CT (1 μ M) stimule l'expression basale de l'IL-6 dans ces lignées sauf dans les CCF-STTG₁ et les Hs 683, et que cette stimulation est presque totalement inhibée par le composé SB-269970 (1 μ M). Les valeurs de stimulation de l'expression basale de l'ARNm de l'IL-6 sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Effet de 5-CT (1 μ M) seule ou en présence de SB-269970 (1 μ M) sur l'expression basale de l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules T98G, U-138 MG, U-87 MG, CCF-STTG₁ et Hs 683. Les valeurs sont exprimées en nombre de fois de l'expression basale de l'ARNm de l'IL-6 déterminée par analyse TaqMan. Les variations standard sont calculées à partir de triplicats d'une même expérience.

Lignée cellulaire	5-CT (1 μ M)	5-CT (1 μ M) et SB-269970 (1 μ M)
T98G	5.17 \pm 0.08	1.28 \pm 0.08
U-138 MG	2.97 \pm 0.11	0.89 \pm 0.06
U-87 MG	2.11 \pm 0.09	1.60 \pm 0.11
CCF-STTG ₁	1.09 \pm 0.14	0.61 \pm 0.12
Hs 683	0.99 \pm 0.08	1.07 \pm 0.13

Dans le cas des cellules CCF-STTG₁ et Hs 683, le niveau d'expression du récepteur 5-HT₇ est probablement trop faible pour entraîner une augmentation détectable de l'expression basale de l'ARNm de l'IL-6 par la 5-CT. En effet, c'est dans ces 2 lignées cellulaires que les niveaux de stimulation de l'accumulation basale de l'AMPc par la 5-CT sont les plus faibles (voir publication n°1).

Ainsi, l'activation du récepteur 5-HT₇ entraîne une augmentation de la synthèse et de la libération de l'IL-6 dans un certain nombre de glioblastomes humains. Cette augmentation dépend du niveau d'expression et de fonctionnalité de ce récepteur. Nous avons ensuite décidé d'étendre ces résultats sur un autre type de cellules gliales : les microglies.

Chapitre II :

Implication du récepteur 5-HT₇ dans l'expression de l'IL-6 dans une lignée microgliale humaine (MC-3).

Publication n°3 :

Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells. (accepté pour publication dans Neuropharmacology).

(Le récepteur sérotoninergique 5-HT₇ couplé à l'induction de l'interleukine-6 dans les cellules microgliales humaines MC-3).

**Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human
microglial MC-3 cells**

Cécile Mahé, Erika Loetscher, Kumlesh K. Dev, Ionel Bobirnac, Uwe Otten¹ & Philippe Schoeffter*

Neuroscience Research, Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG,
WSJ-386.7.44, CH-4002 Basel and ¹Department of Physiology, Vesalgasse 1, CH-4051
Basel, Switzerland

***Author for correspondence; E-mail: philippe.schoeffter@pharma.novartis.com, Phone:
+41 61 324 92 61, Fax: +41 61 324 47 87**

Summary

Brain serotonin 5-HT₇ receptors are known to be expressed in neurons and astrocytes. We now report the presence of these receptors in a third type of cell, microglial cells. 5-Hydroxytryptamine (5-HT), 5-carboxamidotryptamine (5-CT), 5-methoxytryptamine (5-MeOT) and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) induced concentration-dependent stimulations of cAMP accumulation in the human microglial MC-3 cell line. The maximal effect of 5-HT was 3.4 ± 0.3 -fold stimulation (mean \pm S.E.M., n=5) above basal levels. The rank order of agonist potency (pEC₅₀ values) was 5-CT (7.09) > 5-HT (6.13) \geq 5-MeOT (5.78) \gg 8-OH-DPAT (ca. 5). The effect of 5-CT was inhibited in a concentration-dependent manner by the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 (pA₂ value 9.03). Western blot analysis revealed the presence of immunoreactive bands corresponding to the human 5-HT₇ receptor in extracts of MC-3 cells. The presence of two splice variants of the 5-HT₇ receptor (5-HT_{7(a/b)}) was visualized by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis with specific primers. In Real-Time PCR studies, the mRNA for interleukin-6 (IL-6) was found to be increased by 2.5-fold in MC-3 cells after 1 h incubation with 5-CT (1 μ M) and this effect was fully blocked by the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 (1 μ M). These data show that functional 5-HT₇ receptors are present in human microglial MC-3 cells and may be involved in IL-6-linked neuroinflammatory processes.

Keywords: 5-HT₇ receptor; human microglial cells; SB-269970; interleukin-6

Abbreviations: 5-HT, 5-hydroxytryptamine, serotonin; 5-CT, 5-carboxamidotryptamine; 5-MeOT, 5-methoxytryptamine; 8-OH-DPAT, 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin; CHO, Chinese hamster ovary; IL-6, interleukin-6; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SB-269970, (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol

1. Introduction

Receptors for serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) are classified into seven major classes (5-HT₁₋₇), based on structural, functional and pharmacological criteria (Hoyer et al., 1994). The 5-HT₇ receptor, cloned from mouse (Plassat et al., 1993), rat (Lovenberg et al., 1993; Meyerhof et al., 1993; Ruat et al., 1993; Shen et al., 1993), guinea-pig (Tsou et al., 1994) and human (Bard et al., 1993), is positively coupled to adenylyl cyclase and cAMP accumulation through the stimulatory G_s protein and displays a unique pharmacological profile which is consistent across species. Sequence alignment shows a high degree of interspecies homology (95%) but a low overall homology (< 40%) with other 5-HT receptors. A number of splice variants of both the human (5-HT_{7(a/b/d)}) and rat (5-HT_{7(a/b/c)}) receptors have been identified. They display similar pharmacological and functional characteristics, when expressed in cell lines, and a similar tissue distribution (Jasper et al., 1997; Heidmann et al., 1997; Krobert et al., 2001). The most abundant isoform (5-HT_{7(a)}) consists of a 445-amino acid polypeptide with a relatively short third intracellular loop and a long carboxy terminus.

The 5-HT₇ receptor mRNA has been found in the brain, where it is located in the thalamus, hypothalamus and various limbic and cortical regions in rat (Lovenberg et al., 1993; Ruat et al., 1993; Shen et al., 1993), guinea-pig (To et al., 1995) and man (Bard et al., 1993; Hagan et al., 2000), as well as in smooth muscles from cardiovascular and gastrointestinal tissues (Bard et al., 1993; Schoeffter et al., 1996; Hagan et al., 2000). Receptor distribution and pharmacological studies have suggested that 5-HT₇ receptors may play a role in the control of circadian rhythms (Lovenberg et al., 1993; Ying & Rusak, 1997) and smooth muscle tone (Eglen et al., 1997). As far as the nervous system is concerned, selective 5-HT₇ receptor ligands may have potential therapeutic applications in sleep disorders, depression, migraine and pain (for a review, see Thomas and Hagan, 2004).

In the brain, 5-HT₇ receptors are expressed in neurons, as evidenced by means of electrophysiological techniques in slices of rat hippocampus (Bacon and Beck, 2000; Gill et al., 2002) and rat thalamus (Chapin and Andrade, 2001; Goillard and Vincent, 2002). Additionally, 5-HT₇ receptors have also been found in cultured astrocytes (Shimizu et al., 1996; Hirst et al., 1997; Cohen et al., 1999) and immunocytochemically detected *in situ* in astrocytes of mouse suprachiasmatic nucleus (Belenky and Pickard, 2001). We recently identified the presence of functional, cAMP-coupled 5-HT₇ receptors in various human glioblastoma cell lines (Mahé et al., 2004).

In the present study, we now report the presence of 5-HT₇ receptors in a third type of cell of the central nervous system, microglial cells. Microglial cells are considered to be of the macrophage/monocyte lineage and to represent the resident immune cells of the brain (Kreuzberg, 1996). As such, they are involved in neuroinflammatory processes and can release inflammatory products like interleukin-6 (IL-6; Sébire et al., 1993; Gadiant and Otten, 1997). We also found that 5-HT₇ receptor stimulation appears to be linked to IL-6 mRNA expression in the human microglial MC-3 cell line.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The human microglial MC-3 cell line (Janabi et al., 1995; Heese et al., 1998) was grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco BRL Life Technologies Cat. Nr. 41966) supplemented with 10 % foetal calf serum, penicillin G (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Cells were routinely passaged twice a week using a trypsin/EDTA solution (Gibco BRL Life Technologies Cat. Nr. 25300). For cAMP measurements the cells were subcultured in 24-well plates. For reverse

transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and Real-Time PCR experiments, cells were subcultured in 6-well culture plates.

2.2. cAMP measurements and analysis of data

cAMP accumulation was measured in intact cells seeded in 24-well plates, using the standard [³H]adenine prelabelling technique, as previously described (Schoeffter et al., 1997; 1999). Cells were deprived of serum 24 h before the assay. They were incubated with agonists/antagonists for 15 min in the presence of 1 mM isobutylmethylxanthine. The [³H]cAMP/([³H]cAMP+[³H]ATP) dpm ratio (cAMP conversion rate) was calculated for each sample. Concentration-response curves were fitted to the nonlinear logistic function of the Origin 6.1 software package (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). E_{\max} and EC_{50} values were derived from these analyses. Results are given as mean values \pm S.E.M. of the indicated n number of experiments. The pA_2 values of the antagonist compound SB-269970 were estimated from Schild analyses (Arunlakshana and Schild, 1959). Incomplete curves in the presence of the highest concentration of the antagonist were constrained to the E_{\max} of the control curve to obtain EC_{50} estimates.

2.3. Western blot analysis of the 5-HT₇ receptor

Cells were first washed twice with cold phosphate-buffered saline and then detached in 100 μ l of a buffer containing 20 mM Tris at pH 8, 137 mM NaCl, 1 % Nonidet P40, 10 % glycerol, 0.5 mM orthovanadate, 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), sonicated and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 4°C. The proteins (25 μ g per lane) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 4-20% Tris-glycine polyacrylamide gel (Cambrex, Rockland, ME, USA) and transferred onto a PVDF membrane. The membranes were blocked with blocking buffer, consisting of 5 % milk, 1 % bovine serum albumin in

TBST buffer (0.2 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05 % Tween 20) and then incubated for 2 h with a rabbit polyclonal antibody to the serotonin 5-HT₇ receptor (Imgenex, San Diego, CA, USA) diluted in TBST to a final concentration of 0.5 µg/ml. This antibody was raised against a sequence identical for all human receptor splice variants. Membranes were then washed and incubated for 1 h with an anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) diluted 1:100,000 in blocking buffer, followed by application of an enhanced chemiluminescent system (Socochim SA Supersignal^R West Femto, Pierce, Perbio Science, Lausanne, Switzerland).

2.4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the 5-HT₇ receptor

To identify the three splice variants of the human 5-HT₇ receptor (which differ from each other only by their carboxy terminus tails), primers were designed in such a way that the length of the amplification products was specific to each splice variant:

<u>Gene name</u>	<u>Accession number</u>	<u>Length of amplification product</u>
5-HT _{7a}	NM_000872	506 bp
5-HT _{7b}	NM_019860	546 bp
5-HT _{7d}	U68488	639 bp

The sequences of the primers were as follows:

<u>Primer</u>	<u>Sequence</u>
Forward primer:	5' CCT TCA TCT GTG GCA CTT CC 3'
Reverse primer:	5' GGT GTG CTT ACT GCT GAG AT 3'

Total RNA was extracted from MC-3 cells by using the S.N.A.P.TM Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The quantity of total RNA was determined by Ribogreen[®] staining (RibogreenTM RNA Quantitation Kit; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). The quality of the RNA was checked by electrophoretic separation of the RNA on a 1.2 % SeaKem LE agarose gel (Karlan, Santa Rosa, CA, USA). For each RNA sample, 400 ng of

total RNA were first digested with DNase I (Qiagen, Hilden, Germany) in order to remove traces of genomic DNA contamination. The DNase I enzyme was inactivated by addition of EDTA and heating up to 65°C for 2 min. DNase I-treated total RNA was reverse transcribed into cDNA for 60 min at 42°C with 300 ng of random hexamer primers and 50 U of StrataScript™ reverse transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The reaction was stopped by heating up to 95°C for 5 min. In all, 20 ng of RNA reverse transcribed into cDNA was used as template for the polymerase chain reaction (PCR). PCR amplification was performed in a final volume of 20 µl containing 130 µM of dNTPs, 0.5 µM of each primers, 1 U of Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences Europe, Otelfingen, Switzerland) and its corresponding buffer. The PCR amplification took place in a Biometra thermocycler with the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min, then 40 cycles with the following profile: 95°C for 40 s, 60°C for 40 s and 72°C for 40 s, final extension at 72°C for 7 min. After amplification, the PCR products were separated electrophoretically on a 3 % NuSieve 3:1 agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Each RT-PCR product was excised from agarose gels, extracted and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The eluted DNA fragments were sequenced by A. Wanner (Novartis Sequencing Facility).

2.5. Real-Time PCR analysis of interleukin-6 (IL-6) mRNA

Primers and probes were designed using Primer Designer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Probes were labeled with reporter dye, fluorophore-6-carboxy-fluorescein, at the 5' end and dye quencher, 6-carboxytetramethylrhodamine, at the 3' end. Primers and probes were synthesized commercially (Microsynth, Balgach, Switzerland). The 18S Genomic Endogenous Control Kit was purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium).

Gene name	Accession number	Primer/Probe	Sequence
IL-6	NM_000600	Forward	5'CCAGGAGCCCAGCTATGAAC 3'
		Reverse	5'CCCAGGGAGAAGGCAACTG 3'
		Probe	5'CCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGT 3'

Cells were deprived of serum 24 h before the assay. After incubation with 5-CT and SB-269970 for 1 h, the medium was removed and total RNA was extracted as described above. Five ng of RNA reverse transcribed into cDNA were used as template for the Real-Time PCR analysis. The reaction was performed in a final volume of 20 μ l containing 300 nM of forward and reverse primer, 175 nM of probe and qPCR™ Mastermix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgium). Thermal cycler conditions were as follow : 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 40 cycles with the following profile: 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each sample was processed in triplicate. The relative expression of specific transcripts was determined after normalization to 18S rRNA by using the so-called ‘comparative C_T method’ as described in Livak and Schmittgen (2001).

2.6. Drugs

5-Hydroxytryptamine creatinine sulphate (5-HT), 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT) and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT) were obtained from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). 5-Methoxytryptamine (5-MeOT) and (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol hydrochloride (SB-269970) were synthesized at Novartis Pharma AG, Basel. Millimolar stock solutions of test compounds were made on the day of the experiment in dimethylsulphoxide or distilled water. Further dilutions were made in distilled water.

3. Results

3.1. Identification of functional 5-HT₇-like receptors in human microglial MC-3 cells by cAMP measurements

5-HT induced a maximal 3.4 ± 0.3 -fold ($n=5$) stimulation of cAMP accumulation in human microglial MC-3 cells. Concentration-response relationships for cAMP stimulation using the four agonists 5-HT, 5-carboxamidotryptamine (5-CT), 5-methoxytryptamine (5-MeOT) and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) are shown in Fig. 1. The rank order of potency (pEC_{50} , $n=5$) was: 5-CT (7.09 ± 0.06) > 5-HT (6.13 ± 0.06) \geq 5-MeOT (5.78 ± 0.07) >> 8-OH-DPAT (ca. 5). 8-OH-DPAT appeared to have a weak efficacy (Fig. 1). The potent and selective 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970 (10 nM-1 μ M) induced incremental shifts in the concentration-response curve of 5-CT to the right in a parallel manner (Fig. 2). Schild analysis of the antagonism yielded a slope factor close to unity (0.89) and a pA_2 value of 9.03, corresponding to K_B 0.93 nM.

3.2. Western blot analysis of the 5-HT₇ receptor

Western blot analysis was performed to investigate the presence of the 5-HT₇ receptor protein in human microglial MC-3 cells. The antiserum revealed two bands with apparent molecular masses of approximately 45 and 50 kDa in extracts of Chinese hamster ovary (CHO) cells stably transfected with the human 5-HT_{7(a)} receptor cDNA, but not in untransfected CHO cells (Fig. 3A). These two bands were also present in extracts of the human microglial MC-3 cells, indicating the endogenous expression of 5-HT₇ receptors in these cells (Fig. 3B).

3.3. RT-PCR analysis of the 5-HT₇ receptor

The presence of the different splice variants of the 5-HT₇ receptor was investigated by RT-PCR analysis with specific primers that give specific amplification products for each of them

(5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)} and 5-HT_{7(d)}). As a control, the cDNA of the constitutively expressed β -actin gene was also amplified. Two cDNA bands, of the sizes expected for the 5-HT_{7(a)} (506 bp) and the 5-HT_{7(b)} variants (546 bp) were amplified in the reverse transcribed products from human microglial MC-3 cells (Fig. 4). There was no band corresponding to the 5-HT_{7(d)} splice variant (639 bp). The different bands obtained were excised, re-amplified with the same primers and sequenced. Sequencing confirmed that the PCR products corresponded to the 5-HT₇ gene sequence.

3.4. Real-Time PCR analysis of interleukin-6 (IL-6) mRNA

After 1 h, 5-CT (1 μ M) induced a 2.5-fold increase in IL-6 mRNA expression in human microglial MC-3 cells (Fig. 5). This effect was fully blocked by the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 (1 μ M; Fig. 5). Forskolin (10 μ M) induced a maximal 8-fold increase in IL-6 mRNA expression in the same cells after 90 min incubation (not shown).

4. Discussion

5-HT₇ receptors are known to be expressed in neurons and astrocytes (see Introduction). We now bring evidence that they are also present in a third type of cell in the brain, the microglia. In the present study, we used the transformed human microglial MC-3 cell line. This line has been described to retain the characteristic features of primary microglial cells, such as adherence, phagocytosis, expression of several microglial antigens, IL-6 release and neurotrophin expression (Janabi et al., 1995; Heese et al., 1998) and is therefore considered as a valid model system of microglial cells.

In functional cAMP-based studies with human microglial MC-3 cells, we found that 5-HT receptor agonists stimulated cAMP levels and the rank order of agonist potency was 5-CT > 5-HT = 5-MeOT >> 8-OH-DPAT. This is the classical pharmacological ‘fingerprint’ of 5-

HT₇ receptors. Of the three 5-HT receptor classes positively coupled to adenylyl cyclase (5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇), 5-HT₇ is the only one showing higher affinity for 5-CT than for 5-HT (see Hoyer et al., 1994). The relatively low pEC₅₀ values of agonists in MC-3 cells, as compared to their affinities for the cloned 5-HT₇ receptor (Bard et al., 1993) are likely to be ascribed to a limited number of receptors in the former situation. In line with this view, we found that no specific radioligand binding could be detected in MC-3 cells, using [³H]-mesulergine (C. Mahé, personal observations). Furthermore, similar agonist pEC₅₀ values to those reported in the present study have been observed at native 5-HT₇ receptors in rat primary astrocytes (Hirst et al., 1997) and human glioblastoma cells (Mahé et al., 2004).

Definitive evidence that the effect of 5-CT is mediated by 5-HT₇ receptors in MC-3 cells was shown in antagonist studies with SB-269970. This compound has been introduced as a potent and selective 5-HT₇ receptor antagonist, with a pK_i value of 8.9 and a functional pA₂ value of 8.5 (Hagan et al., 2000; Lovell et al., 2000). The pA₂ value of 9.03 found in MC-3 cells is in agreement with these reported data.

To confirm the expression of 5-HT₇ receptors in the MC-3 cells, the presence of the receptor protein was then investigated by Western blotting, using a specific antibody raised against a sequence identical for all human receptor splice variants. Two bands were detected in MC-3 cell extracts, with apparent molecular masses of approximately 45 and 50 kDa. These two bands were also present in extracts of CHO cells stably transfected with the human 5-HT_{7(a)} receptor cDNA. The 45-50 kDa range corresponds to the anticipated molecular mass of the 5-HT₇ receptor, which in addition possesses two putative sites for N-linked glycosylation in its amino-terminal region and several putative sites for phosphorylation (Boess and Martin, 1994). The results suggest that two protein forms of the 5-HT₇ receptor are expressed in MC-3 cells (and in control CHO cells), perhaps with different degrees of glycosylation and/or phosphorylation.

Pharmacological and immunological detection of 5-HT₇ receptors in MC-3 cells was corroborated by results of molecular biology studies, showing the presence of two splice variants of the human 5-HT₇ receptor. RT-PCR amplifications were conducted using specific primers designed in such a way that the length of the amplification products was specific for each splice variant of the human 5-HT₇ receptor. Two bands corresponding to the 5-HT_{7(a)} and 5-HT_{7(b)} splice variants were generated. Sequencing of the different bands confirmed this conclusion. The 5-HT_{7(d)} variant did not seem to be expressed in MC-3 cells, at variance with human glioblastoma cells (Mahé et al., 2004). It should be noticed that the 5-HT_{7(d)} splice variant is represented to a lesser extent or is less widely distributed than the other variants across tissues (Heidmann et al., 1997; Krobert et al., 2001).

This is the first description of serotonin 5-HT₇ receptors being expressed in microglial cells. Microglial cells are the main resident immune cells in the brain and their activation leads to the release of various inflammatory factors (Kreuzberg, 1996). Interestingly, expression of the 5-HT₇ receptor mRNA has been detected in other immune cells, peripheral blood lymphocytes (Stefulj et al., 2000). One of the major pro-inflammatory mediator released by immune cells is IL-6 (for a review, see Van Snick, 1990). Microglial cells, in particular, release large amounts of IL-6 (Sébire et al., 1993; Gadiant & Otten, 1997). In the present study, we bring evidence that 5-HT₇ receptor stimulation in human microglial cells is linked to induction of IL-6 release. Using Real-Time PCR analysis, we found that the 5-HT₇ receptor agonist, 5-CT stimulated the expression of IL-6 mRNA in MC-3 cells, an effect which was abolished in the presence of the selective 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970. It should be noticed that the cAMP-elevating agent, forskolin mimicked the effects of 5-CT on IL-6 mRNA expression. It appears, therefore, that these effects are triggered by an increase in the cellular cAMP concentration. These data point to a potential role of 5-HT₇ receptors in neuroinflammation.

In conclusion, we have shown that pharmacologically defined and immunologically detected 5-HT₇ receptors are present in the human microglial MC-3 cell line. They appear to be linked to IL-6 synthesis and may therefore be involved in inflammatory processes within the brain.

Acknowledgements. The authors are indebted to Dr. Bernard Bucher (CNRS UMR 7034, France) for helpful discussions, to Dr. Daniel Hoyer (Novartis Pharma, NIBR Basel, Switzerland) for carefully reading the manuscript and to Dr. N. Janabi (Laboratoire de Neurovirologie et Neuroimmunologie, Université Paris-Sud, France) for the generous gift of the MC-3 cell line.

References

Arunlakshana, O., Schild, H. O., 1959. Some quantitative uses of drug antagonists. *British Journal of Pharmacology* 14, 48-58.

Bacon, W. L., Beck, S. G., 2000. 5-Hydroxytryptamine₇ receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294, 672-679.

Bard, J. A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T. A., Weinshank, R. L., 1993. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 268, 23422-23426.

Belenky, M. A., Pickard, G. E., 2001. Subcellular distribution of 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Comparative Neurology* 432, 371-388.

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

Chapin, E. M., Andrade, R., 2001. A 5-HT₇ receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. I. Pharmacological characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297, 395-402.

Cohen, Z., Bouchelet, I., Olivier, A., Villemure, J. G., Ball, R., Stanimirovic, D. B., Hamel, E., 1999. Multiple microvascular and astroglial 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human brain: molecular and pharmacologic characterization. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19, 908-917.

Eglen, R. M., Jasper, J. R., Chang, D. J., Martin, G. R., 1997. The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends in Pharmacological Sciences* 18, 104-107.

Gadient, R. A., Otten, U. H., 1997. Interleukin-6 (IL-6) – A molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiology* 52, 379-390.

Gill, C. H., Soffin, E. M., Hagan, J. J., Davies, C. H., 2002. 5-HT₇ receptors modulate synchronized network activity in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 42, 82-92.

Goaillard, J. M., Vincent, P., 2002. Serotonin suppresses the slow afterhyperpolarization in rat intralaminar and midline thalamic neurones by activating 5-HT₇ receptors. *The Journal of Physiology* 541, 453-465.

Hagan, J. J., Price, G. W., Jeffrey, P., Deeks, N. J., Stean, T., Piper, D., Smith, M. I., Upton, N., Medhurst, A. D., Middlemiss, D. N., Riley, G. J., Lovell, P. J., Bromidge, S. M., Thomas, D. R., 2000. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* 130, 539-548.

Heese, K., Hock, C., Otten, U., 1998. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *Journal of Neurochemistry* 70, 699-707.

Heidmann, D. E. A., Metcalf, M. A., Kohen, R., Hamblin, M. W., 1997. Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *Journal of Neurochemistry* 68, 1372-1381.

Hirst, W. D., Price, G. W., Rattray, M., Wilkin, G. P., 1997. Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *British Journal of Pharmacology* 120, 509-515.

Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, F. R., Humphrey, P. P. A., 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacological Reviews* 46, 157-203.

Janabi, N., Peudenier, S., Heron, B., Ng, K. H., Tardieu, M., 1995. Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neuroscience Letters* 195,105-108.

Jasper, J. R., Kosaka, A., To, Z. P., Chang, D. J., Eglén, R. M., 1997. Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7(b)}). *British Journal of Pharmacology* 122, 126-132.

Kreuzberg, G. W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19, 312-318.

Krobert, K. A., Bach, T., Syversveen, T., Kvingedal, A. M., Levy, F. O., 2001. The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363, 620-632.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408.

Lovell, P. J., Bromidge, S. M., Dabbs, S., Duckworth, D. M., Forbes, I. T., Jennings, A. J., King, F. D., Middlemiss, D. N., Rahman, S. K., Saunders, D. V., Collin, L. L., Hagan, J. J., Riley, G. J., Thomas, D. R., 2000. A novel, potent, and selective 5-HT₇ antagonist: (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol (SB-269970). *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 342-345.

Lovenberg, T. W., Baron, B. M., de Lecea, L., Miller, J. D., Prosser, R. A., Rea, M. A., Foye, P. E., Racke, M., Slone, A. L., Siegel, B. W., Danielson, P. E., Sutcliffe, J. G., Erlander, M. G., 1993. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11, 449-458.

Mahé, C., Bernhard, M., Bobirnac, I., Keser, C., Loetscher, E., Feuerbach, D., Dev, K. K., Schoeffter, P., 2004. Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines. *British Journal of Pharmacology* 143, 404-410.

Meyerhof, W., Obermüller, F., Fehr, S., Richter, D., 1993. A novel rat serotonin receptor: primary structure, pharmacology, and expression pattern in distinct brain regions. *DNA and Cell Biology* 12, 401-409.

Plassat, J. L., Amlaiki, N., Hen, R., 1993. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Molecular Pharmacology* 44, 229-236.

Ruat, M., Traiffort, E., Leurs, R., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Arrang, J. M., Schwartz, J. C., 1993. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 90, 8547-8551.

Schoeffter, P., Ullmer C., Bobirnac, I., Gabbiani, G., Lübbert, H., 1996. Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 117, 993-994.

Schoeffter, P., Bobirnac, I., Boddeke, E., Hoyer, D., 1997. Inhibition of cAMP accumulation via recombinant human serotonin 5-HT_{1A} receptors: considerations on receptor effector coupling across systems. *Neuropharmacology* 36, 429-437.

Schoeffter, P., Feuerbach, D., Bobirnac, I., Gazi, L., Longato, R., 1999. Functional, endogenously expressed corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF₁) and CRF₁

receptor mRNA expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 13, 484-489.

Sébire, G., Émilie, D., Wallon, C., Héry, C., Devergne, O., Delfraissy, J. F., Galanaud, P., Tardieu, M., 1993. In vitro production of IL-6, IL-1 β , and tumour necrosis factor- α by human embryonic microglial and neural cells. *Journal of Immunology* 150, 1517-1523.

Shen, Y., Monsma, F. J. Jr., Metcalf, M.A., Jose, P. A., Hamblin, M. W., Sibley, D. R., 1993. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* 268, 18200-18204.

Shimizu, M., Nishida, A., Zensho, H., Yamawaki, S., 1996. Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine₇ receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 279, 1551-1558.

Stefulj, J., Jernej, B., Cicin-Sain, L., Rinner, I., Schauenstein, K., 2000. mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain, Behavior, and Immunity* 14, 219-224.

Thomas, D. R., Hagan, J. J., 2004. 5-HT₇ receptors. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders* 3, 81-90.

To, Z. P., Bonhaus, D. W., Eglen, R. M., Jakeman, L. B., 1995. Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *British Journal of Pharmacology* 115, 107-116.

Tsou, A. P., Kosaka, A., Bach, C., Zuppan, P., Yee, C., Tom, L., Alvarez, R., Ramsey, S., Bonhaus, D. W., Stefanich, E., Jakeman, L., Eglen, R. M., Chan, H. W., 1994. Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase. *Journal of Neurochemistry* 63, 456-464.

Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology* 8, 253-278.

Ying, S. W., Rusak, B., 1997. 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Research* 755, 246-254.

Legends to Figures

Fig. 1. Concentration-response curves of 5-CT, 5-HT, 5-MeOT and 8-OH-DPAT for stimulation of cAMP accumulation in human microglial MC-3 cells. Data are mean values \pm S.E.M. from 5 individual experiments. Results are expressed as percentage of the maximal effect of 5-HT.

Fig. 2. Concentration-response curves of 5-CT in the absence (control) and in the presence of 10 nM, 0.1 μ M and 1 μ M SB-269970 in human microglial MC-3 cells. Data are mean values \pm S.E.M. from 5 individual experiments. Results are expressed as percentage of the maximal effect of 5-CT.

Fig. 3. Western blot analysis of human microglial MC-3 and control cell extracts. (A) Lane 1, untransfected CHO cells (negative control); lanes 2 and 3, CHO cells transfected with the human 5-HT_{7(a)} receptor. (B) Lane 1, untransfected CHO cells; lane 2, human microglial MC-3 cells. Molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left. This pattern of data was observed in three independent experiments.

Fig. 4. RT-PCR analysis of the 5-HT₇ receptor splice variants in human microglial MC-3 cells. Lane 1, DNA length standards of the indicated size (in base pairs, bp). Lane 2, human microglial MC-3 cells. Fragments sizes corresponding to amplified fragments of the 5-HT_{7(a)} (506 bp) and 5-HT_{7(b)} (546 bp) variants are indicated on the right. No amplified product corresponding to the 5-HT_{7(d)} (639 bp) variant was apparent. This pattern of data was observed in three independent experiments.

Fig. 5. Effect of 5-CT in the absence and in the presence of SB-269970 on IL-6 mRNA expression in human microglial MC-3 cells using Real-Time PCR analysis. Cells were treated with 5-CT (1 μ M) for 1 h alone or with SB-269970 (1 μ M). Data are mean values \pm S.E.M. from 3 independent experiments.

Figure 1

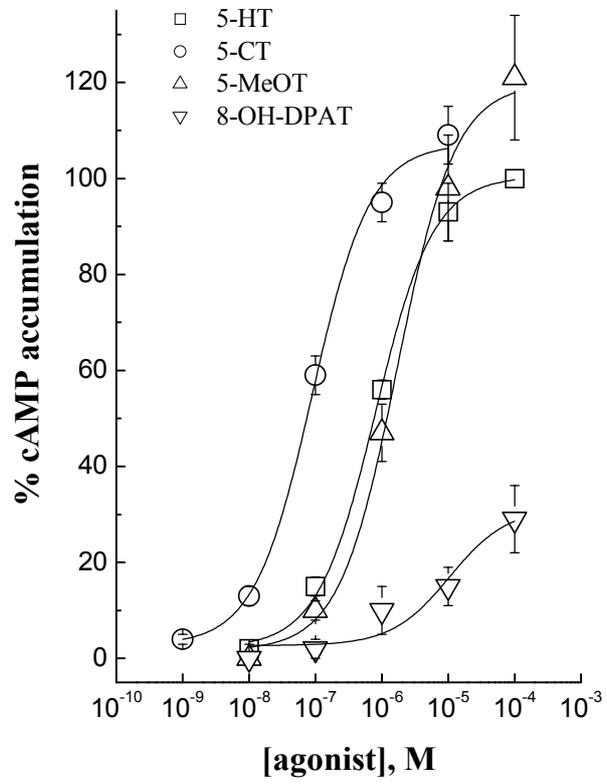


Figure 2

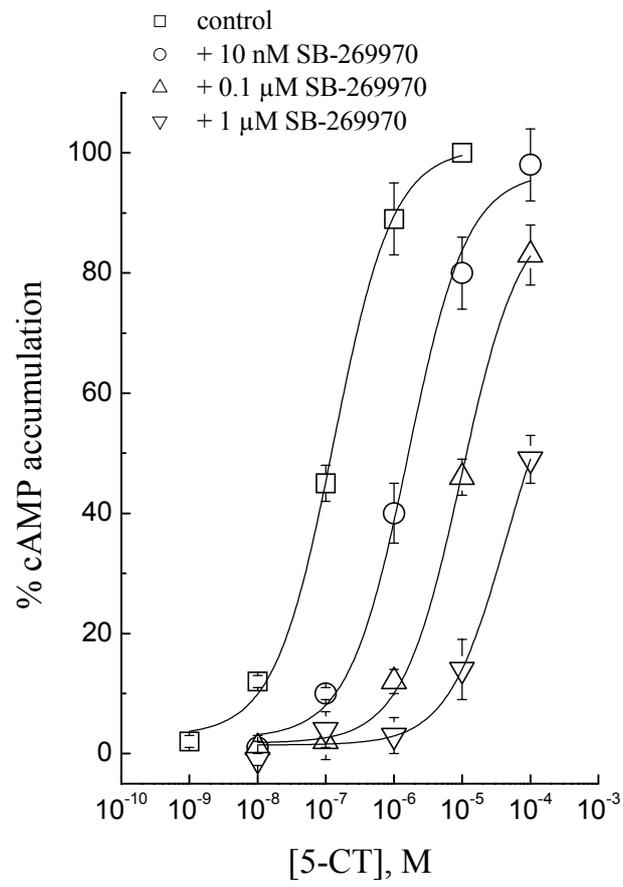


Figure 3

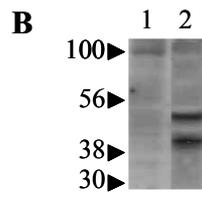
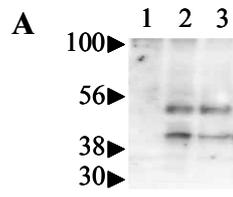


Figure 4

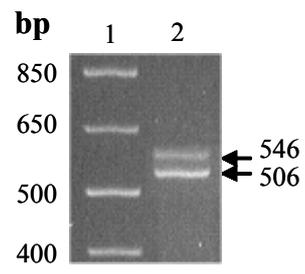
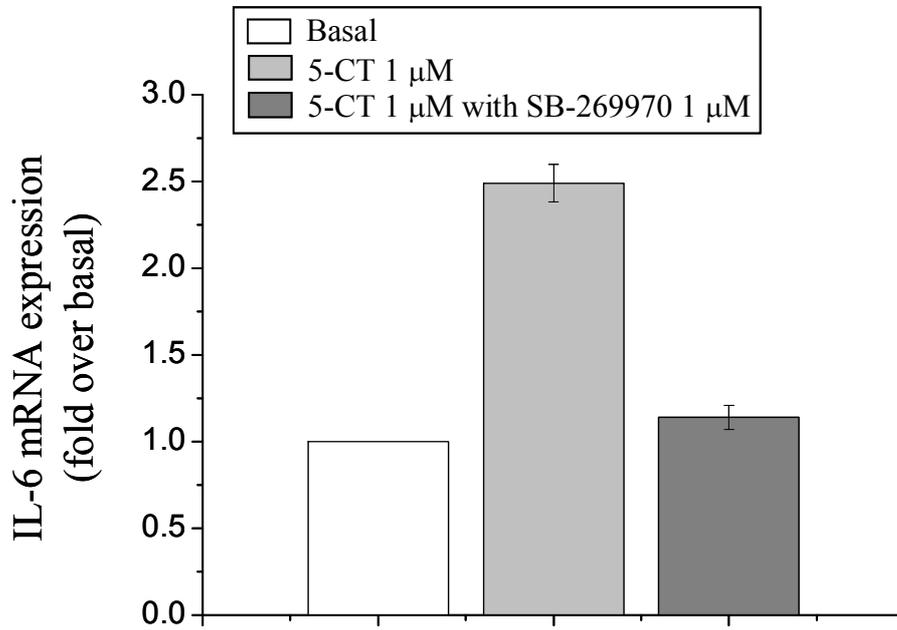


Figure 5



Résumé et discussion complémentaire de la publication 3

Le but de la publication n°3 est de montrer que les microglies humaines expriment aussi le récepteur 5-HT₇ et que l'activation de ce récepteur module l'expression de l'IL-6 comme nous l'avons montré dans les glioblastomes. Les microglies expriment et libèrent également l'IL-6, mais aucune donnée bibliographique ne mentionne la présence du récepteur 5-HT₇ dans ces cellules.

Pour cela, nous avons à notre disposition des lignées de microglies humaines nommées MC-3, nous avons donc décidé de travailler sur ces cellules car, comme dans le cas des glioblastomes humains, elles sont facilement cultivables et propageables et constituent ainsi un bon modèle d'étude de microglie. Ces cellules sont issues de cultures primaires de cellules microgliales humaines, immortalisées après transfection par un plasmide contenant la séquence de l'antigène T du virus SV40 (Janabi *et al.*, 1995). Elles conservent les propriétés des cultures primaires de microglies. Quatre différents clones de ces microglies ont été obtenus par transfection et le clone n°3 (MC-3) montre la plus forte sécrétion basale de l'IL-6.

1. Etude de l'expression fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ dans les microglies MC-3.

Comme dans le cas des glioblastomes, nous avons tout d'abord étudié la présence fonctionnelle du récepteur 5-HT₇ par mesure de l'accumulation de l'AMPc après activation par divers agonistes. Nous avons trouvé le même profil pharmacologique que dans les glioblastomes, caractéristique du récepteur 5-HT₇, avec des valeurs d'EC₅₀ similaires. L'amplitude de l'effet maximal des agonistes est cependant moindre que dans les glioblastomes (3 fois les valeurs basales versus 10 fois en moyenne). L'antagonisme puissant de la 5-CT par le composé SB-269970 confirme la présence du récepteur 5-HT₇ dans ces cellules. L'expression de ce récepteur au niveau protéique a été confirmée par Western-blot et la présence de seulement 2 des 3 variants d'épissage du récepteur (5-HT_{7a} et b) a été montrée par RT-PCR.

Ainsi, les cellules microgliales MC-3 expriment également de façon fonctionnelle le récepteur 5-HT₇ et pourraient constituer un bon modèle d'étude de ce récepteur dans les microglies.

2. Etude du rôle du récepteur 5-HT₇ sur l'expression de l'IL-6 dans les microglies MC-3.

Un traitement d'1 h avec la 5-CT entraîne une augmentation de l'expression basale de l'ARNm de l'IL-6 mesuré par des analyses de TaqMan. Cet effet est presque totalement aboli par ajout du composé SB-269970, confirmant l'implication du récepteur 5-HT₇. Cependant, dans les microglies humaines MC-3, l'effet de la 5-CT est d'amplitude moindre que dans les glioblastomes (2.5 fois les valeurs basales versus 10 fois en moyenne) tout comme sur l'accumulation de l'AMPc. Ceci pourrait expliquer que nous n'ayons pu mesurer de stimulation significative de la libération d'IL-6 par la 5-CT dans le surnageant de culture des microglies MC-3.

Ainsi, l'activation du récepteur 5-HT₇ entraîne une stimulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans les microglies.

Chapitre III :

Etude de la relation stimulation du récepteur 5-HT₇/induction de la production de l'IL-6 dans des cultures primaires d'astrocytes de rat et *in vivo* chez le rat.

Les lignées cellulaires tumorales ou immortalisées peuvent constituer de bons modèles dans un premier temps, mais leur phénotype peut être modifié par diverses mutations. Il est donc nécessaire de revenir à des modèles plus proches de la situation physiologique pour valider les résultats obtenus sur lignées cellulaires. Dans le cas présent de l'induction d'IL-6 par stimulation du récepteur 5-HT₇, nous avons suivi deux approches : 1) les astrocytes de rat en cultures primaires et 2) la mesure d'IL-6 plasmatique chez le rat.

1. Etude de l'expression du récepteur 5-HT₇ dans des cultures primaires d'astrocytes de rat.

1.1. Objectifs

Les lignées de glioblastomes sont des lignées cancéreuses et peuvent donc contenir des mutations et modifications dans leur phénotype d'origine. Ainsi, il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus sur les glioblastomes dans des modèles d'astrocytes plus physiologiques pour conclure de façon plus certaine quant au rôle activateur du récepteur 5-HT₇ dans la synthèse et la libération de l'IL-6 dans les astrocytes. Nous avons, dans cette optique, décidé de travailler avec des astrocytes primaires de rat. Des travaux ont déjà été publiés sur l'expression de ce récepteur dans des astrocytes de rat (Shimizu *et al.*, 1996 ; Hirst *et al.*, 1997). Nous avons travaillé sur 2 types d'astrocytes provenant de 2 régions différentes du cerveau: le cortex frontal et l'hippocampe. Il a déjà été montré que les astrocytes primaires provenant du cortex frontal expriment le récepteur 5-HT₇ (Shimizu *et al.*, 1996). Par contre, aucune donnée bibliographique ne mentionne l'expression du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes d'hippocampe, mais ce récepteur a été trouvé très exprimé dans cette région du cerveau chez le rat (voir introduction de cette thèse).

1.2. Matériels et méthodes

- Cultures primaires d'astrocytes :

Les astrocytes nous ont été fournis par le laboratoire du Professeur U. Otten (Département de Physiologie, Université de Bâle). Les cultures d'astrocytes sont préparées à partir de cerveau de rat Sprague-Dawley âgés d'un jour, la méthode est décrite dans März *et al.* (1999). Les astrocytes sont ensuite transférés dans des plaques de 24 puits (pour la mesure d'AMPC) ou 6 puits (pour l'analyse TaqMan et la mesure d'IL-6 par ELISA) dans du milieu basal d'Eagle

(BME, Gibco n° catalogue 41010-026) complété par 10 % de sérum de veau foetal (FCS), 2 mM de glutamine, 100 units/ml de penicilline G et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont déprivées en sérum 24 h avant les expériences.

- Mesure de l'AMPC :

La méthode est semblable à celle décrite dans les chapitres précédents (voir publications n°s 1 et 3).

- Analyse par TaqMan ('PCR en temps réel') :

La méthode est décrite dans les publications n°s 2 et 3 de ce manuscrit.

- Dosage de l'IL-6 par ELISA :

Les astrocytes sont incubés pendant 24 h avec de la 5-CT (1 µM) dans des plaques de 6 puits. Le composé SB-269970 (1 µM) est ajouté 30 min avant la 5-CT et incubé 24 h après ajout de la 5-CT. Les surnageants de culture sont prélevés, centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm puis stockés à -20°C jusqu'au dosage de l'IL-6. Le dosage est effectué à l'aide d'un kit ELISA selon la procédure expérimentale décrite par le fabricant (rat IL-6 Quantikine, R&D Systems).

- Analyse des résultats : comme décrit dans les publications n°s 1, 2 et 3.

- Substances : comme indiqué dans les publications n°s 1, 2 et 3.

1.3. Résultats et discussion

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes de cortex frontal et d'hippocampe de rat. Nous avons mesuré l'accumulation de l'AMPC après stimulation par la 5-CT seule ou en présence du composé SB-269970 (0.1 µM), qui est un agoniste sélectif du récepteur 5-HT₇ (Lovell *et al.*, 2000). La 5-CT produit une stimulation concentration-dépendante de l'accumulation d'AMPC dans les deux types d'astrocytes (figure 7). Dans les deux cas, la courbe effet-concentration de la 5-CT est déplacée vers la droite de façon parallèle par le composé SB-269970 (0.1 µM) (figure 7). Les valeurs du maximum de stimulation de l'accumulation basale de l'AMPC (E_{max}), ainsi que la pEC_{50} de la 5-CT et le pK_B du SB-266970 sont données dans le tableau 4. Les valeurs de pEC_{50} et de pK_B sont en

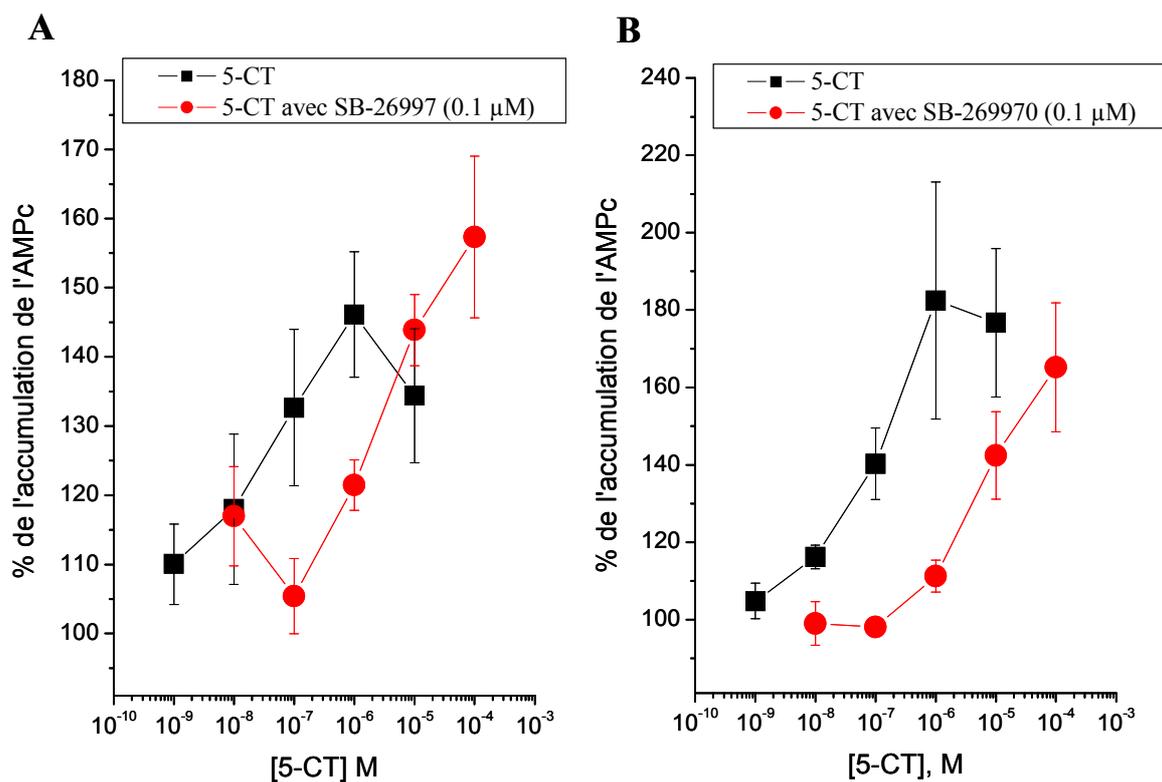


Figure 7 : Courbes effet-concentration de la 5-CT en absence et en présence de SB-269970 (0.1 μM) pour la stimulation de l'accumulation basale de l'AMPC dans les astrocytes primaires provenant du cortex frontal (A) et de l'hippocampe (B) de rat. Chaque point de la figure A représente la moyenne de 3 expériences indépendantes et ceux de la figure B, de 4 expériences indépendantes. Les barres verticales indiquent les écarts-types de la moyenne. Les valeurs sont exprimées en % de l'accumulation basale d'AMPC.

Cellule	E_{\max} (5-CT)	pEC_{50} (5-CT)	pK_B (SB-269970)
astrocytes du cortex frontal (n=3)	1.4 ± 0.1	8.01 ± 0.36	9.56 ± 0.47
astrocytes d'hippocampe (n=4)	1.7 ± 0.2	7.44 ± 0.26	9.21 ± 0.29

Tableau 4: Valeurs de l'effet maximum (E_{\max}) et de la pEC_{50} de la 5-CT pour la stimulation de l'accumulation basale de l'AMPC, et du pK_B de l'effet inhibiteur du SB-269970 dans les astrocytes primaires du cortex frontal et de l'hippocampe de rat. Les valeurs de l' E_{\max} sont exprimées en nombre de fois les valeurs basales en AMPC \pm écarts-types de la moyenne. Les valeurs représentent la moyenne de n expériences.

accord avec la présence du récepteur 5-HT₇ dans ces cellules mais les valeurs de l'E_{max} (1.4 et 1.7 fois les valeurs basales) indiquent un faible niveau d'expression du récepteur 5-HT₇ dans ces cellules.

Nous avons tenté de mesurer d'éventuelles variations de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 par PCR en 'temps réel' (TaqMan) après un traitement d'1 h et 3 h avec la 5-CT (1 μM). Mais, ces expériences n'ont montré aucune modification détectable de l'expression basale de l'ARNm de l'IL-6 après activation du récepteur 5-HT₇.

Nous avons également dosé les taux d'IL-6 dans le milieu de culture de ces astrocytes par ELISA après incubation avec la 5-CT (1 μM) pendant 24 h. Là-encore, aucune stimulation du taux basal d'IL-6 n'a pu être détectée.

Les travaux de Hirst et collaborateurs en 1997 ont montré que les astrocytes de rat exprimant le plus efficacement le récepteur 5-HT₇ proviennent du thalamus/hypothalamus. Pour des raisons techniques, nous n'avons pu obtenir d'astrocytes issus de cette région cérébrale. Nous avons confirmé la présence de récepteurs 5-HT₇ fonctionnels dans les astrocytes provenant du cortex frontal de rat. Cependant, la réponse associée à ce récepteur dans ce type d'astrocytes reste trop faible, ainsi que l'ont montré Shimizu et collaborateurs (1996) et Hirst et collab. (1997). L'hippocampe constitue une région cérébrale où le récepteur 5-HT₇ et son ARNm sont fortement exprimés (voir introduction). Nous avons montré que les astrocytes provenant de l'hippocampe de rat expriment aussi des récepteurs 5-HT₇ fonctionnels, à un niveau légèrement supérieur au cortex frontal, à en juger par l'E_{max} de la 5-CT. Cependant, l'expression du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes est probablement trop faible pour entraîner une augmentation détectable de l'expression de l'IL-6 et de sa libération après une stimulation par la 5-CT. L'exemple des 2 lignées de glioblastomes humains CCF-STTG₁ et Hs 683 (voir Chapitre I des résultats) suggérait déjà qu'un certain niveau d'expression du récepteur 5-HT₇ est requis pour pouvoir observer une augmentation de l'expression de l'IL-6.

2. Impact de la stimulation du récepteur 5-HT₇ sur le taux plasmatique circulant d'IL-6.

2.1. Objectifs

Comme nous n'avons pu montrer de stimulation de l'expression de l'IL-6 par activation du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes primaires de rat, après traitement par la 5-CT, nous avons donc décidé d'examiner l'impact de la stimulation de ce récepteur sur le taux d'IL-6 plasmatique circulant chez le rat. Il a déjà été montré qu'une augmentation de l'IL-6 plasmatique chez l'homme corrèle avec la présence de nombreuses pathologies aussi bien inflammatoires, cancéreuses que psychiatriques. Ainsi, le récepteur 5-HT₇, s'il modulait le taux d'IL-6 plasmatique, pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de diverses maladies associées à des dérèglements de l'IL-6.

En parallèle, le taux d'ACTH et de corticostérone ont été mesurés, puisque la 5-CT est également susceptible de stimuler ces hormones de stress par action sur le récepteur 5-HT_{1A} (Critchley *et al.*, 1994).

2.2. Matériels et méthodes

- Animaux :

Des rats adultes Sprague Dawley (Iffa Credo, Les Oncins, France) sont placés par groupe de 3 ou 4 dans des cages macrolon de type III, avec à disposition à tout moment de l'eau du robinet et de la nourriture (Kliba, Bâle, Suisse). Le cycle de lumière : obscurité est de 12 h : 12 h avec éclairage à partir de 6 h du matin. Les rats sont pesés puis transférés dans des cages macrolon individuelles de type II environ 24 h avant le début de l'expérience. Le premier traitement réalisé sur des groupes de 12 animaux et le second sur des groupes de 9 animaux.

- Substances : comme indiqué dans les publications n^{os} 1, 2 et 3.

La 5-CT maléate (5 mg/kg correspondant à 5-CT base 3 mg/kg) et le composé SB-269970 chlorhydrate (30 mg/kg) sont dilués, juste avant le début de l'expérience, dans une solution saline à 0.9 %.

- Traitements et collecte du plasma :

Les traitements sur rat ont été effectués par l'équipe du Dr. C. Gentsch (NIBR, Basel, Switzerland) entre 13h00 et 16h00, pendant la seconde moitié de la phase lumineuse.

Deux traitements sur les rats ont été effectués : un premier avec la 5-CT (3 mg/kg) seule pendant 1 h et 6 h, et un second avec la 5-CT (3 mg/kg) pendant 1 h en présence du composé SB-269970 (30 mg/kg) administré 30 min avant la 5-CT. Les substances sont administrées par voie intrapéritonéale (i.p. ; 2 ml/kg).

Le second traitement avec le composé SB-269970 est réalisé selon le tableau suivant :

	1 ^{ère} injection	2 ^{ème} injection
Rats témoins	NaCl 0.9 %	NaCl 0.9 %
Rats traités 5-CT	NaCl 0.9 %	5-CT 3 mg/kg
Rats traités 5-CT et SB-269970	SB-269970 30 mg/kg	5-CT 3 mg/kg

La seconde injection est effectuée 30 min après la première. Les rats sont replacés dans leur cage après chaque injection. Une heure après la seconde injection, les animaux sont décapités et le sang provenant du tronc est collecté dans des tubes Eppendorf contenant de l'EDTA. Les tubes sont ensuite légèrement remués et placés dans la glace puis centrifugés pendant 10 min à 9000 rpm. Les échantillons plasmatiques sont séparés puis transférés dans des tubes Eppendorf et enfin stockés à -20°C jusqu'à leurs dosages.

- Dosage de l'IL-6 :

Le dosage est effectué à l'aide d'un kit ELISA selon la procédure expérimentale décrite par le fabricant (rat IL-6 Quantikine, R&D Systems).

- Dosage de l'ACTH :

Le dosage de l'ACTH plasmatique est réalisé par compétition avec l' $[^{125}\text{I}]\text{ACTH}$ à l'aide d'un kit radioimmunologique (ACTH RIA, DiaSorin, Stillwater, MN, USA). Les échantillons plasmatiques sont dilués au 1/2 avant dosage.

- Dosage de la corticostérone :

Les niveaux de corticostérone plasmatique sont mesurés par compétition avec la $[^{125}\text{I}]\text{corticostérone}$ à l'aide d'un kit radioimmunologique (Corticostérone RIA, MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Germany).

- Analyse des résultats :

Les résultats sont donnés en valeurs moyennes \pm écarts-types de la moyenne de n déterminations. Les comparaisons statistiques sont réalisées à l'aide du test t de Student.

2.3. Résultats

- 1^{ère} expérience :

Pour examiner l'impact de l'activation du récepteur 5-HT₇ sur le taux plasmatique de l'IL-6, nous avons tout d'abord réalisé une première expérience consistant en un traitement d'1 h ou 6 h par la 5-CT (3 mg/kg, i.p.) sur des rats. Puis nous avons dosé les taux plasmatiques d'IL-6, d'ACTH et de corticostérone suite à ces deux traitements, comparés à ceux des rats témoins injectés avec de la solution saline à 0.9 %. Après 1 h de traitement avec la 5-CT, les taux plasmatiques d'IL-6, d'ACTH et de corticostérone sont augmentés par rapport à ceux des rats témoins, d'environ 7 fois pour l'IL-6 (figure 8A), 9 fois pour l'ACTH (figure 8B) et 2,5 fois pour la corticostérone (figure 8C). Après 6 h de traitement, il n'y a plus d'effet de la 5-CT sur les taux plasmatiques d'IL-6, d'ACTH et de corticostérone (figure 8). Ainsi, 1 h est un temps approprié pour étudier l'effet de la 5-CT sur la quantité plasmatique d'IL-6.

- 2^{ème} expérience :

Pour confirmer l'implication du récepteur 5-HT₇ dans l'effet de la 5-CT, nous avons effectué une seconde expérience de stimulation par la 5-CT (3 mg/kg, i.p.) pendant 1 h en présence et en absence du composé SB-269970 (30 mg/kg, i.p.), antagoniste spécifique du récepteur 5-HT₇ (Lovell *et al.*, 2000), administré 30 min avant la 5-CT. Encore une fois, suite à l'injection de la 5-CT, les taux plasmatiques d'IL-6, d'ACTH et de corticostérone sont augmentés par rapport à ceux des rats témoins, de façon un peu moins marquée que dans la 1^{ère} expérience (figure 9). Le composé SB-269970 reverse totalement l'effet de la 5-CT sur le taux plasmatique d'IL-6 ($p = 0.01$) (figure 9A) mais ne modifie pas significativement l'effet de la 5-CT sur les taux plasmatiques d'ACTH et de corticostérone ($p > 0.05$) (figures 9B et 9C). Ainsi, l'effet stimulateur de la 5-CT sur la quantité plasmatique de l'IL-6 serait médiée par le récepteur 5-HT₇.

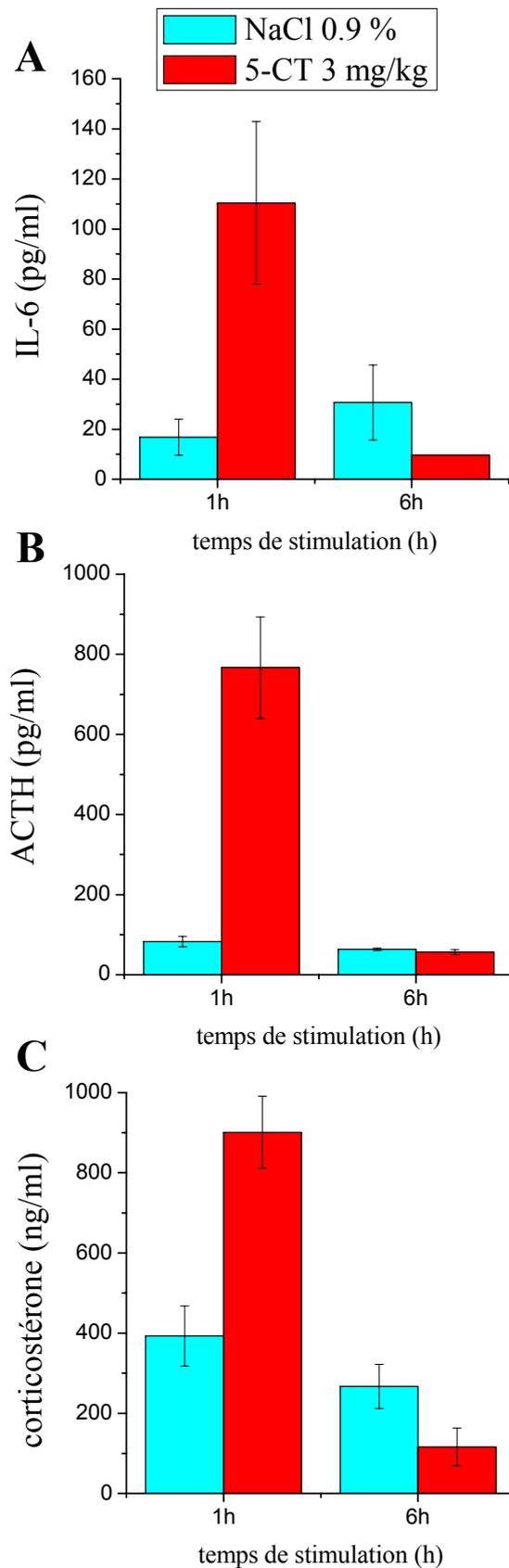


Figure 8. Dosage de l'IL-6 (A), de l'ACTH (B) et de la corticostérone (C) plasmatique chez le rat après un traitement d'1 h et 6 h avec la 5-CT (3 mg/kg).

L'injection de la 5-CT est réalisée en intrapéritonéale. Chaque groupe comporte 12 animaux. Les dosages sont effectués par un kit ELISA pour l'IL-6 (rat IL-6 Quantikine, R&D Systems) et par un kit RIA pour l'ACTH et la corticostérone (ACTH RIA, DiaSorin ; rat corticosterone RIA, MP Biomedicals GmbH).

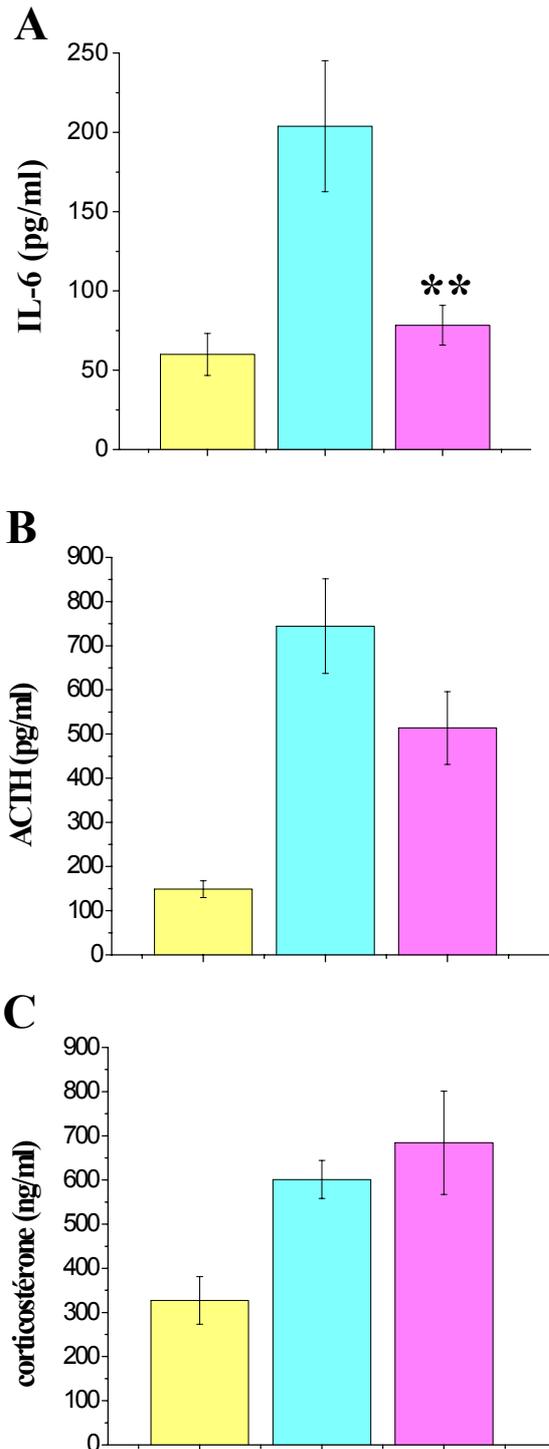
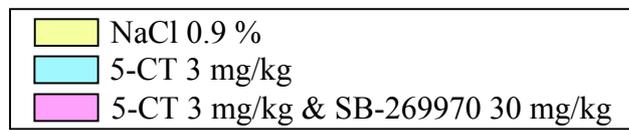


Figure 9. Dosage de l'IL-6 (A), de l'ACTH (B) et de la corticostérone (C) plasmatique chez le rat après un traitement d'1 h avec la 5-CT (3 mg/kg) en présence ou en absence du composé SB-269970 (30 mg/kg).

Les injections de 5-CT et de SB-269970 sont réalisées en intrapéritonéale. L'injection du composé SB-269970 se fait 30 min avant celle de la 5-CT. Chaque groupe comporte 9 animaux. Les dosages sont effectués par un kit ELISA pour l'IL-6 (rat IL-6 Quantikine, R&D Systems) et par un kit RIA pour l'ACTH et la corticostérone (ACTH RIA, DiaSorin ; rat corticostérone RIA, MP Biomedicals GmbH).

** p = 0.01 comparé à 5-CT (3 mg/kg) seule.

2.4. Discussion

Nous avons montré que l'administration de 5-CT (3 mg/kg, i.p.) induit une augmentation marquée du taux plasmatique d'IL-6 après 1 h de traitement chez le rat. Cet effet disparaît après 6 h de traitement. L'effet de la 5-CT sur le taux plasmatique d'IL-6 au temps 1 h, disparaît lorsque les rats sont pré-traités par le composé SB-269970. Ce résultat suggère fortement que cet effet est médié par le récepteur 5-HT₇, puisque le composé SB-269970 est un antagoniste sélectif de ce récepteur (Lovell *et al.*, 2000; Hagan *et al.*, 2000). Il possède en effet un profil de très haute sélectivité, vis-à-vis des autres récepteurs de la 5-HT (> 250 fois), à l'exception du récepteur 5-HT_{5A} vis-à-vis duquel la sélectivité n'est que de 50 fois, et d'une cinquantaine d'autres récepteurs et canaux ioniques (Lovell *et al.*, 2000).

La 5-CT est également un agoniste du récepteur 5-HT_{1A}. Or il est connu que l'activation de ce récepteur induit une augmentation des taux plasmatiques circulant des hormones de stress (ACTH, corticostérone) par activation centrale de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénal chez le rat (Critchley *et al.*, 1994). Il a été décrit que l'administration systémique de 5-CT entraîne une augmentation du taux plasmatique d'ACTH chez le rat, qui n'est cependant pas sensible à l'antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}, WAY-100635 (Jørgensen *et al.*, 1999). Nous avons montré que l'augmentation des taux d'ACTH et de corticostérone induite par l'administration de 5-CT (3 mg/kg, i.p.) n'est pas modifiée significativement par le composé SB269970, et n'est donc probablement pas médiée par le récepteur 5-HT₇, à la différence de l'augmentation du taux d'IL-6.

Il y a donc clairement une dissociation entre les effets de la 5-CT sur le taux plasmatique d'IL-6 (probablement médiés par le récepteur 5-HT₇) et sur les taux plasmatiques des hormones de stress, ACTH et corticostérone (non-médiés par le récepteur 5-HT₇, peut-être par le récepteur 5-HT_{1A} ou un autre récepteur). Cette observation est quelque peu inattendue du fait que l'IL-6 est réputé être un stimulant puissant de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénal (Dunn, 2000) et que par conséquent les effets sur l'IL-6, l'ACTH et la corticostérone devraient s'inscrire dans une séquence de cause à effet.

L'origine de l'IL-6 plasmatique stimulée par la 5-CT chez le rat reste hypothétique. On peut incriminer au premier chef les cellules immunitaires (monocytes, macrophages), circulantes ou résidents, qui sont les principales sources d'IL-6. Ainsi, l'ARNm du récepteur 5-HT₇ a été identifié dans la rate, le thymus et les lymphocytes de rat (Stefulj *et al.*, 2000). Cet ARNm a aussi été détecté dans les cellules vasculaires endothéliales (Ullmer *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1999) qui sont capables de synthétiser l'IL-6 (Sironi *et al.*, 1989). L'effet de la

5-CT pourrait même être central pour une part. La 5-CT n'a pas un indice élevé de pénétration dans le cerveau. Cependant elle a des effets hypothermiants probablement d'origine centrale (Hagan *et al.*, 2000). Il ne faut pas oublier non plus que certaines régions de l'hypothalamus, par exemple l'éminence médiane, sont situées en dehors de la barrière hémato-encéphalique.

En conclusion, nous avons montré qu'il existe un lien entre la stimulation du récepteur 5-HT₇ et l'augmentation de la production d'IL-6 *in vivo*. Des expériences complémentaires sont toutefois nécessaires pour identifier le siège de cet effet.

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSION-PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de la thèse était de montrer que l'activation du récepteur 5-HT₇ pouvait induire la synthèse de l'IL-6. Nous avons décidé dans un premier temps de le montrer *in vitro* dans deux modèles de cellules gliales : des glioblastomes humains en tant que modèles d'astrocytes et les cellules MC-3 en tant que modèles de microglies. Ces modèles d'études sont des lignées cellulaires et sont donc facilement cultivables. Ensuite, nous avons décidé de confirmer ces résultats sur des modèles plus physiologiques : tout d'abord sur divers cultures primaires d'astrocytes de rat puis directement *in vivo* chez le rat.

A. Choix des modèles cellulaires d'étude *in vitro*

1) Astrocytes

Nous avons décidé de travailler sur des astrocytes car il a déjà été montré que les astrocytes primaires de rat expriment de façon fonctionnelle le récepteur 5-HT₇ (Shimizu *et al.*, 1996; Hirst *et al.*, 1997) ainsi que les astrocytes humains (Cohen *et al.*, 1999). De plus, les astrocytes expriment et libèrent de l'IL-6. Ainsi, les astrocytes constituent de bons modèles d'étude de la relation cherchée entre activation du récepteur 5-HT₇ et synthèse de l'IL-6.

Dans un premier temps, les glioblastomes humains nous apparaissaient être de bon modèles d'astrocytes car ils sont facilement cultivables comparés à des astrocytes primaires pour déterminer si l'activation du récepteur 5-HT₇ peut entraîner une augmentation de l'expression et de la libération de l'IL-6. Par contre, nous n'avons aucune donnée bibliographique quant à l'expression de ce récepteur dans ces lignées de glioblastomes humains.

Les glioblastomes humains, étant des lignées tumorales, peuvent présenter des mutations dans leur phénotype de départ, ainsi il nous a semblé nécessaire de travailler, par la suite, avec des modèles plus physiologiques d'astrocytes. En collaboration avec le laboratoire du Pr. Otten (Département de Physiologie, Université de Bâle), nous avons eu à disposition des cultures primaires d'astrocytes issus du cortex frontal et d'hippocampe de rat. Shimizu *et al.*, en 1996, ont montré l'expression du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes du cortex frontal et l'hippocampe constitue l'une des régions du SNC exprimant le plus ce récepteur.

2) Microglies

Les microglies, étant les macrophages résidents du SNC, constituent la principale source d'IL-6 du SNC. Par contre, aucune donnée bibliographique ne mentionne l'expression du récepteur 5-HT₇ dans ces cellules.

Nous avons décidé de travailler avec une lignée cellulaire de microglies humaines nommées MC-3 (Janabi *et al.*, 1995). Ces cellules proviennent de culture primaires de microglies immortalisées par l'antigène T du virus SV40, elles sont donc facilement cultivables. De plus, elles secrètent de grandes quantités d'IL-6. Toutes ces données nous ont conduit à utiliser ces cellules comme modèles de microglies.

B. Principaux résultats

Les résultats de ce travail de thèse ont permis la mise en évidence : 1)- de modèles d'étude du récepteur 5-HT₇ dans les cellules gliales, 2)- de la présence, pour la première fois, du récepteur 5-HT₇ dans les microglies humaines et 3)- d'une relation entre stimulation du récepteur 5-HT₇ et induction de l'IL-6 *in vitro* et *in vivo*, un phénomène non décrit jusqu'ici.

1) Identification de modèles d'étude du récepteur 5-HT₇ dans les cellules gliales.

La mise en évidence de l'expression du récepteur 5-HT₇ dans diverses lignées de glioblastomes humains (U-373 MG, U-138 MG, U-87 MG, DBTRG-05MG, T98G, H4, CCF-STTG1 et Hs 683) permet l'utilisation de ces lignées cellulaires comme modèles d'étude de ce récepteur dans les astrocytes, comme le sont les glioma C6 de rat pour le récepteur 5-HT_{2A} (Elliott *et al.*, 1995). Ces 8 lignées de glioblastomes humains constituent les premiers modèles humains d'étude du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes. De même, la lignée cellulaire MC-3, exprimant le récepteur 5-HT₇, constitue le premier modèle d'étude de ce récepteur dans les microglies.

Comme développé dans l'introduction de cette thèse, les astrocytes et les microglies constituent des populations cellulaires exerçant des rôles primordiaux dans le cerveau en développement mais également dans son bon fonctionnement et le maintien de son intégrité. De plus, des dysfonctionnements de ces cellules pourraient être délétères pour le SNC. Ainsi, le récepteur 5-HT₇, du fait de sa présence dans ces cellules, pourrait jouer un rôle majeur aussi

bien bénéfique que pathologique pour le SNC (suite par exemple à une mauvaise régulation). Par conséquent, l'utilisation de ces modèles cellulaires permettra une première approche quant à l'identification des fonctions du récepteur 5-HT₇ dans les astrocytes et les microglies.

Un autre modèle d'astrocyte a été caractérisé pour l'étude du récepteur 5-HT_{2A}, il s'agit des glioma C6 de rat (Elliott *et al.*, 1995). Ces cellules ont permis de mettre en évidence l'effet stimulateur, suite à l'activation du récepteur 5-HT_{2A}, sur l'expression du BDNF (Meller *et al.*, 2002a) et sur la libération du glutamate dans les astrocytes (Meller *et al.*, 2002b).

D'autres lignées cellulaires exprimant le récepteur 5-HT₇ ont déjà été identifiées et sont utilisées comme modèles d'un type cellulaire. Le premier modèle caractérisé sont les cellules GT1-1 : ce sont des lignées cellulaires neuronales d'origine hypothalamique sécrétant la LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone). Ce modèle a permis de caractériser le récepteur 5-HT₇ comme médiateur de l'effet stimulateur de la sérotonine sur la libération de la LHRH (Héry *et al.*, 1997). Plus récemment, un modèle pour l'étude de ce récepteur dans les cellules épithéliales de la cornée humaine a été développé : les cellules CEPI-17-CL4 (Crider *et al.*, 2003), mais aucun rôle n'a pour l'instant été mis en évidence pour ce récepteur dans ces cellules.

Bien que ces modèles soient des lignées cellulaires immortalisées ou issues de tumeurs, pouvant ainsi contenir diverses mutations dans leur phénotype, elles constituent tout de même un matériel biologique natif, facilement utilisable et cultivable, permettant de nombreuses et multiples études préalables ne nécessitant pas de sacrifices animaux inutiles.

2) Présence du récepteur 5-HT₇ dans les microglies humaines.

C'est la première fois que le récepteur 5-HT₇ est mis en évidence dans des microglies. Aucun récepteur sérotoninergique n'avait, jusqu'à présent, été trouvé exprimé dans des microglies. Par contre, d'autres récepteurs aux neurotransmetteurs ont déjà été caractérisés, comme mentionné dans l'introduction. C'est le cas des récepteurs adrénergiques, GABAergiques, glutamatergiques, purinergiques, nicotiques, à l'adénosine, à la somatostatine, aux bradykinines, à la substance P, au VIP, au PACAP, aux prostaglandines et aux opiacés. Certains de ces récepteurs ont été trouvés impliqués dans la régulation de cytokines.

Cela pourrait constituer de nouvelles fonctions pour le récepteur 5-HT₇ notamment dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'inflammation. Ces résultats seraient

bien-sûr à confirmer sur des modèles plus physiologiques, notamment sur des microglies en cultures primaires.

3) Relation entre stimulation du récepteur 5-HT₇/induction de l'IL-6.

Le principal résultat de cette thèse est la mise en évidence du rôle stimulateur du récepteur 5-HT₇ sur la production de l'IL-6. Ceci a été montré tout d'abord *in vitro* sur 2 types de cellules gliales humaines : des glioblastomes et une lignée de microglies. Dans les glioblastomes, l'activation du récepteur 5-HT₇ entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et de la libération de celle-ci (voir publication n°2). Par contre dans les microglies, nous n'avons pu observer qu'une stimulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 suite à l'activation du récepteur 5-HT₇ (voir publication n°3). Ces résultats n'ont pu être confirmés sur divers astrocytes de rat en cultures primaires, probablement parce que le niveau d'expression des récepteurs 5-HT₇ fonctionnels est trop bas. Mais, nous avons pu montré *in vivo*, un lien de cause à effet entre l'activation du récepteur 5-HT₇ et la production de l'IL-6, visualisé par une augmentation de la concentration plasmatique de l'IL-6 chez le rat.

Les travaux *in vitro* sur les divers modèles de cellules gliales ont permis la mise en évidence:

- d'une relation entre le niveau de fonctionnalité du récepteur 5-HT₇ dans les modèles de cellules gliales (AMPc) et le niveau de stimulation de l'expression et de la libération de l'IL-6.

- d'un seuil minimum de stimulation de l'AMPc entraînant une augmentation significative et quantifiable de l'accumulation de l'ARNm de l'IL-6 dans les divers modèles de cellules gliales.

- d'un seuil minimum de stimulation de l'ARNm de l'IL-6 conduisant à une augmentation significative et quantifiable de la libération et donc du contenu en IL-6 dans le surnageant de culture de ces cellules.

- Relation entre le niveau de fonctionnalité du récepteur 5-HT₇ dans les modèles de cellules gliales (AMPc) et le niveau de stimulation de l'expression et de la libération de l'IL-6.

Le niveau de fonctionnalité du récepteur 5-HT₇ est estimé par sa capacité à stimuler l'accumulation basale de l'AMPc, c'est-à-dire la valeur de l'E_{max} de la 5-CT. Ainsi, pour les

diverses lignées de glioblastomes, on peut établir un ordre de fonctionnalité de ce récepteur, de la plus importante à la plus faible, par rapport à la valeur de l' E_{max} obtenu : H4 > T98G > U-373MG ~ DBTRG-05MG > U-138MG > MC-3 > U-87MG \geq Hs 683 \geq CCF-STTG₁.

L'analyse comparative des résultats des expériences de dosage de l'accumulation de l'AMPc, de l'expression de l'ARNm et de la libération de l'IL-6 dans les glioblastomes et les microglies après traitement par 1 μ M de 5-CT montre clairement une relation entre le niveau de fonctionnalité du récepteur 5-HT₇ et l'efficacité de stimulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et sa sécrétion (tableau 5). Ainsi, l'ordre d'efficacité de stimulation de l'ARNm de l'IL-6 est le suivant : H4 \geq DBTRG-05MG > U-373MG > T98G > U-138MG > MC-3 > U-87MG et celui de la libération de l'IL-6 : H4 > U-373MG ~ DBTRG-05MG > T98G. A l'exception des cellules T98G, on retrouve une corrélation entre l'ordre de fonctionnalité du récepteur 5-HT₇ et son efficacité de stimulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et sa libération.

- Seuil minimum de stimulation de l'AMPc entraînant une augmentation significative et quantifiable de l'accumulation de l'ARNm de l'IL-6.

D'après le tableau 5, on observe en général, à l'exception des cellules DBTRG-05MG et U-87MG, que le niveau de stimulation de l'accumulation de l'AMPc après traitement par 1 μ M de 5-CT est supérieur à celui déterminé pour l'ARNm de l'IL-6. Ceci peut être expliqué soit par une différence de sensibilité entre les 2 méthodes de mesure, soit par le fait qu'il existe un seuil minimum d'augmentation cellulaire de l'AMPc capable d'entraîner une synthèse accrue significative du gène de l'IL-6. Ce seuil minimum effectif serait de 2 fois le basal en AMPc, à en juger par l'effet sur les cellules U-87MG. Ceci pourrait expliquer le fait que dans les astrocytes primaires de rat, on ne puisse observer de stimulation mesurable de l'accumulation de l'ARNm de l'IL-6 après stimulation du récepteur 5-HT₇, puisque la stimulation de l'AMPc est inférieure à 2 fois la valeur basale dans ce cas.

Une explication alternative serait une différence dans la régulation du gène de l'IL-6, qui serait propre à chaque cellule, étant donné que ces cellules sont issues de tumeurs ou immortalisées par des virus.

Nom des lignées	Taux d'augmentation de l'AMPc (nombre de fois le basal)	Taux d'augmentation de l'accumulation l'ARNm de l'IL-6 (nombre de fois le basal)	Taux d'augmentation de l'IL-6 secrétée (nombre de fois le basal)
Glioblastomes (astrocytes)			
H4	32.7 ± 0.9	14.9 ± 1.7	5.7 ± 1.2
U-373MG	9.5 ± 0.5	7.1 ± 2.4	2.6 ± 0.2
DBTRG-05MG	8.3 ± 0.3	12.5 ± 1.9	2.5 ± 0.2
T98G	12.9 ± 1.5	5.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3
U-138MG	7.6 ± 1.5	2.9 ± 0.1	[IL-6] < seuil détectabilité
U-87MG	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	non déterminé
CCF-STTG1	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	non déterminé
Hs 683	1.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	non déterminé
Microglies			
MC-3	3.4 ± 0.3	2.5 ± 0.1	pas de stimulation détectable

Tableau 5. Valeurs des taux d'augmentation du basal d'AMPc, de l'ARNm et de la sécrétion de l'IL-6 après traitement par 1 µM de 5-CT des différentes lignées humaines de glioblastomes et de microglies. Les valeurs sont exprimées en nombre de fois le basal. Traitements de 15 min pour la détermination de l'AMPc, d'1 h pour celle de l'ARNm de l'IL-6 et de 24 h pour celle de la libération de l'IL-6.

- *Seuil minimum de stimulation de l'ARNm de l'IL-6 conduisant à une augmentation significative et quantifiable de la libération de l'IL-6.*

De façon générale, le niveau d'augmentation cellulaire en ARNm de l'IL-6 est plus élevé que celui déterminé pour la libération de l'IL-6 après stimulation du récepteur 5-HT₇ par 1 µM de 5-CT (tableau 5). Les explications de cette observation peuvent être les mêmes que dans le cas précédent et le seuil minimum efficace entraînant une augmentation significative et mesurable de la libération de l'IL-6 serait de 5 fois le basal d'ARNm de l'IL-6, correspondant aux cellules T98G (tableau 5). C'est probablement la raison pour laquelle dans le cas des cellules MC-3, on ne peut mesurer d'augmentation de la libération de l'IL-6 après un traitement de 24 h par la 5-CT.

D'autres phénomènes peuvent également intervenir ; il s'agit de la stabilité de l'ARNm de l'IL-6, de l'efficacité de traduction de cet ARNm et de sécrétion de l'IL-6 dans le surnageant de culture, dépendantes sans doute de chacune des lignées cellulaires. De plus, la stabilité de l'IL-6 dans le surnageant de culture peut également jouer un rôle, avant prélèvement et mesure. En outre, le temps d'incubation avec la 5-CT (24 h) n'est peut-être pas celui après lequel on obtient le maximum de stimulation de la libération de l'IL-6 .

Les travaux de mesure *in vivo* de l'IL-6 plasmatique de rat montrent clairement une relation entre l'activation du récepteur 5-HT₇ et la production de l'IL-6. Par contre, on ne sait pas si cet effet est périphérique ou central. Ainsi, cette étude confirme que les résultats obtenus dans les modèles de cellules gliales ne sont pas dus au caractère tumoral ou immortel de ces cellules mais correspondent réellement à un phénomène physiologique. Par contre, l'étude *in vivo* n'exclut pas le fait que l'expression et/ou la fonctionnalité du récepteur 5-HT₇, étant plus importante(s) dans les glioblastomes que dans les astrocytes primaires de rat, soit dû au caractère tumoral de ces lignées cellulaires. Ce phénomène peut également être dû à un niveau différenciation différent entre les glioblastomes humains et les astrocytes primaires de rat ou à une variabilité inter-espèce. Nous avons testé d'autres glioblastomes humains : les cellules A-172 et U-118MG mais ces cellules n'expriment pas le récepteur 5-HT₇. Ce résultat permet, en partie, d'exclure le fait que l'expression de ce récepteur soit dû au caractère tumoral de ces lignées cellulaires.

Ce résultat met en lumière un nouveau rôle du récepteur 5-HT₇. Ce récepteur a déjà des fonctions neuroendocrines, notamment dans la régulation de la libération de l'aldostérone

par les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat (Contesse *et al.*, 1999), ainsi que dans celle de la libération de l'hormone LHRH dans des lignées cellulaires neuronales (Héry *et al.*, 1997). Mais, c'est la première fois que ce récepteur est montré impliqué dans la régulation d'une cytokine. En général, ce sont les récepteurs tyrosine-kinase qui modulent la libération des cytokines notamment de l'IL-6 (récepteurs de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IFN- γ en particulier) mais il a également été montré que les RCPG, dont certains récepteurs aux neurotransmetteurs, neuropeptides ou chimiokines, sont impliqués dans la production de l'IL-6 (voir introduction de cette thèse).

C. Implications thérapeutiques

Les implications thérapeutiques potentielles de ces résultats sont relativement importantes et variées:

1) Réponses immunitaire et inflammatoire / maladies autoimmunes

On a montré que le récepteur 5-HT₇ est présent dans les microglies et les astrocytes humains. Ces 2 types de cellules gliales exercent des fonctions immunitaires dans le SNC ; elles sont capables d'exprimer les antigènes du CMH de classe I et II ainsi que de présenter l'antigène *in vitro*. De plus, le récepteur 5-HT₇, capable de moduler la production de l'IL-6 par ces cellules, pourrait intervenir dans la régulation de la réponse immunitaire à l'intérieur du SNC. En effet, cette cytokine est impliquée dans l'activation, la différenciation et la prolifération des lymphocytes B et T ainsi que dans la régulation de la production d'anticorps par les lymphocytes B. En outre, étant donné les très fortes similitudes entre les microglies et la lignée des monocytes/macrophages, le récepteur 5-HT₇ pourrait également être exprimé dans ces cellules et réguler la réponse immunitaire dans l'ensemble de l'organisme en modulant la libération de l'IL-6.

Des dérèglements dans la production de l'IL-6 seraient à l'origine de plusieurs maladies chroniques telles que les maladies autoimmunes et inflammatoires, comme par exemple l'arthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer, la méningite ou encore la sclérose en plaques. Ainsi, une sur-expression ou une mauvaise régulation du récepteur 5-HT₇ pourrait être à l'origine de ces pathologies.

2) Oncologie

Il a été montré que l'IL-6 agirait de façon autocrine sur la génèse et la prolifération tumorale. Ainsi, comme le récepteur 5-HT₇ est plus exprimé dans les glioblastomes que dans les astrocytes primaires et est impliqué dans la modulation de la production de l'IL-6, il se pourrait qu'une augmentation de l'expression de ce récepteur participe au phénomène de cancérisation.

Par conséquent, un inhibiteur spécifique du récepteur 5-HT₇ pourrait constituer un agent anticancéreux potentiel dans certaines tumeurs.

3) Maladies psychiatriques et neurodégénératives

Les résultats sont encore trop préliminaires pour confirmer l'implication du récepteur 5-HT₇ dans les maladies neurologiques. Comme mentionné dans l'introduction de cette thèse, l'IL-6 serait impliquée dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose en plaques et de la dépression.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis l'identification de plusieurs lignées de glioblastomes humains et d'une lignée de microglies humaines exprimant de façon fonctionnelle le récepteur 5-HT₇. Ces cellules constituent les premiers modèles humains d'étude de ce récepteur dans les cellules gliales. Dans les glioblastomes humains, l'activation du récepteur 5-HT₇ entraîne une stimulation de l'expression de l'ARNm et de la libération de l'IL-6, alors que dans la lignée de microglies, ce récepteur activé induit seulement l'expression de l'ARNm de l'IL-6. Même si cette relation entre la stimulation du récepteur 5-HT₇ et l'induction ne semble pas être aussi facile à établir dans les astrocytes primaires de rat, elle existe cependant *in vivo* chez le rat. Il reste à savoir dans quel tissu/type cellulaire, l'augmentation du taux plasmatique de l'IL-6 consécutive à la stimulation du récepteur 5-HT₇ prend place. Néanmoins, la découverte d'un lien de cause à effet entre stimulation du récepteur 5-HT₇ et induction d'IL-6 suggère que ce récepteur pourrait devenir une cible thérapeutique dans des domaines aussi variés que l'inflammation, l'immunologie, la cancérologie où l'IL-6 joue un rôle majeur, et peut-être dans d'autres comme la psychiatrie où des dérèglements de l'IL-6 ont été signalés.

Les perspectives de ce travail pourraient être les suivantes :

- Confirmer les résultats obtenus dans les glioblastomes sur des astrocytes primaires d'hypothalamus de rat (en effet, d'après les travaux de Hirst *et al.*, en 1997, ce sont les astrocytes de rat qui expriment le plus efficacement le récepteur 5-HT₇) et sur des astrocytes primaires humains.
- Confirmer la présence du récepteur 5-HT₇ dans des microglies de rat et humaines en cultures primaires.
- Etudier l'expression du récepteur 5-HT₇ dans des monocytes, macrophages ou lymphocytes et voir son effet sur la production de l'IL-6 par ces cellules ; cela permettrait de savoir si ce récepteur est aussi impliqué dans la réponse immunitaire dans l'ensemble de l'organisme et pas seulement dans le SNC.
- Dans le traitement *in vivo* sur rat : savoir si l'effet de la 5-CT est périphérique et/ou central en : 1)-identifiant le ou les types cellulaires responsables de l'augmentation plasmatique de l'IL-6, 2)-mesurant le taux de l'IL-6 dans le liquide céphalo-rachidien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Aberg M.A.I., Aberg N.D., Hedbacker H., Oscarsson J., Eriksson P.S. (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **20**, 2896-2903.

Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489-27494.

Aloisi F. (2001). Immune fonction of microglia. *Glia*, **36**, 165-179.

Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2129-42.

Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.*, **22**, 208-215.

Araque A., Perea G. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*, **47**, 241-248.

Arunlakshana O., Schild H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **14**, 48-58.

Azmitia E.C., Gannon P.J., Kheck N.M., Whitaker-Azmitia P.M. (1996). Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacol.*, **14**, 35-46.

B

Bacon W.L., Beck S.G. (2000). 5-Hydroxytryptamine₇ receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 672-679.

Baker L.P., Nielsen M.D., Impey S., Metcalf M.A., Poser S.W., Chan G., Obrietan K., Hamblin M.W., Storm D.R. (1998). Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT_{7A} receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17469-17476.

Bard J.A., Zgombick J., Adham N., Vaysse P., Branchek T.A., Weinshank R.L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23422-23426.

Barden N. (2003). Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J. Psychiatry Neurosci.*, **29**, 185-193.

Barkhudaryan N., Dunn A.J. (1999). Molecular mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with special reference to serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neurochem. Res.*, **24**, 1169-1180.

Baker L.P., Nielsen M.D., Impey S., Metcalf M.A., Poser S.W., Chan G., Obrietan K., Hamblin M.W., Storm D.R. (1998). Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT_{7A} receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17469-17476.

Bard, J.A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T.A., Weinshank, R.L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23422-23426.

Beattie E.C., Stellwagen D., Morishita W., Bresnahan J.C., Ha B.K., Von Zastrow M., Beattie M.S., Malenka R.C. (2002). Control of Synaptic Strength by Glial TNF α . *Science*, **295**, 2282-2285.

Belenky M.A., Pickard G.E. (2001). Subcellular distribution of 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J. Compar. Neuro.*, **432**, 371-388.

Benveniste E.N., Huneycutt B.S., Shrikant P., Ballestas M.E. (1995). Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav. Immun.*, **9**, 304-314.

Bhalla P., Saxena P.R., Sharma H.S. (2002). Molecular cloning and tissue distribution of mRNA encoding porcine 5-HT₇ receptor and its comparison with the structure of other species. *Mol. Cell. Biochem.*, **238**, 81-88.

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

Bonaventure P., Nepomuceno D., Kwok A., Chai W., Langlois X., Hen R., Stark K., Carruthers N., Lovenberg T.W. (2002). Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT₇) receptor distribution using [³H]5-carboxamidotryptamine and [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT_{1A} knockout and 5-HT_{1A/1B} double-knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, 240-248.

Boucein C., Zacharias R., Farber K., Pavlovic S., Hanisch U.K., Kettenmann H. (2003). Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 2267-2276.

Briley M.S. (1985). Imipramine binding: its relationship with serotonin uptake and depression. In: *Neuropharmacology of Serotonin*. Eds. Green A. R., Oxford University Press, Oxford, 50-78.

C

Campbell I.L. (1998). Structural and functional impact of the transgenic expression of cytokines in the CNS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **840**, 83-96.

Campbell I.L. (2002). Cytokine-mediated inflammation and other actions in the central nervous system. Ernst Schering Res. Found. Workshop, **39**, 61-83.

Chapin E.M., Andrade R. (2001). A 5-HT₇ receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. I. Pharmacological characterization. J. Pharmacol. Exp. Ther., **297**, 395-402.

Chen Y.C., Prusoff W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol. **22**, 3099-3108.

Chio C.C., Chang Y.H., Hsu Y.W., Chi K.H., Lin W.W. (2004). PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP. Cell Signal., **16**, 565-575.

Clemett D.A., Cockett M.I., Marsden C.A., Fone K.C. (1998). Antisense oligonucleotide-induced reduction in 5-hydroxytryptamine₇ receptors in the rat hypothalamus without alteration in exploratory behaviour or neuroendocrine function. J. Neurochem., **71**, 1271-1279.

Cohen Z., Bouchelet I., Olivier A., Villemure J.G., Ball R., Stanimirovic D.B., Hamel E. (1999). Multiple microvascular and astroglial 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human brain: molecular and pharmacologic characterization. J. Cereb. Blood Flow Metabol., **19**, 908-917.

Contesse V., Lenglet S., Grumolato L., Anouar Y., Lihmann I., Lefebvre H., Delarue C., Vaudry H. (1999). Pharmacological and molecular characterization of 5-hydroxytryptamine₇ receptors in the rat adrenal gland. Mol. Pharmacol., **56**, 552-561.

Cook S.J., McCormick F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. Science, **262**, 1069-1072.

Coppen A. (1969). Defects in monoamine metabolism and their possible importance in the pathogenesis of depressive syndromes. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.*, **72**, 173-180.

Crider J.Y., Williams G.W., Drace C.D., Katoli P., Senchyna M., Sharif N.A. (2003). Pharmacological characterization of a serotonin receptor (5-HT₇) stimulating cAMP production in human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 4837-4844.

Critchley D.J., Childs K.J., Middlefell V.C., Dourish C.T. (1994). Inhibition of 8-OH-DPAT-induced elevation of plasma corticotrophin by the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635. *Eur. J. Pharmacol.*, **264**, 95-97.

D

Dawson T.M., Wamsley J.F. (1983). Autoradiographic localization of [³H]imipramine binding sites: Association with serotonergic neurons. *Brain Res. Bull.*, **11**, 325-334.

Delgado M., Leceta J., Ganea D. (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J. Leukoc. Biol.*, **73**, 155-164.

Dong Y., Benveniste E. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, **36**, 180-190.

Dunn A.J. (2000). Cytokine activation of the HPA axis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **917**, 608-617.

E

Edgar D.M., Miller J.D., Prosser R.A., Dean R.R., Dement W.C. (1993). Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J. Biol. Rhythms*, **8**, 17-31.

Eglen, R.M., Jasper, J.R., Chang, D.J., Martin, G.R. (1997). The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 104-107.

Ehlen J.C., Grossman G.H., Glass J.D. (2001). In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT₇ receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.*, **21**, 5351-5357.

Elliott J.M., Newberry N.R., Cholewinski A.J., Bartrup J.T., Briddon S.J., Carey J.E., Flanigan T.P., Newton R.A., Phipps S.L., Reavley A.C., Smith C., Wigmore M., Grahame-Smith D.G., Leslie R.A. (1995). Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor-activated cascade in rat C6 glioma cells. *Neuroscience*, **69**, 1119-1131.

Ernst M., Jenkins B.J. (2004). Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet.*, **20**, 23-32.

Errico M., Crozier R.A., Plummer M.R., Cowen D.S. (2001). 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, **102**, 361-7.

F

Feindt J., Schmidt A., Mentlein R. (1998). Receptors and effects of the inhibitory neuropeptide somatostatin in microglial cells. *Mol. Brain Res.*, **60**, 228-233.

Fiebich B.L., Biber K., Lieb K., van Calker D., Berger M., Bauer J., Gebicke-Haerter P.J. (1996). Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A_{2a}-receptors. *Glia*, **18**, 152-160.

Fiebich B.L., Hull M., Lieb K., Gyufko K., Berger M., Bauer J. (1997). Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J. Neurochem.*, **68**, 704-709.

Fink G., Sumner B.E., McQueen J.K., Wilson H., Rosie R. (1998). Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 764-775.

Forbes I.T., Dabbs S., Duckworth D.M., Jennings A.J., King F.D., Lovell P.J., Collin L., Hagan J.J., Middlemiss D.N., Riley G.J., Thomas D.R., Upton N. (1998). (R)-3,N-dimethyl-

N-[1-methyl-3-(4-methyl-piperidinyl-1-yl)propyl]benz磺amide: The first selective 5-HT₇ antagonist. *J. Med. Chem.*, **41**, 655-657.

Forbes I.T., Douglas S., Gribble A.D., Ife R.J., Lightfoot A.P., Garner A.E., Riley G.J., Jeffrey P., Stevens A.J., Stean T.O., Thomas D.R. (2002). SB-656104-A: a novel 5-HT₇ receptor antagonist with improved in vivo properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3341-3344.

Forbes I.T., Cooper D.G., Dodds E.K., Douglas S.E., Gribble A.D., Ife R.J., Lightfoot A.P., Meeson M., Campbell L.P., Coleman T., Riley G.J., Thomas D.R. (2003). Identification of a novel series of selective 5-HT₇ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1055-1058.

Frei K., Fredrikson S., Fontana A., Link H. (1991). Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, **31**, 147-153.

Frommberger U.H., Bauer J., Haselbauer P., Fraulin A., Riemann D., Berger M. (1997). Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **247**, 228-233.

Furchgott R.F. (1972). The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory, in *Catecholamines* (Blaschko H. and Muscholl E. eds). pp283-335, Springer Verlag, Berlin.

G

Gadient R.A., Otten U.H. (1997). Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog. Neurobiol.*, **52**, 379-90.

Gershon M., Tamir R. (1984). Serotonectin and the family of proteins that binds serotonin. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3115-3118.

Gill C.H., Soffin E.M., Hagan J.J., Davies C.H. (2002). 5-HT₇ receptors modulate synchronized network activity in rat hippocampus. *Neuropharmacology*, **42**, 82-92.

Gjertsen B.T., Mellgren G., Otten A., Maronde E., Genieser H.G., Jastorff B., Vintemylr O.K., McKnight G.S., Doskeland S.O. (1995). Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. Basal cAMP-kinase activity modulates interleukin-1 beta action. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20599-20607.

Goaillard J.M., Vincent P. (2002). Serotonin suppresses the slow afterhyperpolarization in rat intralaminar and midline thalamic neurones by activating 5-HT₇ receptors. *J. Physiol.*, **541**, 453-465.

Goswami S., Gupta A., Sharma S.K. (1995). Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J. Neurochem.*, **71**, 1837-1845.

Gottschall P.E., Tatsuno I., Arimura A. (1994). Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Res.*, **637**, 197-203.

Graveleau C., Paust H.J., Schmidt-Grimminger D., Mukhopadhyay A.K. (2000). Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1277-1286.

Grimaldi M., Pozzoli G., Navarra P., Preziosi P., Schettini G. (1994). Vasoactive intestinal peptide and forskolin stimulate interleukin 6 production by rat cortical astrocytes in culture via a cyclic AMP-dependent, prostaglandin-independent mechanism. *J. Neurochem.*, **63**, 344-350.

Gruol D.L., Nelson T.E. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.*, **15**, 307-339.

Gustafson E.L., Durkin M.M., Bard J.A., Zgombick J., Branchek T.A. (1996). A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *Br J. Pharmacol.*, **117**, 657-666.

H

Hagan, J.J., Price, G.W., Jeffrey, P., Deeks, N.J., Stean, T., Piper, D., Smith, M.I., Upton, N., Medhurst, A.D., Middlemiss, D.N., Riley, G.J., Lovell, P.J., Bromidge, S.M., Thomas, D.R. (2000). Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 539-548.

Hansen T.V.O., Rehfeld J.F., Nielsen F.C. (2000). Function of the C-36 to T polymorphism in the human cholecystokinin gene promoter. *Mol. Psychiatry*, **5**, 443-447.

Heck S., Lezoualc'h F., Engert S., Behl C. (1999). Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9828-9835.

Hedlund P.B., Danielson P.E., Thomas E.A., Slanina K., Carson M.J., Sutcliffe J.G. (2003). No hypothermic response to serotonin in 5-HT₇ receptor knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1375-1380.

Heese K., Hock C., Otten U. (1998). Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J. Neurochem.*, **70**, 699-707.

Heidmann, D.E.A., Metcalf, M.A., Kohen, R., Hamblin, M.W. (1997). Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J. Neurochem.*, **68**, 1372-1381.

Hemedah M., Coupar I.M., Mitchelson F.J. (1999). [³H]-Mesulergine labels 5-HT₇ sites in rat brain and guinea-pig ileum but not rat jejunum. *Br. J. Pharmacol.* 1999, **126**, 179-88.

Hertz L., Tamir H. (1981). Some properties of an astrocytic protein fraction that binds serotonin. *J. Neurochem.*, **37**, 1331-1334.

Héry M., Francois-Bellan A.M., Hery F., Deprez P., Becquet D. (1997). Serotonin directly stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from GT1 cells via 5-HT₇ receptors. *Endocrine*, **7**, 261-265.

Hirst W.D., Price G.W., Rattray M. & Wilkin G.P. (1997). Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 509-515.

Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena F.R., Humphrey P.P.A. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.*, **46**, 157-243.

Hu S., Peterson P.K., Chao C.C. (1998). Kappa-opioid modulation of human microglial cell superoxide anion generation. *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 285-288.

Huneycutt B.S., Benveniste E.N. (1995). Regulation of astrocyte cell biology by the cAMP/protein kinase A signaling pathway. *Adv. Neuroimmunol.*, **5**, 261-269.

I

Inoue M., Kitazawa T., Cao J., Taneike T. (2003). 5-HT₇ receptor-mediated relaxation of the oviduct in nonpregnant proestrus pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, **461**, 207-18.

J

Jacobs B.L., Azmitia E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, **72**, 165-229.

Janabi N., Peudenier S., Heron B., Ng K.H., Tardieu M. (1995). Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci. Lett.*, **195**,105-108.

Jasper J.R., TO Z.P., Kosaka A., Eglén R.M., Chang D.J. (1997). Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7(b)}). *Br. J. Pharmacol.* **122**, 126-132.

Jones B.J., Blackburn T.P. (2002). The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **71**, 555-568.

Jorgensen H., Knigge U., Kjaer A., Warberg J. (1999). Adrenocorticotrophic hormone secretion in rats induced by stimulation with serotonergic compounds. *J. Neuroendocrinol.*, **11**, 283-290.

K

Kalkman H.O., Engel G., Hoyer D. (1986). Inhibition of 5-carboxamidotryptamine-induced relaxation of guinea-pig ileum correlates with [¹²⁵I]LSD binding. *Eur. J. Pharmacol.*, **129**, 139-145.

Kawasaki H., Springett G.M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D.E., Graybiel A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, **282**, 2275-2279.

Kiecolt-Glaser J.K., Preacher K.J., MacCallum R.C., Atkinson C., Malarkey W.B., Glaser R. (2003). Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 9090-9095.

Kikuchi C., Nagaso H., Hiranuma T., Koyama M. (1999). Tetrahydrobenzindoles: selective antagonists of the 5-HT₇ receptor. *J. Med. Chem.*, **42**, 533-535.

Kikuchi C., Hiranuma T., Koyama M. (2002). Tetrahydrothienopyridylbutyl-tetrahydrobenzindoles: new selective ligands of the 5-HT₇ receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2549-2552.

Kikuchi C., Suzuki H., Hiranuma T., Koyama M. (2003). New tetrahydrobenzindoles as potent and selective 5-HT₇ antagonists with increased In vitro metabolic stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 61-64.

Kimelberg H.K. (1995). Receptors on astrocytes--what possible functions? *Neurochem. Int.*, **26**, 27-40.

Kiriya Y., Murayama T., Tokumitsu Y., Nomura Y. (1997). Protein kinase A-dependent IL-6 production induced by calcitonin in human glioblastoma A172 cells. *J. Neuroimmunol.*, **76**, 139-144.

Kitazawa T., Kubo O., Satoh M., Taneike T. (1998). Involvement of 5-hydroxytryptamine₇ receptors in inhibition of porcine myometrial contractility by 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 173-182.

Kogan H.A., Marsden C.A., Fone K.C. (2002). DR4004, a putative 5-HT₇ receptor antagonist, also has functional activity at the dopamine D₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **449**, 105-111.

Kreutzberg G.W. (1995). Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung*, **45**, 357-360.

Krobert A.K., Bach T., Syversveen T., Kvingedal A.M., Levy F.O. (2001). The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterisation of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **363**, 620-632.

Krobert A.K., Levy F.O. (2002). The human 5-HT₇ serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1563-1571.

Kubera M., Kenis G., Bosmans E., Zieba A., Dudek D., Nowak G., Maes M. (2000). Plasma levels of interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist in depression: comparison between the acute state and after remission. *Pol. J. Pharmacol.*, **52**, 237-241.

Kuhn S.A., van Landeghem F.K., Zacharias R., Farber K., Rappert A., Pavlovic S., Hoffmann A., Nolte C., Kettenmann H. (2004). Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. *Mol. Cell. Neurosci.*, **25**, 312-322.

Kumar S., Boehm J., Lee J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 717-726.

L

Laplante P., Diorio J., Meaney M.J. (2002). Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT₇ receptor. *Dev. Brain Res.*, **139**, 199-203.

Le Corre S., Sharp T., Young A.H., Harrison P.J. (1997). Increase of 5-HT₇ (serotonin-7) and 5-HT_{1A} (serotonin-1A) receptor mRNA expression in rat hippocampus after adrenalectomy. *Psychopharmacology*, **130**, 368-374.

Lee J.C., Young P.R. (1996). Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J. Leukoc. Biol.*, **59**, 152-157.

Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H, Contesse V. (2002). Activation of 5-HT₇ receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology*, **143**, 1748-1760.

Lewin R.M, Barde Y.A (1996). Physiology of neurotrophins. *Annu. Rev. of Neurosci.*, **19**, 289-317.

Licastro F., Pedrini S., Caputo L., Annoni G., Davis L.J., Ferri C., Casadei V., Grimaldi L.M. (2000). Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin

in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J. Neuroimmunol.*, **103**, 97-102.

Lieb K., Schaller H., Bauer J., Berger M., Schulze-Osthoff K., Fiebich B.L. (1998). Substance P and histamine induce interleukin-6 expression in human astrocytoma cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-IL-6. *J. Neurochem.*, **70**, 1577-1583.

Lin S.L., Johnson-Farley N.N., Lubinsky D.R., 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.

Liu J.P., Lauder J.M. (1992). S100 beta and insulin-like growth factor-II differentially regulate growth developing serotonin and dopamine neurons in vitro. *J. Neurosci. Res.*, **33**, 248-256.

Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, **25**, 402-408.

Lovell, P.J., Bromidge, S.M., Dabbs, S., Duckworth, D.M., Forbes, I.T., Jennings, A.J., King, F.D., Middlemiss, D.N., Rahman, S.K., Saunders, D.V., Collin, L.L., Hagan, J.J., Riley, G.J., Thomas, D.R. (2000). A novel, potent, and selective 5-HT₇ antagonist: (*R*)-3-(2-(2-(4-methylpiperin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol (SB-269970). *J. Med. Chem.*, **43**, 342-345.

Lovenberg, T.W., Baron B.M., De Lecea, L., Miller, J.D., Prosser, R.A., Rea, M.A., Foye, P.E., Racke, M., Slone, A.L., Siegel, B.W., Danielson, P.E., Sutcliffe, J.G., Erlander, M.G. (1993). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*, **11**, 449-458.

Lucchelli A., Santagostino-Barbone M.G. D'Agostino G., Masoero E., Tonini M. (2000). The interaction of antidepressant drugs with enteric 5-HT₇ receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **362**, 284-289.

M

Maes M., Meltzer H.Y., Bosmans E., Bergmans R., Vandoolaeghe E., Ranjan R., Desnyder R. (1995). Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J. Affect. Disord.*, **34**, 301-309.

Mahé C., Bernhard M., Bobirnac I., Keser C., Loetscher E., Feuerbach D., Dev K.K., Schoeffter P. (2004a). Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.*, **143**, 404-410.

Mahé C., Loetscher E., Feuerbach D., Müller W., Seiler M., Schoeffter P. (2004b). Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **495**, 97-102.

Maimone D., Cioni C., Rosa S., Macchia G., Aloisi F., Annunziata P. (1993). Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. *J. Neuroimmunol.*, **47**, 73-81.

Maizels E.T., Cottom J., Jones J.C., Hunzicker-Dunn M. (1998). Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, **139**, 3353-3356.

März P., Heese K., Dimitriades-Schmutz B., Rose-John S., Otten U. (1999). Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia*, **26**, 191-200.

Meller R., Babity J.M., Grahame-Smith D.G. (2002a). 5-HT_{2A} receptor activation leads to increased BDNF mRNA expression in C6 glioma cells. *NeuroMolecular Medicine*, **1**, 197-205.

Meller R., Harrison P.J., Elliott J.M., Sharp T. (2002b). In vitro evidence that 5-hydroxytryptamine increases efflux of glial glutamate via 5-HT_{2A} receptor activation. *J. Neurosci. Res.*, **67**, 399-405.

Merzak A., Koochekpour S., Fillion M.-P., Fillion G., Pilkington G.J. (1996). Expression of serotonin receptors in human fetal astrocytes and glioma cell lines: a possible role in glioma cell proliferation and migration. *Mol. Brain Res.*, **41**, 1-7.

Meyerhof W., Obermuller F., Fehr S., Richter D. (1993). A novel rat serotonin receptor: primary structure, pharmacology, and expression pattern in distinct brain regions. *DNA Cell Biol.*, **12**, 401-409.

Minghetti L., Polazzi E., Nicolini A., Creminon C., Levi G. (1997). Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in cultured microglia by prostaglandin E₂, cyclic AMP and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 934-940.

Mizuno K., Kanda Y., Kuroki Y., Nishio M., Watanabe Y. (2002). Stimulation of β_3 -adrenoceptors causes phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase via a stimulatory G protein-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 951-960.

Monje M.L., Toda H., Palmer T.D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, **302**, 1760-1765.

Mori K., Ozaki E., Zhang B., Yang L., Yokoyama A., Takeda I., Maeda N., Sakanaka M., Tanaka J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express α_1 , α_2 , β_1 and β_2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, **43**, 1026-1034.

Morrison R.S., Sharma A., de Vellis J., Bradshaw R.A. (1986). Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 7537-7541.

Mossner R., Heils A., Stober G., Okladnova O., Daniel S., Lesch K.-P. (1998). Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. *Neurochem. Int.*, **33**, 251-254.

Mullins U.L., Gianutsos G., Eison A.S. (1999). Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*, **21**, 352-367.

N

Nagata K., Nakajima K., Kohsaka S. (1993a). Plasminogen promotes the development of rat mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Dev. Brain Res.*, **75**, 31-37.

Nagata K., Takei N., Nakajima K., Saito H., Kohsaka S. (1993b). Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neurosci. Res.*, **34**, 357-363.

Nakajima K., Honda S., Tohyama Y., Imai Y., Kohsaka S., Kurihara T. (2001). Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J. Neurosci. Res.*, **65**, 322-331.

Nakajima K., Kohsaka S. (2004). Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.*, **4**, 65-84.

Navikas V., Matusевичius D., Soderstrom M., Fredrikson S., Kivisakk P., Ljungdahl A., Hojeberg B., Link H. (1996). Increased interleukin-6 mRNA expression in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, **64**, 63-69.

Neumaier J.F., Sexton T.J., Yracheta J., Diaz A.M., Brownfield M. (2001). Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J. Chem. Neuroanat.*, **21**, 63-73.

Nishiyama H., Knopfel T., Endo S., Itohara S. (2002a). Glial protein S100 β modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4037-4042.

Nishiyama H., Takemura M., Takeda T., Itohara S. (2002b). Normal development of serotonergic neurons in mice lacking S100 β . *Neurosci. Lett.*, **321**, 49-52.

Noda M., Nakanishi H., Nabekura J., Akaike N. (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci.*, **20**, 251-258.

Noda M., Kariura Y., Amano T., Manago Y., Nishikawa K., Aoki S., Wada K. (2004). Kinin receptors in cultured rat microglia. *Neurochem. Int.*, **45**, 437-442.

Norris J.G., Tang L.P., Sparacio S.M., Benveniste E.N. (1994). Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.*, **152**, 841-850.

Norum J.H., Hart K., Levy F.O. (2003). Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT_{4(b)} and 5-HT_{7(a)}. *J Biol Chem.*, **278**, 3098-104.

O

Ono K., Han J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.*, **12**, 1-13.

Otten U., März P., Heese K., Hock C., Kunz D., Rose-John S. (2001). Signals regulating neurotrophin expression in glial cells. *Prog. Brain Res.*, **132**, 545-554.

P

Pauli S., Linthorst A.C.E., Reul J.M.H.M. (1998). Tumour necrosis factor- α and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 868-883.

Plassat, J.L., Amlaiki, N., Hen, R. (1993). Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 229-236.

Poblete J.C., Azmitia E.C. (1995). Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT_{2A} receptor. *Brain Res.*, **680**, 9-15.

Porter J.T., McCarthy K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.*, **51**, 439-55.

Pousset F., Fournier J., Legoux P., Keane P., Shire D., Soubrie P. (1996). Effect of serotonin on cytokine mRNA expression in rat hippocampal astrocytes. *Mol Brain Res.*, **38**, 54-62.

R

Ransom B., Behar T., Nedergaard M. (2003). New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.*, **26**, 520-522.

Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **176**, 1243-1251.

Rapport M.M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin). V. The presence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.* **180**, 961-969.

Roberts A.J., Krucker T., Levy C.L., Slanina K.A., Sutcliffe J.G., Hedlung P.B. (2004). Mice lacking 5-HT₇ receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1913-1922.

de Rooij J., Zwartkruis F.J., Verheijen M.H., Cool R.H., Nijman S.M., Wittinghofer A., Bos J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477.

Roth B.L., Craigo S.C., Choudhary M.S., Uluer A., Monsma F.J. Jr., Shen Y., Meltzer H.Y., Sibley D.R. (1994). Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1403-1410.

Ruat M., Traiffor T.E., Leurs R., Tardivel-Lacombe J., Diaz J., Arrang J.M., Schwartz J.-C. (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 8547-8551.

S

Schildkraut J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, **122**, 509-522.

Schoeffter P., Ullmer C., Bobirnac I., Gabbiani G., Lubbert H. (1996). Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 993-994.

Schoeffter, P., Bobirnac, I., Boddeke, E., Hoyer, D. (1997). Inhibition of cAMP accumulation via recombinant human serotonin 5-HT_{1A} receptors: considerations on receptor effector coupling across systems. *Neuropharmacology* **36**, 429-437.

Schoeffter, P., Feuerbach, D., Bobirnac, I., Gazi, L., Longato, R. (1999). Functional, endogenously expressed corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF₁) and CRF₁ receptor mRNA expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Fund. Clin. Pharmacol.* **13**, 484-489.

Schulte G., Fredholm B.B. (2003). The G_s-coupled adenosine A_{2B} receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. *Exp. Cell Res.*, **290**, 168-176.

Schwaninger M., Neher M., Viegas E., Schneider A., Spranger M. (1997). Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J. Neurochem.*, **69**, 1145-1150.

Sébire G., Emilie D., Wallon C., Héry C., Devergne O., Delfraissy J.F., Galanaud P., Tardieu M. (1993). In vitro production of IL-6, IL-1 β , and tumour necrosis factor- α by human embryonic microglial and neural cells. *J. Immunol.*, **150**, 1517-1523.

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

Shimizu M., Nishida A., Zensho H., Yamawaki S. (1996). Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine₇ receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 1551-1558.

Shimizu M., Nishida A., Zensho H., Miyata M., Yamawaki S. (1997). Down-regulation of 5-hydroxytryptamine₇ receptors by dexamethasone in rat frontocortical astrocytes. *J. Neurochem.*, **68**, 2604-2609.

Shytle R.D., Mori T., Townsend K., Vendrame M., Sun N., Zeng J., Ehrhart J., Silver A.A., Sanberg P.R., Tan J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J. Neurochem.*, **89**, 337-343.

Singh V.K., Guthikonda P. (1997). Circulating cytokines in Alzheimer's disease. *J. Psychiatr. Res.*, **31**, 657-660.

Sironi M., Breviario F., Proserpio P., Biondi A., Vecchi A., Van Damme J., Dejana E., Mantovani A. (1989). IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.*, **142**, 549-553.

Slassi A., Methvin I., Xin T. (2004). Recent progress in 5-HT₇ receptors: potential treatment of central and peripheral nervous system diseases. *Expert Opin. Ther. Patents*, **14**, 1009-1027.

Sleight A.J., Carolo C., Petit N., Zwingelstein C., Bourson A. (1995). Identification of 5-hydroxytryptamine₇ receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 99-103.

Slezak M., Pfrieder F.W. (2003). New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.*, **26**, 531-535.

Song H., Stevens C.F., Gage F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, **417**, 39-44.

Stefulj J., Jernej B., Cicin-Sain L., Rinner I., Schauenstein K. (2000). mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain Behav. Immunity*, **14**, 219-224.

Stowe R.L., Barnes N.M. (1998). Selective labelling of 5-HT₇ receptor recognition sites in rat brain using [3H]5-carboxamidotryptamine. *Neuropharmacology*, **37**, 1611-1619.

Sun Y.X., Minthon L., Wallmark A., Warkentin S., Blennow K., Janciauskiene S. (2003). Inflammatory markers in matched plasma and cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **16**, 136-144.

T

Thomas D.R., Gittins S.A., Collin L.L., Middlemiss D.N., Riley G., Hagan J., Gloger I., Ellis C.E., Forbes I.T., Brown A.M. (1998). Functional characterisation of the human cloned 5-HT₇ receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. *Br. J. Pharmacol.*, **124**, 1300-1306.

Thomas D.R., Atkinson P.J., Hastie P.G., Roberts J.C., Middlemiss D.N., Price G.W. (2002). [3H]-SB-269970 radiolabels 5-HT₇ receptors in rodent, pig and primate brain tissues. *Neuropharmacology*, **42**, 74-81.

Thomas D.R., Melotto S., Massagrande M., Gribble A.D., Jeffrey P., Stevens A.J., Deeks N.J., Eddershaw P.J., Fenwick S.H., Riley G., Stean T., Scott C.M., Hill M.J., Middlemiss D.N., Hagan J.J., Price G.W., Forbes I.T. (2003). SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 705-714.

Thomas D.R., Hagan J.J. (2004). 5-HT₇ receptors. *Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord.*, **3**, 81-90.

To Z.P., Bonhaus D.W., Eglén R.M., Jakeman L.B. (1995). Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 107-116.

Tork I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **600**, 9-35.

Tsacopoulos M., Magistretti P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.*, **16**, 877-885.

Tsou, A.P., Kosaka, A., Bach, C., Zuppan, P., Yee, C., Tom, L., Alvarez, R., Ramsey, S., Bonhaus, D.W., Stefanich, E., Jakeman, L., Eglén, R.M., Chan, H.W. (1994). Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase. *J. Neurochem.*, **63**, 456-464.

Twarog B.M., Page I.H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.*, **175**, 157-161.

U

Ullmer C., Schmuck K., Kalkman H.O., Lubbert H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.*, **370**, 215-221.

V

Vallières L., Campbell I.L., Gage F.H., Sawchenko P.E. (2002). Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J. Neurosci.*, **22**, 486-492.

Vanhoenacker P., Haegeman G., Leysen J.E. (2000). 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 70-77.

Van Snick J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.*, **8**, 253-278.

Vossler M.R., Yao H. York R.D., Pan M.G., Rim C.S., Stork P.J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, **89**, 73-82.

W

Wang J., Dunn A.J. (1998). Mouse interleukin-6 stimulates the HPA axis and increases brain tryptophan and serotonin metabolism. *Neurochem. Int.*, **33**, 143-154.

Whitaker-Azmitia P.M., Clarke C., Azmitia E.C. (1993). Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse*, **14**, 201-205.

Woo M.S., Jung S.H., Hyun J.W., Kim H.S. (2004). Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine gene expression by forskolin and dibutyryl-cAMP in lipopolysaccharide-stimulated murine BV2 microglial cells. *Neurosci. Lett.*, **356**, 187-190.

Wooley D.F. (1968). Effects of manipulation of biogenic amine levels upon spinal cord reflexes. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **11**, 65-67.

Wu J., Dent P., Jelinek T., Wolfman A., Weber M.J., Sturgill T.W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, **262**, 1065-1069.

Y

Yau J.L., Noble J., Seckl J.R. (2001). Acute restraint stress increases 5-HT₇ receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*, **309**, 141-144.

Ying S.W., Rusak B. (1997). 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.*, **755**, 246-254.

Young S.N., Pihl R.O., Benkelfat C., Palmour R., Ellenbogen M., Lemarquand D. (1996). The effect of low brain serotonin on mood and aggression in humans. Influence of baseline mood and genetic factors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **398**, 45-50.

Z

Zhao B., Schwartz J.P. (1998). Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J. Neurosci. Res.*, **52**, 7-16.

Zhen X., Uryu K., Wang H.Y., Friedman E. (1998). D₁ dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 453-458.

Zheng M., Zhang S.J., Zhu W.Z., Ziman B., Kobilka B.K., Xiao R.P. (2000). β_2 -adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by G_i or G _{$\beta\gamma$} in adult mouse cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40635-40640.