THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2

Unité de recherche Institut de Génomique Fonctionnelle

La signalisation mTOR induite par le récepteur 5-HT$_6$ de la sérotonine comme nouvelle cible thérapeutique pour prévenir l'apparition des déficits cognitifs de la schizophrénie

Présentée par Angelina ROGLIARDO

Le 10 décembre 2021

Sous la direction de Carine BECAMEL

Devant le jury composé de

Julie Le MERRER, Directrice de recherche, INSERM U1253	Rapportrice
Pierre TRIFILIEFF, Chargé de recherche, INRAE UMR 1286	Rapporteur
Michel VIGNES, Professeur de Physiologie et Neurosciences à Université Montpellier 2	Président
Philippe MARIN, Directeur de Recherches, Institut de génomique fonctionnelle	Examinateur
Carine BECAMEL, Maitre de Conférences, Institut de génomique fonctionnelle	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Cette partie du manuscrit sera certainement la plus complexe à écrire, de nombreuses personnes ont fait de près ou de loin ce qu'est ma thèse et je souhaite les remercier de la façon la plus juste.

Tout d'abord, merci à vous membres du jury. A mes deux rapporteurs, Julie Le Merrer et Pierre Trifilieff pour le temps que vous accorderez à juger mon travail de thèse. Mais aussi à Marie-Odile Krebs et Michel Vignes d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous souhaite une belle lecture et j'ai hâte de pouvoir discuter de mon projet avec vous lors de la soutenance.

Alexander et Coralie l'avaient dit et je ne peux qu'être en accord avec eux, Carine tu es sincèrement la meilleure des directrices de thèse. Je ne pense pas que j'aurais pu avoir quelqu'un de mieux que toi pour m'épauler durant ces quatre années (et même avant !). Grâce à toi j'ai pu acquérir une rigueur scientifique et une confiance en moi tout au long de ma thèse. Tu m'as appris énormément, tu t'es toujours rendue disponible malgré ton emploi du temps titanesque (et c'est peu dire !) tout en me laissant une immense liberté, me permettant d'évoluer très rapidement et surtout à ma façon. Je pourrai écrire mille lignes et ce ne serait toujours pas suffisant pour te remercier à la hauteur de ce que cela devrait être... !

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'équipe Marin : Philippe merci pour votre accueil et ce dès mon stage de M1. Merci à tous les chercheurs de cette grande équipe, aux anciens thésards et surtout à ceux qui m'ont accompagné : Lulu, Vinc', Clemouche, parce que vous êtes de loin la meilleure des teams que ce soit pour le soutien au labo et (surtout) en dehors ! Merci pour ces doses de rires même quand ça pouvait être un peu compliqué, et à ces bières d'afterwork (quand c'était vraiment plus compliqué) ! Ma Lulu, cette joie de vivre explosive que tu as, cette gentillesse envers n'importe quel humain dont tu sais si bien faire preuve, ta présence et ton amitié ont fait de ces années fac et thèse un pur bonbon ! Vinc', quel gars sûr tu es, à nos discussions scientifiques un peu trop prises à cœur et surtout à nos soirées en dehors du lab à refaire le monde, à notre escapade à Lyon et nos sessions ski ! Clemouche, la plus dingue, ma meilleure des binômes du lab, ca y est c'est toi la dernière et dieu sait comme tu vas assurer ! Merci aussi à toi Anne, notre super ingé que ce soit pour le lab mais aussi pour m'avoir initié au yoga et donné ces cours après de trop longues journées !

Je tenais aussi à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse de m'avoir suivi ces dernières années : Frédérique Scamps (que j'ai aussi eu la chance d'avoir en tant qu'encadrante de stage M2), Tangui Maurice et Pierre François Mery. Nos discussions et votre engouement pour mon projet m'ont été très bénéfiques.

J'aimerais profondément remercier l'équipe de Philippe Rondard pour la collaboration que nous menons ensemble, merci de m'avoir fait confiance pour réaliser la partie comportement de votre étude Philippe. Merci à toi Mathieu, de bien avoir voulu que je participe à ton projet de thèse mais aussi pour ta joie de vivre, l'organisation du congrès GDR et ces bonnes soirées qui s'en sont suivies !

Je tiens également à remercier tous les stagiaires que j'ai pu encadrer, je pense que vous m'en avez plus appris que moi je ne l'ai fait et pour cela merci. Mehdi, alias midnight Fever, c'est à ton tour de

jouer, je te laisse la suite de ce magnifique projet et cette super encadrante. C'est difficile de me détâcher de tout ça mais j'ai une totale confiance en toi pour dompter ce poste de patch et mener d'une main de maître ton projet de thèse (il va peut être falloir appeler les gardiens pour me sortir de l'institut, mais on verra ça plus tard !!). En parlant de gardiens, merci à eux pour leur gentillesse, une mention spéciale à Henri et tous nos cafés/papotages quand on n'avait pas forcément envie de travailler les weekends ou jours fériés ;).

La team café, qu'est ce qu'aurait été ces années sans le fameux « caf de 8h du mat' ». Merci d'abord à toi Cécé, avec qui tous ces cafés ont commencé, merci d'avoir toujours eu les mots justes, d'avoir calmé ma folie et mes états de stress quand c'était nécessaire, merci pour ta passion pour la science et nos milliers de discussions professionnelles et personnelles. Merci aussi à Vincent, Clem, Lalou la Sorcière (la meilleure des sorcières, le meilleur des soutiens dans et en dehors du lab), Juri et Pola. Petite mention spéciale à ma Pola, à nos discussions enflammées derrière nos postes de patch, à notre passion commune (et passionnelle il faut se l'avouer) pour l'electrophy. Travailler à tes cotés a été une réelle joie même les jours où le patch ne fonctionnait pas (c'est pour dire !). Tu es humainement et scientifiquement incroyable.

Je me demande aussi comment j'aurais pu faire sans la super équipe animalerie ! Denis merci pour ce que tu m'as appris sur les souris mais surtout pour ta sympathie à mon égard. Steeve, que dire, que je n'aurais pas pu faire cette thèse sans toi ? C'est très certainement vrai, merci à toi d'être toujours là, d'avoir pris le relai quand je n'avais plus de cheville, d'avoir toujours la réponse à tout ou de faire en sorte d'en trouver une (mon départ va avoir un goût de vacances pour toi !). Merci aussi au reste de la team : Karim pour ta patience ; Maheva et Manon pour votre pep's et vos rires ; Michel et Luc pour votre aide (quasi chaque jour) et votre bonne humeur !

Pour finir sur le coté travail/labo, merci à tous les services communs sans qui rien ne serait réalisable !

Je me rends compte en écrivant ces quelques lignes, que durant ces années à l'institut j'ai rencontré des personnes très différentes, exceptionnelles, et qui pour certains sont devenus des amis et j'en suis très reconnaissante (la plupart de ces humains sont complètement fous, mais ne faut-il pas l'être quand on a pour passion les neurosciences !).

Enfin j'aimerais écrire quelques mots pour (tenter de) remercier ma famille. C'est une évidence, rien n'aurait été possible sans leur soutien en dehors du labo. Merci à mes parents, merci à ma mère qui m'a appris à me battre pour ce que je voulais, à ne rien lâcher, à rire de tout même (surtout) dans les moments difficiles mais avant tout à avancer un pas après l'autre ! Merci à ma petite sœur, la meilleure des personnes et surtout celle qui peu importe mes choix me soutiendra toujours (même si je soupçonne qu'elle pense que je suis folle !). Merci aussi à toi Emeline, qui est de ces amis si anciens qu'ils font partie de la famille, merci d'être présente depuis toujours, de ta motivation dans les moments plus compliqués et de réussir à me sortir la tête de la thèse quand c'est nécessaire. J'aimerais aussi te remercier ma Laura, sûrement la meilleure personne que je pouvais rencontrer à la fac, la seule qui a pleuré quand j'ai appris que j'avais une bourse de thèse et qui va sûrement pleurer le jour de la soutenance ! Merci de m'avoir écouté parler pendant des heures de mes manip' mais aussi pour nos moments de vies, merci d'être une des personnes les plus douces et gentilles sur cette terre et merci pour ton amitié sans faille. A toi aussi ma Chlobb, si on est arrivée jusqu'en thèse c'est surement grâce à nos heures de révisions ensemble, à ces fameux projets fictifs réalisés jusqu'au bout

de la nuit, mais surtout merci pour nos fous rires, nos moments de vie plus difficiles et nos discussions à n'en plus finir !

Pour terminer comment ne pas citer mes trois meilleurs copains des enfers, Touriste, Gabi et Ludo, qui je crois n'ont toujours pas compris pourquoi j'étais encore à l'école à 27ans mais qui sont toujours là pour me permettre de m'aérer l'esprit le temps de weekends à la campagne, d'un restau, d'une féria ou d'une soirée inoubliable sortie de nulle part !

Enfin, (oui je voulais faire des remerciements succinct mais je crois qu'une sorte de nostalgie s'est emparée de moi et qu'ils sont beaucoup plus longs que prévu, mais comme on dit « on a qu'une thèse » (ou presque) !), merci pour le soutien de la team rédaction Mist : Lulu et Julien (ainsi que le Broc café de Montpellier) pour la fin de l'écriture de ce manuscrit dans les rires et la bonne humeur (Julien je ne me souviendrai jamais de toutes tes maudites blagues désolée mais merci pour ces moments de fraicheur)!.
Et un merci, très spécial, à Monsieur Ours pour la relecture du manuscrit, pour le soutien culinaire, mental et j'en passe mais surtout merci pour cette future aventure qui s'offre à nous !

A noter : l'écriture de ce manuscrit n'aurait pu avoir lieu sans ces milliers de playlists écoutées et aurait eu une autre saveur sans les pauses ''Jeux olympiques'' de cet été, alors merci à tous ces artistes et ces athlètes. Ce fut un réel plaisir de l'écrire et j'ai espoir que ce soit aussi un plaisir de le lire.

A vous, à nous, à eux, à ils …

Résumé

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique d'origine neuro-développementale très invalidante, qui touche environ 1% de la population mondiale et dont le poids économique est très important. Elle est caractérisée par la présence d'un large spectre de symptômes cognitifs comme des troubles de l'attention et de la mémoire, l'incapacité à résoudre les problèmes du quotidien et la désocialisation. Les antipsychotiques actuellement disponibles traitent principalement les symptômes positifs et dans une moindre mesure les symptômes négatifs, mais ils sont inefficaces sur les symptômes cognitifs. Améliorer leur prise en charge reste donc un enjeu important et passe par la mise au point de traitements précoces capables d'enrayer la progression de la maladie. Des travaux précédents de mon équipe ont montré une activation non-physiologique de la voie mTOR dépendant du récepteur 5-HT_6 dans le cortex préfrontal. Ceci est à l'origine de déficits cognitifs dans des modèles murins neuro-développementaux de la pathologie. Sur la base de ces résultats, mon projet de thèse a eu pour objectifs de démontrer si un blocage précoce, durant l'adolescence, de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR permet de prévenir les altérations synaptiques et comportementales au stade adulte dans un modèle pharmacologique de la pathologie. Ainsi, nous avons montré que l'administration précoce d'antagonistes des récepteurs 5-HT_6 prévient la suractivation de la voie mTOR au niveau du CPF à l'âge adulte et les déficits cognitifs associés ainsi que les altérations de la transmission synaptique et des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF. Cette étude montre l'intérêt de repositionner les antagonistes du récepteur 5-HT_6, qui ont démontré une très bonne tolérance, comme traitements curatifs permettant de ralentir ou arrêter l'évolution de la schizophrénie à un stade précoce de la maladie et ainsi prévenir l'émergence des déficits cognitifs au stade adulte.

Abstract

Schizophrenia is a devastating mental disorder of neurodevelopmental origin, which affects ~1% of the population worldwide and represents a major socio-economic burden. It is characterized by a broad pattern of cognitive symptoms, including decreased attention, impaired memory, inaptitude to solve problems and alterations in social cognition. These deficits are poorly controlled by currently available antipsychotics which mainly reduce positive symptoms and, to a lesser extent, negative symptoms. Although improving symptomatic treatments remains an important goal, progress in disease management will likely require shift to novel modes of intervention initiated at an early stage of the disease in high-risk patients. Our team previously demonstrated that a sustained non-physiological activation of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) elicited by 5-HT_6 receptors in the prefrontal cortex mediates deficits in social cognition and episodic memory in two rodent developmental models of schizophrenia. Here, we propose a novel disease modifier strategy to prevent emergence of cognitive deficits at the adult stage, in the neonatal phencyclidine model of schizophrenia. This strategy is based on the early blockade of 5-HT_6 receptor-operated mTOR signaling during adolescence. We showed that early administration of a 5-HT_6 receptor antagonist prevents the overactivation of prefrontal cortical mTOR at the adult stage and the associated cognitive deficits as well as the alterations of synaptic transmission and modifications of intrinsic properties of layer V of pyramidal neurons. This study demonstrates the interest of repositioning 5-HT_6 receptor antagonists, which have shown good tolerance, as disease modifiers to alter the course of schizophrenia and prevent the emergence of cognitive deficits at early adulthood in at-risk individuals.

Table des matières

Introduction 23
Chapitre I : La Schizophrénie 25
A. Généralités 25
a. Epidémiologie et symptomatologie 25
1. Les symptômes positifs 25
2. Les symptômes négatifs 26
3. Les déficits cognitifs 26
b. Etiologie 27
1. Hypothèse génétique 27
2. Hypothèse environnementale 28
2.1 Première période de grande vulnérabilité : la gestation et la petite enfance 29
2.2 Deuxième période de grande vulnérabilité : l'adolescence 31
B. Hypothèses neurochimiques associées à la schizophrénie 35
a. Hypothèse dopaminergique 35
b. Hypothèse glutamatergique 36
c. Hypothèse sérotoninergique 38
C. Traitements actuellement disponibles 41
a. Les traitements pharmacologiques 41
1. Les antipsychotiques typiques 41
2. Les antipsychotiques atypiques 41
3. Les antipsychotiques de nouvelle génération 42
b. Les traitements psychologiques 42
1. La remédiation cognitive 43
2. Les thérapies cognitivo-comportementales 43
c. Approches complémentaires 43
1. Les thérapies électroconvulsives 43
2. Les thérapies de stimulations transcraniennes répétitives 44
3. Les stimulations cérébrales profondes 44
D. Dysfonctionnement du CPF et schizophrénie 44
a. Généralités sur le CPF 44
1. Mise en place du réseau cortical 45
2. Maturation du réseau cortical 45

3. Structure et fonctions cognitives du CPF 46
b. Balance excitation/inhibition 47
E. Modèles murins de la schizophrénie 48
a. Le modèle pharmacologique phencyclidine (PCP) 49
1. Généralités 49
2. Injections néonatales de phencyclidine 50
b. Modèle Disc1 52
1. Généralités 52
2. Le modèle Disc1-L100P 55
Chapitre II – Le système sérotoninergique 59
A. Généralités 59
a. Métabolisme de la sérotonine 59
1. En périphérie 60
2. Au niveau central 61
b. Innervation sérotoninergique au sein du CPF 64
B. Les récepteurs sérotoninergiques 65
a. Généralités 65
b. Couplages des récepteurs aux protéines G 67
C. Principales fonctions de la sérotonine *via* ses récepteurs 68
a. Au niveau périphérique 68
b. Au niveau central 69
1. Durant le développement 70
2. A l'âge adulte 71
2.1 Rôle dans la modulation de l'humeur 72
2.2 Rôle dans la cognition 72
Chapitre III – Le récepteur 5-HT_6 de la sérotonine 75
A. Découverte et structure du récepteur 5-HT_6 75
B. Distribution des récepteurs 5-HT_6 76
a. Localisation régionale 76
b. Localisation cellulaire 77
C. Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT_6 80
a. Couplage canonique à la protéine Gs 80
b. Couplage à d'autres voies de signalisation 81
1. Couplage avec la Src kinase Fyn 81

2. Couplage avec la protéine Jab-1 82
3. Couplage avec la protéine Map1B 82
4. Couplage avec la protéine Nova-1 82
5. Couplage avec la protéine SNX14 82
6. Couplage avec la protéine mTOR 83
c. Activité constitutive du récepteurs 5-HT_6 et voies de signalisation associées 83
1. Couplage à la protéine Cdk5 83
2. Couplage avec NF1 85
D. Principales fonctions du récepteur 5-HT_6 86
a. Modulation de la neurotransmission 86
1. La transmission cholinergique 87
2. La transmission glutamatergique 88
3. La transmission GABAergique 88
4. La transmission monoaminergique 88
b. Rôle neurodéveloppemental 88
E. Récepteur 5-HT_6 et pathologies 89
a. Dépressions et anxiété 90
b. Douleurs neuropathiques 91
c. Epilepsie 91
d. Obésité 92
e. Addictions 92
F. Récepteurs 5-HT_6, troubles cognitifs et pathologies associées 93
a. La maladie d'Alzheimer 94
b. La schizophrénie 95
Chapitre IV – La voie de signalisation mTOR 97
A. Les complexes mTORC 97
a. Le complexe mTORC1 97
b. Le complexe mTORC2 97
c. Activateurs de la voie mTOR 98
B. Dérégulations de mTOR et pathologies 100
a. Les maladies génétiques 100
b. Plasticité synaptique et déficits cognitifs 101
c. Les maladies neurodégénératives 102
d. Autres pathologies associées à mTOR 102

1. Dépression 102
2. Addiction 102
C. Altérations de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR et pathologies associées 103
a. Douleurs neuropathiques 103
b. Epilepsie 103
c. Neurofibromatose 104
D. Schizophrénie et voie de signalisation 5-HT_6-mTOR 104
Matériel et méthode 109
A. Modèle d'étude 110
B. Expérience d'électrophysiologie 110
a. Préparation des tranches aigües de CPF 110
b. Enregistrements électrophysiologiques au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du CPF 111
1. Analyse de la transmission synaptique 111
2. Analyse des propriétés intrinsèques 111
3. Analyse de l'activation des canaux HCN1 111
C. Expériences de comportements 111
a. Reconnaissance d'objets nouveaux (NOR) 112
b. Object in place (OIP) 112
c. Sociabilité et discrimination sociale 112
d. Corridor circulaire 113
e. Labyrinthe en croix surélevé (Elavated plus Maze – EPM) 113
f. Splash test 113
g. Le test de nage forcée (Forced swim test - FST) 114
h. Préférence sucrose 114
D. Expérience de Biochimie 114
a. Préparation des échantillons fractionnés pré et post synaptiques 114
b. Western-blots 115
E. Expériences d'immunohistochimie 115
Résultats 117
I. La voie de signalisation 5-HT_6-mTOR comme cible thérapeutique pour prévenir l'apparition des déficits cognitifs dans des pathologies psychiatriques 118
A. Implication de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR dans un modèle pharmacologique de schizophrénie et bénéfices de son blocage précoce afin de prévenir les déficits cognitifs 118
a. Contexte de l'étude 118

b. Résultats 121

1. Activation non physiologique et soutenue de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR à l'âge adulte au niveau du CPF dans le modèle PCP 121

2. Le blocage précoce de la voie 5-HT_6-mTOR prévient les déficits cognitifs induits dans le modèle PCP 121

3. L'adolescence correspond à la fenêtre thérapeutique idéale pour administrer le traitement 126

4. L'activation soutenue de la voie 5-HT_6-mTOR semble résulter d'une altération de la transmission sérotoninergique et non pas d'une augmentation de l'activité constitutive du récepteur. 129

5. Les altérations de la transmission synaptique inhibitrice et excitatrice observées au niveau du CPF des souris PCP sont prévenues par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR. 133

6. L'activation persistante de la voie mTOR modifie les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du cortex préfrontal dans le modèle PCP 137

B. Implication de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR dans un modèle de consommation chronique de cannabis durant l'adolescence 145

a. Contexte de l'étude 145

b. Résumé des résultats 146

II. Implication du récepteur 5-HT_{2A} dans les symptômes négatifs de la schizophrénie 167

A. Contexte 167

B. Les symptômes négatifs dans le modèle PCP dépendent des récepteurs 5-HT_{2A} 168

a. Expression de déficits comportementaux apparentés aux symptômes négatifs de la schizophrénie dans le modèle PCP 168

b. Expression des récepteurs 5-HT_{2A} augmentée dans le modèle PCP associée à une modulation de la transmission glutamatergique 171

Discussion et perspectives 175

I. Bénéfices d'un blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR sur les déficits cognitifs de la schizophrénie 177

A. Dérégulation des interneurones PV 178

B. Altérations moléculaires 179

II. Bénéfices d'un blocage des récepteurs 5-HT_{2A} sur les symptômes négatifs de la schizophrénie 182

Bibliographie 185

Table des figures

Figure 1 : Schéma récapitulant les différentes étapes du développement cortical chez l'Homme et les facteurs de risques de développer une schizophrénie (périodes de forte vulnérabilité et facteurs environnementaux). 30
Figure 2 : Voies physiopathologiques possibles liant traumatismes durant l'enfance et facteurs de risques de développer une schizophrénie 31
Figure 3 : Densité des épines dendritiques, en fonction de l'âge au niveau des neurones pyramidaux du CPF dorsolateral 32
Figure 4 : Schéma représentant les réseaux neuronaux impliqués en réponse à des stimuli externes. 33
Figure 5 : Hypothèse d'une dérégulation de la transmission dopaminergique dans la schizophrénie. 36
Figure 6 : Hypothèse d'une dérégulation de la transmission glutamatergique dans la schizophrénie. 37
Figure 7 : Voies de signalisations associées aux récepteurs 5-HT_{2A}. 39
Figure 8 : Implication de l'hyperactivation des récepteurs 5-HT_{2A} dans les symptômes de la pathologie 40
Figure 9 : Représentation schématique des différentes régions du CPF chez le rat. 47
Figure 10 : Schéma récapitulant les altérations suite à l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs NMDA dans les modèles animaux 49
Figure 11 : Représentation schématique du récepteur NMDA et du site de liaison de la PCP. 50
Figure 12 : Arbre généalogique d'une partie de la famille ayant la translocation (1;11)(q42;q14.3)... 53
Figure 13 : Interactions fonctionnelles et réseaux de protéines associées à DISC1 54
Figure 14 : Tableaux récapitulant les différents modèles de souris DISC1 et les changements comportementaux associés 57
Figure 15 : Représentation de la synapse sérotoninergique. 60
Figure 16 : Innervation sérotoninergique au niveau du cerveau humain et de rongeur à l'âge adulte 61
Figure 17 : Résumé schématique de la maturation sérotoninergique. 62
Figure 19 : Schéma récapitulant les sources de sérotonine durant le développement embryonnaire et postnatal 63
Figure 18 : L'innervation sérotoninergique peut-être précoce ou tardive en fonction des régions cérébrales, ici chez le rongeur. 62
Figure 20 : Immunomarquage et reconstruction 3D des fibres sérotoninergiques montrant l'évolution de leur morphologie au cours du développement au niveau de la couche V du CPF de souris 64
Figure 21 : Modulation de l'activité des neurones pyramidaux par la sérotonine durant le développement, au niveau des différentes couches du CPF chez le rongeur 65
Figure 22 : Voies de signalisation canoniques associées aux différents récepteurs sérotoninergiques 67
Figure 23 : Multiples fonctions de la sérotonine au niveau du système périphérique. 69
Figure 24 : Multiples fonctions de la sérotonine au niveau du système nerveux central. 70
Figure 25 : Structure du récepteur 5-HT_6. 75
Figure 26 : Cartographie de l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT_6 au niveau du cerveau de rat en hybridation *in situ* 77
Figure 27 : Localisation subcellulaire du récepteur 5-HT_6. 79
Figure 28 : Schéma récapitulant les autres voies de signalisation associées aux récepteurs 5-HT_6. 81

Figure 29 : Le couplage du récepteur 5-HT_6 à la protéine kinase Cdk5 entraine croissance des neurites et migration 84
Figure 30 : Interaction différentielle entre le récepteur 5-HT_6 et les protéines Cdk5 – GPRIN1 85
Figure 31 : Voies de signalisation induites par le récepteur 5-HT_6 impliquant NF1 et mTOR..... 86
Figure 32 : Schéma représentant le contrôle de la transmission synaptique par le récepteur 5-HT_6.. 87
Figure 33 : Schémas représentant les complexes mTORC1 et mTORC2.. 98
Figure 34 : Diversité des voies de signalisation associées à mTOR. 99
Figure 35 : Schéma récapitulant l'hypothèse des « deux hits » entraînant l'apparition de la schizophrénie en intégrant l'implication possible de mTOR. 105
Figure 36 : Interactome du récepteur 5-HT_6 caractérisé grâce à une approche protéomique. 106
Figure 37 : L'activation de la voie de signalisation impliquant le récepteur 5-HT_6 et la protéine mTOR induit des déficits cognitifs chez le rat.. 107
Figure 38 : Schéma expérimental utilisé. 120
Figure 39 : Le blocage précoce, durant l'adolescence de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR prévient à l'âge adulte la suractivation de la voie mTOR au niveau du CPF dans le modèle PCP.. 121
Figure 40 : Altération de la mémoire de reconnaissance dans le modèle PCP prévenue par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR..... 122
Figure 41 : Altération de la mémoire associative dans le modèle PCP prévenue par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR 123
Figure 43 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-$HT_6^{-/-}$ n'affecte pas la mémoire de reconnaissance et la mémoire associative. 125
Figure 44 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-$HT_6^{-/-}$ n'altère ni la sociabilité ni la discrimination sociale. 126
Figure 45 : Le blocage subchronique de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR à l'âge adulte ne permet pas de reverser l'ensemble des déficits cognitifs observés dans ce modèle. 128
Figure 46 : Le traitement aigü administré à l'âge adulte avec le SB258585 permet de reverser les déficits de mémoire associative dans le modèle PCP.. 128
Figure 47 : L'administration de CPPQ, un antagoniste neutre des récepteurs 5-HT_6, aux souris PCP durant l'adolescence prévient l'apparition des déficits dans la mémoire de reconnaissance, la mémoire associative et la discrimination sociale.. 131
Figure 48 : Les souris Veh et 5-$HT_6^{-/-}$ injectées au CPPQ ou PCP ne présentent pas d'altération au niveau de la locomotion..... 132
Figure 49 : Les souris Veh et 5-$HT_6^{-/-}$ injectées au CPPQ ou PCP ne présentent pas un état anxieux. 133
Figure 50 : Transmission glutamatergique « pure » dans le modèle PCP.. 134
Figure 51 : Augmentation de la transmission glutamatergique « globale » dans le modèle PCP 134
Figure 52 : Altération de la transmission GABAergique prévenue par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR.. 135
Figure 53 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-$HT_6^{-/-}$ n'induit pas d'altération de la transmission glutamatergique.. 136
Figure 54 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-$HT_6^{-/-}$ n'induit pas d'altération de la transmission GABAergique. 137
Figure 55 : Le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR prévient les altérations au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF dans le modèle PCP. 138

Figure 56 : Le blocage précoce du récepteur 5-HT_6 avec un antagoniste neutre, le CPPQ prévient les altérations au niveaux des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF dans le modèle PCP. 138
Figure 57 : Les souris 5-$HT_6^{-/-}$ injectées avec la PCP au stade néonatal ne présentent pas d'altération au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF..... 139
Figure 58 : Les changements au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF dans le modèle PCP sont dus à une dérégulation des canaux HCN1.. 140
Figure 59 : Activation du canal HCN1 dans le modèle PCP 140
Figure 60 : Le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR permet de prévenir l'hyperactivation des canaux HCN1..... 141
Figure 61 : Schéma récapitulatif des altérations observées dans le modèle d'injections néonatales de PCP et des bénéfices d'un blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR..... 142
Figure 62 : Schéma expérimental utilisé pour le modèle PCP..... 168
Figure 63 : Les souris PCP présentent des déficits semblables aux symptômes négatifs observés dans la schizophrénie. 169
Figure 64 : Implication des récepteurs 5-HT_{2A} dans les symptômes négatifs présents dans le modèle PCP..... 170
Figure 65 : L'injection de clozapine aux souris PCP permet de prévenir les déficits observés.. 171
Figure 66 : Etat de phosphorylation des récepteurs ionotropiques du glutamate et de la protéine ERK dans le CPF de souris contrôles ou 5-$HT_{2A}^{-/-}$ injectées ou non avec la PCP 171
Figure 67 : Augmentation de la transmission sérotoninergique dans le modèle PCP 172
Figure 68 : Augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} dans le modèle PCP..... 173
Figure 69 : Schéma récapitulatifs des altérations observées dans les modèles de consommation chronique de THC et d'injections de la PCP au stade néonatal, et des mécanismes possiblement impliqués.. 181

Principales abréviations

4-EBP1	Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein
5-HIAA	5-hydroxy-indolylacétique
5-HT	5-hydrotryptamine (ou sérotonine)
5-HT_{2A}	Récepteur de la sérotonine 2A
5-HTP	5-hydroxytryptophane
AADC	L-amino acide décarboxylase
ACSF	Artificial cérébral spinal fluide
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATV	Aire tegmentale ventrale
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	Barrière hématoencéphalique
Cdk5	Cyclin Dependant Kinase 5
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPF	Cortex préfrontal
CPPQ	(S)-1-[(3-chlorophenyl)sulfonyl]-4-(pyrrolidine-3-yl-amino)-1H-pyrrolo[3,2-c]quinolone
CREB	cAMP Responding Element Bound
DISC1	Disrupted in schizophrenia 1
D,L-AP5	Acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque
EPM	Elevated plus maze – Labyrinthe en croix surélevé
ErbB4	Récepteur tyrosine kinase 4
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GAD	Glutamate decarboxylase
GAT1	Transporteur membranaire du GABA
GDP	Guanosine triphosphate

GluA2	Sous unité des récepteurs AMPA
GluN2A	Sous unité des récepteurs NMDA
GPRIN1	G Protein inducer of neurite outgrowth 1
GRIA1	Sous unité 1 des récepteurs AMPA
GRIN2A	Sous unité 2A des récepteurs NMDA
GRM3	Récepteur métabotropique au glutamate 3
GTP	Guanosine triphosphate
FMR	Fragile mental retardation
FST	Forced swim test – Test de nage forcée
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
i.c.v	Intra-cérébro-vasculaire
IGF1	Facteur de croissance semblable à l'insuline
i.p	Intrapéritonéale
ISRS	Inhibiteurs de la recapture de sérotonine
Jab-1	Jun activation domain binding protein 1
KA	Kaïnate
LC1	Light Chain 1
Lmx1b	LIM homeodomain factor 1b
LSD	Lysergic acid diethylamide
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
Map1B	Microtubule Associated Protein 1B
mEPSC	Courants miniatures excitateurs
mGlu	Récepteur métabotropique au glutamate
MAO-A	Monoamine oxydase de type A
MeCP2	Methyl-CpG binding-protein 2
mIPSC	Courants miniatures inhibiteurs
MMP-9	Matrix metalloproteinase
mTOR	Cible mécanistique de la rapamycine
MSN	Neurone épineux moyen

Nacc	Noyau accumbens
NF1	Neurofibromine 1
NGF	Facteur de croissance nerveux
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOR	Reconnaissance d'objets nouveaux
Nova-1	Neuro-Oncological Ventral Antigen 1
NPY	Neuropeptide Y
NRD	Noyau du raphé dorsal
NRG	Neuréguline 1
NRM	Noyau du raphé médian
OIP	Object in place
p70S6k	p70 ribosomal S6 kinase
pA	PicoAmpère
PAM	Modulateur allostérique positif
PB	Progéniteurs basaux
PCP	Phencyclidine
PDE4B	Phosphodiesterase 4B
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPI	Prepulse inhibition
PV	Parvalblumine
RAPA	Rapamycine
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
s.c	Sous cutanée
SEM	Erreur standard Moyenne
SERT	Transporteur de la sérotonine
SNX14	Sorting Nexin 14
SNC	Système nerveux central
STR	Thérapie de stimulation transcraniennes répétitives

TCC	Thérapie cognitivo-comportementale
TH	Tyrosine hydroxylase
THC	Δ^9-tetrahydrocannabinol
TPH2	Tryptophane hydroxylase 2
TSC	Tuberous sclerosis complex
Veh	Vehicule
VEGF	Facteur de croissance de l'endothelium vasculaire
VIP	Peptide intestinal vasoactif
VMAT2	Transporteur de monoamine vésiculaire
WT	Wild type – sauvage
ZD7288	Inhibiteur des canaux HCN1

Introduction

Chapitre I : La Schizophrénie

A. Généralités

a. Epidémiologie et symptomatologie

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique neurodéveloppementale très invalidante qui affecte environ 1% de la population mondiale. En France cela correspond approximativement à 600 milles personnes, ce qui représente un coût socio-économique important (Charrier et al., 2013). Cette maladie affecte les patients de façon quasi indépendante du sexe avec une prévalence légèrement plus importante pour les hommes (15 hommes pour 10 femmes), qui semblent touchés par des formes plus précoces et invalidantes, et qui malheureusement répondent moins rapidement aux traitements actuellement disponibles (Seeman, 2019). Environ 1 patient sur 2 souffrant de schizophrénie a une espérance de vie diminuée et fera au moins une tentative de suicide due à la pathologie, menant dans 10% à 20% des cas au décès (Chesney et al., 2014; Pompili et al., 2007). Cette maladie est déclenchée par une variété de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux qui interfèrent collectivement avec le développement et la maturation du cerveau. Les premiers symptômes se manifestent généralement durant l'adolescence entre 15 et 25 ans. La variété de ces facteurs déclencheurs de la pathologie et le fait qu'elle apparaisse durant une grande période de changements, font que son diagnostic peut être difficile à établir.

Ces symptômes cliniques se caractérisent par des symptômes positifs, négatifs et des déficits cognitifs. Ils peuvent être différents d'un patient à l'autre avec des degrés de sévérité plus ou moins importants. De part leur hétérogénéité, le diagnostic est souvent difficile à poser. De plus, la schizophrénie n'est pas une maladie dont l'apparition est brutale, elle se caractérise par différentes phases, une phase prodromique, une phase psychotique et une phase résiduelle. Durant la phase prodromique, les symptômes sont comme atténués, avec une intensité plus faible. Cette période précédant le premier épisode psychotique se caractérise souvent par un manque de motivation, une asociabilité ou une sensibilité émotive augmentée. Sachant que ces troubles apparaissent durant l'adolescence, il est très difficile de les dissocier d'une adolescence « normale » (Klosterkötter et al., 2001; Larson et al., 2010). Ces symptômes bien qu'annonciateurs ne mènent pas forcement au développement de la pathologie. Il a été évalué que seul la moitié des patients présentent une schizophrénie dite chronique après un premier épisode psychotique (Klosterkötter et al., 2001). Alors que la phase prodromique correspond aux symptômes « avant-coureurs », la phase psychotique correspond à la phase active de la pathologie alors que la phase résiduelle fait suite à un épisode aigu associé à des symptômes atténués. Ces différentes phases n'ont pas la même intensité suivant le patient et vont se répéter par cycle au cours de la maladie.

1. Les symptômes positifs

Ils se caractérisent par une perte de contact avec la réalité, avec des hallucinations et des délires, et sont définis par « la conviction intime de percevoir réellement une sensation pour laquelle il n'y a pas

d'objet extérieur » (Baker et al., 2019; Owen et al., 2016; Waters and Fernyhough, 2017). Les hallucinations sont le plus souvent auditives mais elles peuvent aussi être tactiles, gustatives ou bien olfactives. Les hallucinations peuvent être retrouvées dans d'autres pathologies psychiatriques ou lors de la consommation de drogue ou d'alcool, mais certaines des hallucinations auditives semblent être spécifiques à la schizophrénie. Les idées délirantes s'accompagnent elles, de sentiments de persécutions associés à de la paranoïa, les idées sont invraisemblables et excentriques mais le patient, malgré des preuves contradictoires, est certain de ses croyances. Ces idées délirantes et les hallucinations mènent à des comportements désorganisés pouvant induire des comportements violents et autodestructeurs.

2. Les symptômes négatifs

Les symptômes négatifs correspondent à un ensemble de symptômes déficitaires qui ont un impact négatif sur la qualité de vie des patients. Ces symptômes comprennent un appauvrissement affectif et émotionnel, une diminution des interactions sociales essentiellement caractérisée par une volonté du patient à créer de nouvelles relations moins importantes. Ceci est associé à une perte de la réactivité face à une situation avec une absence d'expression faciale, de l'anhédonie (perte de la capacité à ressentir du plaisir), de l'avolition (perte de volonté, manque de motivation et dynamisme pour effectuer une tâche intellectuelle ou physique) et de l'alogie (pauvreté du discours/de la pensée) (Kirkpatrick et al., 2006; Marder and Galderisi, 2017). Ces symptômes sont moins perceptibles que les symptômes positifs, ils sont difficiles à évaluer car moins spécifiques et très souvent apparentés à des symptômes dépressifs (Dollfus and Lyne, 2017).

Les symptômes positifs et négatifs peuvent être associés. En effet, les symptômes positifs peuvent être à l'origine des symptômes négatifs et inversement. Pour exemple, la paranoïa peut entraîner un retrait social important et cette diminution des interactions sociales peut accentuer le sentiment que les hallucinations et les idées délirantes sont réelles du fait de l'isolement (Fowler et al., 2012; Wickham et al., 2014).

3. Les déficits cognitifs

La schizophrénie est également associée à des déficits sévères dans les fonctions cognitives, qui sont très invalidants pour les patients et mal pris en charge par les stratégies thérapeutiques mises au point jusque là. Ces symptômes se caractérisent par des altérations des fonctions exécutives avec des déficits dans la mémoire de travail et la flexibilité cognitive associés à des troubles de l'attention et du raisonnement, ainsi que des difficultés à résoudre des problèmes et à planifier des tâches (Harvey, 2009; Heinrichs and Zakzanis, 1998; Mihaljevi and Janovi, 2019).

Selon le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux de l'association américaine de psychiatrie (DSM-5), le diagnostic de la schizophrénie est déclaré chez un patient présentant dans le même mois au moins deux symptômes sur les cinq suivants : délires, hallucinations, discours désorganisés, comportement désorganisés ou catatoniques et des symptômes négatifs. Ces symptômes doivent être observés sur au moins six mois.

b. Etiologie

Malgré des avancées majeures au cours de ces dernières années, l'étiologie de la schizophrénie est peu connue, il est en revanche décrit que c'est une pathologie plurifactorielle qui peut résulter de plusieurs facteurs comme des facteurs épigénétiques, génétiques ainsi que des facteurs environnementaux que je décrirai brièvement dans cette partie.

1. Hypothèse génétique

L'origine de la schizophrénie a une part génétique importante, des premières études ont montré le même risque d'apparition de la pathologie chez des enfants ayant une mère schizophrène mais étant élevés par une mère adoptive (Higgins et al., 1997). En effet, certaines variations génétiques et épigénétiques représentent des facteurs de risques de développer la pathologie (Chaumette et al., 2017). Leur identification est difficile et il est nécessaire de rappeler que ce sont des facteurs de prédisposition à la maladie on parle donc de facteurs de vulnérabilité. Les études pan-génomiques d'association (GWAS – genome wide association study) ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués, sans qu'un gène soit à lui seul responsable de la globalité de la pathologie. Ces études ont permis de mettre en évidence d'importantes différences génétiques entre chacun des patients schizophrènes (Tansey et al., 2016) (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Cependant, l'étude des loci porteurs de SNP (single nucleotide polymorphism) et de CNV (copy number variant) permet de mettre en avant certains éléments du génome qui représentent un facteur de risque élevé de développer la pathologie comme la microdélétion 22q11.2 qui augmente de 20 fois ce risque (Cleynen et al., 2020). La majorité des gènes à risques identifiés converge vers des voies biochimiques communes comme des gènes impliqués dans la signalisation des récepteurs glutamatergiques, tels que GRIN2A (sous unité 2A des récepteurs NMDA), GRIA1 (sous unité 1 des récepteurs AMPA) ou GRM3 (récepteur métabotropique au glutamate 3), ce qui va impacter les propriétés des récepteurs et entraîner des altérations de transmission et plasticité synaptique (Harrison, 2015) (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Il a également été démontré que ces gènes sont préférentiellement dérégulés dans certains types cellulaires comme les neurones pyramidaux, les neurones épineux moyens, certains interneurones, et dans une moindre mesure au niveau des cellules embryonnaires, progénitrices ou gliales (Skene et al., 2018).

Parmi les gènes de vulnérabilité se trouve par exemple NRG pour Neuréguline 1. La neuréguline *via* son récepteur ErbB4 a un rôle important dans le développement du système nerveux central (SNC). La signalisation NRG-ErbB4 contrôle le développement des circuits inhibiteurs en favorisant la formation de synapses inhibitrice axo-axonique sur les neurones pyramidaux. Ainsi la NRG régule l'activité des neurones pyramidaux du CPF en favorisant la libération d'acide γ-aminobutyrique (GABA) *via* les interneurones à parvalbumine (PV). De plus, il est montré que l'ablation d'ErbB4 dans les interneurones PV chez la souris empêche la stimulation de la libération GABAergique et ainsi l'inhibition des neurones pyramidaux. Ces souris présentent des symptômes associés à ceux de la schizophrénie, comme une altération dans la mémoire de travail et dans le test du PPI (pre-pulse inhibition ou mesure du réflexe de sursaut acoustique dont l'altération reflète un dysfonctionnement de la filtration de l'information sensorielle) ainsi qu'une hyperactivité (Fazzari et al., 2010; Wen et al.,

2010). Ces résultats montrent donc l'importance de certains gènes dans l'établissement de symptômes associés à la schizophrénie.

D'autres gènes sont décrits comme facteur de vulnérabilité pour la schizophrénie comme le gène *Disc 1* (disrupted in schizophrenia 1) dont l'altération a été détectée dans une grande famille écossaise dont de nombreux membres ont été diagnostiqués schizophrènes. Ce gène code une protéine qui interagit avec plusieurs protéines du cytosquelette jouant un rôle fondamental dans le développement cortical. Divers modèles murins présentant des altérations/mutations au niveau de ce gène ont été générés et sont utilisés pour la plupart comme modèles animaux de la schizophrénie (je discuterai plus en détail du modèle Disc1 L100P dans le paragraphe E de ce chapitre). Ces modèles sont très intéressants car ils réunissent certains, sinon la plupart des symptômes et déficits cognitifs observés dans la pathologie. Dans un modèle exprimant une forme tronquée de Disc1 (dominant négatif), Cardarelli et al., ont montré qu'il y avait une hyperexcitabilité neuronale ainsi qu'une altération de la plasticité au niveau du CPF associées à des potentiels d'actions plus lent et une capacité de décharge ou « firing » diminuée au niveau des interneurones PV, eux-mêmes trouvés en proportions plus faibles (Cardarelli et al., 2018; Crabtree et al., 2017). La suppression de l'expression de Disc1 spécifiquement dans les neurones pyramidaux des couches II/III du CPF (grâce à une electroporation in utero), entraine des altérations au niveau de fonctions impliquant le CPF et l'hippocampe avec des déficits cognitifs qui sont d'autant plus importants qu'ils sont associés à un stress environnemental précoce. Ainsi, cette délétion associée à une exposition à un stress environnemental (modèle MIA – infection immunitaire maternelle), altère la capacité de décharge ou « firing » au niveau des neurones pyramidaux du CPF des souris au stade néonatal et entraine une diminution de l'arborisation dendritique et de la densité des épines ainsi que des deficits de performances cognitives notamment dans le test de mémoire de travail (Xu et al., 2019).

Bien que l'héritabilité de la pathologie soit estimée à 79%, la schizophrénie n'est pas seulement une pathologie héréditaire. En effet, des études réalisées chez des jumeaux monozygotes ont montré que seuls 33% d'entre eux développent une schizophrénie. Des études plus anciennes avaient mis en évidence un risque de 50% de développer la pathologie si son jumeau est affecté (Hilker et al., 2018; Shields and Gottesman, 1972; Sullivan et al., 2003). Les facteurs génétiques de vulnérabilité ne sont donc pas suffisants pour déclencher la pathologie et impliquent probablement des facteurs environnementaux.

2. Hypothèse environnementale

Les facteurs environnementaux agissent en synergie avec les facteurs génétiques, et peuvent ainsi être des facteurs de risques pour la schizophrénie. Ces facteurs sont nombreux et variés, nous allons en citer quelques exemples dans cette sous-partie (van Os et al., 2010).

Les périodes de grande vulnérabilité aux facteurs environnementaux sont les périodes prénatale et postnatale (Ballon et al., 2008; Clarke et al., 2006; Jones et al., 1998; Stilo and Murray, 2019). En effet, la grossesse et l'adolescence sont des périodes fondamentales pour le développement et la maturation du CPF et représentent ainsi des périodes de vulnérabilité pour le déclenchement de la schizophrénie, qui est associée à un développement cérébral anormal. Il est connu que toutes altérations survenant durant une période « critique » entrainent à l'âge adulte des déficits qui sont irréversibles. Ceci est dû aux phénomènes de forte plasticité synaptique ayant lieu durant ces périodes, les meilleurs exemples

illustrant l'importance de ces périodes critiques ont été caractérisés pour le système sensoriel (Hubel and Wiesel, 1970).

2.1 Première période de grande vulnérabilité : la gestation et la petite enfance

En période prénatale, une malnutrition, une infection, un stress intense durant la grossesse ou la consommation de drogues par la mère représentent des facteurs de risque élevés (**Figure 1**) (Stilo and Murray, 2019).

Les complications obstétricales et les traumas lors de la naissance, comme une naissance prématurée, une césarienne d'urgence ou l'utilisation de forceps augmenteraient par deux la probabilité de développer une schizophrénie à l'âge adulte (Rubio-Abadal et al., 2015).

Les événements hypoxiques et ischémiques liés à des complications obstétriques ont également été associés à un facteur de risque de développer une schizophrénie à l'âge adulte. En effet, ces événements entrainent des dérégulations au niveau de l'angiogénèse et de la neurogénèse dans le cerveau en développement et ont été corrélés à une réduction de la matière grise temporale et frontale ainsi qu'à une diminution du fluide cérébrospinal (Ballon et al., 2008). De plus, des autopsies de cerveau humain réalisées au stade néonatal ont permis de montrer, à travers des immunomarquages de la tyrosine hydroxylase (TH – enzyme de synthèse de dopamine), une augmentation importante de dopamine suite à une hypoxie périnatale. Sachant que les hypoxies/ischémies périnatales augmentent de deux fois le risque de développer des pathologies psychiatriques, les auteurs supposent donc que cette dérégulation précoce de la neurotransmission dopaminergique est un facteur de prédisposition à des déficits neurologiques et cognitifs à l'âge adulte (Pagida et al., 2013). L'augmentation de TH et de dopamine est également retrouvée post-mortem chez des patients schizophrènes (Howes and Murray, 2014). Outre cette augmentation de dopamine, une perte des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé dorsal (NRD) a aussi été observée suite à des hypoxies/ischémies chez le rat (Reinebrant et al., 2013). Ces deux neurotransmetteurs, dopamine et sérotonine, interagissent avec les neurotrophines telles que le BDNF (brain derived neurotrophic factor – facteur neurotrophique dérivé du cerveau) et le NGF (nerve growth factor – facteur de croissance nerveux) qui sont elles aussi dérégulées dans des conditions d'hypoxie fœtale. Ces neurotrophines ont des rôles fondamentaux dans la plasticité synaptique, la connectivité et la maturation cérébrale et sont exprimées dans des structures essentielles aux fonctions cognitives : CPF et hippocampe. Ainsi, des changements d'expression durant la période périnatale auront des impacts importants à l'âge adulte et pourraient conduire à des pathologies neurodéveloppementales et psychiatriques comme la schizophrénie (Giannopoulou et al., 2018).

La malnutrition fœtale est aussi un facteur de risque très présent dans le développement de maladies mentales. Une étude récente met en avant l'implication de la vitamine D dans ces processus. En effet, la vitamine D a un rôle important dans la médiation de la prolifération, l'apoptose et la neurotransmission ainsi que dans l'activité inflammatoire. Une carence en vitamine D durant la grossesse est associée à une diminution de BDNF. Ces altérations entrainent une diminution du développement cérébral du fœtus et, *in fine*, à un risque plus important de développer une schizophrénie ou d'autres déficits mentaux à l'âge adulte (Giulia et al., 2020).

Certaines infections se produisant pendant la grossesse peuvent également constituer un facteur de risque. L'utilisation de modèles d'infections maternelles chez la souris montre qu'une injection de poly(I:C) (Polyriboinosinic–polyribocytidilic acid) au 12,5^{ième} jour embryonnaire (E12.5) altère la synthèse de sérotonine dans le placenta par le tryptophane maternel. Ce modèle d'infection permet une régulation positive de la synthèse de tryptophane en sérotonine, entraînant une augmentation de sérotonine endogène et donc une diminution de la croissance axonale sérotoninergique. Ainsi, il est observé une altération des processus neurodéveloppementaux notamment au niveau de la formation de la circuiterie axonale qui aura des effets irréversibles à l'âge adulte (Goeden et al., 2016; Tsukada et al., 2019). Les facteurs neurotrophiques tels que le BDNF et le NGF sont aussi retrouvés diminués, dans le placenta et le fœtus suite à une infection induite à E16 chez la ratte gestante. Cette diminution est associée à une augmentation du risque de développer des troubles neurodéveloppementaux à l'âge adulte (Gilmore et al., 2005)

Une étude plus récente montre qu'une infection au 7^{ième} jour postnatal (J7) chez le rat, avec du poly(I:C) entraine à l'âge adulte des déficits dans des tests de mémoire et d'apprentissage associés à une dérégulation de certains gènes au niveau du CPF et de l'hippocampe, comme le BDNF par exemple. Cependant, contrairement aux études précédentes, l'expression du BDNF est ici augmentée (Baghel et al., 2018).

D'autres études ont montré un impact des infections gestationnelles sur le développement normal du CPF, notamment au niveau de la prolifération cellulaire qui a lieu durant la troisième semaine de grossesse. Une infection maternelle modélisée par un traitement MAM (methylazoxymethanol acetate) chez la ratte gestante entraine chez sa progénie une réduction dans la taille du CPF et de l'hippocampe, ainsi qu'une diminution de la neurogénèse associées à des comportements comparables aux symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie (Flagstad et al., 2004).

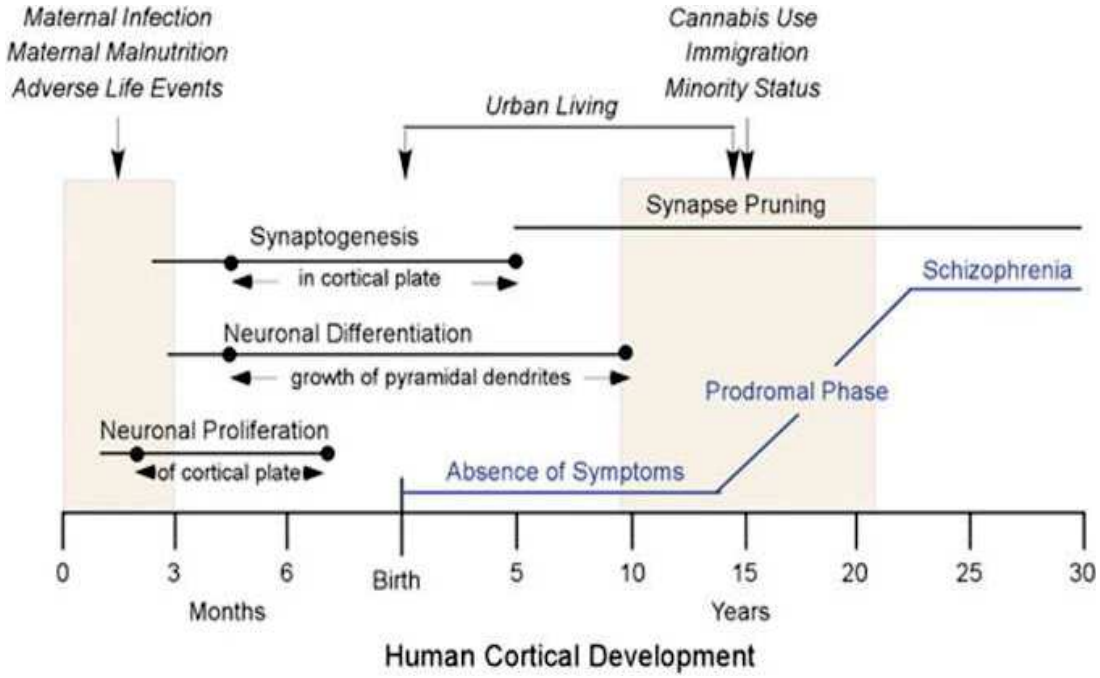


Figure 1 : Schéma récapitulant les différentes étapes du développement cortical chez l'Homme et les facteurs de risques de développer une schizophrénie (périodes de forte vulnérabilité et facteurs environnementaux) (Selemon and Zecevic, 2015).

Dès les années 2000, les traumatismes subis durant l'enfance allant de négligences physiques à émotionnelles (**Figure 2**) et entraînant un stress dit environnemental comme un statut socio-économique bas, l'isolation sociale ou l'abus de drogue durant la pré-adolescence et l'adolescence ont aussi été qualifiés de facteurs de vulnérabilité pouvant impacter la maturation du CPF et les fonctions comportementales associées. Ces traumatismes représentent donc des facteurs de risque pour le développement de la schizophrénie (Stilo and Murray, 2019) et sont susceptibles d'induire à l'âge adulte des déficits cognitifs tels que des altérations de la mémoire, de l'attention et de l'apprentissage, associés à des diminutions de la matière grise dans des structures comme le CPF ou l'hippocampe (Larsson et al., 2013; Popovic et al., 2019). Pour exemple, une étude sur des enfants orphelins montre une diminution du métabolisme du glucose au niveau du CPF associé à une augmentation des altérations cognitives et sociales (Chugani et al., 2001). Réciproquement une autre étude montre que deux patients ayant eu des lésions au niveau du CPF avant l'âge de 2 ans, ont un comportement social altéré à l'âge adulte. Ces comportements ne sont pas observées lorsque les altérations du CPF ont lieu à l'âge adulte (Anderson et al., 1999).

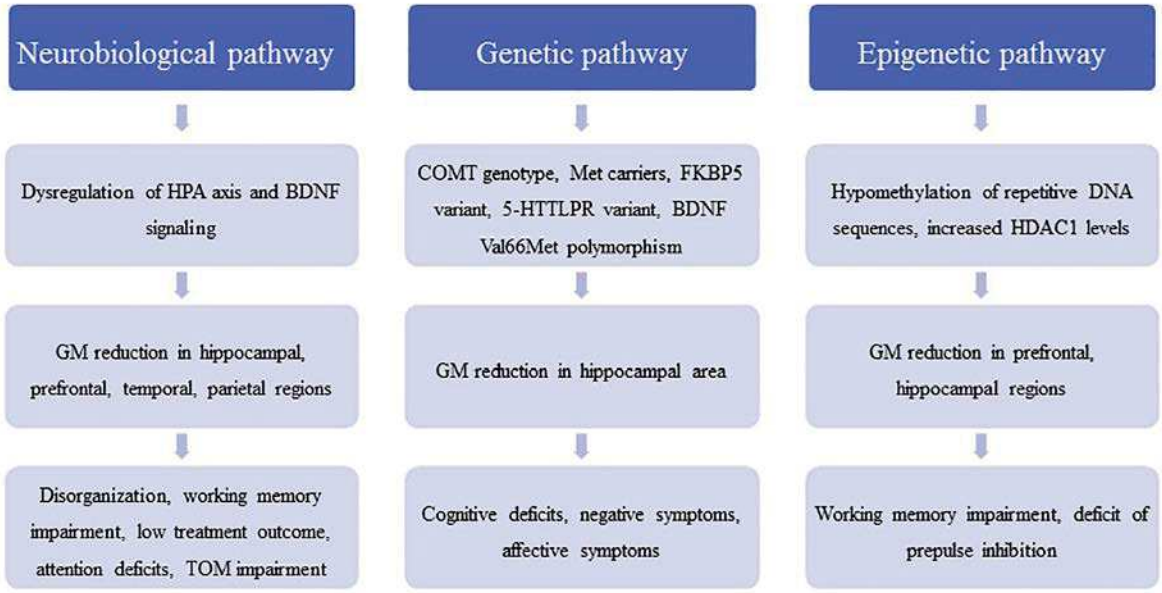


Figure 2 : Voies physiopathologiques possibles liant traumatismes durant l'enfance et facteurs de risques de développer une schizophrénie. Trois voies sont représentées : la voie neurobiologique qui active l'axe du stress, la voie génétique responsable d'une plus grande sensibilité au stress et la voie epigénétique. HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal axis; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; COMT, catechol-*O*-methyltransferase; FKBP5, FK506 binding protein 5; 5-HTTLPR, serotonin-transporter-linked polymorphic region; HDAC1, histone deacetylase 1; TOM, theory of mind ; GM, grey matter (Popovic et al., 2019).

2.2 Deuxième période de grande vulnérabilité : l'adolescence

Les prises de décisions et l'adaptation face à l'environnement sont possibles grâce au remodelage et à l'élagage des synapses excitatrices du CPF pendant l'adolescence. De façon simplifiée, les synapses les plus actives ne seront pas élaguées afin d'établir des connexions robustes dans le cerveau (**Figure 3**).

L'élimination sélective des synapses permettra de stabiliser la balance excitation/inhibition que nous verrons comme essentielle dans les fonctions cognitives et sociales (Silbereis et al., 2016). Durant cet élagage synaptique, il est observé une augmentation de la substance blanche. L'hypothèse émise est

que ces changements seraient dus aux axones non éliminés qui étant plus actifs seraient plus myelinisés afin de permettre une conduction de l'information plus rapide et plus stable (Almeida and Lyons, 2017). Il est important de noter que des altérations au niveau de la substance grise et blanche sont associées à des déficits cognitifs et sont observées dans la schizophrénie.

Cet élagage synaptique durant l'adolescence permettra d'une part aux réseaux neuronaux de se renforcer/s'affaiblir pour améliorer les connectivités et la synchronisation entre les différentes zones cérébrales (meilleur contrôle descendant entre CPF et zones corticales et sous corticales) et d'autre part une neuromodulation adaptée pour un contrôle optimal et fonctionnel du réseau (Sakurai and Gamo, 2019).

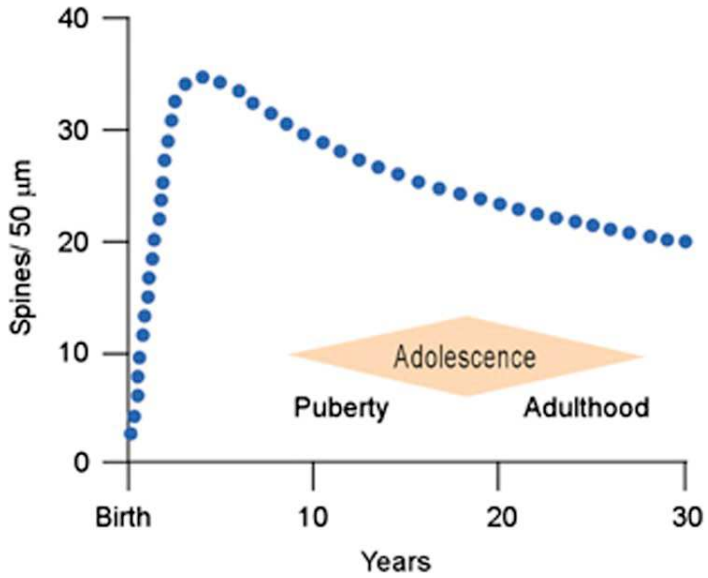


Figure 3 : Densité des épines dendritiques, en fonction de l'âge au niveau des neurones pyramidaux du CPF dorsolateral (Selemon and Zecevic, 2015).

En plus des profonds changements biologiques, hormonaux et physiques qui ont lieu pendant la puberté (Selemon and Zecevic, 2015), on note également une sensibilité accrue à l'environnement qui est associée à de profonds changements dans les interactions sociales entraînant une hyperactivation des structures frontales (**Figure 4)**. En effet, les stimuli sociaux, agréables/désagréables vont ainsi être intégrés et mémorisés et un comportement social adapté sera effectué grâce à la prise de décision générée *via* le CPF (Sakurai and Gamo, 2019).

Les fonctions cognitives de base telles que la mémoire de travail sont aussi établies précocement et s'améliorent au cours de la vie pour être stables à l'âge adulte. Ainsi, durant l'adolescence, les performances dans les tests de mémoires sont plus variables qu'à l'âge adulte. Ceci serait dû à la maturation du CPF avec un circuit neuronal qui se stabilise grâce à la balance excitation/inhibition (Montez et al., 2017).

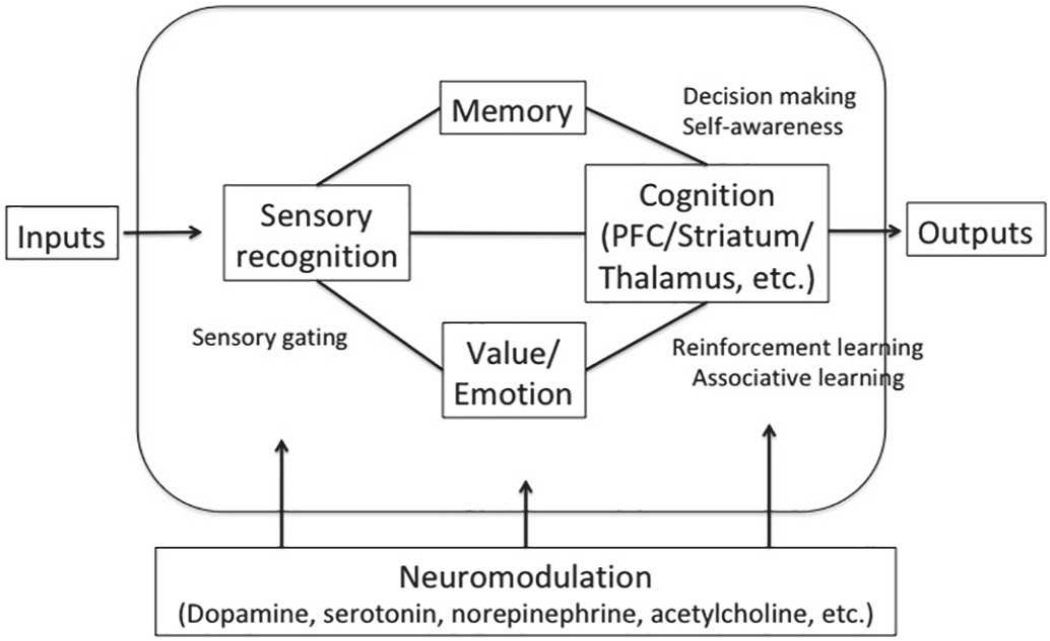


Figure 4 : Schéma représentant les réseaux neuronaux impliqués en réponse à des stimuli externes. Les stimuli sociaux, comme les interactions sociales, sont perçus par le système sensoriel. Ces informations sont intégrées à la mémoire (hippocampe) et une valeur (amygdale) leur est associée (plaisant/déplaisant ; positif/négatif). Elles sont ensuite relayées au niveau du CPF pour que les comportements sociaux (prise de décision) soient appropriés en réponse aux stimuli. Ces processus peuvent être modulés par le renforcement de l'apprentissage et de la conscience de soi et pas les systèmes neuromodulateurs. Les réseaux neuronaux impliqués doivent se développer correctement et fonctionner en coordination afin d'établir une cognition sociale appropriée (Sakurai and Gamo, 2019).

Des différences de statut économique, de culture et un environnement pauvre affectent aussi le développement neurocognitif durant l'adolescence (**Figure 1**). Pour exemple, une étude sur des jeunes adolescentes (entre 14 et 16 ans) ayant été persécutées de façon chronique montrent un comportement antisocial et des prises de décision considérées à risques, associés à une augmentation de l'activité du CPF (Foulkes and Blakemore, 2018; Telzer et al., 2018). Il est montré que plus les facteurs de stress sociaux sont importants plus le risque de développer des troubles psychiatriques est élevé (Davis et al., 2016).

Adolescence et consommation de cannabis

D'autres altérations environnementales, comme la consommation de drogues (**Figure 1)** telles que l'alcool, le tabac ou le cannabis à ce moment du développement entrainent à l'âge adulte des déficits irréversibles, pouvant mener à des pathologies psychiatriques comme la schizophrénie (Krebs et al., 2019; Nielsen et al., 2017; Renard et al., 2017; Selemon and Zecevic, 2015). La consommation de cannabis apparaît comme étant la drogue entraînant le risque le plus élevé de développer une schizophrénie (Ortiz-Medina et al., 2018). En effet, une consommation précoce de cannabis favoriserait l'apparition de psychoses qui sont développées environ deux à trois ans plus tôt que chez les non consommateurs (Large et al., 2011).

D'autres études ont permis de corréler la consommation de cannabis avec l'aggravation des symptômes observés dans la schizophrénie. Avec par exemple des temps d'hospitalisation plus longs

chez les patients schizophrènes, une incidence de rechutes plus élevée et une augmentation du risque de suicide (Malchow et al., 2013). Ces effets sont dus à une augmentation des risques de développer des comportements dépressifs et anxieux suite à une consommation durant l'adolescence (Gobbi et al., 2019). En effet, l'âge de consommation est proportionnellement associé à la gravité du déclin cognitif notamment au niveau de la mémoire de travail. Il est observé que les personnes consommant du cannabis avant leur 17 ans ont des performances cognitives significativement plus faibles que ceux ayant eu une consommation plus tardive (Pope et al., 2003). Une diminution significative de la connectivité neuronale et fonctionnelle entre le Noyau accumbens (Nacc) et le CPF serait à l'origine de ces altérations (Filbey and Yezhuvath, 2013; Volkow et al., 2014).

La substance psychoactive majeure du cannabis est le THC (Δ^9-tetrahydrocannabinol) qui cible le système endocannabinoïde en se liant notamment aux récepteurs CB1 localisés dans des structures cérébrales essentielles aux fonctions cognitives et dont l'expression augmente fortement de la période prénatale à l'adolescence (Jutras-Aswad et al., 2009; Mato et al., 2003). Le système endocannabinoïde est impliqué dans les fonctions synaptiques et la neuroplasticité permettant ainsi de faciliter le neurodéveloppement et la maturation cérébrale, notamment durant l'adolescence (Krebs et al., 2020). Ainsi la suractivation des récepteurs CB1 durant cette période mène à des déficits dans ces fonctions qui persistent à l'âge adulte. Il a été montré que des injections chroniques de THC chez le rat durant l'adolescence entrainent à l'âge adulte une dérégulation du développement neuronal caractérisé par un élagage précoce des épines dendritiques, une atrophie de l'arborisation dendritique ainsi qu'une altération du profil de transcription au niveau des gènes associés à la morphogénèse, au développement dendritique et à l'organisation du cytosquelette (Renard et al., 2016). Ces effets observés au niveau des neurones pyramidaux de la couche III du CPF ont été associés aux troubles psychiatriques de la schizophrénie. Le THC durant l'adolescence interfèrerait avec la maturation correcte du CPF, et serait associé à une réduction massive des récepteurs CB1 empêchant l'élagage correct des synapses excitatrices par les endocannabidoïdes, menant à l'âge adulte à des déficits cognitifs (Rubino et al., 2015).

Le déclin cognitif observé chez l'Homme est également retrouvé chez les rongeurs. L'injection chronique d'un agoniste des récepteurs CB1 pendant l'adolescence chez le rat ou la souris entraine à l'âge adulte des déficits de mémoire de travail, de sociabilité et des comportements anxieux. Ces déficits ne sont pas observés lorsque l'injection d'agoniste des récepteurs CB1 est réalisée à l'âge adulte, mettant ainsi en avant la période de vulnérabilité que représente l'adolescence (Berthoux et al., 2020; O'Shea et al., 2004). D'autres études montrent une altération de la mémoire spatiale et des activités motrices à l'âge adulte suite à une administration croissante de THC durant l'adolescence. Cette administration croissante permet de mimer le mode de consommation des adolescents. Les déficits observés sont corrélées à des altérations des réseaux neuronaux et de la plasticité avec une diminution de l'expression de la protéine BDNF dans le CPF et une altération de l'activité sérotoninergique qui peut-être différente en fonction des régions cérébrales (augmentation au niveau du CPF et diminution au niveau de l'hippocampe). Ces changements neurochimiques et neurologiques induits par la consommation de THC durant l'adolescence entrainent des déficits comportementaux irréversibles à l'âge adulte (Poulia et al., 2020). L'ensemble de ces résultats met en avant l'importance du développement et de la maturation du CPF dans l'établissement des déficits cognitifs.

Lors de ma thèse, j'ai participé à une étude chez la souris, de consommation chronique de THC durant toute l'adolescence qui entraine à l'âge adulte des altérations au niveau du CPF associées à des déficits cognitifs, que j'aborderai plus en détails dans la partie « Résultats ».

B. Hypothèses neurochimiques associées à la schizophrénie

Différents systèmes tels que, le système dopaminergique, glutamatergique, et sérotoninergique ont été étudiés afin de comprendre l'apparition des différents symptômes observés dans la pathologie.

a. Hypothèse dopaminergique

L'hypothèse dopaminergique met en avant une altération de la transmission dopaminergique avec un excès de synthèse de dopamine notamment au niveau du striatum (**Figure 5**) (Lyon et al., 2011). Cette hypothèse a été mise en avant dès 1963, grâce à l'utilisation des antipsychotiques de première génération, tels que l'halopéridol et la chlorpromazine, qui sont efficaces contre les symptômes psychotiques et sont des antagonistes des récepteurs D2 de la dopamine (Carlsson and Lindqvist, 1963). Il a été montré que l'administration d'amphétamine, qui est une drogue dopaminomimétique, à des patients schizophrènes entraine une augmentation de la transmission dopaminergique associée à une augmentation des symptômes psychotiques (Laruelle and Abi-Dargham, 1999). Depuis, de nombreuses études ont permis de confirmer l'implication de cet excès de dopamine au niveau de la voie mésolimbique, dans les symptômes positifs de la pathologie (Howes and Murray, 2014). Ainsi l'hypothèse dopaminergique se caractérise principalement par une hyperactivation dopaminergique de la voie mésolimbique qui expliquerait les symptômes positifs et dans une moindre mesure, une hypoactivation dopaminergique de la voie mésocorticale sous-tendant les symptômes négatifs et les déficits cognitifs.
L'utilisation d'antagonistes dopaminergiques entrainent cependant des effets secondaires importants comme des sentiments d'angoisse intérieure ou de la dyskinésie – mouvements anormaux involontaires – et/ou de l'akathisie – trouble du mouvement caractérisés par de l'agitation et un besoin irrépressible de bouger – ainsi qu'une prise de poids, une augmentation des facteurs de risques cardiovasculaire et des symptômes cognitifs et négatifs secondaires (Carbon and Correll, 2014; Hirose, 2003; Krogmann et al., 2019; Yoshimura et al., 2019).
Plus récemment, il a également été suggéré que lors de complications au cours de l'accouchement (facteur de risques de développer une schizophrénie) il pouvait y avoir une diminution de la dopamine au niveau du striatum ce qui va à l'inverse de l'hypothèse d'une augmentation de la voie dopaminergique. Ces résultats mettent en avant l'implication d'autres systèmes dans l'apparition des symptômes de la pathologie (Froudist-Walsh et al., 2017).

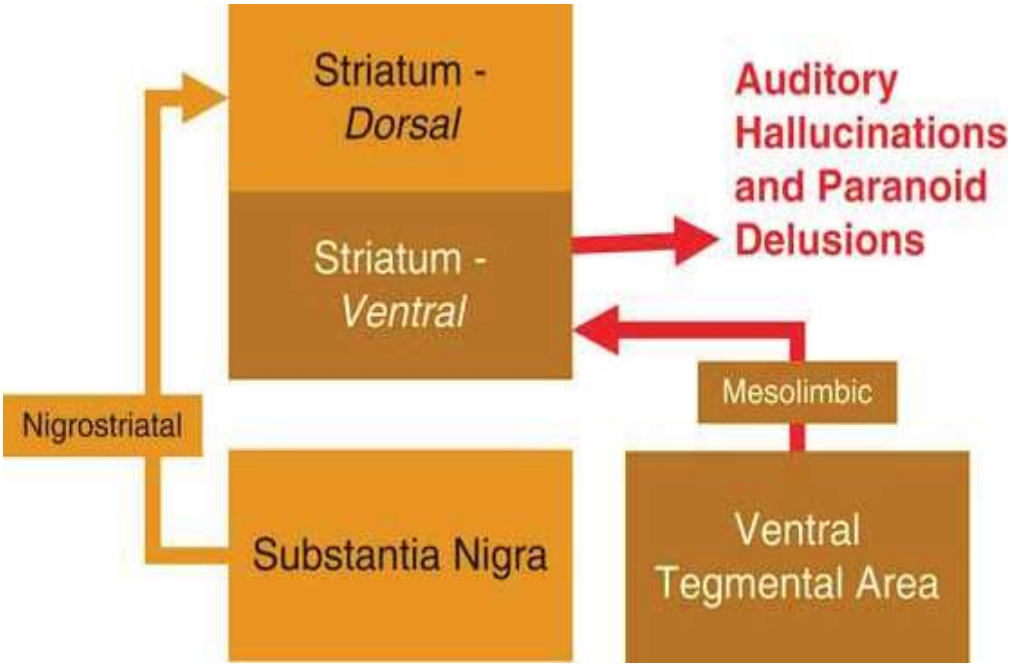


Figure 5 : Hypothèse d'une dérégulation de la transmission dopaminergique dans la schizophrénie. La voie mésolimbique se projettant de l'ATV au niveau du striatum ventral est hyperactivée et serait à l'origine des hallucinations auditives et des délires. La voie nigrostriatale se projettant de la substance grise au striatum dorsal qui contrôle les mouvements moteurs n'est pas affectée (Stahl, 2018).

b. Hypothèse glutamatergique

L'implication du système glutamatergique dans la schizophrénie a été mise en avant *via* les récepteurs NMDA. En effet, il a d'abord été observé chez des individus sains l'apparition de psychoses suite à la consommation de composés antagonistes des récepteurs NMDA, comme la phencyclidine (PCP) ou la kétamine (Krystal et al., 1999; Pradhan, 1984). Depuis, de nombreux modèles animaux – modèles PCP, kétamine, dizolcilpine (MK-801) – se basent sur un hypofonctionnement des récepteurs NMDA afin de reproduire certains des symptômes observés chez les patients schizophrènes (Cadinu et al., 2018; Haaf et al., 2018).

L'hypofonctionnement des récepteurs NMDA a été caractérisés plus spécifiquement au niveau des interneurones GABAergiques du CPF. Cette diminution entraînant un hyperfonctionnement du système glutamatergique associé à une dérégulation dans la balance excitation/inhibition.
Des études post-mortem de patients schizophrènes montrent des altérations de la neurotransmission GABAergique avec une diminution de l'ARNm et de la protéine GAD67 (principale enzyme de synthèse du GABA) au niveau du CPF. Cette diminution d'ARNm est retrouvée au niveau des interneurones PV qui génèrent les oscillations gamma. Ces dernières sont corrélées à l'exécution d'une tâche cognitive comme la mémoire de travail (Dienel and Lewis, 2019; Taylor and Tso, 2015). En effet, chez la souris, la délétion des récepteurs NMDA spécifiquement au niveau des interneurones PV entraine une désynchronisation des rythmes gamma associée à des déficits dans la mémoire de travail, l'habituation et l'apprentissage associatif (Carlén et al., 2012).

Nous verrons plus en détail ces dysfonctionnements au niveau du CPF ainsi que le modèle pharmacologique PCP et leurs implications dans les symptômes de la schizophrénie dans les parties suivantes.

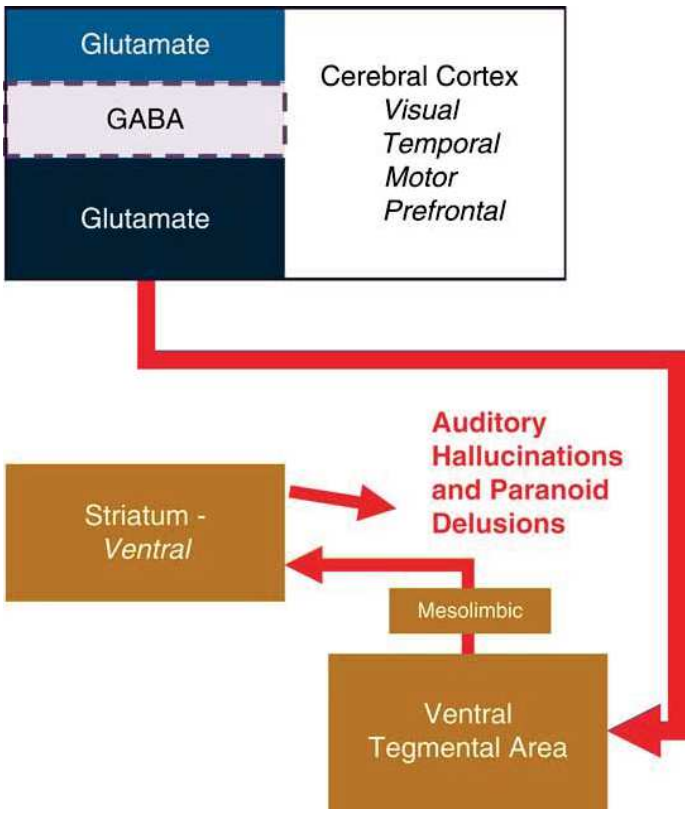


Figure 6 : Hypothèse d'une dérégulation de la transmission glutamatergique dans la schizophrénie. L'hypofonctionnement des récepteurs NMDA au niveau des interneurones GABA du cortex cérébral entraine une suractivation glutamatergique de l'aire tegmentale ventrale. La suractivation de cette voie induit à son tour un excès de dopamine dans le striatum ventral *via* la voie mésolimbique et serait à l'origine des hallucinations et des délires paranoïdes (Stahl, 2018).

Une libération excessive de glutamate dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) entraine une suractivation de la voie dopaminergique méso-limbique et une libération augmentée de dopamine dans le Nacc. Cet hyperfonctionnement de la transmission glutamatergique (**Figure 6**) est à l'origine des symptômes positifs de la pathologie. Cet hyperfonctionnement est aussi à l'origine des symptômes négatifs et cognitifs. En effet, l'augmentation glutamatergique au niveau de l'ATV entraine une suractivation des interneurones GABAergiques dans cette zone et ainsi une inhibition des neurones dopaminergiques de la voie dopaminergique méso-corticale.

Il semble donc nécessaire de diminuer la libération de glutamate afin de limiter l'ensemble de ces dérégulations et ainsi les symptômes observés. Dans cette optique des agonistes et antagonistes des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGlu) ont été étudiés. Les récepteurs $mGlu_2$ sont des récepteurs couplés aux protéines Gi, majoritairement présynaptiques ils vont permettre de diminuer la libération de neurotransmetteurs dont le glutamate. De façon intéressante, des études post-mortem ont montré que l'expression de ce récepteur est diminuée au niveau du cortex frontal de patients schizophrènes non traités avec des antipsychotiques (González-Maeso et al., 2008). Il a également été montré dans des modèles neurodéveloppementaux de schizophrénie chez le rat que l'utilisation de

LY379268, un agoniste des récepteurs $mGlu_{2/3}$ permet de diminuer les déficits cognitifs notamment de mémoire de travail ainsi que les altérations de la transmission synaptique glutamatergique et de l'excitabilité neuronale au niveau du CPF à l'âge adulte (Xing et al., 2018). Cependant, en clinique, l'utilisation chronique d'agonistes des récepteurs $mGlu_{2/3}$ montre une efficacité faible, très probablement à cause de leur manque de spécificité envers les récepteurs $mGlu_2$ (Galici et al., 2005). Ainsi, de nouvelles molécules, spécifiques des récepteurs $mGlu_2$, afin d'éviter tout effet secondaire associés à l'activation concomitante des récepteur $mGlu_3$, ont été développées et testées en clinique. Cette sélectivité est permise grâce à l'utilisation de PAM (modulateurs allostériques positifs) qui augmentent l'affinité de liaison du ligand. Ces PAM $mGlu_2$ ont montré des effets thérapeutiques prometteurs. Ils entrainent une diminution de l'hyperlocomotion, une diminution de la libération de glutamate au niveau cortical et ont des effets procognitifs (Maksymetz et al., 2017). En phase I d'essais cliniques, le JNJ40411813, un PAM $mGlu_2$, présente des effets encourageants sur les symptômes négatifs induits par une faible dose de kétamine, cependant malgré une tolérance correcte chez les individus sains, ce composé est associé à une diminution de la précision dans des tâches d'attention (Salih et al., 2015). Un autre composé le AZD8529 a été développé en phase clinique II, il montre une bonne tolérance sans effets secondaires importants cependant les améliorations observées ne sont pas significatives par rapport à la prise d'un placebo (Litman et al., 2016).

Ainsi les effets bénéfiques des agonistes des récepteurs $mGlu_2$ identifiés dans les modèles animaux ne sont pas forcément tous retrouvés dans les essais cliniques chez l'Homme, montrant ainsi que cette seule cible n'est pas suffisante pour reverser les symptômes des patients schizophrènes.

c. Hypothèse sérotoninergique

Le système sérotoninergique est également dérégulé dans cette pathologie (Abi-Dargham, 2007; Eggers, 2013). Un hypofonctionnement du système sérotoninergique a été proposé suite à l'observation d'une atrophie corticale associée à une diminution des niveaux du métabolite de la sérotonine dans le liquide céphalo-rachidien chez des patients schizophrènes (Bleich et al., 1988; Yamasue et al., 2004). Cet hypofonctionnement serait associé aux symptômes négatifs de la pathologie (Peitl et al., 2016) mais de plus en plus d'études montrent le lien entre des dérégulations du système sérotoninergique et les déficits cognitifs présents dans la pathologie. Pour exemple, les effets bénéfiques de certains neuroleptiques atypiques comme l'amisulpride, observés dans la dépression et la cognition sont attribués à l'inhibition des récepteurs $5\text{-}HT_7$ de la sérotonine (Nikiforuk and Popik, 2013).

D'autres études ont mis en avant un hyperfonctionnement de la neurotransmission sérotoninergique (Eggers, 2013). En effet, dès les années 1950 des études mettent en corrélation les symptômes positifs de la pathologie comme les hallucinations avec les symptômes observés chez des patients toxicomanes et montrent que le LSD (lysergic acid diethylamide) induit des psychoses (Breier, 1995). Dès 1998, Vollenweider et son équipe montrent chez des sujets sains que les effets psychotropes induits par le LSD et la psilocybine sont reversés par l'administration de kétanserine, un antagoniste des récepteurs $5\text{-}HT_{2A}$ (Preller et al., 2017; Vollenweider et al., 1998). Le récepteur $5\text{-}HT_{2A}$ est donc responsable des effets hallucinogènes de certains composés tels que LSD, DOI, mescaline ou psilocybine (**Figure 7**) que ce soit chez la souris ou chez l'Homme (Halberstadt, 2015; Hanks and González-Maeso, 2013; Preller et al., 2017). Il a été suggéré que ce récepteur puisse être impliqué dans les hallucinations visuelles. En

effet, une diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{2A} est trouvée dans le cortex visuel de patients présentant des symptômes psychotiques ainsi que chez des patients atteints de la maladie de Parkinson dont les hallucinations visuelles peuvent être fréquentes (Kometer et al., 2011; William Moreau et al., 2010).

Les récepteurs 5-HT_{2A} sont activés par des agonistes hallucinogènes et non hallucinogènes qui sont associés à des voies de signalisations différentes. Ainsi, tous les agonistes peuvent activer les voies de signalisations liées à Gq, cependant les composés hallucinogènes vont être en capacité d'activer aussi les voies de signalisations dépendantes de la protéine $G_{i/o}$ (**Figure 7**). L'activation d'une ou l'autre de ces voies mène à des réponses comportementales différentes chez la souris, tel que le balancement saccadé de la tête « head twitch response » qui permet d'évaluer l'effet hallucinogène d'un composé (Halberstadt and Geyer, 2018).

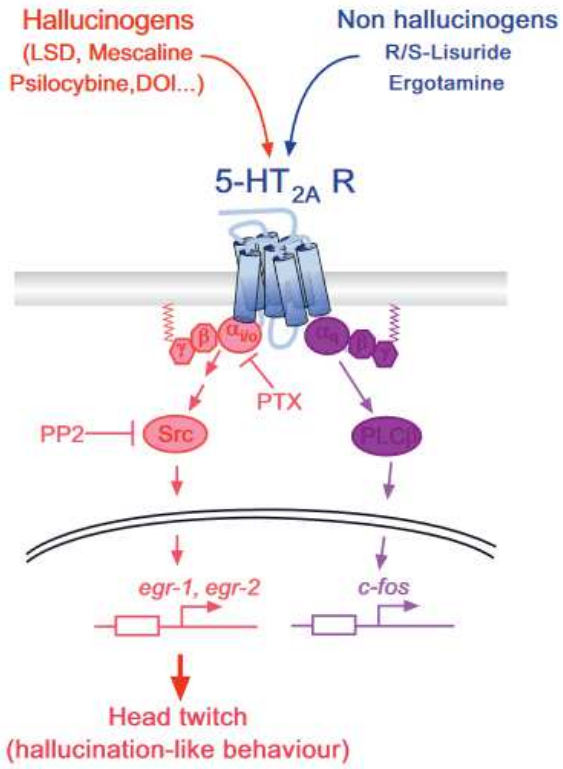


Figure 7 : Voies de signalisations associées aux récepteurs 5-HT_{2A}. Les deux classes d'agonistes hallucinogènes et non hallucinogènes permettent l'induction de c-fos via la protéine $G_{q/11}$ (en violet). Seuls, les agonistes hallucinogènes permettent aussi l'induction d'egr-1 et d'egr-2 (en rouge), via la protéine $G_{i/o}$ et entrainent un « head twitch » caractéristique de l'effet hallucinogène de ces composés (Marin et al., 2011).

Pour finir, la pimavanserine, un agoniste inverse des récepteurs 5-HT_{2A} a été notamment approuvé aux Etats-Unis comme traitement contre les hallucinations et les délires associées aux psychoses retrouvées dans la maladie de Parkinson (Cummings et al., 2018).
D'autres études réalisées chez la souris ont montré que ce sont spécifiquement les récepteurs localisés au niveau postsynaptique des neurones pyramidaux du CPF qui vont être recrutés pour medier les effets des hallucinogènes et induire une réponse comportementale semblable aux symptômes positifs de la schizophrénie (González-Maeso et al., 2007). Les antipsychotiques de seconde génération actuellement utilisés comme traitement de la schizophrénie sont, entre autres, des antagonistes des

récepteurs 5-HT_{2A}. Ces molécules sont ainsi efficaces pour traiter les symptômes positifs observés dans la pathologie. Cependant, une étude précédente réalisée par mon équipe a démontré que les récepteurs 5-HT_{2A} présynaptiques des synapses thalamo-corticales jouent un rôle essentiel dans les processus de mémoire associative suggérant que les antipsychotiques, en bloquant ces récepteurs puissent aggraver les troubles cognitifs du patient.

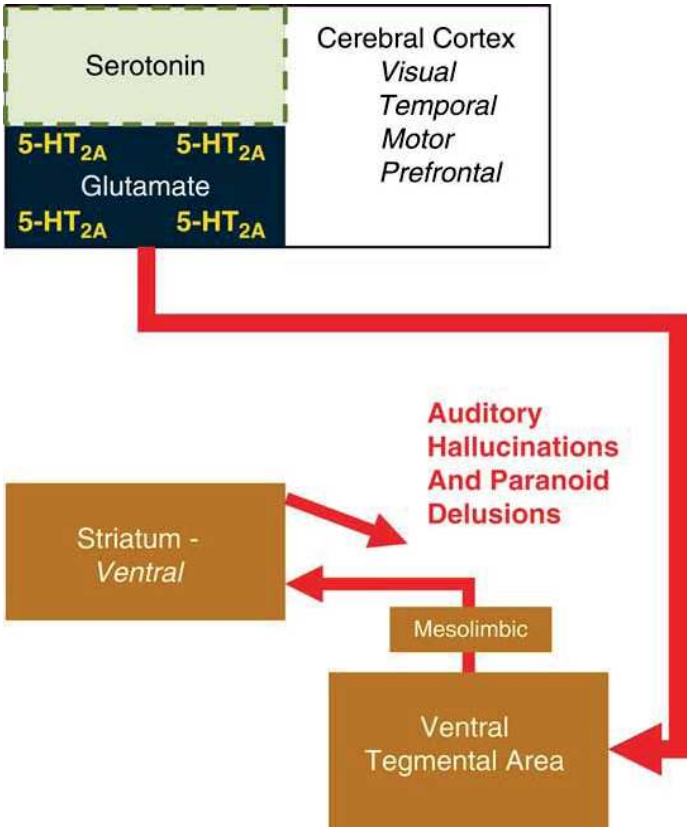


Figure 8 : Implication de l'hyperactivation des récepteurs 5-HT_{2A} dans les symptômes de la pathologie. Cette hyperactivation due soit à un excès de sérotonine, soit à une régulation à la hausse des récepteurs 5-HT_{2A} (en condition pathologique) ou à la prise d'un agoniste psychédélique hallucinogène 5-HT_{2A} (LSD, psilocybine), pourraient conduire à une libération excessive de glutamate dans l'ATV activant la voie mésolimbique. Cela entraînerait un excès de dopamine dans le striatum ventral, étant à l'origine des psychoses (Stahl, 2018).

Il est important de comprendre que ces trois systèmes – dopaminergique, glutamatergique et sérotoninergique – sont interconnectés et ne sont pas strictement impliqués dans un seul symptôme de la pathologie mais vont interagir ensemble et activer différentes voies de signalisations provoquant les symptômes observés. Par exemple, l'hypofonctionnement des récepteurs NMDA au niveau des interneurones GABAergiques du CPF entraine une hyperactivation de la voie glutamatergique au niveau de l'ATV (**Figure 8**) et est à l'origine d'un excès de dopamine au niveau de la voie mésolimbique (Stahl, 2018).

C. Traitements actuellement disponibles

La prise en charge de la schizophrénie se fait d'une part grâce à une approche médicamenteuse avec des traitements symptomatiques pharmacologiques (utilisation d'antipsychotiques) et d'autre part grâce à une approche psychologique qui est essentielle pour que le patient comprenne la pathologie et soit enclin à se soigner.

a. Les traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques peuvent être classés en trois groupes : les antipsychotiques typiques, les antipsychotiques atypiques et les antipsychotiques de nouvelle génération.

1. Les antipsychotiques typiques

Les antipsychotiques typiques, classiques, conventionnels ou aussi nommés de première génération ciblent le système dopaminergique et vont permettre de bloquer les récepteurs D2 postsynaptiques dans le but de diminuer l'hyperfonctionnement du système dopaminergique. Le premier agent neuroleptique, la chlorpromazine, de la famille des phenotiazines, découvert en France dans les années 1950, a révolutionné la prise en charge des psychoses et ouvert la voie aux traitements des maladies mentales (López-Muñoz et al., 2005). Cependant les antipsychotiques de première génération montrent une certaine aspécificité expliquant les effets secondaires indésirables qui leur sont attribués comme des symptômes extrapyramidaux importants (responsable de dyskinésies et tremblements) et une hyperprolactinémie (responsable de dysfonctionnements sexuels tels qu'un hypogonadisme et de l'infertilité). De plus, ils ne sont efficaces que sur les symptômes positifs.

2. Les antipsychotiques atypiques

Depuis la découverte dans les années 1990 de la clozapine, le traitement pharmacologique de la schizophrénie a fortement évolué. Les antipsychotiques atypiques, non conventionnels ou de seconde génération sont à la fois des antagonistes des récepteurs D2 dopaminergiques et des récepteurs 5-HT_{2A} (Kuroki et al., 2008). Ainsi, ils vont permettre de diminuer les effets secondaires observés avec les antipsychotiques de première génération et vont aussi avoir un effet sur les symptômes négatifs de la pathologie (Meltzer, 1989). Les antipsychotiques comme la quetiapine, la clozapine et le ziprasidone sont des antagonistes ayant une forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{2A} et une affinité plus faible pour les récepteurs D2. Ce sont également des agonistes partiels des récepteurs 5-HT_{1A} qui sont des autorécepteurs somato-dendritiques. L'activation de ces autorécepteurs augmente l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV et la libération de dopamine par la voie mésocorticale au niveau du CPF. Or nous avons vu que les symptomes cognitifs et négatifs semblent être associés à un hypofonctionnement de la voie mésocorticale. Ces données laissent penser que ces antipsychotiques sont en capacité de réguler ces symptomes (Díaz-Mataix et al., 2005).

Cependant l'efficacité des antipsychotiques de seconde génération sur l'ensemble des symptômes de la schizophrénie est discutable. Les symptômes peuvent être encore présents de façon significative deux ans après le début du traitement, impactant ainsi fortement la qualité de vie du patient (Novick

et al., 2009). De plus, 30 à 40% des patients ne répondent pas à ces traitements, ce manque d'efficacité fait que de nombreux patients les arrêtent (Lieberman et al., 2005). Enfin, des effets secondaires assez importants sont observés. Par exemple la clozapine, recommandée pour les patients résistants aux autres neuroleptiques, peut entraîner des convulsions ou, pour les formes les plus graves, une agranulocytose (De Berardis et al., 2018; Siskind et al., 2016). Enfin, aucun traitement pharmacologique actuellement sur le marché n'est en capacité de traiter efficacement les troubles cognitifs ou les symptômes négatifs (Carbon and Correll, 2014).

3. Les antipsychotiques de nouvelle génération

Les antipsychotiques de nouvelle génération ou de troisième génération ont été étudiés sur la base de ces constats. Ces composés, comme l'aripirprazole, le brexpiprazole et la cariprazine sont tous des agonistes partiels des récepteurs D2 (Keks et al., 2020). L'aripiprazole est également un agoniste partiel des récepteurs D2, des récepteurs 5-HT_{1A} et dans une moindre mesure un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (Burris et al., 2002; Shapiro et al., 2003). L'aripiprazole est qualifié de « stabilisateur de la dopamine », le fait que ce ne soit pas un antagoniste des récepteurs D2 permet à la fois de diminuer la transmission dopaminergique au niveau du striatum en inhibant la libération dopaminergique présynaptique et permet aussi une activation moins importante des récepteurs D2 postsynaptiques sans les inhiber complètement. Ainsi, les effets délétères extrapyramidaux sont moins importants, cependant il reste certains effets secondaires suite à la prise de ce composé (Ribeiro et al., 2018). De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblent principalement le système glutamatergique avec, comme nous l'avons vu précédemment les PAM $mGlu_2$.

Ainsi, les antipsychotiques actuels sont efficaces pour traiter les symptômes positifs de la pathologie, dans une moindre mesure les symptômes négatifs mais sont totalement inefficaces pour réguler les déficits cognitifs, il est donc nécessaire de mieux comprendre les voies de signalisations impliquées dans la pathologie afin d'identifier de nouvelle cible thérapeutique.

b. Les traitements psychologiques

Afin d'atténuer les altérations psychologiques et sociales, il est nécessaire qu'un traitement non médicamenteux soit mis en place pour les patients diagnostiqués schizophrènes et chez les personnes à hauts risques de transition. Comme nous l'avons vu, la schizophrénie est une pathologie qui se manifeste de façon précoce. Afin d'augmenter les chances de succès du traitement, il est essentiel que ces patients soient pris en charge dès l'apparition du premier épisode de psychose afin d'éviter que ces événements psychotiques ne deviennent chroniques. Pour cela, il est nécessaire d'adapter le traitement (médicamenteux et psychologique) au patient et au stade de la maladie. Ces traitements psychologiques ont plusieurs aspects, il est d'abord essentiel que le patient et son entourage comprennent la pathologie, on parle d'éducation thérapeutique. La thérapie cognitivo-comportementale (TCC) et la remédiation cognitive sont aussi au centre de ces traitements psychologiques. Le but étant notamment de diminuer les effets délétères des antipsychotiques sur la cognition, d'améliorer la qualité de vie des patients en intervenant pour une amélioration de l'insertion professionnelle, de la sociabilité et des activités quotidiennes. Le but est que le patient prenne conscience de ses capacités.

1. La remédiation cognitive

La remédiation a pour but d'améliorer les fonctions cognitives et sociales chez les patients et permet de diminuer les symptômes psychotiques. Cette thérapie est favorisée pour des altérations du traitement de l'information associées à une altération de l'attention sélective ou de la reconnaissance faciale (Levaux et al., 2009; Twamley et al., 2003). La remédiation cognitive commence quand le patient est stable et que son traitement médicamenteux a été réduit à la posologie minimale efficace. La thérapie peut se faire en groupe ou de façon individuelle et sera réalisée au travers d'exercices spécifiques qui peuvent être verbaux, informatiques ou écrits. Le fonctionnement cognitif sera évalué après chaque séance afin de pouvoir adapter les séances au patient et ainsi d'améliorer les fonctions cognitives pour permettre au patient de se réadapter socialement et professionnellement.

2. Les thérapies cognitivo-comportementales

Les TCC vont agir sur l'intensité des symptômes et sur l'apprentissage. Le but est d'essayer de diminuer « les biais » de raisonnements qui entrainent chez le patient le maintien de ses croyances et de ses idées délirantes. Cette thérapie agit aussi sur les symptômes négatifs et a pour but d'eviter que le patient se replie et s'isole socialement. Ces thérapies peuvent se dérouler en groupe ou seul, avec pour objectif de renforcer leur confiance en eux et d'apprendre à gérer leurs émotions (Pilling et al., 2002). Cette approche va aider les patients à normaliser leurs symptômes, à discriminer des expériences psychotiques de celles qui ne le sont pas et aussi de discuter des origines de leurs hallucinations (Burns et al., 2014). De plus, les TCC semblent efficaces chez les personnes qui sont résistantes aux traitements antipsychotiques. Une étude montre que juste après ce type de thérapie les patients montrent une diminution des hallucinations auditives ainsi que des améliorations au niveau de la perception de la maladie. Malheureusement, les bienfaits ne sont que transitoires et disparaissent 6 mois après la thérapie (Valmaggia et al., 2005).

c. Approches complémentaires

La résistance aux traitements peut mener à des thérapies complémentaires telles que les stimulations cérébrales avec des thérapies électroconvulsives, des stimulations magnétiques transcraniennes répétitives ou des stimulations cérébrales profondes.

1. Les thérapies électroconvulsives

Ces thérapies ont été utilisées dès les années 30 pour le traitement de la schizophrénie, d'abord abandonnées suite à l'émergence des antipsychotiques, elles sont de nouveau utilisées dans les années 60 pour les patients résistants aux traitements. Cette thérapie consiste, sous anesthésie, en de brèves injections de courants dans le cerveau afin d'induire une crise convulsive. Diverses études montrent que l'utilisation d'une thérapie électroconvulsive associée à des antipsychotiques permet une réduction des symptômes chez les patients schizophrènes (Tharyan and Adams, 2005).

2. Les thérapies de stimulations transcraniennes répétitives

Les STR sont apparues plus récemment et consistent en l'application d'impulsions magnétiques fortes et brèves au niveau de la surface du cuir chevelu. Cette thérapie s'est montrée en premier lieu efficace notamment pour le traitement des hallucinations auditives. Sur la base d'une altération de la balance excitation/inhibition dans le cortex et de la connectivité corticale, la STR aurait à la fois des effets sur les symptômes positifs (*via* le traitement des hallucinations auditives), négatifs (en rapport à l'hypoactivité du CPF qui peut être ici reversée) et cognitifs (en rapport aux dérégulations de la balance excitation/inhibition et l'apparition de ces déficits) de la pathologie (Mehta et al., 2019; Nucifora et al., 2019). Ce qui est intéressant avec cette technique, c'est qu'il est possible de réaliser des stimulations basses fréquences au niveau du cortex temporo-parietal gauche (car il y a un hyperfonctionnement dans cette zone associé aux hallucinations auditives) et des stimulations hautes fréquences au niveau du cortex frontal (car un hypofonctionnement dans cette zone est associé aux symptomes négatif). Enfin, cette thérapie est non invasive ce qui présente aussi un avantage.

3. Les stimulations cérébrales profondes

Ce traitement consiste à implanter un stimulateur qui va envoyer des impulsions électriques dans les zones d'intérêts afin de rétablir l'excitabilité cérébrale. Cette technique est utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson mais encore peu d'études sont réalisées pour évaluer ses bienfaits sur la schizophrénie (Beszłej et al., 2019). Néanmoins, chez une patiente atteinte de schizophrénie et dont le traitement avec des antipsychotiques n'a présenté aucun effet, ce dispositif implanté au niveau du Nacc améliore dès 4 semaines les symptômes positifs et négatifs. Après 11 mois de thérapie, l'amélioration de ces symptômes est stable avec un effet bénéfique observé dans la qualité de vie de la patiente (Corripio et al., 2016).

D. Dysfonctionnement du CPF et schizophrénie

a. Généralités sur le CPF

Au cours de l'évolution le CPF s'est développé et complexifié, sa croissance s'est accompagnée d'une différenciation phylogénétique complète ce qui en fait une structure très spécialisée. Il constitue environ 30% des aires corticales et a une période de maturation longue qui s'étend jusqu'à l'adolescence. En effet, c'est la dernière structure cérébrale à se consolider, et il n'est complètement mature qu'à l'âge de 25 ans environ, ce qui le rend extrêmement vulnérable aux perturbations causées par des événements externes vécus avant cet âge. L'ensemble de ces informations et le fait qu'il soit notamment impliqué dans les fonctions cognitives et exécutives en font un acteur majeur dans les comportements. Ainsi, de nombreuses pathologies psychiatriques et neurodéveloppementales présentent des altérations au niveau du CPF, telles que la schizophrénie, la sclérose tubéreuse ou l'autisme (Meffre et al., 2012; Molnár et al., 2019).

1. Mise en place du réseau cortical

Le CPF a une organisation laminaire et sa connectivité fonctionnelle se base notamment sur la mise en place des réseaux neuronaux. La formation du cortex cérébral requiert une régulation complexe des processus cellulaires dans l'espace et le temps et implique ainsi une variété de cellules progénitrices (Kwan et al., 2012).

La migration neuronale va se faire de façon radiale, de façon coordonnée entre neurones inhibiteurs et excitateurs en partant des couches profondes vers les couches superficielles (Nowakowski et al., 2017; Rakic, 1988).
Les cellules souches neuroépithéliales vont se diviser afin de produire un pool de progéniteurs corticaux qui deviendront par la suite des neurones spécialisés (Nowakowski et al., 2017; Pfeiffer et al., 2016). Les neuroblastes – les cellules post-mitotiques qui donnent les neurones – seront ensuite guidés par la glie radiaire dans leur migration, qui se fait perpendiculairement à la surface ventriculaire. Leur croissance chez la souris se fait du 11 au 18ème jour embryonnaire (Silbereis et al., 2016). Une fois leurs destinations atteintes, les neuroblastes vont poursuivre leurs différenciations en émettant des prolongements – neurites – qui donneront par la suite l'axone et les dendrites. Les neurones pyramidaux formés précocement seront présents dans les couches les plus profondes V-VI et les neurones plus récents dans les couches superficielles II-III (Marín-Padilla, 2014). Ces neurones immatures vont se complexifier jusqu'à la pré-puberté (Petanjek et al., 2011).
La plupart des interneurones ont une migration tangentielle, parallèle à la surface ventriculaire et contrairement aux neurones excitateurs qui dérivent du cortex, les interneurones inhibiteurs proviennent des éminences ganglionnaires (Gelman and Marín, 2010; Laclef and Métin, 2018; McManus et al., 2004).

2. Maturation du réseau cortical

Le CPF est composé principalement de deux types de neurones, les neurones excitateurs et les neurones inhibiteurs. Les neurones excitateurs, ou neurones pyramidaux, constituent environ 80% des neurones corticaux et utilisent le glutamate comme principal neurotransmetteur excitateur. Les neurones inhibiteurs ou interneurones constituent environ 20% des neurones corticaux et utilisent le GABA comme principal neurotransmetteur inhibiteur (Markram et al., 2004; Rudy et al., 2011). Les neurones pyramidaux vont transmettre les signaux excitateurs dans les différentes zones du cerveau et au sein du CPF tandis que les interneurones vont plutôt avoir un rôle de régulateur en inhibant généralement les neurones alentour.

Le CPF a une des maturations les plus tardives et elle n'est complète qu'en fin d'adolescence. En effet, l'adolescence correspond à une période critique du CPF. Durant cette période, il va y avoir au sein de cette structure, un nombre important de réarrangements synaptiques, avec un important processus d'élagage synaptique qui va permettre d'éliminer un grand nombre de synapses (**Figure 3**) et ce de la fin de la petite enfance jusqu'à l'adolescence (Casey et al., 2008; Larsen and Luna, 2018).

La substance blanche quant à elle va augmenter de manière significative, afin que les systèmes de connexion entre les différentes régions cérébrales soient plus efficaces. Cela s'accompagne d'une myélinisation importante des structures intracorticales qui est corrélée avec une diminution de la substance grise et une augmentation des capacités cognitives (Giedd, 2004; Tamnes et al., 2017).

3. Structure et fonctions cognitives du CPF

Le CPF est constitué de trois grandes parties anatomiquement différentes (Barbas, 1989; Carmichael and Price, 1994; Dalley et al., 2004), le CPF médian, latéral et orbital. Chacune de ces régions préfrontales est connectée à elle-même et aux deux autres (Trojanowski and Jacobson, 1977; Yeterian and Pandya, 1985) (**Figure 9**).

Le CPF médian se divise en deux parties : dorsale et ventrale. La partie dorsale comprend le cortex précentral et le cortex cingulaire antérieur. La partie ventrale comprend le cortex limbique, infralimbique et le cortex orbital médian. Les lésions de cette région entraînent généralement une perte de spontanéité et des difficultés dans l'initiation des mouvements et de la parole (Cummings, 1993; Valenstein et al., 1987). Les patients atteints de lésions médiales/cingulaires sont généralement apathiques, désintéressés par l'environnement et incapables de concentrer leur attention sur des tâches comportementales ou cognitives. Le CPF médian est donc impliqué dans le contrôle des fonctions exécutives telles que la planification et le raisonnement (MacDonald et al., 2000).

Le CPF latéral est composé des parties dorsales et ventrales du cortex insulaire granulaire et du cortex orbital latéral. Les lésions de la région latérale induisent les déficits cognitifs les plus caractéristiques de la lésion du lobe frontal. Le trouble le plus courant est l'incapacité à formuler et à exécuter des plans et des séquences d'actions, associé généralement à des troubles de l'attention (Shallice, 1988). Il est aussi impliqué dans les processus motivationnels et affectifs (Bechara et al., 2000). Le CPF latéral joue donc un rôle crucial dans l'organisation et l'exécution du comportement, de la parole et du raisonnement.

Le CPF orbital est composé du cortex orbital ventral et du cortex ventro-latéro-orbital. Des lésions au niveau de cette zone induisent des changements de personnalité corrélés à d'importants troubles de l'attention (Zhou and Fuster, 1997). Il est aussi impliqué dans les fonctions cognitives telles que les processus de motivation, d'attention et d'émotion (Bush et al., 2002; Vogt, 2005).

Chacune de ces régions est aussi fortement impliquée dans les comportements sociaux avec un rôle dans la perception des autres, de soi, mais aussi dans la motivation sociale, le désir d'établir des connexions avec les autres et les récompenses/valeurs auxquelles sont rattachées la sociabilité (Bicks et al., 2015).

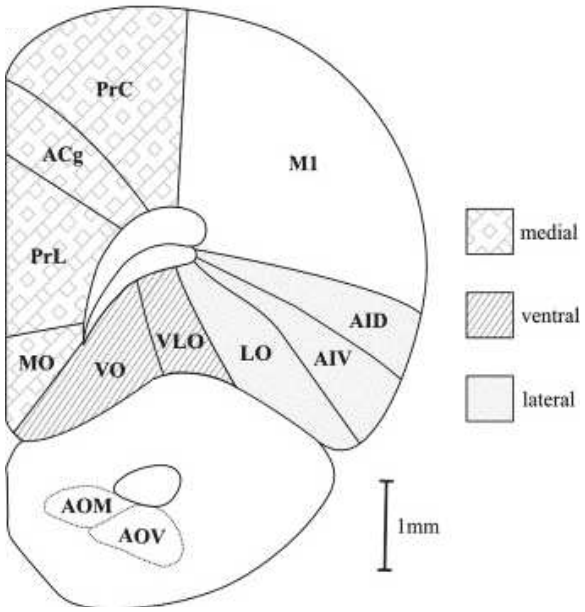


Figure 9 : Représentation schématique des différentes régions du CPF chez le rat. Abréviations : Cortex médian : PrC, cortex précentral ACg, cortex cingulaire antérieur ; PrL, cortex prélimbique ; MO, cortex orbital médian. Cortex ventral : VLO, cortex orbital ventrolatéral ; VO, cortex orbital ventral. Cortex latéral : AID, cortex insulaire agranulaire dorsal ; AIV, cortex insulaire agranulaire ventral ; LO, cortex orbital latéral. AOM, noyau olfactif antérieur médian ; AOV, noyau olfactif antérieur ventral ; M1, aire motrice principale (Dalley et al., 2004).

Ainsi, *via* ses différentes régions et ses connexions réciproques avec les zones corticales et sous corticales, le CPF est en capacité de contrôler les fonctions cognitives et sociales. Pour exemple, une altération de la connexion entre le CPF dorsolateral et le cervelet est responsable de la gravité des symptômes négatifs. Le traitement par des thérapies de stimulations transcraniennes répétitives d'une durée de 4h sur 5 jours permet de diminuer la sévérité de ces symptômes (Brady et al., 2019). De plus, les études post-mortem de patients schizophrènes montrent une diminution totale du volume cérébral de 3% avec une perte de 2% de la matière grise. Ces études montrent aussi une diminution de la connectivité neuronale qui induit une réduction globale du volume du CPF et plus précisément de la matière grise (Kim et al., 2017; Selemon et al., 2002).

b. Balance excitation/inhibition

Au sein du réseau cortical il existe une balance entre la transmission excitatrice et la transmission inhibitrice. Les neurones vont reçoivent des entrées excitatrices et inhibitrices qui doivent être équilibrées et ajustées en permanence afin d'assurer le fonctionnement et la stabilité du réseau neuronal. Une altération dans la balance excitation/inhibition avec une sur et/ou une sous activation des neurones pyramidaux et/ou des interneurones peut générer une transmission de l'information qui sera, *in fine*, aberrante. Bien que les interneurones GABAergiques soient moins représentés que les neurones pyramidaux, ils vont contrôler la plasticité et l'excitabilité neuronale en agissant sur ces derniers. Le CPF étant impliqué dans de nombreux processus cognitifs, la balance excitation/inhibition joue un rôle fondamental dans la régulation de ces comportements. Ainsi, il est observé qu'une altération au niveau de ces circuits peut mener à des pathologies neurologiques et psychiatriques.

Les troubles du spectre de l'autisme, l'épilepsie ou la schizophrénie, sont associées à cette dérégulation dans la balance excitation/inhibition au niveau du CPF (Bicks et al., 2015; Canitano and Pallagrosi, 2017; Goldberg and Coulter, 2013; Zhou et al., 2015). Des études post-mortem de patients atteints d'autisme ou de schizophrénie ont montré, par exemple, des changements structurels dans les circuits GABAergiques et glutamatergiques (Chattopadhyaya and Cristo, 2012). L'altération de la transmission GABAergique est liée à une altération de la plasticité impliquant les récepteurs NMDA ainsi qu à une diminution des oscillations de fréquence gamma entraînant une hyperactivité corticale qui serait à l'origine des déficits d'inhibition cognitive responsables des hallucinations (Jardri et al., 2016). Comme nous l'avons abordé précédemment, des études réalisées sur des modèles précliniques de schizophrénie et en post-mortem chez l'Homme montrent une altération de la transmission GABAergique caractérisée par une diminution des taux d'ARNm de la PV et de la principale enzyme de synthèse du GABA (GAD67), ainsi qu'une diminution de l'immunoréactivité de son transporteur membranaire (GAT1) au niveau du CPF (Lewis, 2011). Il est important de noter que les interneurones PV sont nécessaires et suffisants dans la génération et le maintien des oscillations gamma (Cardin et al., 2009). L'altération de ces oscillations est associée aux déficits cognitifs observés dans la schizophrénie comme des déficits dans la mémoire de travail et au niveau de la flexibilité cognitive (Ferguson and Gao, 2018; McNally and McCarley, 2016).

Ces altérations au niveau des oscillations gamma et de la balance excitation/inhibition ont aussi un effet sur le comportement social. En effet, Yizhar et al., montrent dans des tests de sociabilité (exploration sociale et test de crawley) couplés à de l'optogénétique chez la souris, que la stimulation des neurones pyramidaux du CPF abolit l'exploration sociale alors que la stimulation des interneurones PV permet de reverser ces altérations, montrant ainsi l'importance de l'équilibre dans la balance excitation/inhibition (Yizhar et al., 2011).

Ainsi, l'ensemble des études suggèrent que l'altération de la transmission GABAergique observée à l'âge adulte dans la schizophrénie serait due à un hypofonctionnement des récepteurs NMDA au cours du neurodéveloppement induisant une altération de la maturation des interneurones. Le développement normal des interneurones GABAergiques semble donc essentiel afin d'éviter la genèse de la pathologie (Caballero et al., 2020; Kehrer et al., 2008; Kjaerby et al., 2014).

E. Modèles murins de la schizophrénie

De nombreux modèles animaux de la schizophrénie ont permis de mieux comprendre la pathologie et les mécanismes moléculaires qui entrent en jeu dans les symptômes de la maladie afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques aux patients (Jones et al., 2011; Winship et al., 2019). Ces modèles précliniques se divisent en quatre groupes : pharmacologiques, neurodéveloppementaux, génétiques ou lésionnel. Afin d'induire des symptômes plus prononcés, il est possible que l'induction de la pathologie combine plusieurs de ces quatre approches dans un même modèle. Les premiers modèles à avoir été développés reposaient sur un dysfonctionnement du système dopaminergique et présentaient principalement les symptômes positifs de la pathologie. Sachant que les déficits cognitifs et les symptômes négatifs sont très peu pris en charge par les antipsychotiques actuels, il est nécessaire de travailler sur des modèles animaux qui récapitulent la majorité des symptômes observés dans la pathologie. Lors de ma thèse je me suis intéressée à un modèle pharmacologique, le modèle PCP et un modèle génétique, les souris portant la mutation Disc1 L100P. Je ne décrirai ici que ces deux modèles de schizophrénie.

a. Le modèle pharmacologique phencyclidine (PCP)

Les modèles pharmacologiques résultant d'un hypofonctionnement des récepteurs NMDA (**Figure 10**) sont très utilisés comme modèle de la pathologie, les antagonistes à la base de ce blocage sont la PCP, la kétamine ou le MK-801 (Adell, 2020; Lodge and Mercier, 2015).

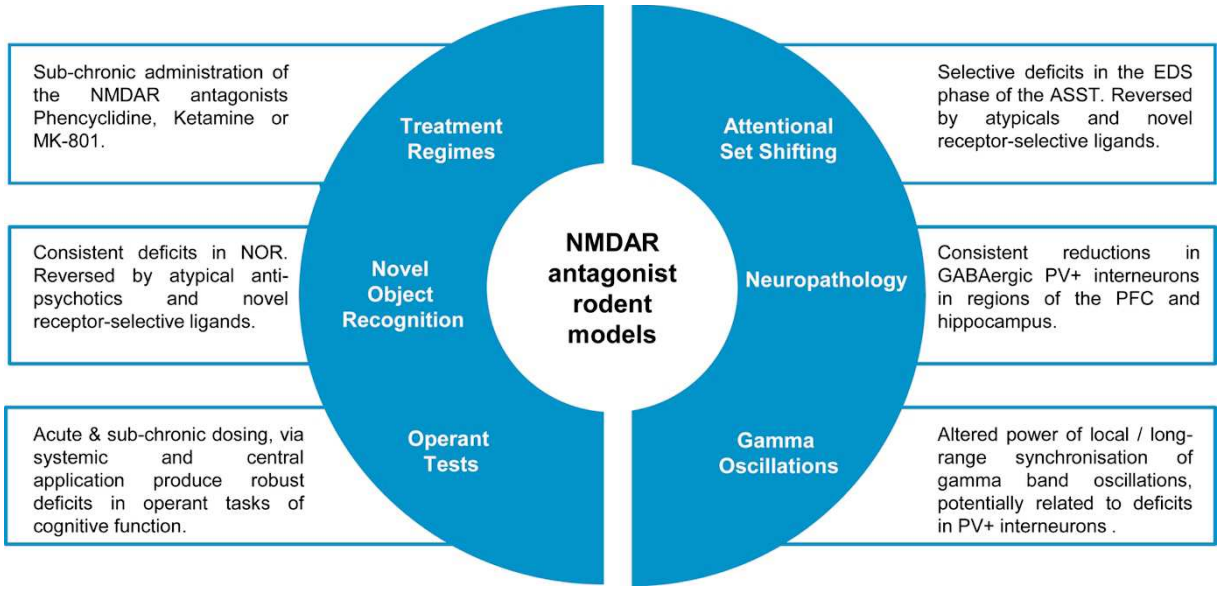


Figure 10 : Schéma récapitulant les altérations suite à l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs NMDA dans les modèles animaux. Schéma récapitulant les altérations observées suite à l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs NMDA dans les modèles animaux. De nombreux déficits comportementaux, neurochimiques et structuraux retrouvés dans ces modèles animaux sont communs à ceux observés chez les patients schizophrènes. Abréviations : ASST, attentional set shifting task ; EDS, extra-dimensional shift ; NOR, novel object recognition ; PV+, parvalbumin positive ; PFC, prefrontal cortex (Cadinu et al., 2018).

1. Généralités

La phencyclidine est un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA (**Figure 11**). Ce psychotrope hallucinogène a d'abord été développé et testé en clinique sur des modèles animaux en tant qu'anesthésique. Dans les années 1960, Greifenstein et son équipe testent cette molécule chez l'Homme sur la base des résultats observés chez les animaux (Domino and Luby, 2012; Greifenstein et al., 1958). Cependant, il est très vite décrit que ce composé entraine aussi des psychoses importantes avec des délires et hallucinations qui semblent mimer certains symptômes de la schizophrénie (Luby et al., 1959). Rapidement l'usage de la PCP, aussi nommé « poudre d'ange » ou « drogue du zombie » devient récréatif pour ces effets.

Il a été montré chez des mères consommant de la PCP lors de leur grossesse que la molécule passe la barrière du placenta, qu'elle est présente dans le lait maternel et qu'elle est retrouvée dans les urines des enfants au stade néonatal. Cette exposition à la PCP entraine une altération du développement du cerveau notamment au niveau de l'hippocampe et du CPF, associée à un comportement anormal chez l'enfant caractérisé par des dysfonctionnements moteurs et d'apprentissage (Golden et al., 1987; Nicholas et al., 1982).

Très vite, il est montré chez l'Homme que la prise de PCP récapitule globalement l'ensemble des symptômes observés dans la schizophrénie. Sa consommation entraîne entre autres des hallucinations, des délires ainsi que des altérations dans les performances cognitives (Javitt and Zukin, 1991).

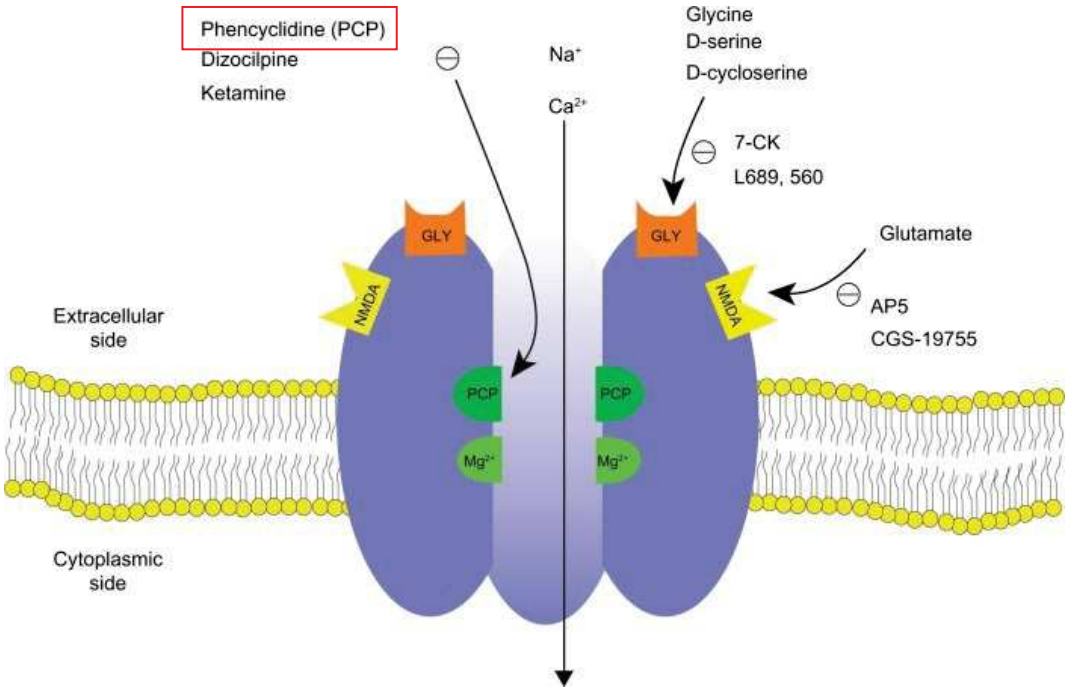


Figure 11 : Représentation schématique du récepteur NMDA et du site de liaison de la PCP (Li et al., 2011).

2. Injections néonatales de phencyclidine

Les facteurs de risques de développer une schizophrénie à l'âge adulte sont fortement augmentés si des altérations surviennent au cours du second trimestre de grossesse chez l'Homme, ce qui correspond aux deux premières semaines postnatales chez la souris. C'est aussi durant cette période que les récepteurs NMDA sont des acteurs majeurs pour le développement, la migration neuronale et pour les processus de plasticité dans le cortex cérébral (Reiprich et al., 2005). Au vu de ces résultats, le blocage des récepteurs NMDA par la PCP spécifiquement durant cette période (deux premières semaines postnatales) a été utilisé comme modèle préclinique de la schizophrénie chez les rongeurs.

D'abord très appliqué chez le rat, ce modèle a ensuite été transposé chez la souris (Nakatani-Pawlak et al., 2009). Cependant, très peu d'études ont été réalisées chez ces dernières. Nous essaierons de donner quelques exemples des troubles retrouvés dans le modèle néonatal (3 injections à 2 jours d'intervalle : 7ème, 9ième et 11ième jour postnatal soit J7, J9 et J11) afin de montrer que contrairement aux modèles d'injections aigües de PCP chez les animaux adultes, ce modèle induit des altérations irréversibles (et non transitoires) et récapitule la majorité des symptômes observés dans la schizophrénie faisant de ce modèle un modèle préclinique à forte valeur translationnelle (Wang and Johnson, 2005).

Altérations comportementales :

De nombreux changements comportementaux ont été décrits dans le modèle néonatal, avec par exemple des altérations dans le test de réflexe de sursaut suite à un stimulus acoustique (PPI) qui est caractéristique des symptômes positifs de la pathologie, un retrait social qui est apparenté aux symptômes négatifs ainsi que des déficits d'attentions, de mémoire de travail et de mémoire spatiale corrélés aux déficits cognitifs de la pathologie. Les résultats de locomotion peuvent être différents d'une étude à l'autre, certaines montrant une hyperlocomotion notamment chez le rat alors que chez la souris aucune différence n'est observée (Anastasio and Johnson, 2008; Nakatani-Pawlak et al., 2009; Rodríguez et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Altérations neuronales et neurochimiques :

Chez le rat, les injections répétées à J7, J9 et J11 induisent une neurodégénérescence associée à une augmentation des processus d'apoptose et entrainent des comportements anormaux à long terme mis en avant dans les tests de PPI (Wang and Johnson, 2005; Wang et al., 2003).

La maturation du système GABAergique commence durant les phases précoces du neurodéveloppement et la transmission glutamatergique médiée par les récepteurs NMDA est essentielles dans cette étape (Le Magueresse and Monyer, 2013). Ainsi, l'altération de la transmission glutamatergique par la PCP en néonatal entraine des altérations tant au niveau excitateur qu'inhibiteur et serait à l'origine de l'émergence des symptomes de la schizophrénie. En effet, les injections néonatales de PCP chez la souris induisent des modifications au niveau de la transmission GABAergique associées à une diminution de l'expression des interneurones PV et des épines dendritiques notamment dans le CPF, le Nacc et l'hippocampe, des régions essentielles aux fonctions cognitives. Ceci est en corrélation avec les diminutions observées dans le CPF et l'hippocampe de patients schizophrènes (Mouri et al., 2007; Nakatani-Pawlak et al., 2009). Il est aussi noté, chez le rat, une désynchronisation cérébrale avec la suppression des oscillations théta dans l'hippocampe et une augmentation des oscillations gamma au niveau du CPF entraînant des changements de synchronisation entre ces deux structures (Kjaerby et al., 2017). Le traitement néonatal chez le rat entraine aussi une diminution de la fréquence des courants miniatures postsynaptiques inhibiteurs dans les couches II/III des neurones pyramidaux, montrant qu'une altération de la transmission inhibitrice de façon précoce a un impact à l'âge adulte (Kjaerby et al., 2014).

Importance de la triple injection en néonatal :

D'autres modèles d'injections de PCP existent et sont administrés à l'âge adulte avec des protocoles d'injections qui diffèrent dans leur nombre et durée (injections dîtes aigües – injection unique – subchroniques – 2 à 14 jours – ou chroniques – 15 jours ou plus) ainsi que dans les doses de PCP injectées. Cependant, ces modèles ne prennent pas en compte les altérations neurodeveloppementales qui sont à l'origine de la schizophrénie et qui donc peuvent avoir lieu quand le blocage des récepteurs NMDA est réalisé en néonatal (Grayson et al., 2016).
De façon intéressante, des souris ayant reçu au stade néonatal une seule injection de PCP présentent des altérations dans le test de piscine de morris et dans le PPI mais pas dans les tests de reconnaissance d'objets (NOR) (Rodríguez et al., 2017) suggérant qu'une injection unique au stade néonatal n'est pas suffisante pour induire l'ensemble des symptômes. De plus suivant la dose injectée les résultats

peuvent être contradictoires, une étude précédente montre que l'injection unique de PCP, contrairement à une triple injection en néonatal, n'est pas en capacité d'induire des déficits dans le PPI (Anastasio and Johnson, 2008).
Ainsi le modèle d'injections de PCP (10mg/kg) à J7, J9 et J11 semble être le plus robuste pour mimer la pathologie.

D'autres études mettent en avant des modèles associant des altérations développementales et environnementales afin de mimer la pathologie. Pour exemple, l'association du modèle néonatal d'injections de PCP chez le rat avec une isolation post-sevrage entraine des déficits plus robustes à l'âge adulte notamment au niveau de la reconnaissance sociale (Hamieh et al., 2021). Ce double modèle permettrait de mimer les deux périodes critiques de la schizophrénie : la première, caractérisée par une altération au stade néonatal qui est pharmacologique et la seconde, plus tardive, durant la pré-adolescence qui de par l'isolation correspondrait à une altération environnementale. De même, une injection unique de PCP associée à une administration de THC au début de l'âge adulte potentialise les déficits et entraine cette fois ci des déficits dans les test de locomotion et de NOR qui n'étaient pas observés sans cette altération environnementale (Rodríguez et al., 2017). Des études montrent aussi les effets de ces doubles modèles avec des variantes dans les stress environnementaux imposés durant l'adolescence comme des protocoles de contention et de nage forcée. Ces modèles présentent à l'âge adulte des déficits cognitifs, dans les tests de reconnaissance d'objets, une augmentation de l'anxiété mais pas d'hyperlocomotion. Il est aussi observé des altérations de la transmission synaptique avec une diminution de la LTP au niveau de l'hippocampe (Moghadam et al., 2021).

Modèle d'injections néonatales et antipsychotiques :

Pour terminer, l'injection de PCP au stade néonatal est aussi justifiée comme modèle préclinique de schizophrénie car la sensibilité à la PCP est diminuée par l'administration d'antipsychotiques atypiques (Adem et al., 2019). Pour exemple, l'administration de clozapine à des souris et rats traités au stade néonatal permet de reverser, à l'âge adulte, les déficits observés dans les tests de sociabilités et d'hyperlocomotion (Hamieh et al., 2021; Nakatani-Pawlak et al., 2009). Il est aussi montré que l'administration d'olanzapine permet de diminuer l'augmentation des processus d'apoptose observée au niveau du CPF dorsolateral chez le rat (Wang et al., 2003).

b. Modèle Disc1

1. Généralités

Comme nous avons pu le voir dans la première partie de ce chapitre, l'étiologie de la schizophrénie est peu connue, cependant le facteur de risque le plus élevé de développer la pathologie reste l'hérédité (Sullivan et al., 2003). La schizophrénie est associée à de nombreuses variations génétiques et l'un des premiers gènes impliqués à avoir été caractérisé, est Disc1 (Disrupted in Schizophrenia 1).

Le locus du gène DISC a été qualifié de gène à risque, augmentant de 50 fois la probabilité de développer une maladie mentale. Cette mutation a été découverte grâce à une étude sur une famille écossaise (**Figure 12**) dans laquelle on retrouve une translocation entre les chromosomes 1 et 11

(translocation (1;11)(q42;q14.3)), qui est en corrélation avec des individus atteints de troubles bipolaires, de schizophrénie et de dépressions majeures (Blackwood et al., 2001; Clair et al., 1989).

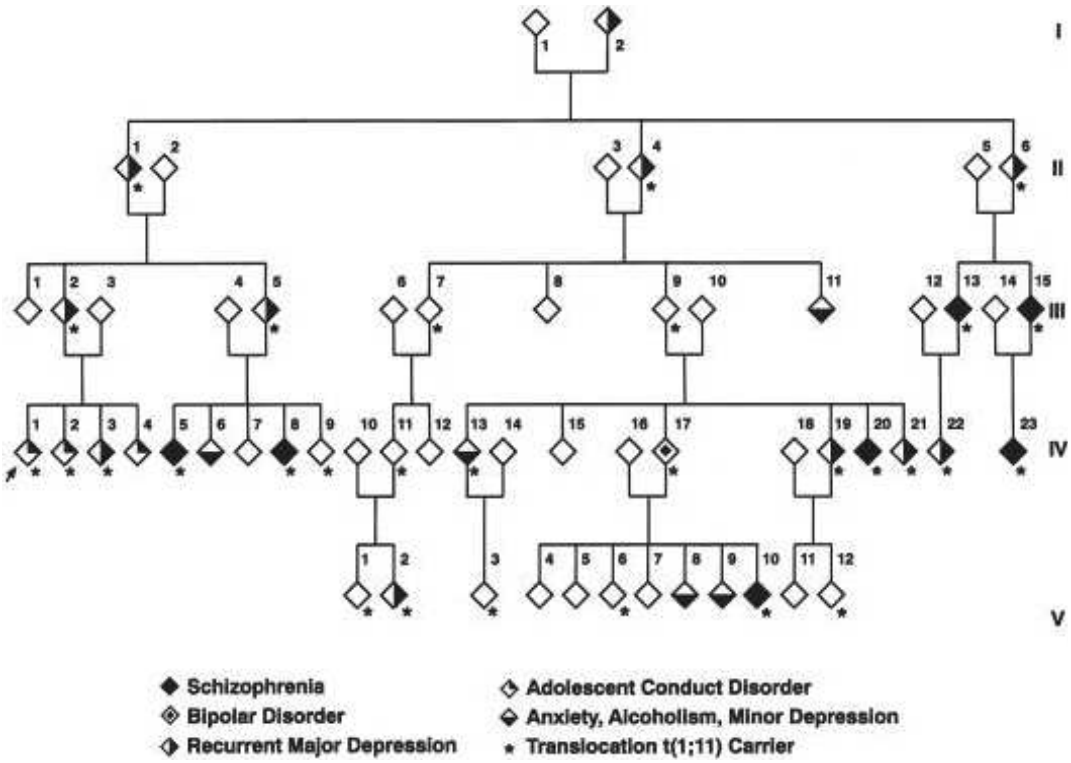


Figure 12 : Arbre généalogique d'une partie de la famille ayant la translocation (1;11)(q42;q14.3) (Blackwood et al., 2001).

Disc1 est une protéine d'échafaudage synaptique exprimée précocement, capable de s'associer à de nombreuses molécules synaptiques et du cytosquelette, notamment à celles du réseau microtubulaire et du centrosome (**Figure 13**). Elle semble avoir un rôle important dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration neuronale, la plasticité synaptique et la synaptogénèse (Brandon et al., 2009; Mao et al., 2009; Tropea et al., 2018). Pour exemple, l'électroporation de shRNA DISC1 empêche la prolifération des progéniteurs neuronaux à E13 chez la souris ainsi qu'à l'âge adulte dans le gyrus denté. Ces altérations mènent à des défauts d'apprentissages et de plasticité à l'âge adulte (Mao et al., 2009).

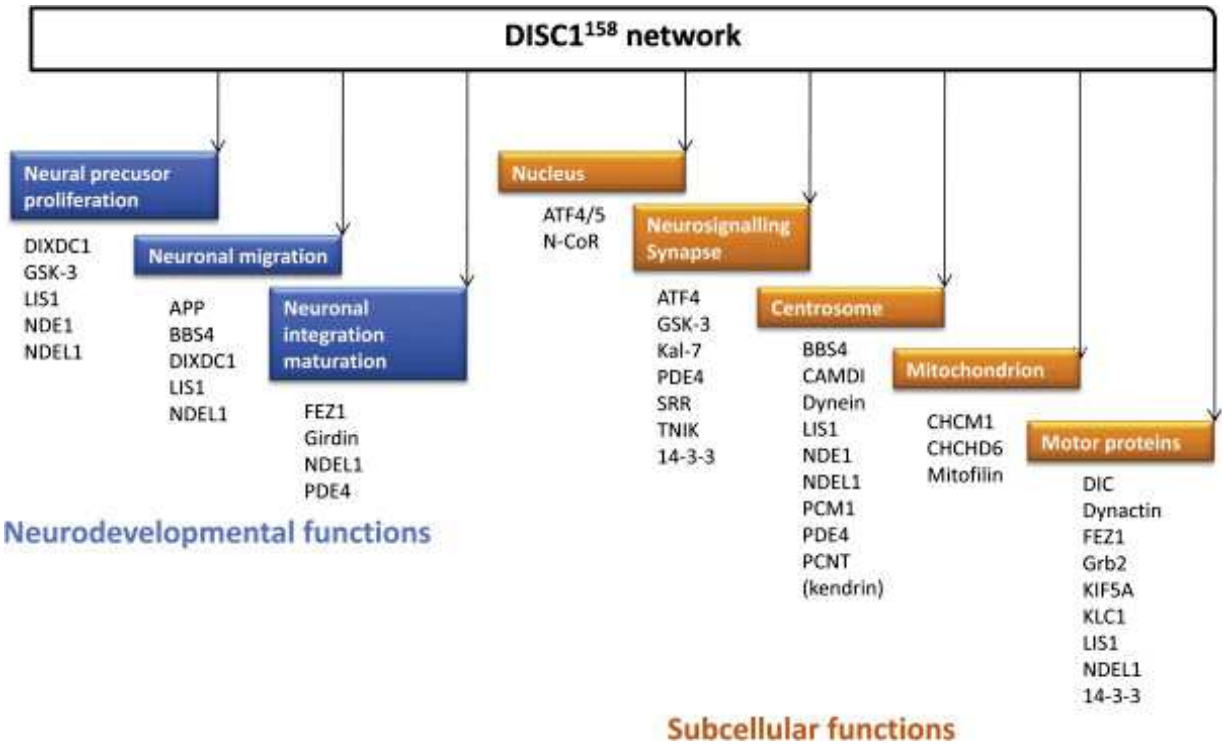


Figure 13 : Interactions fonctionnelles et réseaux de protéines associées à DISC1. DISC1 et ses interacteurs protéiques sont impliqués dans des fonctions neurodéveloppementales comme la régulation de la prolifération, de la migration, de l'intégration et la maturation neuronale. Ils sont également impliqués dans les fonctions subcellulaires comme la régulation de l'expression des gènes, la signalisation intracellulaire et le fonctionnement synaptique, et enfin dans la régulation du trafic intracellulaire et mitochondrial. Abréviations : APP, amyloid precursor protein; ATF4/5, activating transcription factor4/5; BBS4, Bardet-Biedl syndrome 4; CAMDI, coiled-coil protein associated with myosin II and DISC1; CHCM1, coiled-coil helix cristae morphology 1; CHCHD6, coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6; DIC, dicarboxylate ion carrier; DISC1, Disrupted-In-Schizophrenia 1; DIXDC1, DIX domain containing 1; FEZ1, fasciculation and elongation protein zeta 1; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; GSK-3, glycogen synthase kinase 3; KIF5A, kinesin family member 5A; KLC1, kinesin light chain 1; LIS1, lissencephaly-1; NDE1, nudE nuclear distribution E homolog 1; NDEL1, nudE nuclear distribution E homolog 1-like 1; PDE4, phosphodiesterase 4B or 4D; N-CoR, nuclear receptor co-repressor; Kal-7, kalirin 7; TNIK, TRAF2 and NCK interacting kinase; SRR, serine racemase; PCM1, pericentriolar material 1; PCNT, pericentrin (Lipina and Roder, 2010).

Différentes études ont identifié des mutations dans la partie C-terminale de Disc1 comme responsables des comportements psychotiques observés dans cette famille écossaise (**Figure 14**). Il existe 13 exons qui codent les isoformes Disc1, l'exon 2 code la plupart du domaine de la tête protéique qui est le domaine qui interagit avec la phosphodiesterase 4B (PDE4B). Des mutations non-sens induites au niveau de l'exon 2 par le N-nitroso-N-éthylurée, un agent mutagène, mènent à deux mutations, Q31L et L100P (mutations qui ne sont pas retrouvées chez les patients). La mutation Q31L est associée à un modèle de dépression et la mutation L100P aux modèles de schizophrénie, ceci est confirmé par le fait que les antipsychotiques agissent sur les troubles présentés par la souris à mutation L100P, alors qu'ils n'ont aucun effet sur les souris à mutation Q31L (Clapcote et al., 2007).

2. Le modèle Disc1-L100P

Altérations comportementales :

Ce modèle récapitule des symptômes de la schizophrénie avec, une altération dans le test PPI ainsi que des déficits cognitifs. Les déficits cognitifs sont caractérisés par des déficits dans la mémoire de travail, dans des tests de reconnaissance d'objets et dans des tests d'inhibition latente qui permettent d'évaluer la faculté à ignorer une information non pertinente. En revanche, il n'est pas observé d'altérations de mémoire spatiale, de sociabilité, d'anxiété ou de dépression (Clapcote et al., 2007; Cui et al., 2016). En terme de locomotion des résultats contradictoires sont observés, certaines études montrent une hyperlocomotion des souris, observée seulement pendant les 30 premières minutes de test (sur 90min), tandis que d'autres ne montrent aucune différence dans la distance parcourue par rapport aux souris contrôles (Cui et al., 2016; Lipina et al., 2010).

Altérations morphologiques :

Les souris Disc1-L100P présentent une diminution du volume cérébral d'environ 13% en comparaison aux souris contrôles (Clapcote et al., 2007). Bien que cela n'ait pas été décrit précisément dans le modèle L100P, il est aussi retrouvé chez les souris Disc1 mutantes, des ventricules élargis, une agénésie du corps calleux, un cortex cérébral réduit avec un amincissement des couches II et III et une réduction de l'épaisseur du CPF dorsolatéral. Ces résultats sont en corrélation avec les observations faites en post-mortem sur les patients schizophrènes (Shen et al., 2008).

Altérations neuronales et neurochimiques :

Dans ce modèle, il est aussi observé une diminution de la longueur et de la surface occupée par les dendrites ainsi que de la densité des épines au niveau des neurones pyramidaux du CPF et de l'hippocampe. Ceci est associé à une diminution de la prolifération neuronale et à un positionnement incorrect des couches corticales, conduisant ainsi à des déficits semblables à ceux observés chez les patients schizophrènes (**Figure 14**) (Lee et al., 2011).

Les souris Disc1-L100P présentent aussi une altération au niveau des interneurones corticaux GABAergiques avec une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine PV dans ces interneurones. Ces altérations seraient à l'origine d'une diminution de l'inhibition au niveau des neurones pyramidaux et pourraient, *in fine*, entraîner une altération de la balance excitation/inhibition (Borkowska et al., 2016).

Ces modulations neuronales pourraient être dues à une altération de l'interaction entre Disc1 et ses partenaires protéiques comme PDE4B dont le gène est aussi considéré comme risque de développer la schizophrénie (Millar et al., 2005). Disc1 régule positivement la signalisation AMPc *via* son interaction inhibitrice avec PDE4B, cette dernière permettant en condition physiologique de dégrader l'AMPc (Ooms et al., 2019). Ainsi dans les modèles de mutation Disc1, l'AMPc est dérégulée impactant la plasticité synaptique, la régulation de la balance excitation/inhibition et *in fine*, l'apprentissage et la mémoire. De plus, l'utilisation de rolipram, un inhibiteur de PDE4B permet d'obtenir des performances supérieures à celles obtenues avec certains antipsychotiques comme la clozapine et l'olanzapine dans des tests d'attention et de traitement de l'information (Kanes et al., 2007; Lipina and Roder, 2010). Enfin, une augmentation significative des courants médiés par les récepteurs NMDA a été caractérisée

sur des cultures corticales de neurones transfectés avec des shRNA DISC1, il est aussi observé une augmentation des courants postsynaptiques excitateurs au niveau de la couche V du CPF *in vivo* sur les souris shRNA *Disc1*. Ces résultats sont associés à une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2A du récepteur et à une modification de la voie de signalisation AMPc/PKA *via* l'interaction des récepteurs NMDA avec PDE4 (Wei et al., 2014). Ainsi l'intéraction entre DISC1 et PDE4 est essentielle pour les processus de plasticité au niveau de l'hippocampe, et une altération de cette interaction est associée à des déficits comportementaux (McGirr et al., 2016; Tropea et al., 2018).

Modèle Disc1-L100P et antipsychotiques :

Pour finir, le modèle Disc1-L100P est validé comme modèle préclinique de schizophrénie car l'utilisation d'antipsychotiques permet de prévenir certains déficits observés dans ce modèle. Pour exemple, l'administration d'haloperidol ou de clozapine reverse les déficits observés dans les tests de PPI et d'inhibition latérale (Clapcote et al., 2007). L'administration de clozapine reverse aussi les déficits observés dans le test de reconnaissance d'objets (Cui et al., 2016).

Table 1. Comparison among the DISC1 mouse models

	Mutants			Dominant-negative transgenic			
				Constitutive		Inducible	
References	Clapcote et al. (2007)		Koike et al. (2006), Kvajo et al. (2008)	Shen et al. (2008)	Hikida et al. (2007)	Pletnikov et al. (2008)	Li et al. (2007)
Name	Q31L	L100P	Δ25 bp	BAC-ΔC	CaMK-ΔC	CaMK-ΔC	CaMK-cc
Exogenous DISC1	n/a	n/a	n/a	Mouse	Human	Human	Human
Promoter	Endogenous	Endogenous	Endogenous	Endogenous	αCaMKII	αCaMKII	αCaMKII
Mouse strain	B6 × DBA→B6		129→B6	CBA × B6	B6	B6 × SJL × CBA	B6
Neuroanatomy	Reduced brain volume	Reduced brain volume	Reduced PFC volume	Smaller cortex, enlarged LV, corpus callosum agenesis, thinning of layers II/III	Enlarged LV	Enlarged LV	
Neurogenesis				Reduced			
Pyramidal cells			DG: altered organization, CA1: reduced short-term potentiation				DG: reduced dendritic complexity, CA1: reduced synaptic transmission
Interneurons			No difference in PV or calbindin in mPFC	PV reduced in mPFC, hippocampus	PV reduced in mPFC		

CA1, cornu ammonis; DG, dentate gyrus; LV, lateral ventricles; mPFC, medial prefrontal cortex; PV, parvalbumin.

Table 2. Behavioral analysis of the DISC1 mouse models

Putative neuropsychological correlate	Test	Mutants			Dominant-negative transgenic			
					Constitutive		Inducible	
		Clapcote et al. (2007)		Koike et al. (2006)	Shen et al. (2008)	Hikida et al. (2007)	Pletnikov et al. (2008)	Li et al. (2007)
		Q31L	L100P	Δ25 bp	BAC-ΔC	CaMK-ΔC	CaMK-ΔC	CaMK-cc
Cognition	Prepulse inhibition	yes	yes	no	n/d	yes	no	n/d
	Latent inhibition	yes	yes	n/d	yes	n/d	n/d	n/d
	Working memory (T maze)	yes	yes	yes	n/d	n/d	n/d	yes
	Spatial learning and memory	no	no	no	n/d	no	yes (only F)	n/d
Positive	Novelty-induced locomotion (first 30 min in open field)	no	yes	no	no	no	no	no
Negative or depressive-like	Sociability (three-chamber)	yes	no	n/d	n/d	n/d	n/d	yes
	Sucrose consumption	yes	no	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
	Forced swim test	yes	no	n/d	yes	yes	n/d	yes
Gender used for testing		M+F	M+F	M+F	M	M	M+F	M+F

Abnormal phenotype in the test is indicated by "yes", no difference from the controls by "no", and not determined yet by "n/d". The gender of the mice used for behavioral testing is indicated as: F, females; M, males.

Figure 14 : Tableaux récapitulant les différents modèles de souris DISC1 et les changements comportementaux associés (Jaaro-Peled, 2009).

Chapitre II – Le système sérotoninergique

A. Généralités

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), est une monoamine biogène. D'abord identifiée en 1937, dans le tractus gastro intestinal de lapin par Vittoro Erspamer, elle est alors appelée entéramine (Vialli and Erspamer, 1937). Elle est ensuite caractérisée et isolée, en 1947 par Maurice Rapport et Irvine Page, dans le sérum du sang de bœuf comme substance possédant des propriétés vasoconstrictrices, elle est alors appelée sérotonine (Rapport et al., 1948). Quelques années plus tard, en 1957, Brodie et Shore montrent, sur la base des travaux précédents, la présence de récepteurs de la sérotonine spécifiquement au niveau cérébral et révèlent son rôle de neurotransmetteur (Shore et al., 1957). Les neurones sérotoninergiques sont extrêmement ramifiés et vont ainsi projeter sur l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière. Enfin, son rôle majeur dans différentes étapes du développement neuronal ainsi que son implication dans de nombreuses fonctions physiologiques comme le contrôle de l'humeur, du sommeil, de la prise alimentaire ou de la cognition font de la sérotonine un neuromodulateur très étudié.

a. Métabolisme de la sérotonine

La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane provenant de l'alimentation, par les neurones sérotoninergiques au niveau central, et par les neurones entériques périphériques et les cellules entérochromaffines au niveau périphérique. Elle est produite en deux étapes : premièrement le tryptophane est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase, en 5-hydroxytryptophane (5-HTP), ensuite le 5-HTP est décarboxylé par la L-amino acide décarboxylase (AADC) en sérotonine (Clark et al., 1954). Dans les neurones, le tryptophane est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase 2 (TPH2) (Walther et al., 2003; Zhang et al., 2004). Alors qu'en la périphérie, la sérotonine circulante est synthétisée par TPH1 dans les cellules entérochromaffines du tractus gastrointestinal (Walther et al., 2003). Une fois synthétisée, la sérotonine est stockée dans des vésicules de sécrétion grâce au transporteur de monoamine 2 (Vésicular Monoamine Transporter – VMAT2).
Enfin, la libération de sérotonine dans la fente synaptique se fait par exocytose suite à la stimulation des neurones sérotoninergiques. Cette libération va entraîner, l'activation de récepteurs pré et post-synaptiques. La sérotonine en excès dans le compartiment extracellulaire va ensuite pouvoir être recaptée par son transporteur membranaire SERT (Serotonin Reuptake Transporter – Transporteur de la sérotonine) puis elle sera soit stockée à nouveau dans les vésicules ou dégradée par une enzyme intracellulaire, la monoamine oxydase de type A (MAO-A) pour former un métabolite l'acide 5-hydroxy-indolylacétique (5-HIAA) qui sera éliminé par voie rénale (**Figure 15**) (McIsaac and Page, 1959).

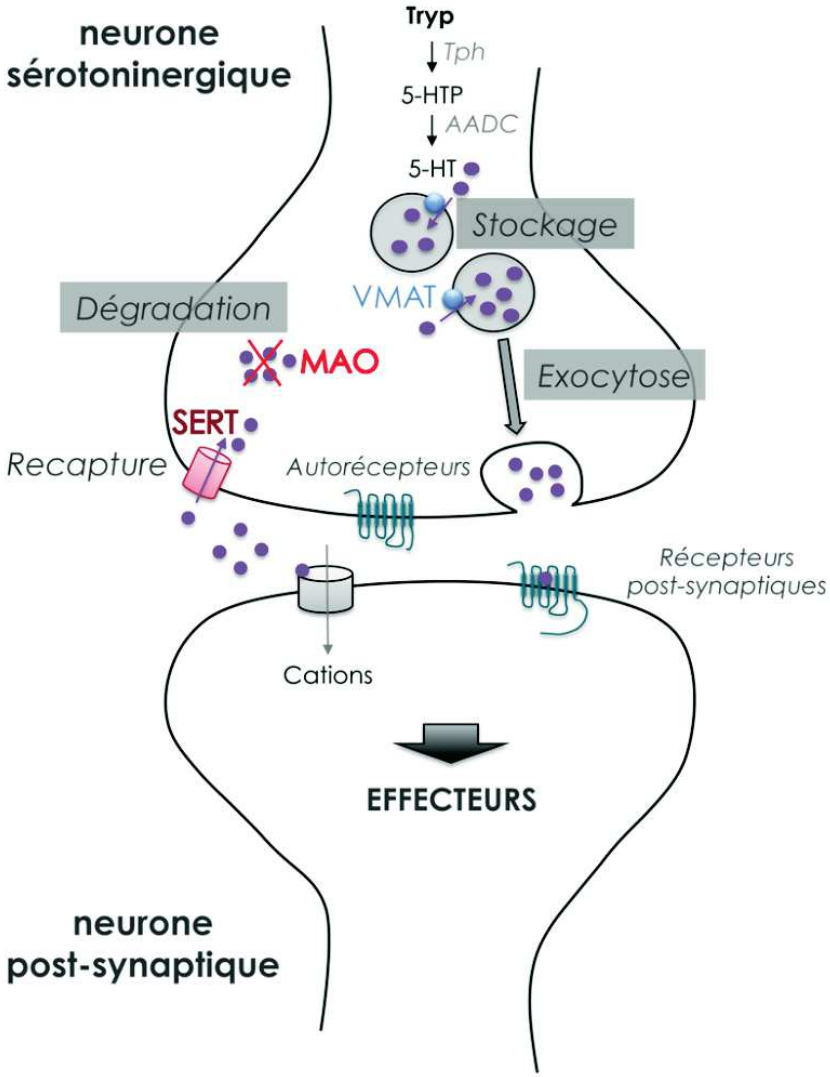


Figure 15 : Représentation de la synapse sérotoninergique. Le tryptophane, précurseur de la sérotonine est transformé en 5-hydroxytryptophane dans les neurones du raphé, par la tryptophane hydroxylase. Puis la 5-hydroxytryptophane decarboxylase permet sa dégradation en sérotonine. Cette dernière est ensuite stockée dans des vésicules et sera relarguée dans le compartiment synaptique par exocytose grâce une stimulation venant d'un potentiel d'action arrivant à la terminaison synaptique. Ceci permettra soit l'activation de récepteurs pré ou postsynaptiques, soit la recapture de sérotonine par SERT. Suite à sa recapture, la sérotonine est soit de nouveau stockée, soit dégradée donnant un métabolite : l'acide 5-hydroxy-indolylacetique. D'après la thèse de Fanny Duhr.

1. En périphérie

La synthèse de sérotonine est limitée aux cellules entérochromafines et dans une moindre mesure aux plaquettes qui représentent le site de stockage le plus important en dehors du SNC (Hardisty and Stacey, 1955). C'est au niveau périphérique que la majorité (95%) de la sérotonine est libérée assurant ainsi de nombreuses fonctions que je détaillerai brièvement dans la partie « fonctions du système serotoninergique ».

2. Au niveau central

La synthèse de la sérotonine se fait principalement par les neurones sérotoninergiques du raphé dont les projections vont innerver l'ensemble du cerveau (Charnay and Leger, 2010; Hornung, 2003). Les corps cellulaires présents dans les noyaux du raphé se rassemblent en différents sous groupes (de B1 à B9) chez le rongeur (**Figure 16**).

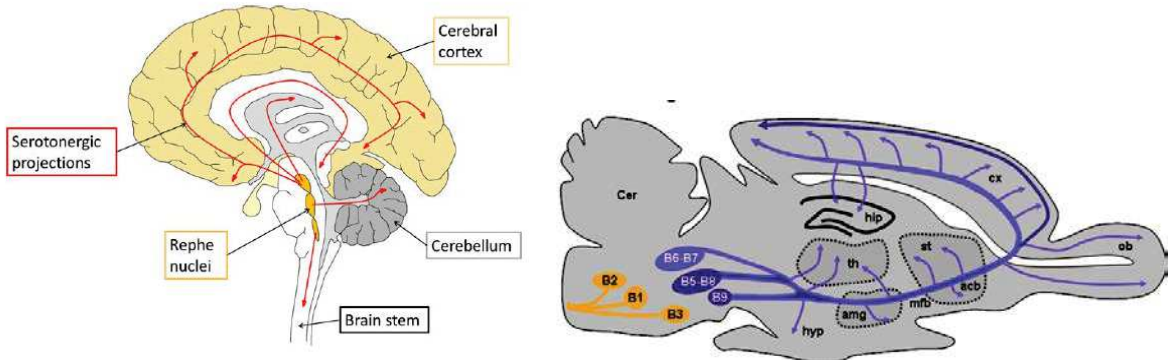


Figure 16 : Innervation sérotoninergique au niveau du cerveau humain et de rongeur à l'âge adulte (Fidalgo et al., 2013; Vitalis et al., 2013).

Dans la partie caudale du raphé (B1-B3) les neurones projettent en direction de la moelle épinière, du tronc cérébral et de la périphérie. Les neurones du groupe B4 innervent le cervelet. Dans la partie médiane et dorsale du raphé (B5-B9) les neurones innervent une grande partie de l'encéphale avec le cortex, l'hippocampe, thalamus, amygdale, hippocampe et striatum par exemple (Vitalis et al., 2013; Wallace and Lauder, 1983).

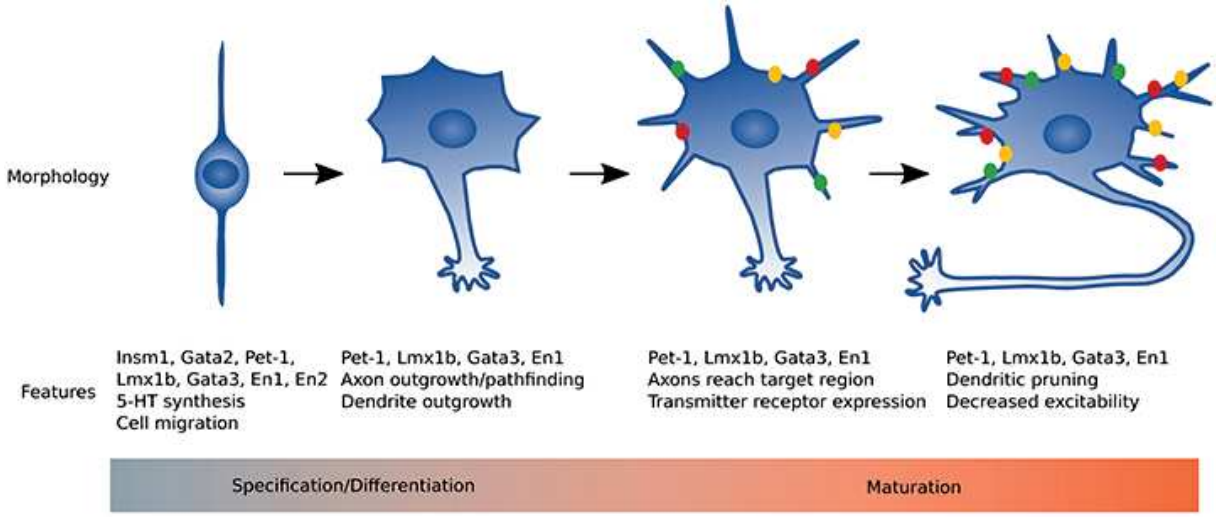


Figure 17 : Résumé schématique de la maturation sérotoninergique. Les neurones sérotoninergiques immatures ont en premier lieu une morphologie bipolaire et vont utiliser la translocation nucléaire pour migrer jusqu'à leur destination finale au niveau du raphé. Divers facteurs de transcription vont alors permettre l'activation de plusieurs gènes permettant la synthèse de sérotonine. Dans un second temps, les axones des neurones sérotoninergiques immatures vont s'étendre et se développer de manière rostrale et caudale, et atteindre leurs structures cibles au moment de la naissance chez les rongeurs. Au début de la période postnatale, les dendrites sont relativement courtes avec une ramification modérée et la plupart des gènes nécessaires à la fonction neuronale mature sont exprimés. Du début de la période postnatale jusqu'à 3 semaines de vie, les dendrites des neurones du raphé dorsal s'allongent puis se rétractent et réduisent le nombre de branches à l'âge de 2 mois (Spencer et Deneris, 2017).

Le développement du système sérotoninergique démarre précocement (**Figure 17**). Des études embryonnaires ont montré que les neurones du raphé font partie des premiers neurones à innerver le cortex (Lidov et al., 1980). Ce développement nécessite l'expression de facteurs de transcription tels que Pet1 ou Lmx1b (LIM homeodomain factor 1b) qui induisent, chez la souris, la différenciation des cellules souches embryonnaires en neurones sérotoninergiques, et qui permettent la maturation de ces neurones en régulant des gènes clefs pour la synthèse de sérotonine (Dolmazon et al., 2011; Liu et al., 2010). Il a été montré grâce à l'inactivation du gène lmx1b spécifiquement au niveau des neurones du raphé, en utilisant un système Cre-loxP inductible, que ce facteur de transcription est nécessaire pour la biosynthèse de sérotonine dans le cerveau de souris adultes et qu'il est impliqué dans la régulation de l'expression de TPH2, Sert et VMAT2 (Song et al., 2011). En utilisant des souris Lmx1b$^{-/-}$, il a également été montré que l'expression de Lmx1b est nécessaire à chaque étape du développement pour la formation des projections axonales « à longue portée » qu'établissent les neurones 5-HT avec les diverses structures cérébrale (Donovan et al., 2019).

La sérotonine est retrouvée dès le dixième jour embryonnaire (E10) chez la souris, à E12 chez le rat et au troisième trimestre de grossesse chez l'Homme (Pattyn et al., 2003; Wallace and Lauder, 1983). C'est à ces moments donnés que les neurones sérotoninergiques vont commencer leur différenciation et innerver progressivement les structures cibles. Ce n'est qu'à partir de J21 que l'innervation jusqu'à chacune des structures cibles sera complète chez la souris (**Figure 18**) (Deneris and Gaspar, 2018; Lidov and Molliver, 1982).

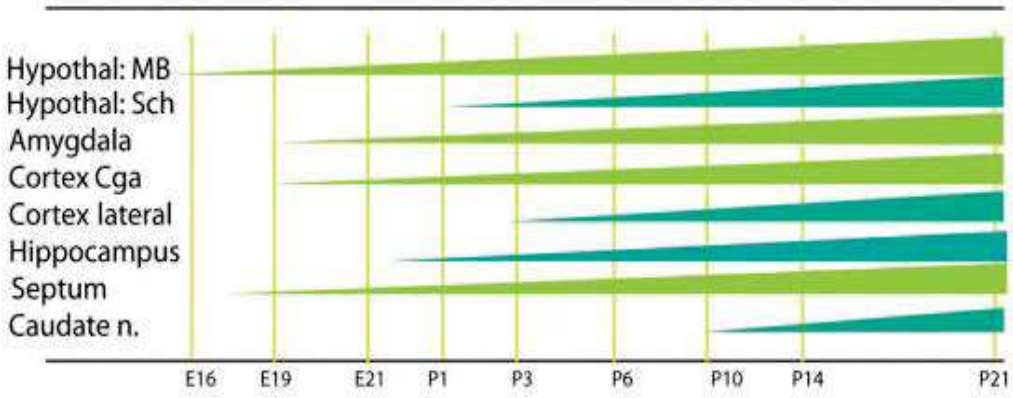


Figure 18 : L'innervation sérotoninergique peut-être précoce ou tardive en fonction des régions cérébrales, ici chez le rongeur. En vert une innervation précoce, en bleu une innervation tardive (Deneris and Gaspar, 2018).

Les souris Pet$^{-/-}$ expriment seulement 30% de neurones sérotoninergiques au niveau du raphé dorsal, et expriment des taux très faibles des enzymes nécessaires à la synthèse et la dégradation de sérotonine. De façon intéressante, malgré une expression de sérotonine plus faible, aucune différence n'est observée au niveau de sa concentration entre les stades E10.5 et E15.5, chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles. Les études montrent qu'à cette période, la sérotonine est majoritairement d'origine placentaire (Bonnin et al., 2011). En effet, le placenta va produire de grandes quantités de sérotonine et va être la première source de ce neurotransmetteur pour le développement cérébral du fœtus. La sérotonine maternelle joue donc un rôle clef dans les processus neurodéveloppementaux (**Figure 19**) (Bonnin et al., 2011; Rosenfeld, 2020).

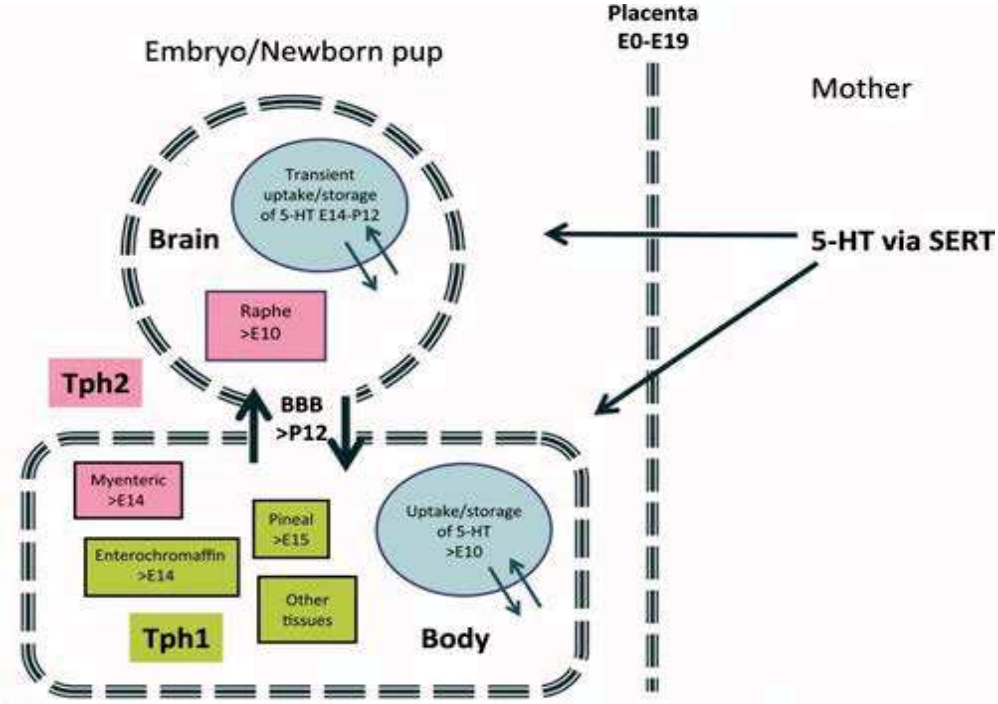


Figure 19 : Schéma récapitulant les sources de sérotonine durant le développement embryonnaire et postnatal. La sérotonine est transportée à travers le placenta *via* le transporteur SERT. Chez la souris à E10.5 commence la production de sérotonine et la différenciation des neurones du raphé. A E14, la glande pinéale et les cellules entérochromaffines et myentériques produisent de grandes quantités de sérotonine. D'autres tissus en produisent en plus petites quantités comme les cellules bêta pancréatiques, les cellules parafolliculaires de la thyroïde, les cellules du cumulus ovarien, les ganglions de la racine dorsale et les papilles gustatives. En vert : la synthèse de sérotonine impliquant TPH1. En rose : la synthèse de sérotonine impliquant TPH2. En bleu : site d'absorption/stockage de sérotonine, qui a d'abord lieu dans les tissus non neuronaux (Trowbridge et al., 2011).

Comme nous avons pu le voir, les neurones sérotoninergiques présentent de longs axones qui sont très ramifiés. Ces fibres vont cibler l'ensemble des neurones excitateurs et inhibiteurs dans les différentes couches corticales et vont donc avoir un rôle modulateur important dès le développement embryonnaire et ce jusqu'à l'âge adulte.

Il est intéressant de noter que la morphologie des dendrites des neurones sérotoninergiques diffère en fonction de leurs origines. Ainsi, les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal ont des dendrites courtes et très arborisées à J4 qui vont s'allonger jusqu'à J21, pour ensuite se raccourcir jusqu'à P60. Alors que les dendrites des neurones sérotoninergiques du raphé médian ne subissent pas de changements majeurs entre J4 et J60 (Rood et al., 2014).

b. Innervation sérotoninergique au sein du CPF

Au niveau du CPF, l'innervation par les neurones du raphé commence dès E17 chez le rat, et la maturation des fibres sérotoninergique continue au stade postnatal dans cette structure. Dans le CPF, l'innervation sérotoninergique est maximale à J7 (**Figure 20**), diminue jusqu'à J28, puis reste inchangée jusqu'à l'âge adulte. De plus durant ces périodes, les fibres sérotoninergiques vont avoir une morphologie différente, et l'expression des récepteurs le sera aussi (Maddaloni et al., 2017; Sargin et al., 2019).

L'utilisation de souris TPH2^{GFP} permet de visualiser la morphologie des fibres sérotoninergiques durant le développement, jusqu'à l'âge adulte. Aux stades précoces, dans la couche V du CPF les fibres sérotoninergiques présentes ont un aspect irrégulier en forme de point qui sera perdu à partir de J28 et à l'age adulte au profit de fibres ayant un aspect lisse et régulier (**Figure 20**) (Maddaloni et al., 2017).

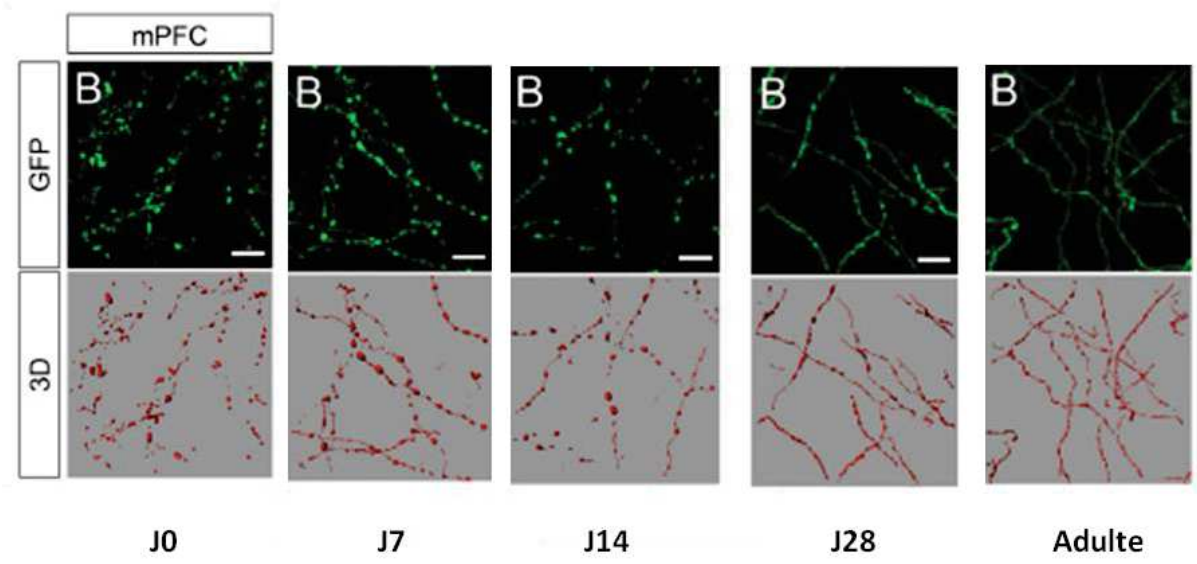


Figure 20 : Immunomarquage et reconstruction 3D des fibres sérotoninergiques montrant l'évolution de leur morphologie au cours du développement au niveau de la couche V du CPF de souris. Adapté des résultats de Maddaloni et al., 2017.

Des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de CPF de cerveaux de rats montrent au cours du développement un effet différentiel de la sérotonine sur le potentiel de membrane. De J6 à J19, l'administration de sérotonine entraine une forte dépolarisation des neurones pyramidaux de la couche V. Puis, progressivement au cours du temps, la sérotonine induit une hyperpolarisation de ces neurones. Ceci est dû à l'expression différentielle de récepteurs de la sérotonine en fonction du développement. Au niveau des neurones pyramidaux de la couche V, les récepteurs 5-HT$_7$ et 5-HT$_{2A}$ sont exprimés précocement et vont participer à la dépolarisation de ces neurones. Puis, entre J16 et J19, il va y avoir une diminution de l'expression des ARNm des récepteurs 5-HT$_7$ ainsi qu'une diminution des récepteurs 5-HT$_{2A}$ et une augmentation progressive de l'expression des récepteurs 5-HT$_{1A}$, chez le rat et la souris, la sérotonine induira alors une hyperpolarisation des neurones pyramidaux de la couche V (Zhang et al., 2018). A l'âge adulte, les cellules pyramidales du cortex présentent une expression robuste des récepteurs 5-HT$_{1A}$ (Béïque et al., 2004; Elliott et al., 2018). Ainsi durant les deux

premières semaines post-natales chez le rat, la sérotonine permet la dépolarisation et l'excitation des neurones pyramidaux de la couche V, puis la diminution des récepteurs 5-HT_{2A} est associée à une diminution des effets excitateurs de la sérotonine au cours du temps (Zhang et al., 2018). Alors qu'au niveau des couches II/III la sérotonine va avoir un rôle inhibiteur qui persiste de la période postnatale à l'âge adulte (expérience de patch clamp de J6 à J96) via les récepteurs 5-HT_{1A} (Goodfellow et al., 2009).

Des analyses post-mortem ont également montré des changements d'expression des récepteurs sérotoninergiques entre la période postnatale et l'âge adulte chez l'Homme au niveau du CPF. L'expression des récepteurs 5-HT_{1A} reste stable durant tout le développement alors que l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} va augmenter au cours de l'enfance, se stabiliser puis commencer à diminuer à la fin de l'adolescence (Lambe et al., 2011).
La sérotonine entraine donc des phénomènes d'excitation/inhibition qui évoluent au cours du développement (**Figure 21**) mais aussi en fonction de la couche du CPF. Ces changements excitation/inhibition sont dus à l'expression différentielle des récepteurs sérotoninergiques.

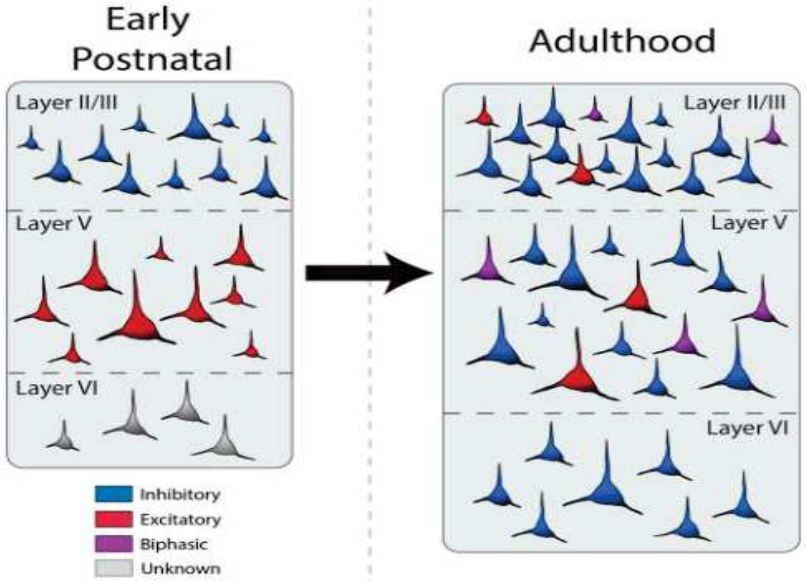


Figure 21 : Modulation de l'activité des neurones pyramidaux par la sérotonine durant le développement, au niveau des différentes couches du CPF chez le rongeur. A gauche : période postnatale. A droite : période adulte. Les couleurs des neurones pyramidaux représentent les effets de la sérotonine : inhibition en bleu, excitation en rouge, à la fois inhibition et excitation en violet et effets inconnus en gris (Sargin et al., 2019).

B. Les récepteurs sérotoninergiques

La sérotonine a un rôle de neuromodulateur qui lui est conféré grâce à sa liaison aux différents récepteurs de la sérotonine que je vais présenter très brièvement dans ce sous-chapitre.

a. Généralités

Au cours de ces 70 dernières années, la classification des récepteurs de la sérotonine a évolué. L'existence de différents récepteurs a été mise en évidence par Gaddum et Picarelli en 1957. A cette

époque, ils réalisent des expériences sur l'intestin de cochon d'inde et montrent qu'il existe deux récepteurs à la tryptamine (sérotonine), car la sérotonine peut être bloquée partiellement par la morphine et totalement par la dibenzyline (Gaddum and Picarelli, 1997). Ces récepteurs sont d'abord nommés M et D de par leur affinité. Dans les années 80, le développement des techniques de ligands radiomarqués permet à l'équipe de Peroutka et Snyder de mettre en évidence différents récepteurs, c'est à ce moment là que les premiers récepteurs de la sérotonine (5-HT_1 et 5-HT_2) sont mis en évidence (Peroutka and Snyder, 1979). Les récepteurs D et M, seront ensuite ainsi rebaptisés, respectivement 5-HT_2 et 5-HT_3.

Aujourd'hui, les récepteurs sérotoninergiques sont classés en fonction de leur homologie de séquence, leur structure et de leurs propriétés de transduction du signal (**Figure 22**). Il en existe sept classes : 5-HT_1 à 5-HT_7 (Barnes et al., 2021; Göthert, 2013; Hoyer et al., 1994). A l'exception des récepteurs 5-HT_3 qui sont des récepteurs canaux perméables aux cations monovalents, les six autres membres sont tous des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Barnes et al., 2021; Bockaert et al., 2003; Hoyer et al., 2002). Les RCPGs sont des récepteurs constitués de sept hélices transmembranaires et sont associés à des protéines G hétérotrimériques qui sont composées d'une sous unité alpha, liant soit le guanosine diphosphate (GDP, forme inactive) soit le guanosine triphosphate (GTP, forme active), associées à des sous-unités béta et gamma (Bockaert and Pin, 1999; Hall et al., 1999).

Les récepteurs 5-HT sont associés à la classe A-1 des RCPGs qui ont une expression diffuse au sein du cerveau.

b. Couplages des récepteurs aux protéines G

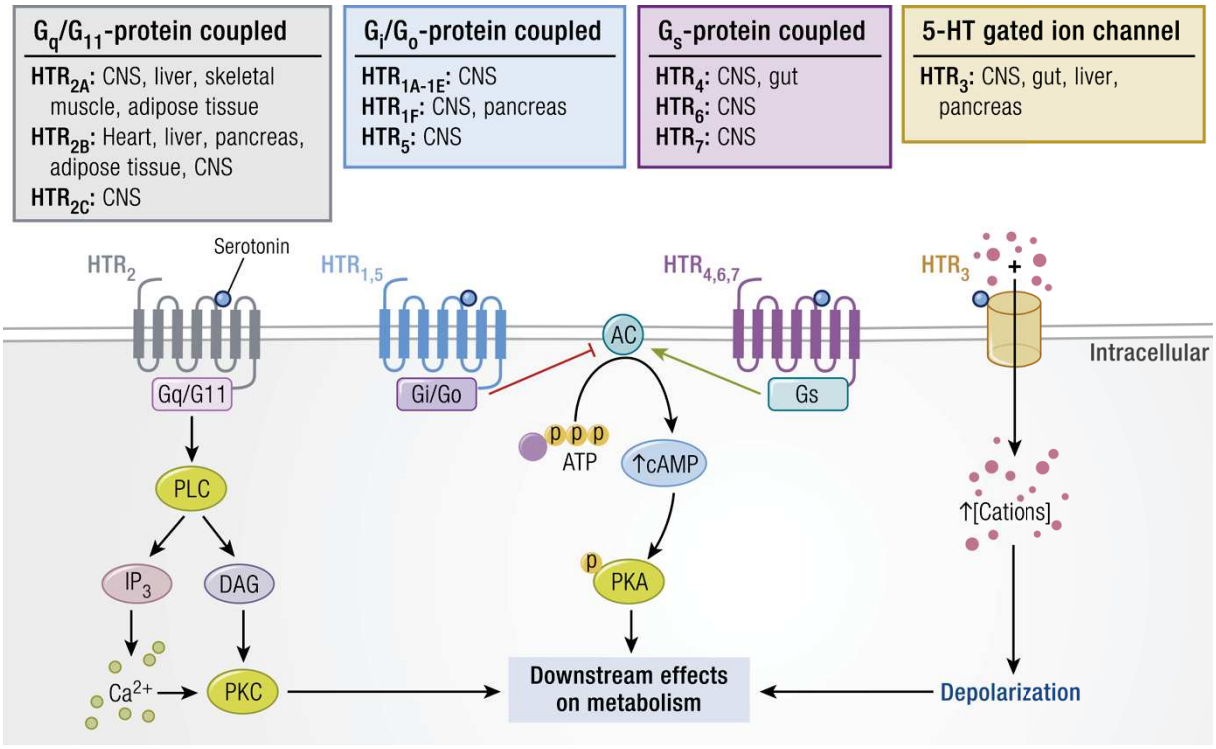


Figure 22 : Voies de signalisation canoniques associées aux différents récepteurs sérotoninergiques (Yabut et al., 2019).

En fonction de leur liaison aux différentes protéines G il est possible de classer ces récepteurs en quatre catégories (**Figure 22**) :

Les récepteurs couplés aux protéines Gi/Go : les récepteurs 5-HT_1 (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}) et 5-HT_5 appartiennent à cette catégorie. Ils vont être en capacité d'inhiber l'adénylate cyclase et ainsi inhiber la formation du second messager AMPc.

Les récepteurs couplés aux protéines Gq : les récepteurs 5-HT_2 (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}) activent la phospholipase C induisant l'augmentation intracellulaire des seconds messagers IP_3 (Inositol triphosphate) et DAG (diacylglycerol). Les IP_3 vont permettre la libération des stocks intracellulaires de calcium.

Les récepteurs couplés aux protéines Gs : les récepteurs 5-HT_4, 5-HT_5, 5-HT_6 et 5-HT_7 sont couplés à cette protéine et vont induire la stimulation de l'adénylate cyclase permettant l'augmentation intracellulaire d'AMPc.

Les récepteurs couplés aux protéines $G_{12/G13}$: les récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7 peuvent aussi être couplés à ces protéines. Ce couplage est associé à l'activation de Rho GTPases.

De part leurs liaisons et leurs localisations, les récepteurs sérotoninergiques vont pouvoir activer des voies de signalisations extrêmement variées menant ainsi à des processus physiologiques et des comportements multiples (Millan et al., 2008).

C. Principales fonctions de la sérotonine *via* ses récepteurs

a. Au niveau périphérique

Comme nous l'avons vu précédemment, la sérotonine est retrouvée à 95 % en périphérie où elle a de multiples fonctions (**Figure 23**). Dès 1912, O'Connor met en évidence une action vasoconstrictrice au niveau des intestins d'une substance présente dans le sérum sanguin. Le nom de sérotonine et la caractérisation de sa structure n'apparaîtront que dans les années 1940 confirmant sa provenance des cellules entérochromaffines et son rôle dans la vasodilatation et dans la pression sanguine (Calama et al., 2003; Göthert, 2013).
Depuis, il a été attribué à la sérotonine de nombreux rôles qui sont essentiels pour maintenir l'homéostasie énergétique et le fonctionnement de divers organes. Je citerai ici brièvement ces fonctions.

La sérotonine a un rôle important *via* le tractus gastro-intestinal où elle induit et régule l'activité musculaire péristaltique exerçant ainsi un contrôle sur la motilité intestinale *via* la transduction des récepteurs sérotoninergiques dans les neurones entériques (Heredia et al., 2013; Li et al., 2011). Les patients atteints du syndrome carcinoïde présentent des tumeurs bénignes dues à une synthèse excessive de sérotonine ainsi qu'une dérégulation de la motilité intestinales. Des inhibiteurs de TPH1 et 2 ont récemment été mis sur le marché en raison de leurs effets sur ces syndromes, confirmant l'importance de la sérotonine dans le contrôle de la motilité intestinale (Markham, 2017). La sérotonine est aussi impliquée dans des pathologies telles que la maladie coeliaque, la maladie inflammatoire de l'intestin ou le syndrome du côlon irritable, démontrant ainsi son rôle dans l'inflammation intestinale (voir la revue (Manocha and Khan, 2012)).

En plus de son implication au niveau de l'inflammation intestinale, la sérotonine joue un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire et l'inflammation globale (voir revue (Shajib and Khan, 2015)). La sérotonine stockée dans les plaquettes peut circuler à travers le sang afin d'être relarguée et d'entraîner l'infiltration des cellules immunitaires. Elle est aussi en capacité d'initier ou de potentialiser une réponse immunitaire. Les mastocytes peuvent aussi stocker la sérotonine, la synthétiser et la sécréter (Nowak et al., 2012). La sérotonine d'origine plaquettaire est également impliquée dans les mécanismes de vasodilatation et de vasoconstriction, entraînant une augmentation de l'agrégation plaquettaire et donc de la coagulation sanguine (Kaumann and Levy, 2006).

La sérotonine joue aussi un rôle au niveau des muscles cardiaques et squelettiques. Par exemple, chez des souris mutantes une inactivation du gène TPH1 (l'enzyme de synthèse de la sérotonine) entraine des insuffisances cardiaques avec une augmentation de la taille du cœur et une activité cardiaque anormale (Côté et al., 2003).

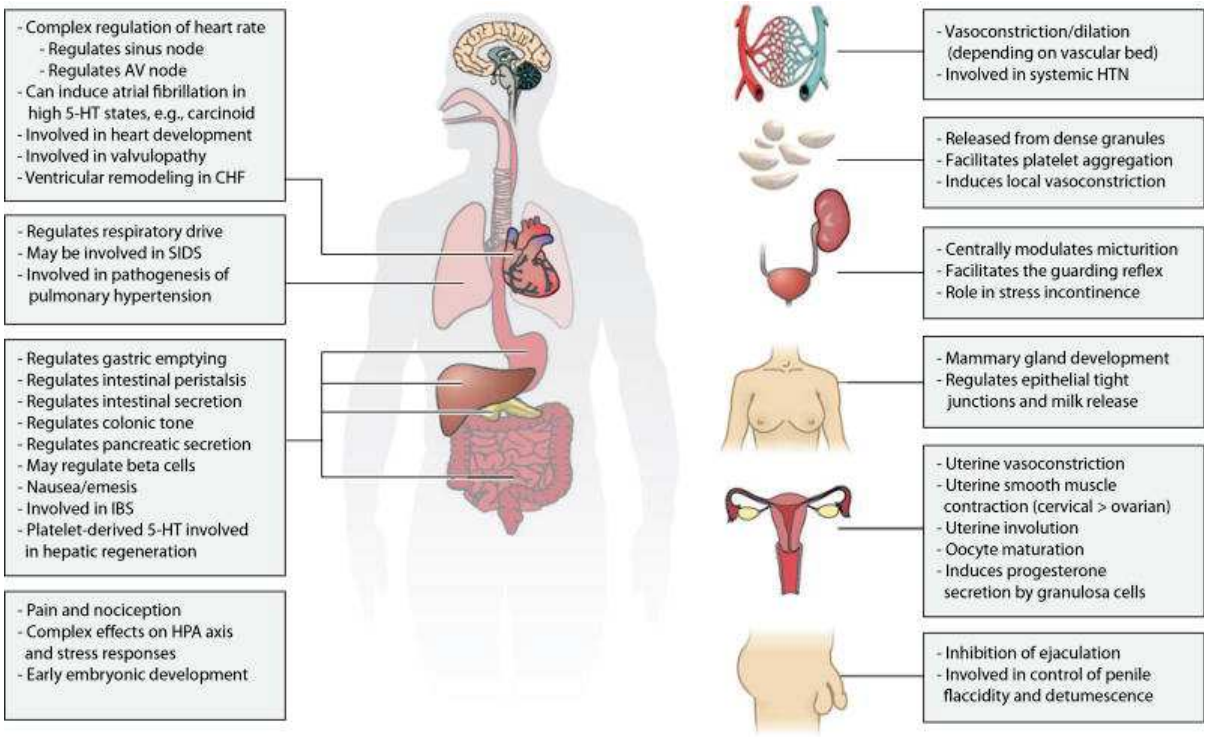


Figure 23 : Multiples fonctions de la sérotonine au niveau du système périphérique. Abréviations : AV, atrioventricular; CHF, congestive heart failure; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; HTN, hypertension; IBS, irritable bowel syndrome; SIDS, sudden infant death syndrome (Berger et al., 2009).

b. Au niveau central

Malgré sa plus faible expression au niveau central (5%) elle possède des rôles essentiels (**Figure 24**). Il a ainsi été démontré que la sérotonine est impliquée dans des processus très variés comme le neurodéveloppement, le contrôle de l'humeur, de l'anxiété, dans la cognition avec un rôle dans l'apprentissage et la mémoire, mais aussi un rôle dans l'agressivité ou la phobie sociale. Elle exerce aussi un effet dans la prise alimentaire, les cycles de veille/sommeil, le comportement sexuel ou encore la douleur (Gaspar et al., 2003).

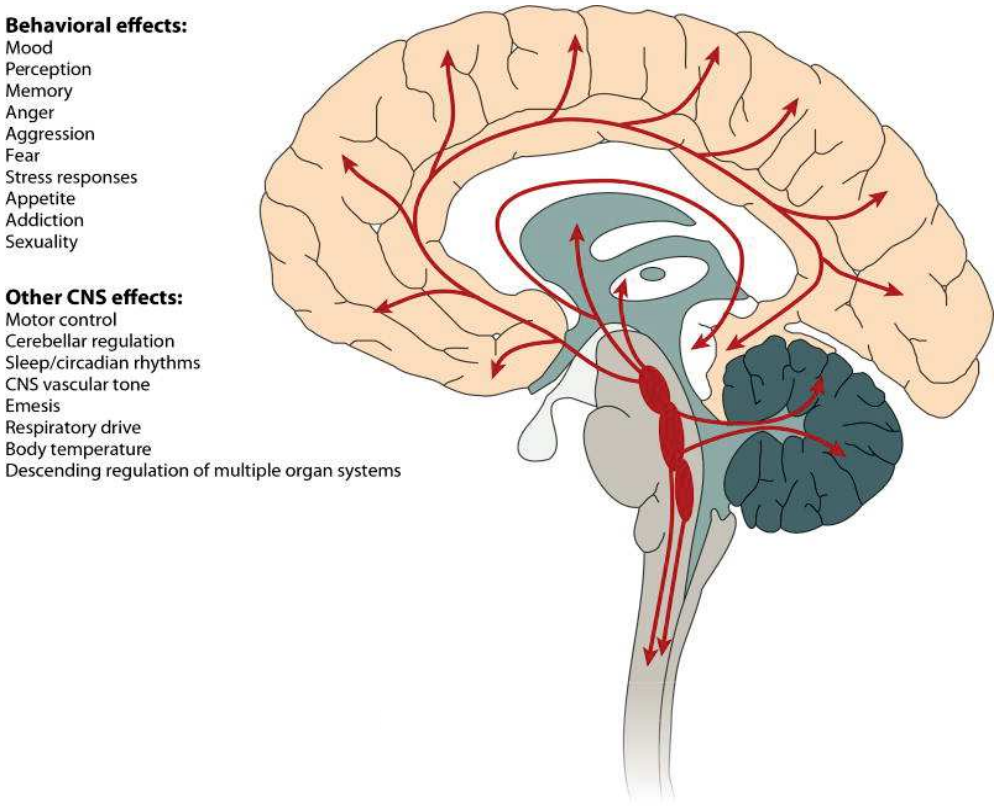


Figure 24 : Multiples fonctions de la sérotonine au niveau du système nerveux central. Le noyau du raphé dorsal et le noyau du raphé médian, innervent une grande partie du système nerveux central par des projections diffuses, ainsi pratiquement toutes les cellules du cerveau sont proches d'une fibre sérotoninergique, faisant de la sérotonine un régulateur de nombreuses fonctions cérébrales et comportements. Adapté de Berger et al., 2009.

1. Durant le développement

Exprimé de façon précoce le système sérotoninergique exerce un rôle majeur au cours du développement du SNC (Brummelte et al., 2017). De nombreux modèles génétiques de déplétion sur les gènes impliqués dans la synthèse de sérotonine (TPH2) ou dans sa recapture/élimination (SERT, VMAT2) ont pu mettre en avant les effets d'un hypofonctionnement sérotoninergiques sur le développement (Narboux-Nême et al., 2013).

Xing et al, ont récemment montré que la sérotonine *via* les récepteurs 5-HT_{2A} favorise la prolifération des progéniteurs basaux (PB). Les PB vont produire les neurones des couches superficielles du cortex et sont donc essentiels pour le développement du cerveau. Il est décrit que les récepteurs 5-HT_{2A} ne sont pas exprimés précocement dans le néocortex d'embryon de souris, cependant l'expression ectopique des récepteurs 5-HT_{2A} par électroporation *in utero,* à E13.5 d'un plasmide codant pour le récepteur 5-HT_{2A} humain, suffit à augmenter la prolifération des PB. Cette étude montre aussi que la sérotonine stimule la prolifération des PB dans le néocortex d'embryon de furets et chez le fœtus humain. Pour les furets, l'invalidation génétique des récepteurs 5-HT_{2A} grâce à la technique de CRISPR-Cas 9, entraine une diminution de la prolifération des PB. Chez l'humain, il est aussi observé, suite à l'activation pharmacologique des récepteurs 5-HT_{2A} dans le néocortex de fœtus, une stimulation de la prolifération des PB. Ces résultats montrent, dans divers modèles, l'importance de la sérotonine dans l'établissement des couches cérébrales (Xing et al., 2020).

La sérotonine est aussi impliquée dans la migration lors du développement. En effet, des souris SERT$^{-/-}$ ou des souris sauvages (WT) ayant reçu à E14 de la fluoxétine (un inhibiteur de la recapture de sérotonine (ISRS) mais aussi une des molécules les plus utilisées pour traiter la dépression) ce qui permet aussi une augmentation de la sérotonine extracellulaire, présentent une augmentation de la migration des interneurones corticaux de l'éminence ganglionnaire caudale (structure essentielle à la génération d'interneurones corticaux) (Delgado et al., 1990; Wong and Licinio, 2001). Ceci entraînant une altération de la distribution laminaire corticale (Frazer et al., 2015). Ces souris présentent également des symptômes d'anxiété et des comportements émotionnels anormaux au stade adulte. Ces altérations comportementales ainsi qu'une vulnérabilité aux pathologies psychiatriques sont aussi observées chez l'Homme et la souris lors une réduction de l'expression de SERT durant le développement embryonnaire et fœtal du cerveau (Ansorge et al., 2004; Gaspar et al., 2003).

L'ablation complète ou spécifique de SERT dans le CPF, au niveau de neurones pyramidaux de la couche V et VI au stade néonatal chez la souris, augmente le nombre de synapses glutamatergiques fonctionnelles entre les neurones du CPF et les neurones sérotoninergiques et dopaminergiques du NRD. Cette hyper-innervation CPF-NRD est reproduite par une exposition précoce à la fluoxétine au stade néonatal et provoque des symptômes de type anxieux/dépressifs à l'âge adulte. Montrant ainsi qu'une augmentation de sérotonine durant des périodes précoce de vie a un impact sur la synaptogénèse entraînant des déficits comportementaux à l'âge adulte (Soiza-Reilly et al., 2019).

La sérotonine est aussi impliquée dans le contrôle de la formation des synapses et de la densité des épines dendritiques (Bijata et al., 2017; Speranza et al., 2017). Elle a aussi un rôle dans la complexification de l'arbre dendritique. Des rats ayant reçu de la fluoxétine au stade néonatal présentent à l'âge adulte une augmentation drastique de l'arborisation dendritique au niveau des neurones pyramidaux des couches II et III du CPF ainsi qu'une diminution de la densité des épines dendritiques dans ces neurones mais aussi dans les neurones pyramidaux de l'amygdale basolatérale. Ces animaux montrent une synchronisation sensorimotrice altérée, une diminution de la locomotion et des comportements de types dépressifs (Ko et al., 2014).

De façon globale, ces études ont montré que la sérotonine agit comme un facteur de croissance et de différenciation et permet la régulation de nombreux processus développementaux tels que la neurogénèse, la migration neuronale, la synaptogènese, mais aussi l'élagage dendritique. Ainsi, le système sérotoninergique semble jouer un rôle majeur dans la maturation du système cérébral (Buznikov, 1984; Gaspar et al., 2003).

2. A l'âge adulte

Le système sérotoninergique a une distribution large au niveau du système nerveux central et la diversité de ses récepteurs permet de maintenir physiologiquement de nombreux comportements. Ainsi, à l'âge adulte la sérotonine est impliquée dans des comportements qui peuvent être très différents allant de la perception de la douleur à l'addiction. Ici, nous ne serons pas exhaustif sur les multiples effets de la sérotonine mais essaierons de donner deux exemples de ses rôles principaux : le contrôle de l'humeur et de la cognition.

2.1 Rôle dans la modulation de l'humeur

Souvent appelée « hormone du bonheur » la sérotonine doit ce surnom à son implication dans la modulation de l'humeur. En 1955, une étude met en évidence que l'administration de réserpine, un bloqueur de la recapture des monoamines vésiculaires, connu maintenant pour produire des syndromes dépressifs, augmente l'excrétion dans les urines du métabolite principal de la sérotonine (Pletscher et al., 1955). Ainsi dès les années 1980, le rôle clef de la sérotonine dans la dépression et son association à des pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson est démontrée (Mayeux et al., 1984). Diverses études postulent que les symptômes dépressifs seraient dus à une diminution de la transmission sérotoninergique. Cependant d'autres montrent des taux élevés de sérotonine extracellulaires dans les cerveaux de patients déprimés (Andrews et al., 2015; Shelton et al., 2009).

Les inhibiteurs de la recapture de sérotonine tels que la fluoxétine, permettent entre autres, une augmentation de la prolifération des précurseurs neuronaux dans l'hippocampe. Cette implication de la sérotonine dans la neurogénèse adulte permet l'intégration de neurones nouveaux dans le gyrus denté et de reverser, *in fine*, les symptômes de dépression (Kowalska et al., 2021; Park, 2019). Cependant le bénéfice de ces inhibiteurs n'apparaît qu'après plusieurs semaines de traitement, 30% des patients y sont résistants. De plus, il leur est attribué des effets délétères notamment sur la mémoire de travail (Berthoux et al., 2019; Castañé et al., 2015, 2015; Duman et al., 2016; Yu et al., 2019).

Pour finir, une étude a mis en avant l'effet différentiel de la sérotonine sur les comportements dépressifs et anxieux. Les auteurs ont utilisé une stratégie thérapeutique afin d'augmenter l'activité sérotoninergique au niveau central chez des souris transgéniques et suivre les comportements dépressifs (test de nage forcée) et anxieux (test du labyrinthe en croix surélevée) qui y sont associés. Ces souris transgéniques expriment la channel rhodopsine de type 2, spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques centraux, sous le contrôle du promoteur TPH2. Ainsi l'activation sérotoninergique au niveau du noyau du raphé médian (NRM) augmente les comportements anxieux alors qu'une activation sérotoninergique au niveau du NRD favorise des effets antidépresseurs. Une activation simultanée des deux aires va quant à elle favoriser une suppression des actions impulsives. Ainsi, l'utilisation d'ISRS comme traitement chez les patients dépressif peut exacerber l'anxiété pendant les phases initiales du traitement (Ohmura et al., 2020).

2.2 Rôle dans la cognition

La sérotonine est un régulateur très important de la cognition, énormément étudiée au niveau du CPF cela a mis en avant son implication dans la mémoire à court terme, l'apprentissage, la mémoire associative, l'attention ou la flexibilité cognitive (Bacqué-Cazenave et al., 2020; Dalley et al., 2004; Liy-Salmeron and Meneses, 2008; Puig and Gulledge, 2011; Scholes et al., 2007). En effet, le CPF reçoit des inputs sérotoninergiques des NRD et NRM qui modulent les multiples récepteurs présents dans les différentes couches du CPF. Ainsi suivant où et quel récepteur sérotoninergique est activé les effets comportementaux associés seront différents (Fernandez et al., 2016; Sargin et al., 2019; Séguéla et al., 1989).

L'étude de Liy-Salmeron et Meneses, illustre cette variabilité de l'effet de la sérotonine suivant le sous type de récepteur qu'elle active. Une administration de kétamine chez le rat adulte entraine une diminution de la mémoire à court terme. L'administration systémique ou intra-préfrontale de sérotonine abolit cette diminution. Plus précisément, ces effets positifs sur la mémoire dépendent de l'administration d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) ou d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} (MDL 100907), 5-HT_6 (SB-399885) ou 5-HT_7 (SB-269970). Cette étude montre une implication différente de la sérotonine suivant son association à ses sous-types de récepteurs. Ainsi, les chercheurs mettent en évidence que le blocage des récepteurs NMDA par la kétamine induit un hypofonctionnement glutamatergique à l'origine des déficits de mémoire à court terme et explique que le système sérotoninergique reverse ces déficits (Liy-Salmeron and Meneses, 2008).

De façon plus globale, la sérotonine est impliquée dans les fonctions exécutives telles que l'inhibition cognitive. Le test de Stroop, très utilisé en neuropsychologie notamment pour les patients schizophrènes, permet justement de mesurer ces comportements (Velligan et al., 1997). John Ridley Stroop, propose ce test en 1935, les patients se voient présenter visuellement des mots de couleurs qui sont écrits avec des encres de couleurs différentes ; ROUGE, VERT, BLEU, par exemple. Il est plus difficile de nommer la couleur dans laquelle le mot est écrit que de le lire. Ce test entraine une interférence qui est produite par une information non pertinente au cours de l'exécution d'une tâche cognitive. Ainsi, ce test permet d'étudier l'interférence entre la lecture d'un mot et sa couleur, et donc d'évaluer la capacité à inhiber une réponse qui est automatique. Scholes et al., montrent *via* une étude en double aveugle sur des patients sains, une diminution de l'interférence Stroop (corrélé à une amélioration du contrôle de l'attention) lorsque les patients ont reçu un traitement avec une déplétion en tryptophane (diminue la sécrétion de sérotonine) ou avec une déplétion tyrosine/phénylalanine (diminution de la dopamine). Montrant ainsi l'implication de la sérotonine et de la dopamine dans le contrôle de l'attention dans des structures spécifiques telles que le CPF. En effet, des études d'IRM fonctionnelle ont montré une association entre la déplétion en tryptophane associée au test Stroop et l'augmentation de l'activation du cortex cingulaire antérieur et du CPF (Evers et al., 2006).

De nombreuses études ont montré que la sérotonine est aussi associée à une augmentation de l'apprentissage et de la mémoire associative (Harvey et al., 2004). Par exemple, les souris 5-$HT_{2A}^{-/-}$ présentent des performances cognitives altérées dans un test évaluant la mémoire associative. Les performances cognitives sont restaurées lors de l'expression virale du récepteur 5-HT_{2A} spécifiquement au niveau du thalamus démontrant l'importance présynaptique dans les synapses thalamocorticales du récepteur 5-HT_{2A} (Barre et al., 2016; Bécamel et al., 2017).

Enfin, des approches optogénétiques et chimiogénétiques permettant de manipuler la libération de sérotonine par les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal, ont permis de montrer que les variations de sérotonine au niveau cérébral, et notamment au niveau du CPF, ont un impact sur la flexibilité cognitive (Clarke et al., 2004; Sargin et al., 2019). Par exemple, il est montré qu'une inhibition chimiogénétique des neurones sérotoninergiques au niveau du raphé dorsal, chez la souris adulte diminue leur performance dans des tests d'apprentissages inversés, montrant ainsi l'implication de la sérotonine dans la flexibilité cognitive (Matias et al., 2017). Ces altérations comportementales pourraient impliquer les récepteurs 5-HT_{2A}. En effet, d'autres études caractérisent un rôle de ces récepteurs dans la mémoire de travail spatiale, les fonctions exécutives et notamment la flexibilité cognitive. Des effets délétères sur ces comportements ont été montré suite à une consommation aigüe

de LSD chez l'Homme (agoniste 5-HT_{2A}) qui sont reversés grâce à un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (Furr et al., 2012; Pokorny et al., 2019; Sessa, 2008).

Au vu de la forte implication de la sérotonine dans le contrôle de la cognition, de nombreuses études rapportent que des dérégulations de ce neurotransmetteur sont associées à des pathologies psychiatriques et développementales comme des troubles de l'humeur, des troubles du spectre autistique, la sclérose tubéreuse, la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie. Ainsi, il est primordial d'étudier les récepteurs de la sérotonine, leurs localisations ainsi que leurs voies de signalisation afin de caractériser au mieux l'implication de la sérotonine dans ces pathologies et de pouvoir développer des stratégies thérapeutiques adaptées. Dans le chapitre suivant je développerai donc l'importance de la sérotonine dans ces fonctions à travers un récepteur sérotoninergique clef, le récepteur 5-HT_6 qui a fait l'objet d'étude de ma thèse.

Chapitre III – Le récepteur 5-HT$_6$ de la sérotonine

A. Découverte et structure du récepteur 5-HT$_6$

Le récepteur 5-HT$_6$ est un RCPG couplé aux protéines Gs (Sebben et al., 1994). Il a d'abord été découvert en 1993, dans le striatum de rat puis trois ans plus tard chez l'Homme (Kohen et al., 1996; Ruat et al., 1993). Le clonage et la caractérisation de ce récepteur ont permis de mettre en avant que le gène humain du récepteur 5-HT$_6$ (*htr6*) code pour une protéine de 440 acides aminés et qu'il est localisé au niveau du chromosome 1. L'homologue de ce récepteur est retrouvé, sur le chromosome 5 chez le rat et sur le chromosome 4 chez la souris. Ces récepteurs de rongeur ont chacun 89% d'homologie avec le récepteur 5-HT$_6$ humain (et 97% entre eux) (Kohen et al., 2001; Woolley and Fone, 2004).

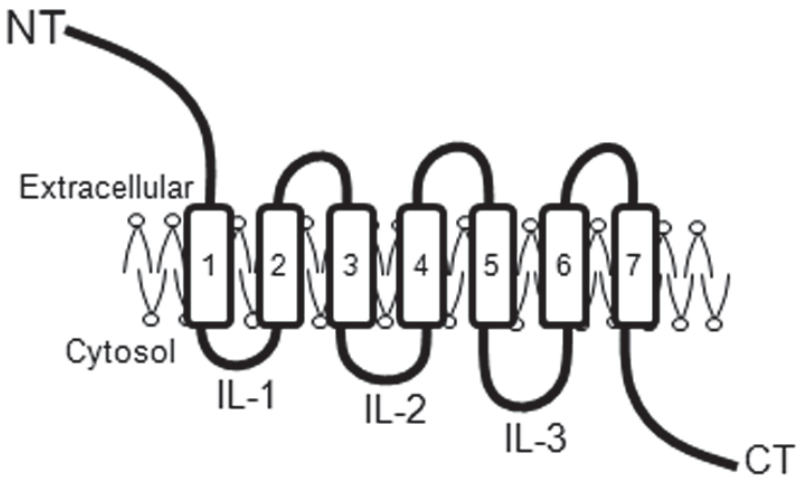


Figure 25 : Structure du récepteur 5-HT$_6$. Le récepteur 5-HT$_6$ est un RCPG, il est composé de sept hélices transmembranaires reliées par trois boucle intracellulaires (IL) et trois extracellulaires, avec un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire (Kim et al., 2014).

Le récepteur 5-HT$_6$ se compose d'une extrémité N-terminal extracellulaire (Kim et al., 2014) relativement courte (27 acides aminés), d'une boucle intracellulaire cytoplasmique i3 (57 acides aminés) et d'un long domaine C-terminal (120 acides aminés) (**Figure 25**). Ces indicateurs sont caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines Gs. Ce récepteur présente aussi une forte homologie avec les autres récepteurs sérotoninergiques, de part la présence de l'aspartate en position 106 (ASP^{106}) qui est important pour la liaison récepteur-sérotonine. Il possède aussi des caractéristiques uniques avec un site de glycosylation (Asn9) situé en N-terminal et la formation d'un pont disulfure entre la première et la seconde boucle extracellulaire (Cys^{99}-Cys^{180}). La région C-terminale et la boucle i3 contiennent de nombreux sites de phosphorylation par la PKC (Woolley and Fone, 2004). Un variant d'épissage tronqué a été caractérisé chez l'Homme, avec une déplétion de 289 paires de bases au niveau de la région codant pour le domaine transmembranaire IV et la troisième

boucle intracellulaire. Ce récepteur est exprimé à la membrane mais il est incapable de lier la sérotonine et est non fonctionnel (Olsen et al., 1999).

B. Distribution des récepteurs 5-HT$_6$

a. Localisation régionale

Le récepteur 5-HT$_6$ de la sérotonine est exclusivement exprimé au niveau du SNC et plus particulièrement dans des structures impliquées dans les fonctions cognitives (**Figure 26**) (Woolley and Fone, 2004). L'ARN messager (ARNm) de ce récepteur est quant à lui exprimé précocement au cours du développement cérébral, aux alentours de E10 chez la souris et son expression se stabilise à l'âge adulte (Dayer et al., 2015; Vitalis et al., 2013).
Dès les années 1996, Ward et al., mettent en évidence par la technique d'hybridation *in situ*, la localisation de l'ARNm du récepteur 5-HT$_6$ dans le cerveau de rat au niveau des bulbes olfactifs, du striatum, du Nacc, de l'hippocampe, des différentes couches du cortex, de l'hypothalamus, de l'amygdale et du cervelet. Des expériences d'immunomarquages avec des anticorps permettant de cibler la partie C-terminale du récepteur ont permis de confirmer l'expression de ce récepteur au niveau des tubercules olfactifs, des aires frontales et enthorinales du cortex, du Nacc, du striatum, de l'hippocampe (plus particulièrement dans le stratum oriens et le stratum radiatum de l'aire CA1 et la couche moléculaire du gyrus denté) et de la couche moléculaire du cervelet (Gérard et al., 1997). Cependant ces deux études, Ward et al., et Gérard et al., montrent, par exemple une expression de l'ARNm du récepteur 5-HT$_6$ au niveau de l'hypothalamus alors que l'immunomarquage ne montre pas d'expression dans cette zone et inversement au niveau du cervelet qui présente un fort immunomarquage et une faible proportion d'ARNm. Le niveau d'expression de l'ARNm n'étant pas forcément correlé au niveau d'expression protéique et les anticorps dirigés contre les RCPG de la classe A (dont fait partie le récepteur 5-HT$_6$) pouvant présenter une faible affinité, il serait intéressant de reproduire ces études.

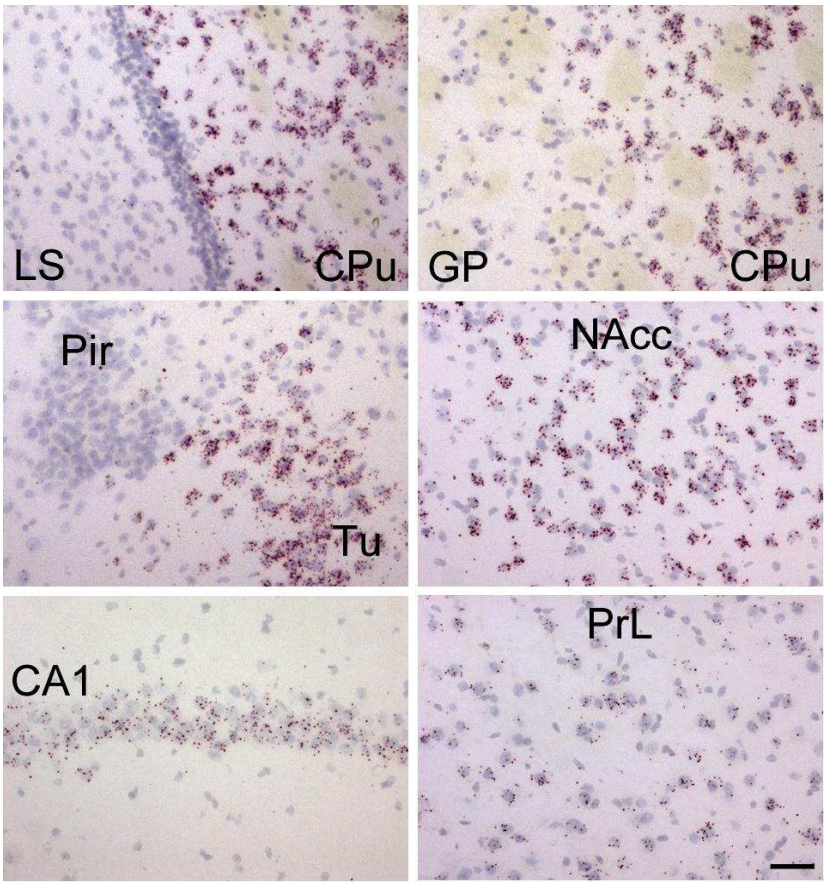


Figure 26 : Cartographie de l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT$_6$ au niveau du cerveau de rat en hybridation *in situ*. Il est montré une expression au niveau des ganglions de la base, du Nacc, de l'hippocampe et du cortex. De gauche à droite et de haut en bas : Cpu, putamen caudé ; GP, globus pallidus; LS, septum lateral NAcc, noyau accumbens; Pir, cortex piriforme ; PrL, cortex prelimbique; Tu, tubercule olfactif. Echelle = 25 µm (Helboe et al., 2015).

Chez l'Homme, des études post-mortem ont montré une expression similaire à celle observée chez le rat, avec une localisation importante au niveau du CPF, du striatum et de l'hippocampe (Marazziti et al., 2012, 2013). Ce récepteur apparaît moins exprimé chez la souris que chez le rat ou l'Homme, mais sa distribution est similaire avec une expression plus importante au niveau du CPF, du striatum et du Nacc (Berthoux et al., 2020; Hirst et al., 2003; Svenningsson et al., 2007).

b. Localisation cellulaire

D'un point de vue cellulaire, le récepteur 5-HT$_6$ n'est pas exprimé au niveau des neurones sérotoninergiques. En effet, l'utilisation de 5,7-Dihydroxytryptamine – une neurotoxine permettant la diminution des concentrations de sérotonine – au niveau des neurones du raphé dorsal, permet de diminuer les niveaux d'ARNm du transporteur de la sérotonine (de façon semblable à une lésion des neurones sérotoninergiques). Cependant, il n'est pas observé une diminution de l'ARNm du récepteurs 5-HT$_6$ dans cette zone ainsi que dans le Nacc, et l'hippocampe par exemple. Ces résultats montrent ainsi que ce récepteur n'est pas un auto-récepteur et qu'il ne participe donc pas à l'homéostasie du système sérotoninergique (Gérard et al., 1996). De même, la lésion sélective des neurones

cholinergiques n'affecte pas la liaison d'un radioligand au récepteur 5-HT_6 au niveau du cortex frontal (Marcos et al., 2006).

Le récepteur est localisé dans différents types cellulaires. D'après des expériences d'immunomarquages réalisées sur des tranches de cerveau de souris, ce récepteur est exprimé dans les cellules pyramidales des différentes couches cellulaire du CPF, notamment au niveau de la couche V (Berthoux et al., 2020; Lorke et al., 2006), mais aussi dans les interneurones corticaux (Riccio et al., 2009). Au niveau de l'hippocampe, le récepteur 5-HT_6 est retrouvé dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1 et du gyrus denté et dans les interneurones GABAergiques. Au niveau du striatum, la majorité de ce récepteur est exprimé dans les « medium spiny neurons » (MSN qui sont des neurones GABAergiques de projection représentant 95% des neurones du striatum) (Helboe et al., 2015).
Les études de Helboe et al., ont aussi montré une expression de l'ARNm des récepteurs 5-HT_6 dans les neurones glutamatergiques et dans les neurones GABAergiques. Suivant la structure, une co-expression de l'ARNm des récepteurs 5-HT_6, des récepteurs 5-HT_{3A}, de la calbindine et de la calrétinine a été retrouvée dans les interneurones. La majorité des neurones GABAergiques du striatum expriment l'ARNm du récepteur 5-HT_6 alors qu'il est retrouvé en proportion plus faible dans les interneurones GABAergiques de l'hippocampe et du CPF (approximativement 15% des interneurones GABAergiques GAD67 positifs expriment l'ARNm du récepteur 5-HT_6). Helboe et al, montrent dans cette étude que la majorité des interneurones exprimant le récepteur 5-HT_6 appartiennent à la sous population des interneurones 5-HT_{3A}, une proportion moins importante des récepteurs 5-HT_6 est exprimée dans les interneurones PV et somatostatine et il est retrouvé de façon mineure dans les interneurones VIP ou NPY (Helboe et al., 2015). La présence de ce récepteur au niveau des neurones excitateurs et inhibiteurs, associée à son niveau d'expression qui diffère selon la structure, laisse penser à une possible implication de ce derniers dans la régulation de la balance excitation/inhibition.

Chez l'Homme, l'utilisation d'un ligand radiomarqué du récepteur 5-HT_6 associé à des immunomarquages a permis de mettre en avant l'expression du récepteur au niveau des neurones pyramidaux du CPF et de l'hippocampe. La présence du récepteur 5-HT_6 est aussi rapportée au niveau des cellules gliales du CPF mais pas de l'hippocampe (Marazziti et al., 2012). Au niveau du striatum, il est présent seulement dans les neurones et n'est pas retrouvé au niveau des astrocytes (Marazziti et al., 2013).

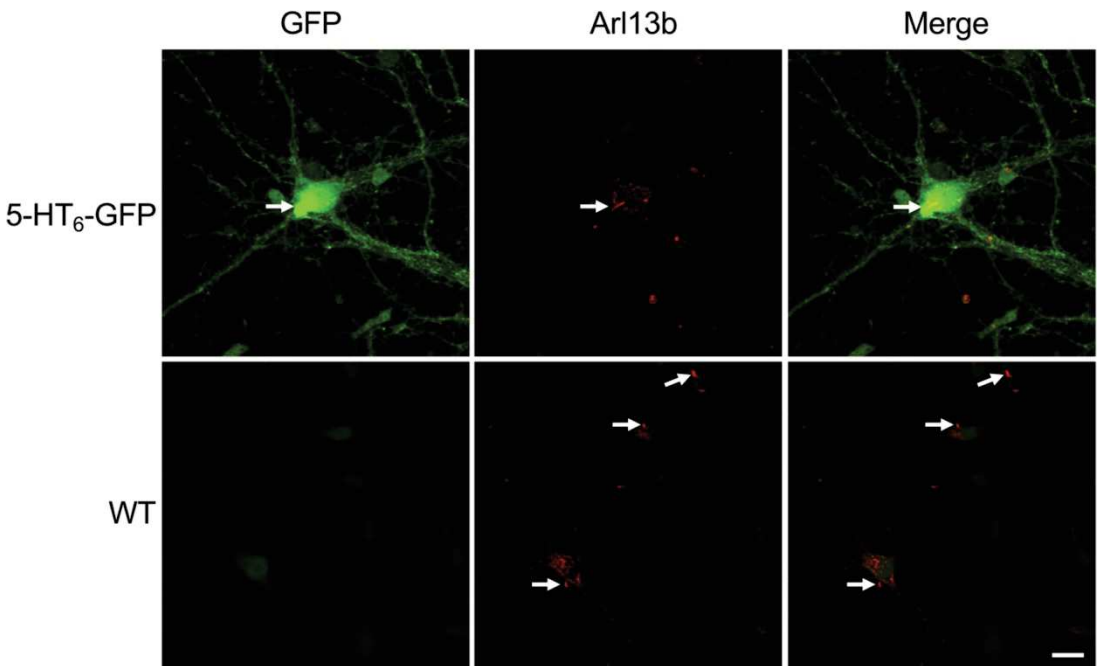


Figure 27 : Localisation subcellulaire du récepteur 5-HT$_6$. Le récepteur 5-HT$_6$ colocalise avec la protéine ciliaire Arl13b (en rouge) dans des cultures primaires de neurones hippocampiques venant d'embryons de souris 5-HT$_6$-GFP (en vert). La colocalisation du récepteur avec le corps cellulaire ou les dendrites est plus faible (Chaumont-Dubel et al., 2020).

Les récepteurs de la sérotonine ont d'abord été caractérisés comme étant préférentiellement localisés dans le compartiment dendritique (Hamon et al., 1999). Récemment, Pujol et al., ont montré sur des tranches de souris transgéniques exprimant le récepteur 5-HT$_6$ étiqueté avec la protéine GFP (souris 5-HT$_6$-GFP Ki), que le récepteur 5-HT$_6$ est aussi trouvé au niveau somatique sur des neurones corticaux et striataux au stade néonatal (Pujol et al., 2020). Cette localisation somatique a également été décrit sur des cultures primaires de neurones hippocampiques (Chaumont-Dubel et al., 2020).

Le récepteur est aussi exprimé au niveau du cil primaire (**Figure 27**) qui agit comme une antenne cellulaire permettant de transmettre les signaux de nombreuses voies de signalisation et de concentrer de nombreux RCPG essentiels pour le développement (Brodsky et al., 2017; Chaumont-Dubel et al., 2020; Hamon et al., 1999). Ainsi, il a été démontré que le récepteur 5-HT$_6$ co-localise avec la protéine cilliaire Arl13b dans les cultures primaires de neurones hippocampiques (Chaumont-Dubel et al., 2020). De plus, l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT$_6$ entraine une diminution de la longueur du cil dans des cultures primaires de neurone striataux (Brodsky et al., 2017). A l'inverse, la restauration de l'expression du récepteur dans des cultures primaires de neurones striataux et corticaux, issus de souris 5-HT$_6^{-/-}$ permet d'augmenter la longueur du cil (Lesiak et al., 2018). Plus récemment, grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes permettant de détecter les changements dynamiques d'AMPc, il a été montré que contrairement aux récepteurs 5-HT$_6$ somatiques, les récepteurs 5-HT$_6$ ciliaires présentent une activité constitutive moins importante (Jiang et al., 2019).

C. Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT$_6$

a. Couplage canonique à la protéine Gs

Comme nous avons pu le voir, le récepteur 5-HT$_6$ est canoniquement couplé à la protéine Gs *via* le motif BBxxB (B : résidu basique, x : résidu non basique) présent dans la boucle intracellulaire i3. Ce motif, conservé chez l'Homme, le rat et la souris, est essentiel dans la modulation de l'activité constitutive des RCPG, des mutations au niveau de ce domaine entrainent ainsi une inhibition de l'activité constitutive du récepteur 5-HT$_6$ (Kohen et al., 2001).

L'activation de Gs par le récepteur 5-HT$_6$ active la voie de l'adenylate cyclase et la production d'AMPc permettant l'activation de la PKA qui phosphoryle le facteur de transcription CREB (cAMP Responding Element Bound). CREB est ensuite en capacité de moduler l'expression de différents gènes dont le BDNF (Sebben et al., 1994; Wang et al., 2018; Woolley and Fone, 2004).

b. Couplage à d'autres voies de signalisation

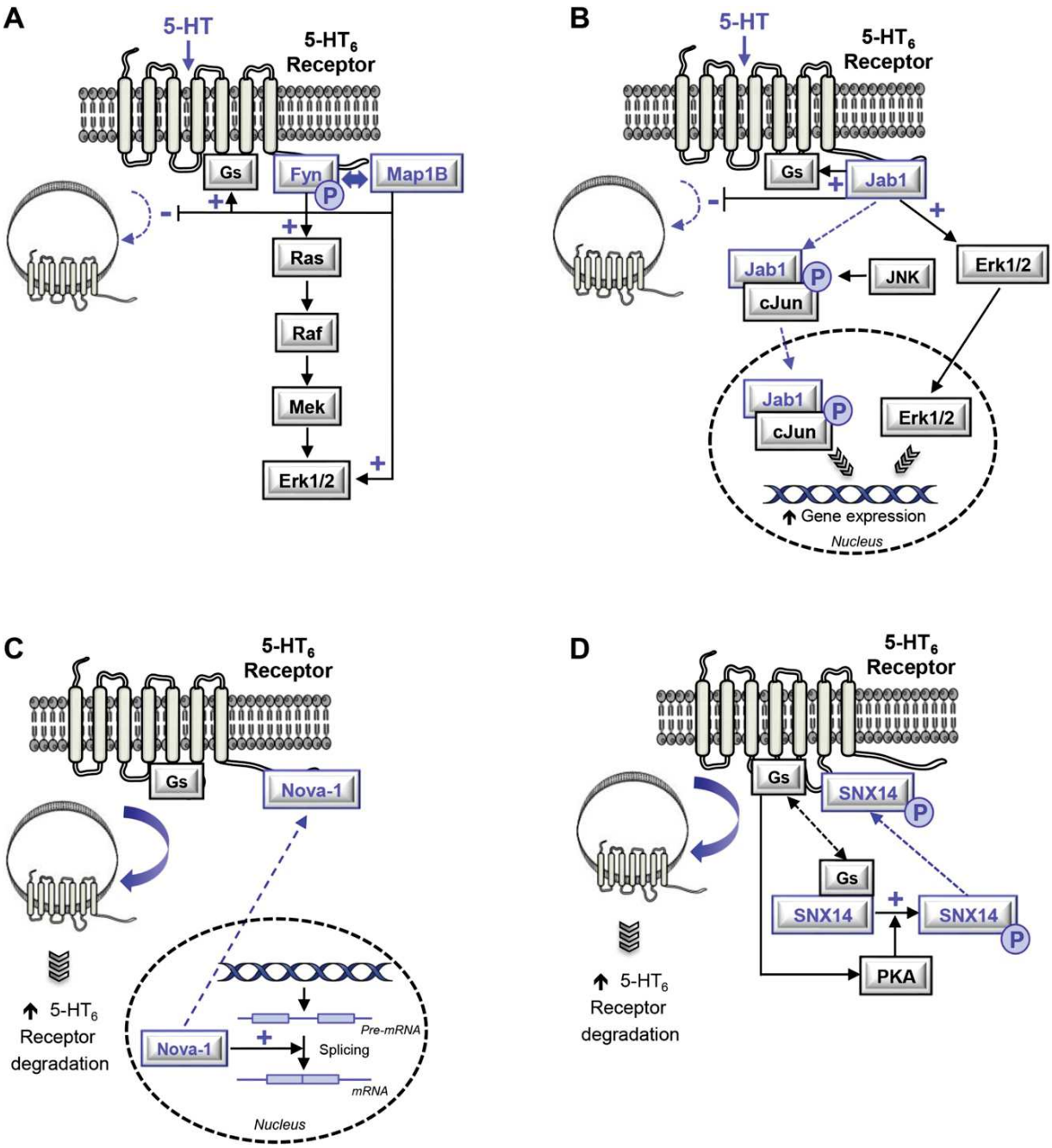


Figure 28 : Schéma récapitulant les autres voies de signalisation associées aux récepteurs 5-HT$_6$. La régulation du trafic et de la signalisation des récepteurs 5-HT$_6$ implique divers partenaires protéïques (Chaumont Dubel et al., 2020).

1. Couplage avec la Src kinase Fyn

Le couplage entre le récepteur 5-HT$_6$ et la kinase Fyn de la famille Src a été caractérisé grâce à la technique de double hybride (Yun et al., 2007). L'équipe de Yun et al., a mis en évidence l'interaction de la partie C-terminale du récepteur avec la protéine tyrosine kinase Fyn *via* son domaine SH3. De plus, ces deux protéines présentent une distribution similaire dans le cerveau de rat. Il a également

été montré que la surexpression de Fyn dans des cellules hétérologues mène à un adressage à la membrane du récepteur accompagné d'une augmentation de son activité. La stimulation du récepteur quant à elle, induit une autophosphorylation de Fyn au niveau de la tyrosine 420, jouant ainsi un rôle sur son activité kinase. Enfin, cette autophosphorylation permet l'activation de ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) *via* la cascade Ras-Raf1-Mek (**Figure 28.A**).

2. Couplage avec la protéine Jab-1

Toujours grâce à la technique de double hybride, cette équipe a mis en évidence l'interaction entre la kinase Jab1 (Jun Activation domain-Binding protein1) et le récepteur 5-HT$_6$ *via* la partie C-terminale et la boucle i3 (Yun et al., 2010). L'inhibition de l'expression de Jab1 entraine une diminution de l'expression membranaire du récepteur ainsi qu'une diminution de son activité (**Figure 28.B**). L'activation du récepteur entraine elle, la translocation de Jab1 dans le noyau lui permettant d'interagir avec son substrat c-Jun, induisant ainsi son activation. De façon intéressante, des conditions hypoxiques, *in vivo* et sur culture cellulaire, entrainent une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT$_6$ et de Jab-1, permettant un effet neuroprotecteur en diminuant la mort cellulaire (Yun et al., 2010). Une étude plus récente met en avant un autre rôle de ce couplage. En effet, une augmentation de l'activation de la voie Jab1-Phospho-c Jun sous le contrôle du récepteur 5-HT$_6$ est montrée dans l'épilepsie. Le blocage de cette voie par un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ diminue la fréquence des crises spontanées et reverse les déficits de mémoire et d'apprentissage observés dans un modèle préclinique d'épilepsie (Liu et al., 2019).

3. Couplage avec la protéine Map1B

Cette équipe a ensuite identifié un couplage entre le récepteur 5-HT$_6$ et la protéine Map1B (Microtubule Associated Protein 1B) (**Figure 28.A**), une protéine associée aux microtubules etfortement exprimée dans le cerveau. Le récepteur 5-HT$_6$ interagit avec la sous unité LC1 (Light Chain 1) de la protéine Map1B *via* son domaine C-terminal. Cette interaction favorise l'expression du récepteur à la membrane et diminue son endocytose suggérant un effet de cette voie sur la désensibilisation et l'activité fonctionnelle du récepteur (Kim et al., 2014).

4. Couplage avec la protéine Nova-1

Plus récemment, il a été montré que le récepteur 5-HT$_6$ interagit avec Nova-1 (Neuro-Oncological Ventral Antigen 1) (**Figure 28.C**) une protéine neuronale de liaison à l'ARN permettant de réguler l'épissage de l'ARN. Lorsque le récepteur est surexprimé, l'activité d'épissage est diminuée et Nova-1 est transloquée du noyau au cytoplasme et s'associe à l'extrémité C-terminale du récepteur. Inversement, la surexpression de Nova-1 contrairement à l'association du récepteur avec Fyn, Jab1 ou Map1B, permet d'augmenter l'internalisation du récepteur et sa dégradation par le protéasome (Kim et al., 2019).

5. Couplage avec la protéine SNX14

Le récepteur 5-HT$_6$ interagit également avec la protéine SNX14 (Sorting Nexin 14) qui est fortement exprimée au niveau du cerveau (**Figure 28.D**). SNX14 va réguler de façon négative la signalisation

associée au récepteur en promouvant l'endocytose et la dégradation du récepteur mais aussi en agissant directement sur la protéine Gs en la « séquestrant ». La phosphorylation de SNX14 par la PKA induit la libération de Gs. Elle est ensuite transloquée à la membrane et se lie à la boucle i3 du récepteur facilitant la dégradation de ce dernier (Ha et al., 2015).

6. Couplage avec la protéine mTOR

Les approches de double hybride ont permis à cette équipe de mettre en évidence l'interaction du récepteur avec les différents partenaires protéiques que nous venons d'énoncer. Mon équipe a quant à elle, caractérisé de nouveaux partenaires protéiques du récepteur grâce à un crible protéomique. Ils ont notamment caractérisé pour la première fois un couplage physique et fonctionnel du récepteur 5-HT$_6$ avec la voie de signalisation mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) (Meffre et al., 2012). Je décrirai plus en détail ce couplage dans le chapitre IV.

c. Activité constitutive du récepteurs 5-HT$_6$ et voies de signalisation associées

Le récepteur 5-HT$_6$ possède une forte activité constitutive c'est-à-dire que ce récepteur peut être activé en l'absence de son ligand donc en absence de sérotonine. L'activité constitutive du récepteur 5-HT$_6$ est caractérisée depuis les années 2000. Kohen et son équipe observent, dans un milieu dépourvu de sérotonine, une augmentation de l'AMPc qui est proportionnelle à la quantité transfectée de plasmide exprimant l'ADNc du récepteur 5-HT$_6$ dans des cellules hétérologues (JEG-3 et COS-7). De plus, ils montrent que cette activité constitutive du récepteur est régulée positivement par le motif BBxxB de la boucle i3 du récepteur (Kohen et al., 2001). Cependant, d'autres partenaires protéiques peuvent moduler cette activité constitutive, dont la protéine Cdk5 (Cyclin Dependant Kinase 5) et la protéine Neurofibromin 1 (NF1) qui ont été identifiées comme partenaire protéiques du récepteur 5-HT$_6$ lors du crible protéomique réalisé par mon équipe (Meffre et al., 2012). Pour rappel, des outils pharmacologiques permettent de mettre en évidence l'activité constitutive d'un récepteur : l'utilisation d'antagonistes neutres permet de bloquer l'activation du récepteur induite par un agoniste mais n'aura aucun effet sur son activité constitutive contrairement aux agonistes inverses qui sont en capacité de bloquer l'activité constitutive du récepteur.

1. Couplage à la protéine Cdk5

Les études protéomiques ont permis de mettre en évidence un couplage du récepteur avec la protéine Cdk5 (Cyclin Dependent Kinase 5) qui est fortement exprimée au niveau du cerveau et qui régule des mécanismes clefs du fonctionnement cérébral tels que la transmission et la plasticité synaptique (Meffre et al., 2012). Dans des cultures de neuroblastomes NG108-5, et des cultures primaires de neurones d'hippocampe et de striatum, l'interaction entre le récepteur 5-HT$_6$ et Cdk5 provoque la phosphorylation du récepteur par Cdk5 au niveau de son résidu Ser^{350}. Cette phosphorylation est associée à une augmentation de l'activité de la Rho GTPase Cdc42 et à l'élongation des neurites (Duhr et al., 2014). Ainsi, cette interaction induit la pousse neuritique en absence d'agoniste 5-HT$_6$.

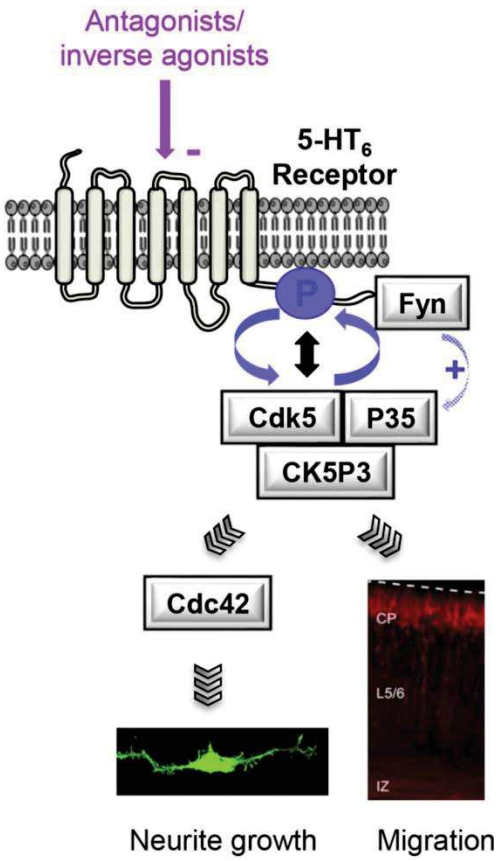


Figure 29 : Le couplage du récepteur 5-HT$_6$ à la protéine kinase Cdk5 entraine croissance des neurites et migration. Le récepteur 5-HT$_6$ active la signalisation Cdk5 *via* la phosphosphorylation du récepteur sur son résidu Ser^{350}. Cette activation se fait de façon indépendante de l'agoniste. Le récepteur 5-HT$_6$ recrute et active également Fyn, qui peut contribuer à l'activation de Cdk5 par le récepteur 5-HT$_6$ grâce à l'induction de p35 un activateur de Cdk5. L'activation de Cdk5 par le récepteur joue un rôle clé dans la migration des neurones corticaux et l'initiation de la croissance des neurites (Chaumont Dubel et al., 2020).

L'application d'un agoniste inverse inhibe les effets du couplage du récepteur 5-HT$_6$-Cdk5, montrant que cette cycline régule positivement l'activité constitutive du récepteur. En plus de son implication dans la pousse neuritique, l'activation de la voie de signalisation Cdk5 par le récepteur 5-HT$_6$ est impliquée au cours du développement dans les processus de migration des neurones pyramidaux du cortex (**Figure 29**) (Dayer et al., 2015; Duhr et al., 2014).

Plus récemment notre équipe a montré que la protéine GPRIN1 (G Protein inducer of neurite outgrowth 1), un partenaire et substrat de Cdk5 interagit avec le récepteur 5-HT$_6$ *in vivo* et augmente l'activité constitutive Gs du récepteur. Cette interaction favorise l'élongation et l'arborisation dendritique. Ainsi, l'interaction séquentielle du récepteur 5-HT$_6$ avec Cdk5 et GPRIN1 (**Figure 30**) facilite la succession des étapes de la différenciation neuronale. La pousse neuritique est dépendante de la protéine Cdk5, indépendamment de l'activité Gs et de GPRIN1 alors que la complexification de l'arbre dendritique est elle, dépendante de l'activité constitutive du récepteur *via* Gs et de GPRIN1 indépendamment de l'activité de Cdk5 (Pujol et al., 2020).

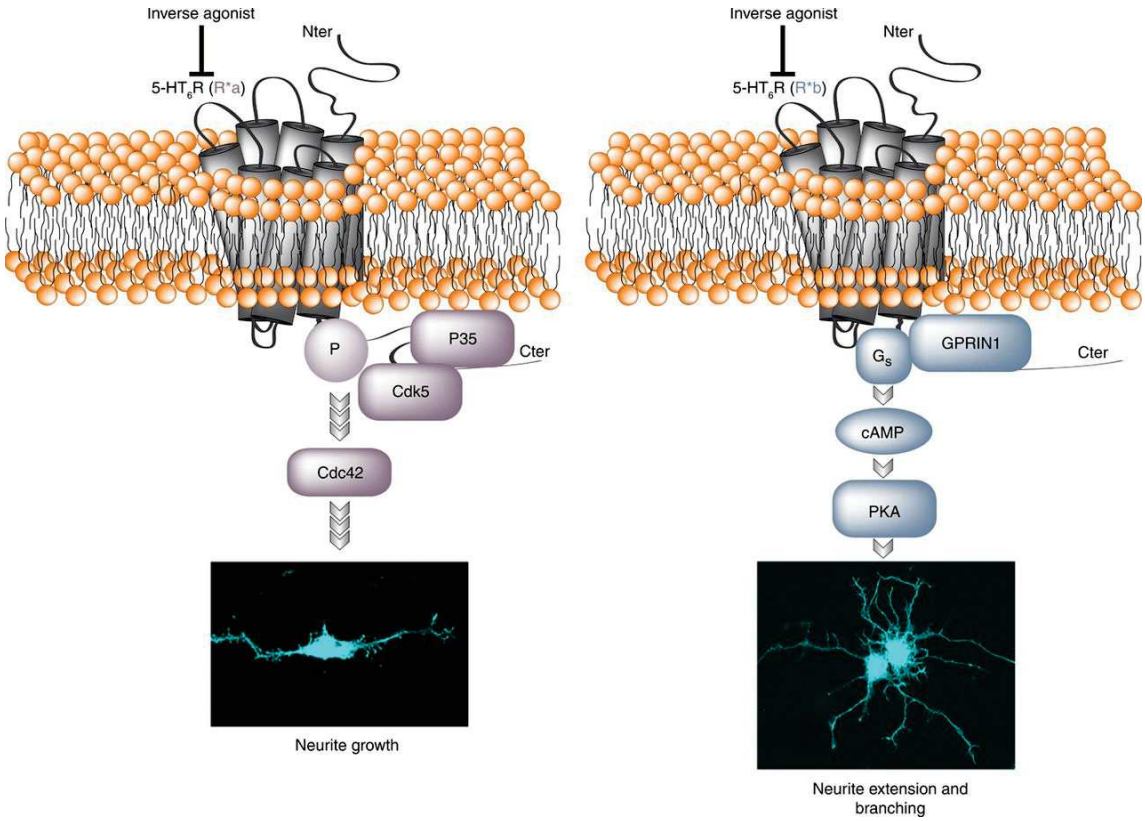


Figure 30 : Interaction différentielle entre le récepteur 5-HT$_6$ et les protéines Cdk5 – GPRIN1. A gauche : l'association entre le récepteur 5-HT$_6$ et Cdk5 entraîne la phosphorylation du récepteur sur un résidu sérine, entraînant l'activation par le récepteur de la signalisation Cdc42 et l'initiation de l'excroissance des neurites, de façon indépendante de l'agoniste. A droite : l'association du récepteur avec GPRIN1 entraine l'activation de la PKA et ainsi l'extension et la ramification des neurites. Ce mécanisme est aussi indépendant de l'agoniste. L'application d'un agoniste inverse a un effet inhibiteur sur ces deux voies, montrant ainsi qu'elles dépendent de l'activité constitutive du récepteur (Pujol et al., 2020).

2. Couplage avec NF1

Le récepteur 5-HT$_6$ interagit physiquement avec NF1 (Neurofibromin 1) qui est une protéine activatrice des Ras-GAP (Ras GTPase activating protein) (Xu et al., 1990). La Neurofibromine est une protéine encodée par le gène *NF1*, dont les mutations sont responsables de la neurofibromatose de type 1, une maladie monogénique affectant environ 1 personne sur 3000 et qui se caractérise par des tumeurs multiples et des déficits dans l'apprentissage et l'attention (Trovó-Marqui and Tajara, 2006). Le récepteur 5-HT$_6$ interagit *via* son domaine C-terminal avec le domaine homologue de la pleckstrine (PH) de la protéine NF1 (**Figure 31**). Cette interaction permet la production d'AMPc en absence

d'agoniste du récepteur et favorise donc l'activité constitutive de ce dernier sur la voie de signalisation Gs dépendante. Chez les patients atteints de la neurofibromatose de type 1, il a été identifié une mutation au niveau du domaine PH de la neurofibromine, qui est le domaine essentiel pour son interaction avec le récepteur 5-HT$_6$ (Deraredj Nadim et al., 2016). La perturbation de cette association entraine une diminution de l'activité constitutive Gs dépendante du récepteur chez les souris hétérozygotes pour le gène NF1 (*NF1*$^{+/-}$) chez lesquelles le niveau d'expression de la neurofibromine est significativement diminué (modèle préclinique de la maladie) (Deraredj Nadim et al., 2016). Cette diminution d'expression de la neurofibromine entraîne également une stimulation aberrante des voies de signalisations dépendantes de Ras, telles que les voies Raf-MEK-Erk et la voie mTOR (Oliveira and Yasuda, 2014).

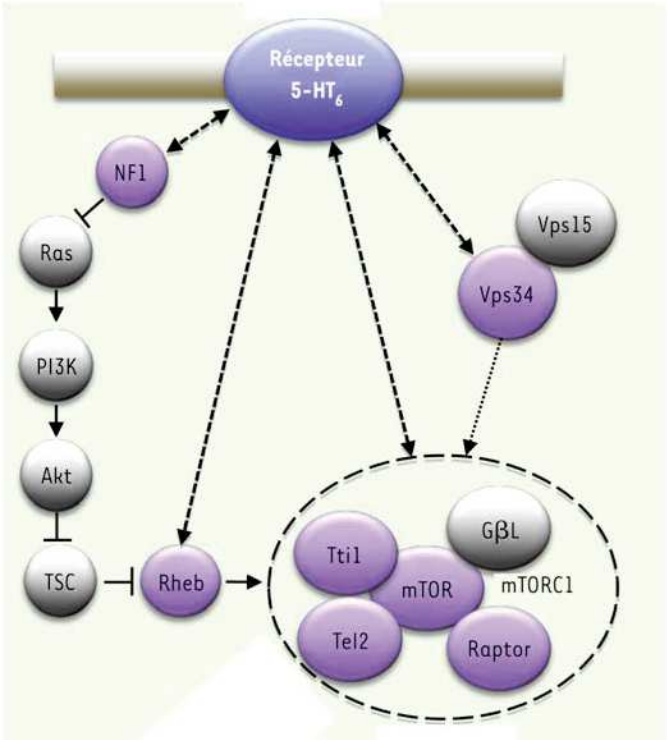


Figure 31 : Voies de signalisation induites par le récepteur 5-HT$_6$ impliquant NF1 et mTOR. (Marin et al., 2011).

D. Principales fonctions du récepteur 5-HT$_6$

a. Modulation de la neurotransmission

Diverses études ont montré un rôle clef du récepteur 5-HT$_6$ dans la modulation de la transmission synaptique des systèmes glutamatergiques, GABAergiques, cholinergiques et monoaminergiques (**Figure 32**).

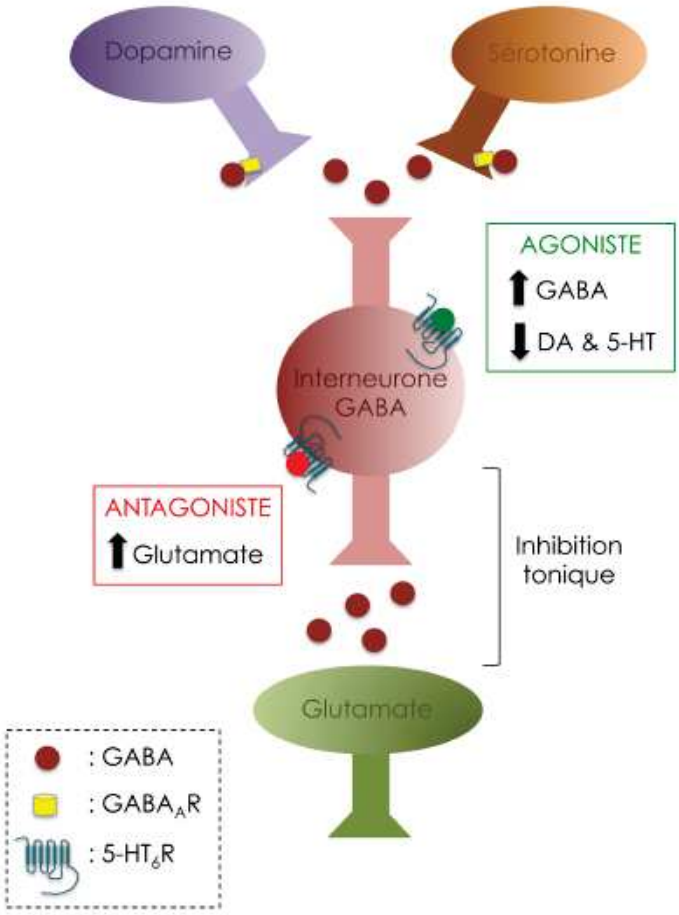


Figure 32 : Schéma représentant le contrôle de la transmission synaptique par le récepteur 5-HT$_6$. L'utilisation d'antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ entraine une inhibition des interneurones GABAergiques, permettant de lever l'inhibition sur les neurones glutamatergiques (ici du cortex et l'hippocampe). Cette levée d'inhibition GABAergique entraine la libération d'acetylcholine, dopamine et noradrénaline (non montrés ici). A l'inverse l'utilisation d'un agoniste des récepteurs 5-HT$_6$ entraine une augmentation de l'activation des interneurones GABAergiques, responsable d'une inhibition de la transmission dopaminergique et sérotoninergique (Schechter et al., 2008).

1. La transmission cholinergique

Bien que peu exprimé au niveau des neurones cholinergiques, des études de microdialyses ont mis en avant un rôle fonctionnel du récepteur 5-HT$_6$ dans la modulation du système cholinergique. Il a été retrouvé au niveau du CPF une augmentation de la libération d'acétylcholine suite à l'administration d'un antagoniste compétitif du récepteur 5-HT$_6$ (Marcos et al., 2006; Riemer et al., 2003). Cette augmentation entraine une amélioration des performances cognitives (Codony et al., 2011; Riemer et al., 2003). De plus, l'inhibition des récepteur 5-HT$_6$ permet de potentialiser l'effet du donepezil qui est un inhibiteur d'acétylcholinestérase. Ces effets pro-cognitif et pro-cholinergique sont très étudiés dans la maladie d'Alzheimer comme traitement symptomatique avec notamment l'idalopirdine, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ (Da Silva Costa-Aze et al., 2012; Gravius et al., 2011; Loiseau et al., 2008).

2. La transmission glutamatergique

D'autres expériences de microdialyses ont montré l'implication du récepteur 5-HT$_6$ dans la modulation du système glutamatergique. Les premières études de microdialyse montrent que l'injection, à des rats canulés, d'un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ entraine une augmentation du glutamate extracellulaire au niveau du CPF, de l'hippocampe ou du striatum (Dawson et al., 2000, 2001). Inversement, des enregistrements électrophysiologiques ont permis de montrer que l'activation du récepteur réduit la transmission glutamatergique notamment au niveau des MSN du striatum et des neurones pyramidaux de la couche V du CPF (Tassone et al., 2011). Dans des tâches comportementales de reconnaissance d'objets, il est décrit que l'augmentation de la consolidation de la mémoire par les antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ implique une augmentation de la neurotransmission glutamatergique (King et al., 2004).

3. La transmission GABAergique

Comme nous avons pu le voir, les récepteurs 5-HT$_6$ co-localisent avec le système GABAergique, ils vont ainsi pouvoir moduler leur neurotransmission (Gérard et al., 1997). L'administration sous cutanée d'agonistes des récepteurs 5-HT$_6$ entraine une augmentation dose-dépendante de la concentration extracellulaire de GABA chez le rat au niveau du CPF, du striatum, de l'hippocampe ou de l'amygdale, sans affecter la concentration de glutamate (Schechter et al., 2008). L'activation des récepteurs 5-HT$_6$ entraine aussi une augmentation de la fréquence des courants inhibiteurs post-synaptiques spontanés au niveau des neurones pyramidaux de l'aire CA1 sur des tranches d'hippocampe ainsi qu' une diminution de la LTP (West et al., 2009).

4. La transmission monoaminergique

Le récepteur 5-HT$_6$ module également la neurotransmission monoaminergique *via* son action sur la transmission GABAergique. Ainsi l'activation des récepteurs 5-HT$_6$ par le WAY-181187 (30mg/kg) induit une augmentation de la concentration extracellulaire de GABA dans le CPF et le striatum, accompagnée d'une diminution de la concentration extracellulaire de 5-HT au niveau du CPF et une diminution de dopamine au niveau du striatum (Schechter et al., 2008).

b. Rôle neurodéveloppemental

Comme nous avons pu le voir le récepteur 5-HT$_6$ est exprimé précocement durant le développement cérébral, lui donnant ainsi divers rôles neurodéveloppementaux que ce soit dans la mise en place des circuits cérébraux, la migration neuronale ou le développement dendritique par exemple (Dayer et al., 2015; Duhr et al., 2014; Jacobshagen et al., 2014).

Le récepteur 5-HT$_6$ joue un rôle important dans la neurogénèse. Une augmentation des taux de sérotonine chez la souris entraine des altérations développementales avec par exemple une diminution de la prolifération des cellules souches neurales qui commence à E17.5 et qui persiste du stade néonatal à l'âge adulte (Cheng et al., 2010). Ces effets délétères sont prévenus par l'inhibition, *via* un siRNA ou des antagonistes, des récepteurs 5-HT$_6$. Les auteurs ont montré que l'activation soutenue des récepteurs 5-HT$_6$ est à l'origine d'une diminution de l'activation des caspases 3 et 9 qui

sont des voies apoptotiques au profit de l'augmentation des voies non apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Cette diminution de la mort cellulaire induite par les récepteurs 5-HT$_6$ serait à l'origine des déficits développementaux observés (Wang et al., 2014).

Le récepteur 5-HT$_6$ possède aussi un rôle important dans la migration cellulaire. Sur la base de l'importance de la sérotonine dans le contrôle des processus cellulaires durant le développement, *Riccio et al*., montrent que le récepteur 5-HT$_6$ est exprimé dans les interneurones corticaux et que son activation diminue la vitesse de migration des interneurones. Un excès de sérotonine extracellulaire, chez les souris SERT$^{-/-}$, entraine une altération dans la migration des neurones pyramidaux et des interneurones du cortex (Riccio et al., 2009). L'électroporation, *in utero* à E14.5 d'un shRNA ciblant le gène *htr6*, entraine aussi un positionnement incorrect des neurones pyramidaux corticaux. Ce contrôle est dépendant de Cdk5 et de son activateur p35 qui sont des régulateurs importants de la migration neuronale (Jacobshagen et al., 2014). Le récepteur 5-HT$_6$ a donc un rôle dans la migration neuronale aussi bien pour le système glutamatergique que pour le système GABAergique.

En plus de ce rôle dans la migration, l'interaction de Cdk5 avec le récepteur 5-HT$_6$ permet de promouvoir la pousse neuritique dans des lignées cellulaires de neuroblastome NG108-15, montrant ainsi le rôle du récepteur dans la croissance neuritique et donc l'initiation des processus de différenciation neuronale (Duhr et al., 2014). Comme nous l'avons vu précédemment, notre équipe a récemment montré une interaction séquentielle entre le récepteur 5-HT$_6$, Cdk5 et GPRIN. GPRIN va pouvoir potentialiser l'activité constitutive du récepteur ce qui va favoriser l'élongation des neurites et la ramification des neurones (Pujol et al., 2020). Ainsi le récepteur va être en capacité de contrôler la morphologie de l'arbre dendritique.

E. Récepteur 5-HT$_6$ et pathologies

Jusque là, nous avons vu que le récepteur 5-HT$_6$ est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tant au niveau de son expression dans des structures essentielles pour les fonctions cognitives que par son rôle dans le neurodéveloppement ou dans la modulation de la neurotransmission. Il apparaît donc évident que des perturbations au niveau de l'expression ou de la signalisation de ce récepteur soient associées à diverses pathologies psychiatriques et neurodéveloppementales. Comme nous allons le voir dans ce paragraphe, le récepteur 5-HT$_6$ est également impliqué dans d'autres maladies telles que la dépression, l'épilepsie, les douleurs chroniques et même l'obésité, faisant de ce récepteur une cible thérapeutique d'intérêt (Karila et al., 2015).

a. Dépressions et anxiété

Le rôle de la sérotonine dans le contrôle de l'humeur est connu depuis de nombreuses années, diverses études se sont donc intéressées au rôle des récepteurs 5-HT$_6$ au niveau de cette régulation. L'application d'un agoniste des récepteur 5-HT$_6$ permet de diminuer le temps d'immobilité des rats dans le test de nage forcée (FST – comportement dépressif) et le temps passé dans les bras fermés dans l'EPM (comportement anxieux), suggérant un effet antidépresseur et anxiolytique de l'activation du récepteur (Nikiforuk et al., 2011). Une autre étude confirme l'effet antidépresseur induit par l'activation des récepteurs 5-HT$_6$. En effet, l'administration d'un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT$_6$, l'EMDT ou de fluoxétine, entraine une diminution de l'immobilité dans le test de suspension par la queue. Ces effets sont abolis par l'administration de SB271046, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ (Svenningsson et al., 2007). L'administration intra-corticale, dans le CPF dorso-médian de souris, d'un agoniste des récepteurs 5-HT$_6$, le EMD386088 diminue l'anxiété, caractérisée par une augmentation du temps passé au centre de l'arène, le temps passé dans le bras ouvert de l'EPM ainsi qu'une augmentation des interactions sociales. A l'inverse, l'administration d'un antagoniste, le SB271046, induit des effets anxiogènes dans ces mêmes tests. Ces effets sont abolis lors de l'administration d'un antagoniste des récepteurs GABA$_A$ montrant ainsi l'importance de la transmission inhibitrice dans l'effet antidépresseur et anxiolytique induit par l'activation des récepteurs 5-HT$_6$ (Geng et al., 2018).
Cependant le rôle exact des récepteurs 5-HT$_6$ est discuté dans les modèles animaux de dépression où l'activation et l'inhibition des récepteurs 5-HT$_6$ peut avoir le même effet antidépresseur. L'injection subchronique de kétamine chez la souris peut modéliser des comportements de type dépression. Il est montré dans ce modèle que l'utilisation d'un agoniste des récepteurs 5-HT$_6$, le E-6837 mais également d'un antagoniste, le SB271046, permet dans les deux cas de diminuer les temps d'immobilité dans les tests de suspension par la queue et de FST (Suárez-Santiago et al., 2017).
Une autre étude montre chez le rat que l'utilisation du SB399885, un antagoniste compétitif des récepteurs 5-HT$_6$ est en capacité de diminuer le temps d'immobilité dans le FST (Abraham et al., 2014). L'effet antidépresseur de cet antagoniste serait attribué à son action sur la neurotransmission monoaminergique. Une étude un peu plus récente vient appuyer cette hypothèse. Les auteurs montrent dans un modèle de dépression – modèle lésionnel 6-OHDA – au niveau du cortex prélimbique qu'un agoniste des récepteurs 5-HT$_6$, le WAY208466 a un effet antidépresseur et permet de reverser les déficits dans les tests de préférence sucrose et de nage forcée dans ce modèle. A l'inverse, l'utilisation d'un antagoniste, le SB258585, augmente ces comportements dépressifs. Les études neurochimiques ont montré que l'utilisation d'un agoniste 5-HT$_6$ induit une augmentation des taux de dopamine et noradrenaline associée à une nette augmentation de la transmission glutamatergique, alors que l'utilisation d'un antagoniste 5-HT$_6$ a l'effet inverse (Zhang et al., 2016).
L'ensemble des résultats montrent que les agonistes mais aussi les antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ peuvent exercer un effet antidépresseur. Cette disparité comportementale peut être due au type d'administration de ces ligands (systémique ou locale), la structure cérébrale ciblée, le modèle expérimental choisi (rat ou souris) ou le modèle dépressif utilisé. De plus, dans la plupart des études il n'est pas précisé si l'agoniste est total, partiel ou inverse et si les antagonistes sont neutres ou biaisés. En effet, suivant les propriétés pharmacologiques de ces ligands l'activation/inhibition du récepteur pourra être différente. Ainsi le SB258585 et le SB271046 sont en fait des agonistes inverses sur la signalisation Gs, ils sont donc en capacité de bloquer l'activité constitutive du récepteur si elle est présente.

b. Douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques se caractérisent par des douleurs chroniques secondaires et peuvent survenir suite à une lésion cérébrale, médullaire ou à une maladie qui affecte le système somatosensoriel comme la sclérose en plaque (Szok et al., 2019). Cette pathologie présente des symptômes très handicapants, en effet ces douleurs profondes et chroniques sont associées à des troubles anxio-dépressifs, des troubles du sommeil mais aussi des déficits cognitifs. Plusieurs études se sont intéressées au rôle des récepteurs 5-HT$_6$ dans ce type de douleurs.

Dans un modèle de douleur neuropathique inflammatoire (injection de formol dans la patte de l'animal), l'administration d'antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$, le SB399885 ou le SB258585 (qui sont en réalité des agonistes inverses), a un effet anti-nociceptif alors que l'injection de sérotonine ou de l'agoniste, EMD386088 a un effet pro-nociceptif (Castañeda-Corral et al., 2009).

Dans un autre modèle de douleur, le modèle de ligature du nerf spinal chez le rat qui modélise la neuropathie traumatique douloureuse, l'administration d'un antagoniste du récepteur 5-HT$_6$ va permettre de diminuer l'allodynie tactile et thermique observée dans ce modèle (Devegowda et al., 2013; Pineda-Farias et al., 2017). L'administration d'un antagoniste 5-HT$_6$ va également permettre de potentialiser l'effet analgésique des gabapentinoïdes qui sont utilisés comme traitement de première intention des douleurs neuropathiques. Les déficits de mémoire observés dans ce modèle sont aussi abolis grâce à ce traitement (Jayarajan et al., 2015).

Toujours dans le modèle de ligature du nerf spinal chez le rat, il a été récemment montré que les symptômes douloureux et les déficits cognitifs associés sont abolis par l'administration d'agonistes inverses du récepteur 5-HT$_6$, par la rapamycine (un inhibiteur de mTOR) ainsi que par l'administration intrathécale d'un peptide Tat qui perturbe l'interaction physique entre le récepteur 5-HT$_6$ et la protéine mTOR. En revanche, ils ne sont pas atténués par l'administration d'antagonistes neutres de ces récepteurs. Ces résultats démontrent l'influence délétère de l'activation non-physiologique de la voie mTOR par les récepteurs 5-HT$_6$ spinaux constitutivement actifs, sur les symptômes douloureux et cognitifs dans les douleurs neuropathiques. Ces données mettent en avant le rôle analgésique des antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ (Martin et al., 2020).

c. Epilepsie

Dès les années 2000, Routledge et son équipe mettent en avant les propriétés anticonvulsives des antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$, le SB271046 et le SB258585, dans un modèle d'épilepsie (électrochocs chez le rat) (Routledge et al., 2000). Une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT$_6$ a été observée chez des patients atteints d'une épilepsie du lobe temporal qui est la forme d'épilepsie pharmaco-résistante la plus fréquente à l'âge adulte. Cette augmentation est également observée dans le modèle pilocarpine de la pathologie chez le rat. L'administration de l'antagoniste SB399885 des récepteurs 5-HT$_6$ permet de supprimer les crises épileptiques dans ce modèle (Wang et al., 2015). Il est aussi observé une diminution de l'expression des canaux KCNQ2/3. Ces canaux représentent l'isoforme principal des canaux potassiques voltages dépendants exprimés dans les neurones pyramidaux et les interneurones. Ce sont des régulateurs clefs de l'activité cérébrale, ils

participent notamment au remodelage synaptique, à l'excitabilité du réseau neuronal et sont responsables des courants M qui sont dérégulés dans de nombreuses pathologies épileptiques pédiatriques. L'administration de SB271046, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$, permet de rétablir l'excitabilité neuronale et la LTP qui sont respectivement augmentée et diminuée dans le modèle pilocarpine. Cet antagoniste permet aussi d'augmenter l'amplitude des courants M qui sont diminués dans ce modèle. L'ensemble des résultats de cette étude montre que le blocage des récepteurs 5-HT$_6$ dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal permet d'améliorer la plasticité synaptique et de rétablir un équilibre dans la balance excitation/inhibition *via* la régulation des canaux M (Zhu et al., 2020).
Une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT$_6$ et de l'activation de la voie Jab1/Phospho-c-Jun associée à une augmentation du nombre de neurones apoptotiques a également été observée à la suite des crises au niveau de l'hippocampe et du cortex dans ce modèle. L'administration de SB271046 permet de reverser de manière dose dépendante les altérations observés. Ainsi l'inhibition de cette voie de signalisation permet de diminuer la fréquence des crises spontanées et de reverser les déficits de mémoire et d'apprentissage observés (Liu et al., 2019).

d. Obésité

La sérotonine joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire et le contrôle de la satiété. K. Fone et son équipe ont montré chez le rat que l'injection en intra-cérébro-vasculaire (i.c.v) d'un oligonuclétotides antisens permettant d'inhiber l'expression du récepteur 5-HT$_6$ ou l'utilisation de Ro 04-6790, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$, entraine une diminution de la prise alimentaire ainsi que de la prise de poids (Woolley et al., 2001). Des résultats similaires ont été observés chez les souris 5-HT$_6^{-/-}$ (Frassetto et al., 2008). L'implication des récepteurs 5-HT$_6$ dans le contrôle de la prise alimentaire est aussi observée dans des modèles d'obésité. Ainsi, dans un modèle de prise alimentaire excessive chez le rat, l'administration chronique d'idalopirdine, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$, permet de diminuer la prise alimentaire. Cette diminution est accompagnée d'une diminution de tissus adipeux au niveau du péritoine, ainsi que d'une diminution des taux plasmatiques de glucose, de triglyceride et de cholestérol, entraînant une diminution de poids chez les animaux ayant reçu l'idalopirdine (Dudek et al., 2015).

Ainsi ces résultats montrent que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ pourrait être efficace dans le traitement de l'obésité.

e. Addictions

Les récepteurs 5-HT$_6$ ont un rôle dans les processus de récompense. L'hypothèse la plus commune qui sous tend l'apparition de comportement d'addiction, est une altération des processus neuronaux intervenant dans l'apprentissage de la récompense, dans des circuits qui convergent dans le Nacc. Cela entraine des comportements compulsifs et d'addiction (Stuber et al., 2011). Le Nacc est composé de MSN GABAergiques qui vont projeter à travers deux voies : la voie D1, directe ou nigrostriée exprimant les récepteurs de la dopamine D1 et la dynorphine et la voie D2, indirecte ou striato-pallidale exprimant les récepteurs de la dopamine D2 et l'enképhaline. Brodsky et al., montrent grâce à l'utilisation de vecteurs exprimant le récepteur 5-HT$_6$ sous le contrôle du promoteur de l'enképhaline ou de la dynorphine que la surexpression du récepteur dans les neurones de la voie striato-pallidale

diminue l'auto-administration de cocaïne chez le rat et la préférence de place induite par cette drogue (Brodsky et al., 2016).

L'injection de CMP 42, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$, entraine une diminution de l'auto-administration de nicotine et d'alcool chez le rat (de Bruin et al., 2013a). Ainsi les récepteurs 5-HT$_6$ semblent être impliqués dans les processus de consommation excessive de drogue.

F. Récepteurs 5-HT$_6$, troubles cognitifs et pathologies associées

Le récepteur 5-HT$_6$ est également impliqué dans les fonctions cognitives, en faisant une cible thérapeutique prometteuse pour traiter les déficits cognitifs observés notamment dans les pathologies neuropsychiatriques. En 2001, *Woolley et al*, mettent en évidence pour la première fois l'implication des récepteurs 5-HT$_6$ dans la cognition. Ils montrent chez le rat que l'administration en i.c.v d'un oligonucléotide antisens 5-HT$_6$ induit des effets bénéfiques sur la mémoire à long terme dans le test de la piscine de Morris. Dans cette même étude, ils montrent que l'injection chronique d'antagoniste 5-HT$_6$ a le même effet pro-cognitif dans ce test (Woolley et al., 2001). Plus récemment, il a été décrit que l'injection, cette fois ci d'agoniste 5-HT$_6$ chez des souris induit des effets délétères sur la flexibilité cognitive et sur la mémoire de travail, confirmant l'implication des récepteurs 5-HT$_6$ dans les processus cognitifs (Amodeo et al., 2018). Cependant, Sun et al., ont montré que les souris mutantes 5-HT$_6^{-/-}$ passent plus de temps à trouver la plateforme dans le test de la piscine de Morris comparé aux souris contrôles, aucune différence n'a été observée dans le test d'alternance spontannée (Y maze) (Sun et al., 2021). Les neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe de ces souris présentent une arborisation dendritique plus complexe, un segment initial plus long et une LTP diminuée (Sun et al., 2021).

De nombreuses études ont montré l'effet pro-cognitif des antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ dans divers modèles précliniques de déficits cognitifs mais aussi dans quelques études cliniques préliminaires chez l'Homme pour des traitements de la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie (de Bruin and Kruse, 2015; Codony et al., 2011; de Jong and Mørk, 2017; Tsegay et al., 2020). Il a été observé dans des modèles murins présentant des déficit cognitifs que les effet pro-cognitifs des antagonistes dépendent du rôle modulateur des récepteurs 5-HT$_6$ sur les neurotransmissions cholinergiques, glutamatergiques et monoaminergiques (Lacroix et al., 2004; Mørk et al., 2017; Tassone et al., 2011). Ainsi, *Mørk et al*, ont montré grâce à des analyses de microdialyses chez le rat, que l'administration d'idalopirdine un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ entraine une augmentation des niveaux extracellulaires de dopamine, de noradrenaline et de glutamate au niveau du CPF pouvant expliquer les effets pro-cognitifs de cette molécule.

L'administration de scopolamine (un antagoniste muscarinique) entraine des déficits dans des tests de mémoire de travail, d'apprentissage, de reconnaissance sociale, de mémoire spatiale et dans des tâches de flexibilité cognitive. L'ensemble des déficits observés est reversé par l'administration en i.p, d'antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ (Da Silva Costa-Aze et al., 2012; Gravius et al., 2011; Loiseau et al., 2008). Une étude récente montre dans ce modèle que l'utilisation d'un agoniste inverse des récepteurs 5-HT$_6$ permet également de reverser les déficits dans les tests de reconnaissance d'objets et dans la flexibilité cognitive (Drop et al., 2021). Montrant une nouvelle fois l'implication des recepteurs 5-HT$_6$ dans la cognition.

Enfin, l'altération de la neurotransmission glutamatergique par administration d'antagonistes des récepteurs NMDA tels que le dizocilpine (MK-801) ou la PCP entraine les mêmes types de déficits qui sont eux aussi reversés par l'administration d'antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ (de Bruin et al., 2013b; Marcos et al., 2008a, 2008b; Meffre et al., 2012).

Ces modèles de déficits cognitifs sont associés à des maladies neurodégénératives ou psychiatriques que je mettrai ici en avant au travers de la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie.

a. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus commune chez les personnes âgées, de plus sa prévalence et son coût sont en continuelle augmentation de part le vieillissement de la population (Alzheimer Association, 2016). Cette pathologie neurodégénérative est caractérisée par un déclin cognitif associé à l'accumulation de plaques ß amyloïdes et de la protéine Tau. Actuellement, deux traitements sont disponibles avec les inhibiteurs de cholinesterases (Donezepil, Rivastigmine et galantine) et la mémantine un antagoniste des récepteurs NMDA. Cependant ces inhibiteurs ont aussi des effets au niveau périphérique, ils engendrent donc de nombreux effets secondaires invalidants (S. Schneider, 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur 5-HT$_6$ module la transmission cholinergique et est exclusivement exprimé au niveau du SNC pouvant ainsi diminuer les effets secondaires observés avec les autres traitements du fait de cette localisation. Dans cette pathologie la sérotonine est dérégulée, les taux de sérotonine ainsi que la densité de récepteurs 5-HT$_6$ sont diminués au niveau du cortex temporal de patients atteints de la pathologie. Sachant que l'inhibition des récepteurs 5-HT$_6$ augmente la libération d'acetylcholine cette diminution de la densité de récepteurs pourrait être un mécanisme adaptatif pour ré-augmenter les taux d'acétylcholine dans la pathologie (Marcos et al., 2008b; Mitchell and Neumaier, 2005). De nombreuses études ont montré les effets bénéfiques des antagonistes 5-HT$_6$ sur des modèles murins de la pathologie. Pour exemple, dans un modèle de la pathologie d'Alzheimer induit par injection i.c.v d'Aβ, une injection chronique de SB258585 pendant 30 jours chez le rat permet de prévenir les déficits de mémoire et d'apprentissage observés et de reverser les déficits de plasticité au niveau de l'hippocampe (Shahidi et al., 2019). Le blocage des récepteurs 5-HT$_6$ pourrait permettre de réguler la balance excitation/inhibition en diminuant la signalisation GABAergique au profit d'une augmentation des concentrations en glutamate. Ce mécanisme permettrait ainsi une régulation de l'activité neuronale spécifiquement dans des régions impliquées dans le contrôle de la cognition (West et al., 2009).

Les effets bénéfiques des antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ observés dans les modèles murins sont aussi observés chez les patients atteints de la pathologie (Codony et al., 2011; de Jong and Mørk, 2017). L'idalopirdine (Lu AE58054) un antagoniste sélectif ayant une forte affinité pour le récepteur 5-HT$_6$ associé au Donezepil un inhibiteur d'acethylcholine esterase, diminue les déficits cognitifs chez les patients présentant une forme modérée de la maladie (Arnt et al., 2010; Wilkinson et al., 2014). Bien que très prometteur, ce traitement n'a pas passé la phase III des essais cliniques. En effet, sur plus de 2500 patients atteints de la pathologie, les effets bénéfiques précédemment observés de l'iladopirdine par rapport au placebo n'ont cette fois pas permis de diminuer le déclin cognitif sur six mois de traitements (Atri et al., 2018). Plus récemment, mon équipe a conçu et synthétisé un ligand multi-cibles capable de se comporter à la fois comme un agoniste du récepteur 5-HT$_4$, un agoniste inverse du récepteur 5-HT$_6$ et un inhibiteur de l'acetycholinesterase. Ce composé montre des effets très

prometteurs avec des propriétés anti-amnésiques évaluées dans les déficits de mémoire de travail chez le rongeur (Hatat et al., 2019; Millan et al., 2020).

b. La schizophrénie

Comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre les déficits cognitifs sont des symptômes de la pathologie qui ne sont pas pris en charge par les traitements actuels. Au vu des effets bénéfiques des antagonistes des récepteurs 5-HT$_6$ sur la cognition, de nombreuses recherches ont été menées afin de caractériser les effets comportementaux de ces antagonistes dans des modèles animaux de schizophrénie (de Bruin and Kruse, 2015; Nikiforuk, 2014). Ici je presenterai brievement quelques études démontrant les bénéfices du blocage des récepteurs 5-HT$_6$.

Le modèle PCP mime certains déficits cognitifs observés dans la schizophrénie avec notamment une altération dans la mémoire de travail, de la flexibilité cognitive, la mémoire associative ou des processus attentionnels. Dans un modèle d'injections sub-chroniques de PCP chez le rat adulte, l'injection aigüe d'idalopirdine, un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$, 1h avant le test permet de reverser les déficits observés dans le NOR (Arnt et al., 2010). Une autre étude montre les mêmes effets pro-cognitifs dans ce test avec un autre antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$, le SB742457. Ces effets bénéfiques dans le NOR, sont observés lors d'une unique injection 1h avant les test dans le modèle d'injection de PCP en néonatal chez le rat (Zajdel et al., 2016). L'utilisation de cet antagoniste a aussi un effet positif dans des tests d'apprentissage et de flexibilité cognitive (de Bruin et al., 2013b; Idris et al., 2010). Les bénéfices d'inhibiteurs des récepteurs 5-HT$_6$ ont également été mis en avant par notre équipe dans deux modèles neurodéveloppementaux de schizophrénie chez le rat (injections de PCP au stade néonatal et isolement post-sevrage). En effet, les déficits cognitifs observés à l'âge adulte dans les tests de NOR et de reconnaissance sociale sont reversés par une administration aigüe de SB258585 réalisée 30min avant les tests.

Ces déficits cognitifs sont observés dans d'autres modèles de la schizophrénie, comme le modèle pharmacologique d'injections de MK801 à l'âge adulte, et sont là aussi reversés par l'injection d'antagonistes 5-HT$_6$ quelques minutes ou heures avant les tests (de Bruin et al., 2016; Gravius et al., 2011).

Chapitre IV – La voie de signalisation mTOR

A. Les complexes mTORC

La protéine mTOR, pour mechanistic target of rapamycine, anciennement nommée mammalian target of rapamycine, est une protéine kinase sérine/thréonine. Cette protéine est la cible de la rapamycine qui inhibe son activité. En 1975, une équipe canadienne réalise des prélèvements de sol sur l'île de Pâques. A partir de ces échantillons, ils isolent une molécule synthétisée par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* : la rapamycine (Vézina et al., 1975). Les auteurs mettent d'abord en avant les propriétés antifongiques de cette molécule mais rapidement elle présente un fort intérêt thérapeutique de part ses propriétés antiprolifératives – inhibition de la prolifération des cellules T – et donc par ses propriétés immunosuppressives (Chang and Sehgal, 1991). Elle sera utilisée comme traitement thérapeutique, sous le nom de Sirolimus ; afin d'empêcher les rejets suite à une greffe notamment lors d'une transplantation rénale (Morelon et al., 2001).

mTOR forme deux complexes multiprotéiques structurellement et fonctionnellement différents : mTORC1 et mTORC2 (**Figure 33**) (Zhou and Huang, 2010). Ces complexes sont tout deux composés : de mTOR ; de GβL (aussi nommé à mLST8 pour mammalian letal with sec13 protein 8) ; du complexe Tti1/Tel2 qui va interagir directement avec mTOR et permettre notamment la stabilité et l'assemblage de mTORC1 ; et de DEPTOR (domaine d'interaction DEP avec mTOR) un inhibiteur des deux complexes (Lipton and Sahin, 2014). Ces deux complexes possèdent également des partenaires protéiques spécifiques, présentent une sensibilité à la rapamycine différente et vont être en capacité d'activer/être activés par des voies de signalisation différentes (**Figure 34**).

a. Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine, il est associé à : la protéine d'échafaudage Raptor (regulatory associated protein of mTOR) qui est essentielle pour son activité et pour la sensibilité à la rapamycine ; ainsi qu'à PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) qui est un inhibiteur de mTORC1 ; et de FKBP12, le domaine de liaison à la rapamycine.
Le complexe mTORC1 permet la synthèse protéique et a pour fonctions principales de réguler la croissance, la prolifération et la survie cellulaire.

b. Le complexe mTORC2

Le complexe mTORC2 a longtemps été présenté comme insensible à la rapamycine. Depuis, des études ont mis en avant un impact de la rapamycine sur ce complexe mais seulement après un traitement à long terme (Sarbassov et al., 2006). En effet, mTORC2 est associé à la protéine d'échafaudage Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) qui masque le site de liaison à la rapamycine, ce qui lui a longtemps conféré cette propriété. Ce complexe est aussi associé à mSIN1 (mammalian stress activated map-kinase interacting protein 1) qui détermine, entre autre, la localisation subcellulaire de

mTORC2 et, à protor1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) qui sont des protéines associées à Rictor (Fu and Hall, 2020).
Le complexe mTORC2 a pour fonctions principales de réguler la dynamique du cytosquelette d'actine et la survie cellulaire.

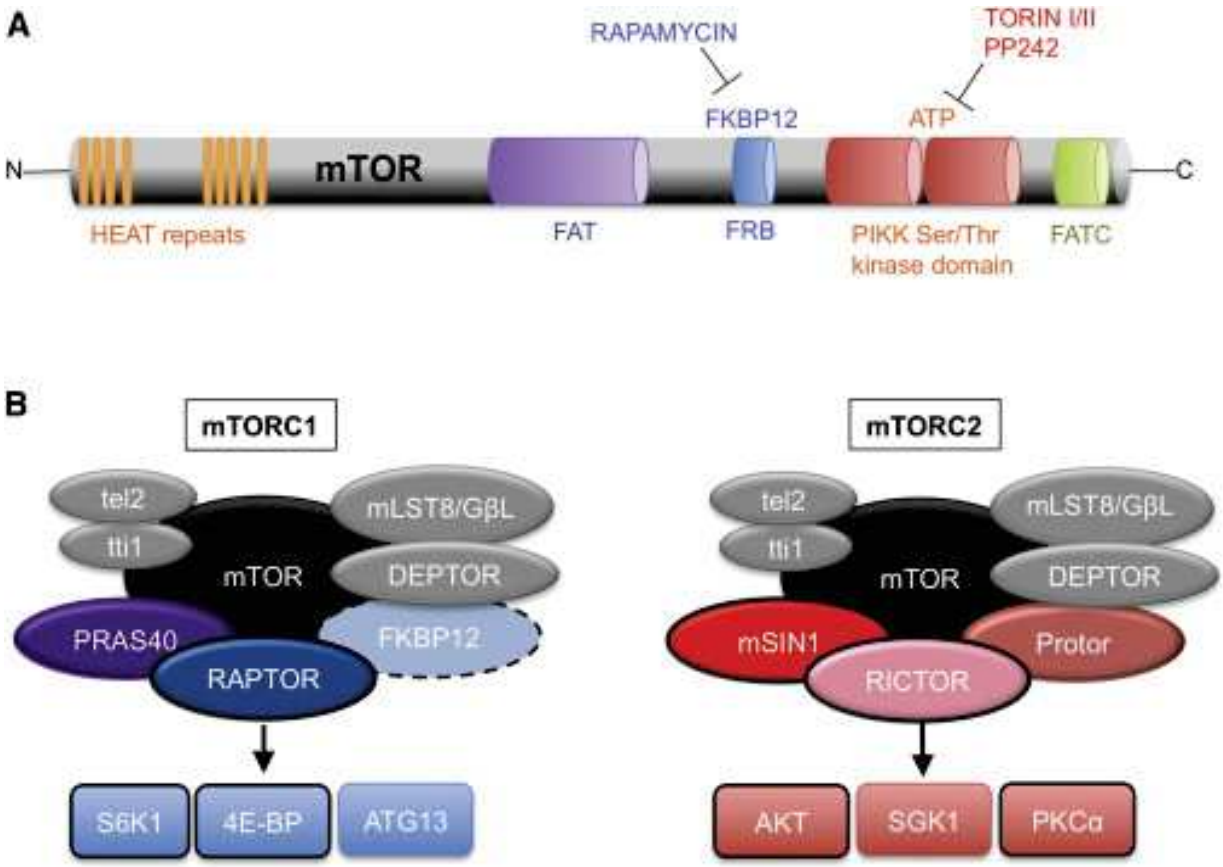


Figure 33 : Schémas représentant les complexes mTORC1 et mTORC2. **A** : Composition des domaines de la protéine kinase mTOR. HEAT (huntingtin, facteur d'élongation 3, une sous-unité de la phosphatase 2A et TOR1) médie les intérations avec Raptor, Rictor et d'autres partenaires protéiques. Le domaine de liaison FKBP12-Rapamycine (FRB) permet l'inhibition de mTORC1. Le domaine kinase PIKK est le site d'inhibition de kinases inhibitrices, Torin I et II, qui inhibent l'activité de mTORC1 et mTORC2. **B** : Composition des complexes mTORC1 et 2 : avec notamment mTOR, tel2, tti1, mLST8/GβL et DEPTOR qui sont retrouvés dans les deux complexes mTORC1 et mTORC2 (Lipton and Sahin, 2014).

c. Activateurs de la voie mTOR

Les principaux activateurs de la voie de signalisation mTOR peuvent être des signaux extra- ou intracellulaires comme : des facteurs neurotrophiques tel que le BDNF; des hormones comme l'insuline ou des facteurs de croissance comme l'IGF1 (insuline like growth factor 1 – Facteur de croissance semblable à l'insuline) ou le VEGF (Vascular endothelial growth factor – Facteur de croissance de l'endothelium vasculaire) ; des molécules de guidage comme la reeline ; et des RCPGs comme les récepteurs de la sérotonine ou les récepteurs métabotropiques du glutamate ; et des récepteurs ionotropiques comme les récepteurs NMDA (**Figure 34**).

Le complexe mTORC1 contrairement à mTORC2 est un capteur de nutriment et pourra être activé aussi par le glucose par exemple (Bockaert and Marin, 2015; Hay and Sonenberg, 2004).

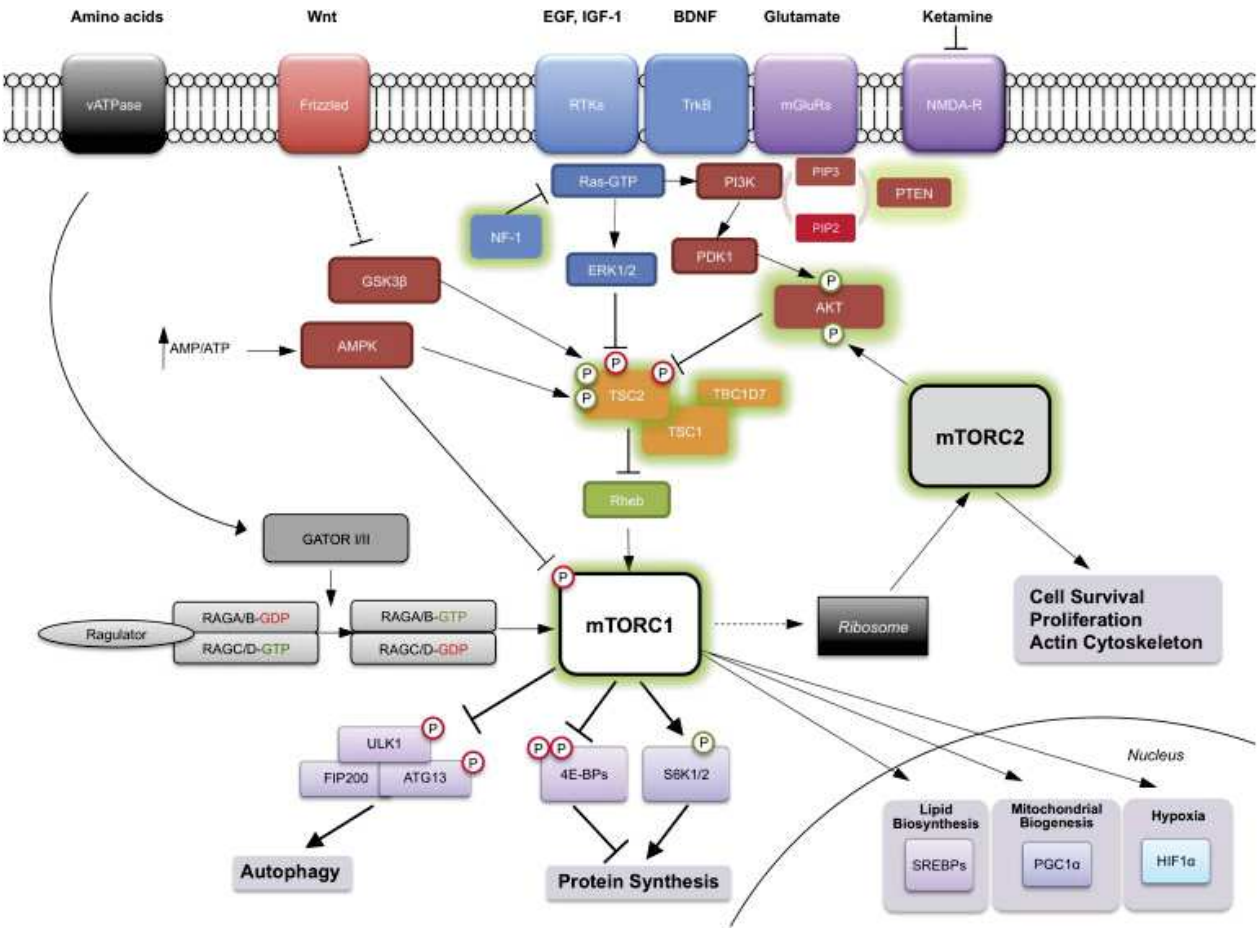


Figure 34 : Diversité des voies de signalisation associées à mTOR. Les deux complexes mTOR vont intégrer des signaux variés (provenant de nutriments, de cytokines ou de facteurs de croissances par exemple) et induire des réponses cellulaires cruciales comme l'autophagie ou la synthèse de protéines (Lipton and Sahin, 2014).

Le complexe mTORC1 est activé par une Ras GTPase, cette GTPase va activer soit la voie ERK1/2 soit la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT (protein kinase). Ces voies permettent l'inhibition de la phosphorylation du complexe TSC (Tuberous sclerosis complex) levant l'inhibition exercée par ce dernier sur une petite GTPase homologue de Ras nommée Rheb (Ras homolog enrichied in brain). Ces voies sont ainsi à l'origine de l'activation du complexe mTORC1 (Hay and Sonenberg, 2004; Inoki, 2003). mTORC1 active ensuite directement 4-EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein), et p70S6k 1/2 (p70 ribosomal S6 kinase) qui sont deux régulateurs clefs de la traduction protéique (Hara et al., 1998).

En phosphorylant ces protéines, mTOR va pouvoir contrôler/réguler les étapes d'initiation et d'élongation de la synthèse des protéines, et sera aussi à l'origine de phénomène d'autophagie permettant la dégradation des protéines mal repliées (**Figure 34**) (Fonseca et al., 2014).

B. Dérégulations de mTOR et pathologies

Dans cette partie nous décrierons de façon succincte les pathologies impliquant une dérégulation de mTOR. Nous nous concentrerons sur le complexe mTORC1 et sur les pathologies du SNC. Cette partie ne se veut pas exhaustive mais permettra de mieux comprendre la forte implication de mTOR et son importance dans l'établissement de pathologies génétiques, neurodégénératives et psychiatriques.

a. Les maladies génétiques

La sclérose tubéreuse est une des pathologies liées à mTOR la plus connue. Cette pathologie est une forme génétique rare d'autisme entraînant des atteintes cutanées comme des tumeurs bénignes et des atteintes du système nerveux comme des crises d'épilepsies et des troubles de l'apprentissage. La sclérose tubéreuse est due à une mutation des gènes *TSC1* et *TSC2*. Comme nous l'avons vu les protéines TSC sont des effecteurs en aval des voies PI3K/AKT et RAS/MAPK qui peuvent activer le complexe mTORC1. Il est montré dans la sclérose tubéreuse une dérégulation de cette signalisation, avec une activation de ce complexe qui va être permanente. L'expression de ce complexe dans de nombreux tissus explique les altérations observées tant au niveau central qu'au niveau périphérique (Curatolo et al., 2018; Ehninger and Silva, 2011; Feliciano, 2020).

Outre la sclérose tubéreuse, il est retrouvé cette altération de la voie de signalisation mTOR dans d'autres formes de pathologies incluant des déficiences intellectuelles comme le syndrome du X fragile qui est aussi associé à des déficits cognitifs et comportementaux (Sharma et al., 2010). Cette pathologie est due à une altération au niveau du gène FMR 1 (Fragile mental retardation) qui empêche sa transcription. Ainsi, la protéine FMRP qui est une protéine de liaison à l'ADN et qui est essentielle pour le développement neuronal, l'architecture des épines dendritiques et la plasticité synaptique, ne sera plus traduite. De fait, cette pathologie neurodéveloppementale se caractérise par une hyperexcitabilité neuronale due à une altération dans la balance excitation/inhibition. Chez les souris $FMR1^{-/-}$, une suractivation de la voie de signalisation mTORC1 et de p70S6K notamment au niveau des synapses hippocampiques ainsi qu'une hyperactivation de la voie ERK/MAPK est observé. Un traitement chronique de rapamycine administré *via* la nourriture de J21 jusqu'à J60, permet dans ce modèle de souris de reverser l'hyperphosphorylation de la protéine S6 ainsi que les comportements anxiogènes. Cependant, la rapamycine n'a aucun effet sur les déficits de mémoire, d'apprentissage ou sur le comportement social (Bagni and Zukin, 2019; Saré et al., 2018).

La neurofibromatose de type 1 est une pathologie causée par la mutation du gène NF1, comme nous l'avons vu précédemment cette pathologie se caractérise par des tumeurs multiples et des déficits dans l'apprentissage et l'attention. La mutation de ce gène entraine une suractivation de la voie Ras-Pi3k-AKT et notamment de la voie mTOR. Il est d'ailleurs montré que dans des cellules primaires déficientes en neurofibromine et dans les lignées cellulaires tumorales dérivées de patient NF1, mTOR est activée de façon constitutive (Bergoug et al., 2020; Trovó-Marqui and Tajara, 2006).

Le syndrome de Down ou trisomie 21, se caractérise par un retard cognitif important associé à des modifications physiques. Dans cette pathologie, il est observé une hyperactivation de mTOR qui entraine des déficits dans l'induction de l'autophagie, de la formation de l'autophagosome et la

dégradation des mitochondries par autophagie. Dans un modèle de trisomie 21 chez la souris, il est retrouvé une hyperactivation de la voie AKT/mTOR qui entraine une augmentation de la traduction dendritique locale interférant avec les phénomènes de plasticité synaptique (Bordi et al., 2019; Troca-Marín et al., 2012).

Le syndrome de Rett's est une maladie génétique rare provoquant un retard mental important et une atteinte motrice sévère causés par une mutation au niveau du gène MeCP2 (methyl-CpG binding-protein 2). La protéine de ce gène est un facteur épigénétique important au niveau des neurones. Les modèles animaux de cette pathologie montrent des altérations morpho-fonctionnelles de la connectivité synaptique qui seraient dues à une diminution de l'activation de la voie de signalisation AKT/mTOR. En effet, les souris ayant des mutations au niveau de Mecp2 présentent une altération de la phosphorylation de la kinase S6 et un défaut de l'initiation de la synthèse de protéines (Ricciardi et al., 2011). Dans ces modèles de déficience en MeCP2, la structure des nucléoles (site de transcription et de maturation des ARN) est altérée. La nucléoline, la protéine de liaison aux ARN ribosomique (ARNr), et la voie de signalisation p70S6K/mTOR contrôlent la synthèse et la maturation des ribosomes au niveau des nucléoles. Chez les patients atteint de ce syndrome, il a été observé une diminution de l'expression de la nucléoline et une augmentation de la phosphorylation des deux complexes mTORC1 et mTORC2 pouvant entraîner une biogénèse anormale des ribosomes (Olson et al., 2018).

b. Plasticité synaptique et déficits cognitifs

L'ensemble des pathologies génétiques que nous venons de mentionner ci-dessus s'accompagnent de troubles cognitifs. La voie AKT/mTOR – impliquée dans la morphogénèse dendritique, la plasticité synaptique et qui régule/module les transmissions GABAergiques et glutamatergiques – est essentielle dans le neurodéveloppement et semble capitale dans l'apparition des déficiences intellectuelles associées à des déficits cognitifs.

La plasticité synaptique est une propriété indispensable au fonctionnement du SNC. Les circuits neuronaux vont adapter leurs réponses en fonction des stimuli qu'ils reçoivent de leur environnement (Feldman, 2009). Les réseaux neuronaux excitateurs et inhibiteurs vont subir des modifications dans la transmission synaptique qui peuvent être rapides (quelques secondes) et/ou durables (jusqu'à plusieurs jours). Le concept de plasticité à d'abord été décrit en 1949 par Hebb, et étayé ensuite en 1979 par Bliss et Lomo. Ils décrivent une amélioration persistante de la neurotransmission excitatrice suite à une stimulation haute fréquence des synapses excitatrices (HFS). On parle de potentialisation à long terme (LTP), cette propriété est initiée de façon rapide et stable dans le temps. A l'opposé, on retrouve la dépression à long terme (LTD) qui correspond à une diminution durable (plusieurs heures) de l'efficacité synaptique suite à des stimulations basses fréquences (Bear and Malenka, 1994).

Au niveau de l'hippocampe ces deux types de plasticité sont complémentaires et essentielles dans la formation/le maintien de l'apprentissage et de la mémoire. Cela requiert des modifications structurelles telles que par exemple des changements de croissance dendritique, la formation/suppression de synapses, et/ou un renforcement de la transmission synaptique. Ainsi, il a été montré, chez la souris que l'inhibition de mTOR par la rapamycine induit une inhibition de la LTP associée à une diminution de la mémoire à long terme suggérant que mTOR est nécessaire dans ces processus (Stoica et al., 2011; Tang et al., 2002).

c. Les maladies neurodégénératives

Le rôle de mTOR dans le maintien de la mémoire à long terme en fait une cible prometteuse pour traiter des pathologies cognitives mais aussi pour des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. De plus, des études réalisées sur différents modèles de la pathologie, ont montré que la diminution de l'activation de mTOR a un effet bénéfique en ralentissant le vieillissement (Weichhart, 2018).

Dans des modèles murins de la pathologie il est décrit qu'une inhibition de mTOR par la rapamycine permet de diminuer les plaques amyloides et de prévenir les déficits cognitifs (Spilman et al., 2010). Une étude plus récente montre que le blocage de mTOR par la rapamycine, toujours dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, a un effet neuroprotecteur et améliore les fonctions cognitives et cérébrovasculaires. En effet, chez les patients atteints il est observé une altération de la barrière hématoencéphalique (BHE) qui va permettre l'entrée au niveau cérébral de facteurs sanguins pro-inflammatoire et neurotoxiques. L'inhibition de mTOR est en capacité de prévenir les altérations de la BHE observées dans ce modèle mais peut également réguler positivement les protéines faisant partie des jonctions serrées. Les auteurs montrent ici que cette régulation permet de préserver la BHE dans des lignées cellulaires endothéliales immortalisées de cerveau de souris (bEnd.3) (Van Skike et al., 2018).

De part son rôle dans l'autophagie, mTOR est également impliquée dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Huntington ou la maladie de parkinson (Switon et al., 2017; Williams et al., 2008; Zhu et al., 2019).

d. Autres pathologies associées à mTOR

1. Dépression

Une dérégulation de la signalisation mTOR est observée dans les troubles dépressifs majeurs. Il a notamment été caractérisé une diminution de mTORC1 en post-mortem au niveau du CPF de patients dépressifs (Jernigan et al., 2011). Plus récemment, il a été mis en avant que la privation de sommeil ainsi que les molécules psychoactives nouvellement étudiées pour leur effet antidépresseur à action rapide – comme la kétamine ou la psylocibine – induisent une augmentation de l'activation de mTOR qui permet à son tour l'activation de la synthèse protéique, de la synaptogénèse et du remodelage synaptique (Holz et al., 2019). Cette « action rapide », malheureusement grande absente des traitements actuels utilisés dans la dépression, implique l'activation de mTOR (K V et al., 2020).

2. Addiction

Une association entre mTOR et les addictions a récemment été caractérisée (Ucha et al., 2020). Dans un modèle de consommation chronique d'alcool chez le rat, il est observé une augmentation de la phosphorylation des protéines p70S6k et 4EBP au niveau du Nacc. Une administration intracérébrale de rapamycine spécifiquement dans le Nacc, permet de diminuer cette attirance pour l'alcool et les comportements délétères associés (Neasta et al., 2010). Des résultats similaires sont observés dans

des modèles de consommation de cocaïne et de méthamphétamine (Huang et al., 2018; Wu et al., 2011).

L'ensemble des études que nous venons d'aborder mettent en avant l'implication de mTOR dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la synthèse de protéines, la prolifération et la croissance cellulaire. Cette protéine kinase semble être aussi engagée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la plasticité synaptique, le développement neuronal et la cognition. Il apparaît donc évident qu'une dérégulation de cette voie de signalisation soit associée à des pathologies très diverses. Comme nous l'avons décrit précédemment, il en est de même pour les récepteurs 5-HT_6 qui sont impliqués dans de nombreux comportements. C'est pourquoi nous mettrons en avant dans la prochaine partie, le couplage de mTOR et du récepteur 5-HT_6 et son implication dans des pathologies neurologiques et psychiatriques dont la schizophrénie.

C. Altérations de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR et pathologies associées

a. Douleurs neuropathiques

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, la voie de signalisation mTOR associée au récepteur 5-HT_6 est impliquée dans les douleurs neuropathiques chroniques. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les symptômes de douleurs chroniques, induits par une ligature du nerf spinal chez le rat, ainsi que les déficits cognitifs associés étaient abolis par l'administration soit de rapamycine, soit d'un agoniste inverse du récepteur 5-HT_6, soit par un peptide Tat perturbant la liaison physique entre le récepteur et la protéine mTOR. L'injection aigüe d'un antagoniste neutre du récepteur 5-HT_6 n'a cependant aucun effet bénéfique sur ces troubles suggérant que l'activité constitutive du récepteur soit responsable de ces effets délétères (Martin et al., 2020).

b. Epilepsie

Dans les épilepsies et notamment les épilepsie du lobe temporal, il est observé une augmentation des récepteurs 5-HT_6 (Wang et al., 2015). De façon intéressante, il est aussi montré dans ce type d'épilepsies que l'inhibition de mTOR par la rapamycine permet de supprimer les crises épileptiques (Russo et al., 2013). Sur la base de ces résultats il est décrit que l'administration d'antagonistes des récepteurs 5-HT_6 (en i.p.) dans le modèle pilocarpine chez les rats permet d'augmenter la latence avant une crise, de diminuer sa sévérité et la fréquence de décharge des neurones CA1 de l'hippocampe. Les auteurs montrent aussi dans ce modèle une activation non physiologique de mTOR qui est inhibée par les antagonistes des récepteurs 5-HT_6, démontrant ainsi l'implication de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR dans les crises épileptiques (Wang et al., 2015).
Les crises d'épilepsies sont aussi un des symptômes de la sclérose tubéreuse et ces crises peuvent être prévenues par l'administration de rapamycine (Curatolo et al., 2018), il serait donc intéressant de voir si l'inhibition des récepteurs 5-HT_6 dans ce modèle permettrait de prévenir les crises induites par une dérégulation de mTOR.

c. Neurofibromatose

Nous avons vu dans la partie précédente que cette pathologie est associée à une diminution d'expression de la neurofibromine ce qui entraine une suractivation de la voie Ras-Pi3k-AKT et de la voie mTOR. Mon équipe s'est intéressée aux effets du blocage de la voie 5-HT_6-mTOR sur les déficits cognitifs associés à cette pathologie. Ils ont pu montrer qu'une injection aigüe de rapamycine ou d'un agoniste inverse 5-HT_6, mais pas d'un antagoniste neutre, permet d'abolir les déficits cognitifs observés chez les animaux *NF1*$^{+/-}$ (Doucet et al. Int. J.Mol. Sci. 2021, 22, 10178. Sous presse).

D. Schizophrénie et voie de signalisation 5-HT_6-mTOR

L'hypothèse de l'implication de mTOR dans la schizophrénie résulte du fait que cette protéine est un acteur majeur dans les processus de plasticité, de synthèse protéique et de contrôle de la morphologie neuronale. Ainsi une altération par des facteurs génétiques, épigénétiques ou environnementaux, de la signalisation mTOR au cours du neurodéveloppement, pourra avoir un impact sur la synthèse protéique, essentielle à la mise en place correcte des réseaux neuronaux au sein du SNC (**Figure 35**) (Gururajan and Buuse, 2014). Pour étayer cette hypothèse il est montré dans un modèle génétique de la pathologie, le modèle Disc1 une activation non physiologique de mTOR associée aux déficits cognitifs observés dans ce modèle (Zhou et al., 2013).

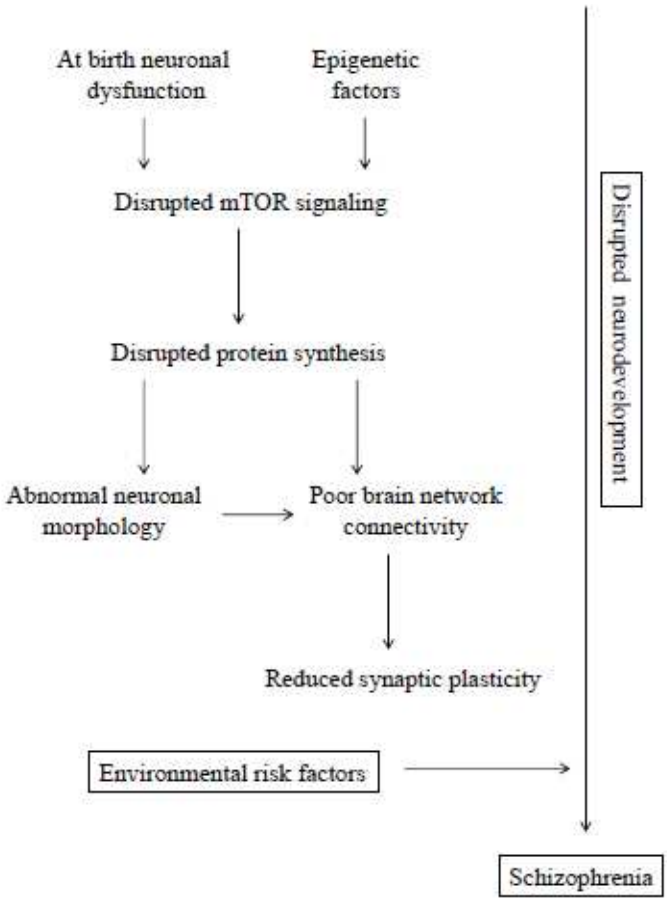


Figure 35 : Schéma récapitulant l'hypothèse des « deux hits » entraînant l'apparition de la schizophrénie en intégrant l'implication possible de mTOR. Des dysfonctionnements neuronaux à la naissance et/ou des facteurs épigénétiques, sont des évènements retrouvés dans de la pathologie. Cela peut conduire à une altération de la signalisation mTOR conduisant à une synthèse de protéine dérégulée et donc possiblement à des déficits au niveau de la morphologie neuronale, de la connectivité cérébrale et de la plasticité synaptique. Ceci pourrait augmenter la vulnérabilité aux facteurs environnementaux conduisant finalement à l'apparition de la schizophrénie (Gururajan and Buuse, 2014).

Comme nous l'avons vu, en utilisant une approche protéomique basée sur des techniques de chromatographie d'affinité combinées à de la spectrométrie de masse, mon équipe a caractérisé un réseau de protéines associées au récepteur 5-HT_6 de la sérotonine. Ils ont démontré le recrutement par le récepteur de plusieurs protéines de la voie mTOR, incluant mTOR et Raptor, deux constituants du complexe mTORC1 sensible à la rapamycine (**Figure 36**). Dans cette étude, il est décrit qu'une administration périphérique d'agonistes 5-HT_6 chez le rat active la voie mTOR dans plusieurs aires du cerveau dont le CPF, l'hippocampe et le striatum et induit des déficits cognitifs dans plusieurs paradigmes comportementaux (test de sociabilité et test de mémoire épisodique). L'administration aigüe de rapamycine ou d'un agoniste inverse 5-HT_6, le SB258585 chez les rats adultes permet d'abolir l'activation de la voie mTOR ainsi que les troubles cognitifs associés (**Figure 37**).

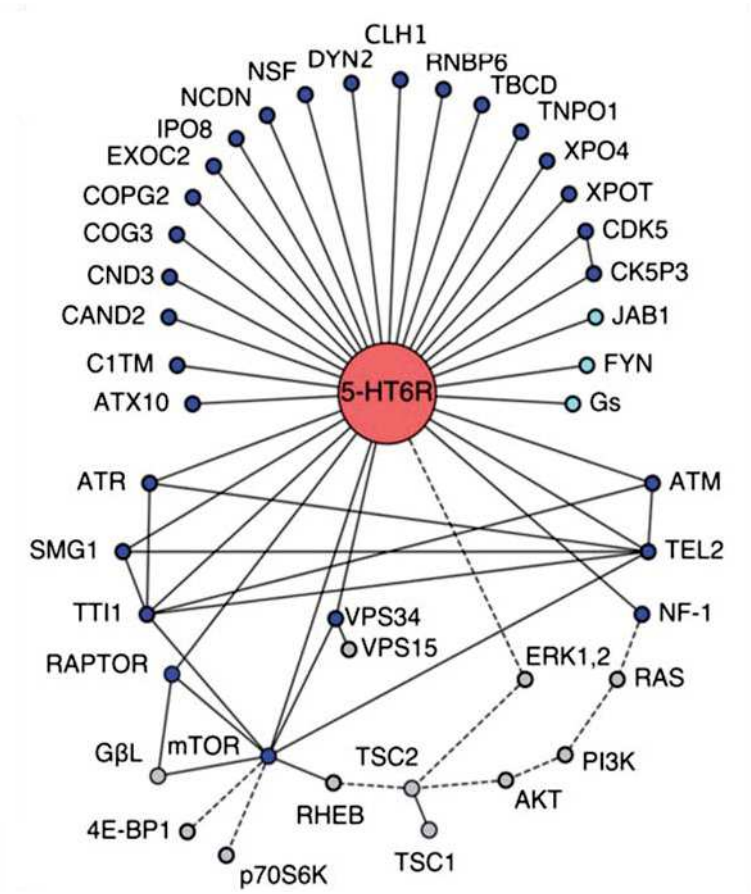


Figure 36 : Interactome du récepteur 5-HT$_6$ caractérisé grâce à une approche protéomique. (Meffre et al., 2012).

Au cours de cette étude, mon équipe a aussi pu mettre en avant que l'activité de mTOR est *spécifiquement* renforcée au niveau du CPF chez le rat, et ce dans deux modèles développementaux de schizophrénie (traitement néonatal à la phencyclidine et isolement social en post-sevrage) et qu'un traitement aigüe administré à l'âge adulte avec le SB258585, un agoniste inverse 5-HT$_6$, abolit les déficits cognitifs observés chez ces animaux, reproduisant ainsi l'effet de la rapamycine (**Figure 37**) (Meffre et al., 2012).

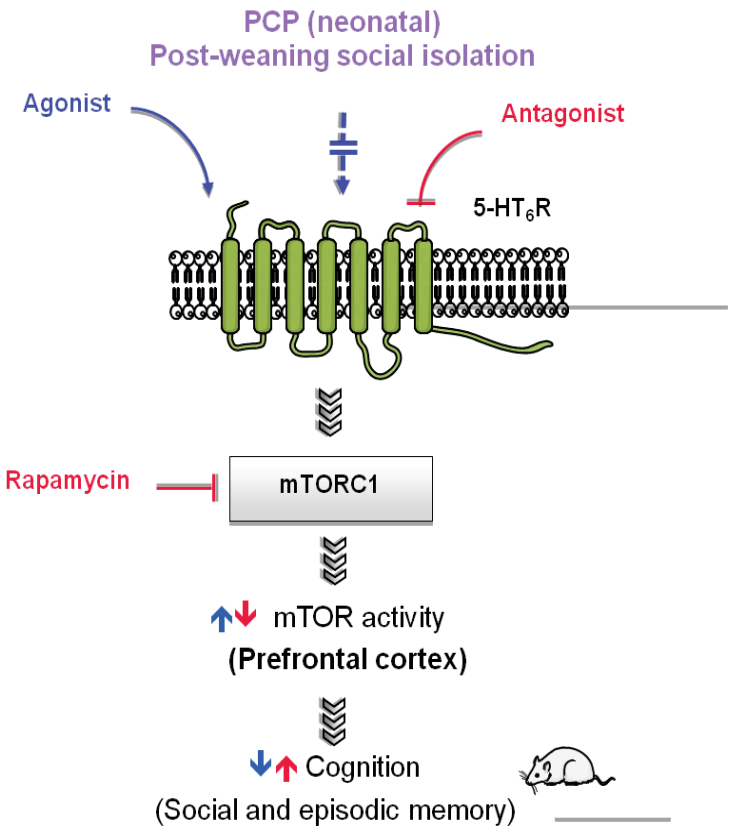


Figure 37 : L'activation de la voie de signalisation impliquant le récepteur 5-HT$_6$ et la protéine mTOR induit des déficits cognitifs chez le rat. L'administration aigüe d'un agoniste 5-HT$_6$ à des rats entraine une augmentation de l'activité de mTOR associée à des déficits dans le test de reconnaissance du nouvel objet et le test de discrimination sociale. Cette activation de la voie mTOR est retouvée spécifiquement au niveau du CPF dans deux modèles neurodéveloppementaux de schizophrénie (rats ayant reçu de la PCP au stade néonatal ou isolés après le sevrage) et est également associée à des déficits cognitifs. L'administration aigüe d'un antagoniste des récepteurs 5-HT$_6$ à ces animaux permer d'abolir l'activation de mTOR et les déficits cognitifs associés (Meffre et al., 2012).

Plus récemment, nous avons démontré dans un modèle murin de consommation chronique de THC durant l'adolescence que les déficits cognitifs observés chez les animaux adultes étaient associés à une suractivation de la voie 5-HT$_6$-mTOR au niveau du CPF (Berthoux et al., 2020). Le blocage précoce, spécifiquement durant l'adolescence, de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR permet à l'âge adulte de *prévenir* les déficits cognitifs observés dans ce modèle (Berthoux et al., 2020). Cette étude sera décrite plus précisément dans la partie « Résultats » de ma thèse car j'ai effectué une partie des expériences de comportement de cette étude. Les effets de la voie de signalisation mTOR sur les déficits cognitifs présents dans la schizophrénie a fait l'objet de ma thèse, je décrirai donc aussi plus amplement dans la partie « Résultats » les bénéfices cognitifs d'un blocage précoce de cette voie sous le contrôle du récepteur 5-HT$_6$.

Matériel et méthode

A. Modèle d'étude

Les souris femelles et mâles C57Bl/6J utilisées, proviennent des laboratoires Janvier Labs et Charles River. Elles sont hébergées à l'institut en cycle inversé (12h-12h) et les expérimentations sont effectuées « en cycle jour ».
Ces souris sont injectées en sous cutanée (s.c), avec de la phencyclidine à 10mg/kg (souris PCP) ou avec une solution saline (souris contrôles ; Veh) à J7, J9 et J11. De J30 à J45 (période correspondant à l'adolescence chez la souris). Plusieurs groupes sont réalisés : un groupe de souris injecté quotidiennement, en intra-péritoneal (i.p), avec soit le SB258585 un agoniste inverse des récepteurs 5-HT_6 (à 2,5mg/kg), soit la rapamycine (RAPA) l'inhibiteur de mTOR (à 1,5 mg/kg) soit le CPPQ un antagoniste neutre des récepteurs 5-HT_6 (à 2,5mg/kg). Ces drogues sont diluées en proportion 1:1:18 dans une solution composée de DMSO/Tween-80/NaCl.
L'ensemble des expériences de biochimie, d'immunohistochimie et d'électrophysiologie, sont réalisées ensuite chez la souris à l'âge adulte (à partir de J60).
Des lignées transgéniques ont aussi été utilisées : les souris 5-$HT_6^{-/-}$ (dont le gène codant pour les récepteurs 5-HT_6 a été invalidé) et les souris 5-$HT_{2A}^{-/-}$ (dont le gène codant pour les récepteurs 5-HT_{2A} a été invalidé) sur lesquelles le même protocole expérimental a été appliqué.

B. Expérience d'électrophysiologie

a. Préparation des tranches aigües de CPF

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane puis les cerveaux prélevés dans une solution de dissection oxygénée contenant en mM : 25 $NaHCO_3$; 1,25 NaH_2PO_4 ; 2,5 KCl ; 0.5 $CaCl_2$; 7 $MgCl_2$; 25 glucose ; 110 choline chloride ; 11,6 acide ascorbique ; 3,1 sodium pyruvate. Des coupes coronales de CPF (300 microns) sont réalisées au vibratome et transférées dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) oxygéné. Les enregistrements sont ensuite réalisés au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du CPF.
Les pipettes d'enregistrement ont une résistance comprise entre 4 et 6 mégaOhms. Pour l'enregistrement des courants miniatures les pipettes sont remplies d'une solution intracellulaire contenant : 115 mM cesium gluconate ; 20 mM CsCl ; 10 mM HEPES ; 2,5 mM $MgCl_2$; 4 mM Na_2ATP ; 0,4 mM NaGTP ; 10 mM sodium phosphocréatine ; 0,6 mM EGTA à pH 7,3.
Pour l'enregistrement des propriétés intrinsèques et du voltage sag les pipettes sont remplies d'une solution intracellulaire contenant : 120 mM K^+ gluconate ; 10 mM KCl ; 10 mM HEPES ; 1,8 mM $MgCl_2$; 4 mM Na_2ATP ; 0,3 mM NaGTP ; 14 mM sodium phosphocréatine ; 0,2 mM EGTA à pH 7,2.

b. Enregistrements électrophysiologiques au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du CPF

1. Analyse de la transmission synaptique

Les courants miniatures excitateurs (mEPSC) sont isolés en ajoutant dans le bain d'enregistrement, 1 µM de tétrodotoxine (TTX) (afin d'inhiber les potentiels d'actions) et 100µM de picrotoxine (afin d'inhiber la transmission GABAergique). Les courants miniatures inhibiteurs (mIPSC) sont quant à eux isolés en ajoutant, 10µM de CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione – afin d'inhiber les récepteurs AMPA et kaïnate) et 100µM de D,L-AP5 (acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque – afin de bloquer les récepteurs NMDA). Les courants miniatures ont aussi été enregistrés de manière « globale » (mEPSC total), c'est à dire seulement en présence de TTX (absence de picrotoxine, CNQX et D,L-AP5).
Les courants sont enregistrés durant 10min à l'aide d'un amplificateur Multiclamp 700B, et l'analyse de la fréquence et l'amplitude est réalisée sur 1 minute d'enregistrement grâce au logiciel Clampfit 10.2 (Axon Instruments).

2. Analyse des propriétés intrinsèques

Pour les propriétés intrinsèques, des enregistrements patch-clamp en configuration cellule entière et en courant imposé, sont réalisés afin d'analyser le potentiel de membrane au repos, la rhéobase qui correspond à la quantité de courant injectée afin de déclencher un potentiel d'action, le potentiel seuil ainsi que la capacité de décharge des potentiels d'action ou « firing ».
Les potentiels d'action sont induits par injection d'un courant croissant de 2ms avec un delta de 10 pA, et sont ensuite analysés pour évaluer le potentiel seuil et la rhéobase. Le firing est analysé en injectant un courant de 150 pA durant 250 ms, le nombre de potentiel d'action est ensuite comptabilisé.

3. Analyse de l'activation des canaux HCN1

L'activation des canaux HCN1 est mesurée en utilisant un protocole de voltage sag qui consiste à induire une hyperpolarisation du neurone patché en injectant un courant de -400 pA à 0 pA incrémenté de 50 pA en 50 pA. Les conductances inhibitrices et excitatrices sont bloquées en ajoutant 100 µM de picrotoxine, 10µM de CNQX et 100 µM de D,L-AP5 dans la chambre d'enregistrement.

C. Expériences de comportements

Les souris sont manipulées tous les jours pendant une semaine avant les tests comportementaux afin qu'elles soient habituées à l'expérimentateur. Elles sont aussi placées dans la pièce d'expérimentation, 30min avant le début de chaque test, afin d'éviter tous phénomènes de stress liés aux déplacements des cages.

a. Reconnaissance d'objets nouveaux (NOR)

Ce test comportemental permet d'évaluer la mémoire de reconnaissance dans le modèle murin. Le premier jour, les souris sont habituées à l'open field durant 10min. Le deuxième jour, les souris sont placées avec deux objets identiques (objet 1-1) pendant 5min puis après un intervalle de rétention d'1h, un des deux objets est remplacé par un objet dit nouveau (objet 1-2). Le troisième jour, l'intervalle de rétention est de 24h, l'objet 2 est remplacé par un nouvel objet (objet 1-3). Après chaque session de test les souris sont replacées dans leur propre cage. Les animaux ayant un temps d'exploration total inférieur à 3 secondes sont exclus du groupe.

b. Object in place (OIP)

Ce test permet d'évaluer la mémoire associative dans le modèle murin. Le premier jour, les souris sont habituées à l'open field durant 10min. Le deuxième jour les souris sont placées en présence de 4 objets différents pendant 10min. Après un intervalle de rétention d'1h, deux des objets sont permutés et l'animal peut explorer l'ensemble des objets durant une phase test de 5min.

Pour ces deux tests :

L'open field est une arène constituée de 4 compartiments de 50X50cm. Par la suite chacun de ces compartiments contiendra par session une souris de même sexe. Ceci permet, malgré les séparations entre les arènes de ne pas induire de biais d'odeur entre mâles et femelles.

Les conditions d'éclairage sont faibles environ 50 lux afin de ne pas engendrer de stress.

Les objets utilisés sont des jouets en plastique, tours de légos, dés, ou des falcons contenant de la litière par exemple (environ 3 cm de largeur, 3 cm de longueur, 5 cm de hauteur) et sont nettoyés avec de l'éthanol 20% entre chaque session, afin de diminuer les odeurs restantes sur les objets entre les groupes.
Les expériences sont enregistrées par vidéo *via* le logiciel Noldus, les temps d'exploration (contact du nez ou reniflement à moins d'un centimètre de l'objet) sont mesurés par l'expérimentateur en aveugle. Le temps passé à explorer chaque objet est ensuite analysé pour évaluer l'index de discrimination. Index de discrimination NOR = (Temps passé à explorer le nouvel objet – Temps passé à explorer l'ancien objet) /Temps d'exploration total.
Index de discrimination OIP = (Temps passé à explorer les deux objets permutés – Temps passés à explorer les objets non permutés)/Temps d'exploration total. Les animaux qui ont un temps d'exploration total inférieur à 3 secondes sont exclus du groupe.

c. Sociabilité et discrimination sociale

Les expériences sont effectuées dans une boîte en plexiglas (largeur : 35 cm, longueur : 20 cm, hauteur : 20 cm).

Ce test aussi nommé test de Crawley, permet d'évaluer la sociabilité et la discrimination sociale dans le modèle murin. Les souris sont placées dans cette boîte contenant trois compartiments (S1-centre-S2), durant 10min correspondant à la phase d'habituation. Ensuite une souris du même âge et du même sexe appelée interacteur, est placée dans le compartiment (S1), immobilisée dans une cage cylindrique avec des barreaux en inox aussi appelée prison. Dans l'autre compartiment (S2) est placé, aussi dans une prison, un objet. Les interacteurs sont habitués aux prisons durant des sessions de 20min les deux jours précédents le test afin de diminuer le stress lié à « l'enfermement ». Le temps de contact et de reniflement que passe la souris à explorer les deux prisons est comptabilisé, durant les 10min de test. L'index de sociabilité est alors calculé : Index de sociabilité = (S1-S2)/(S1+S2).
L'objet est ensuite remplacé par une nouvelle souris (S2) durant 10min. Cela permet d'évaluer la discrimination sociale. L'index de discrimination sociale est calculé sur la même base que celui de l'index de sociabilité, durant les 10min de test : (S2-S1)/(S2+S1). Les animaux restant préférentiellement dans un seul compartiment pendant l'une des 3 phases (habituation, sociabilité ou discrimination) sont exclus du groupe.

d. Corridor circulaire

Ce test permet d'évaluer l'activité locomotrice chez la souris. Les animaux sont placés dans un corridor circulaire (18 cm de diamètre, 14 cm en hauteur) comprenant 4 capteurs infrarouges (Imetronic, Pessac, France), cet environnement est faiblement lumineux. La locomotion est mesurée pendant 60min et est comparée entre chaque condition.

e. Labyrinthe en croix surélevé (Elavated plus Maze – EPM)

Ce test permet d'évaluer l'anxiété chez la souris. L'EPM est un appareil en plexiglas noir à quatre bras (26 cm de long × 5 cm de large) placés en croix à partir d'un carré central neutre (5 cm × 5 cm) élevé de 50 cm au dessus du sol. Il se compose de deux bras opposés comprenant des murs (bras fermés) et de deux bras opposés dépourvus de murs (bras ouverts). Ce test est effectué dans des conditions de faible éclairage (environ 50 lux). Le temps cumulé passé dans les bras ouverts (aversifs), fermés (non aversifs) et au centre est enregistré au cours d'une session de 5 minutes et comparé entre chaque condition. L'entrée dans un bras est validée si l'animal a, au minimum, ses deux pattes dans une des ces zones.

f. Splash test

Ce test permet d'évaluer le comportement motivationnel et dans une moindre mesure dépressif chez la souris. Il consiste à pulvériser une solution de sucrose à 10% sur le flanc de la souris. La viscosité de la solution va entraîner chez la souris un comportement de toilettage (grooming). Après avoir appliqué cette solution, le temps avant d'initier le grooming ainsi que le temps qu'il lui est consacré, sont enregistrés pendant une période de 5 minutes en tant qu'indice de soins personnels et de comportement de motivation.

g. Le test de nage forcée (Forced swim test - FST)

Ce test permet d'évaluer la dépression dans le modèle animal. Chacune des souris est placée individuellement dans un cylindre en verre de 2L (23,5cm de hauteur et 13,5 cm de diamètre) rempli au trois quart d'eau à température ambiante. Les souris sont forcées de nager pendant 6min. Le temps d'immobilité, corrélé à un état dépressif chez le rongeur, est ensuite mesuré pour chaque animal.

h. Préférence sucrose

Ce test permet d'évaluer l'anhédonie chez le rongeur. Il a été adapté d'après le protocole de *Liu, M., Yin, C., Zhu, L. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice* (Liu et al., 2018). Les souris sont d'abord habituées pendant 48h à l'eau sucrée (solution de sucrose à 1%), ensuite les souris sont placées individuellement dans une cage contenant l'eau de boisson et la nourriture pendant 12h. Cela est suivi par 24h de privation totale d'eau et de nourriture. Les souris ont ensuite accès pendant 12h à de la nourriture ainsi qu'à un biberon d'eau de boisson et un contenant la solution de sucrose à 1%. Chaque biberon est pesé avant et après les tests afin de mesurer le volume consommé pour chaque biberon et ainsi calculer le ratio de préférence au sucrose.
Préférence sucrose ratio = (consommation Sucrose/consommation totale d'eau et de sucrose)

D. Expérience de Biochimie

a. Préparation des échantillons fractionnés pré et post synaptiques

Pour l'étude des voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, les animaux âgés de J30 à J35 ayant reçu une injection en i.p soit de DOI (5mg/kg), soit de sérum physiologique sont sacrifiés 1h après l'administration de ces solutions. Pour les animaux traités avec les antagonistes de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR les sacrifices sont effectués à partir de J60 après les expériences de comportement.
Les CPF sont rapidement prélevés et potterisés dans un tampon d'HEPES (10mM, pH 7,4) et sucrose (0,32mM) contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Après centrifugation à 1000g pendant 10min à 4°C, le surnageant est conservé. Une partie, correspondant *à l'homogénat cellulaire ou « l'input »*, est conservée dans du laemmli 4X, l'autre partie est centrifugée à 12000g pendant 20min à 4°C. Le culot est ensuite repris dans une solution tampon (HEPES (4mM, pH 7,4), l'EDTA (1mM), inhibiteurs de protéases et de phosphatases). Cette étape est répétée deux fois. Le surnageant correspondant à la préparation synaptique brute ou *synaptosomes*, est conservé dans du laemmli 4X. Le culot est lui homogénéisé dans une solution tampon (Tris (20mM, pH 6), SDS (1%), du triton (1%) associés à des inhibiteurs de protéases et de phosphatases). Après 30min sur roue à 4°C, les échantillons sont centrifugés à 40000g pendant 30min à 4°C. Le culot résultant est de nouveau homogénéisé dans une solution tampon (Tris 10mM, pH 8 ; triton (1%) ; associés à des inhibiteurs de protéases et de phosphatases) placé sur roue pendant 30min à 4°C puis centrifugé à 40000g pendant

30min à 4°C. Le surnageant correspondant à *l'enrichissement présynaptique* est conservé dans du laemmli 4X et le culot est repris dans du SDS 5% et correspond à *l'enrichissement postsynaptique.*

b. Western-blots

Après dosage des divers échantillons, les protéines (20 à 30 µg) sont déposées sur un gel pré-coulé à gradient 4-15% (BioRad) puis transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont saturées durant 1 h dans une solution de TBS/Tween-20 0,1%/Lait 5%, à température ambiante. Les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C dans de la BSA 5% contenant l'anticorps primaire : lapin anti-phospho mTOR S^{2448} 1 : 1000 (Cell Signalling 2971), lapin anti-phospho-p70S6K T^{389} 1 : 1000 (Cell Signalling 9205), lapin anti-mTOR 1 :1000 (Cell Signalling 2972), lapin anti-p70S6K 1 : 1000 (Cell Signalling 9202), lapin anti-Phospho-GluN2B S^{1303} 1 : 500 (Millipore 07-398), souris anti-GluN2B 1 : 1000 (BD Transduction 610416) souris anti-GluA2 1 : 1000 (Millipore AB1768), lapin anti-Phospho-GluA2 S^{880} 1 : 1000 (Invitrogen PAS-38134), souris anti-GluA2 1 : 1000 (Millipore AB1768) anti-PSD-95 souris 1 : 300 (NeuroMab 75-028), anti-Synaptophysin de souris 1 : 1000 (Millipore MAB5258), souris anti-Munc18 1: 5000 (BD Biosciences 610336), souris anti-panActin 1 : 2000 (Invitrogen MS-1295), lapin anti-récepteur $5HT_{2A}$ 1 : 300 (Immunostar 25288), lapin anti-GAPDH 1 :1000 (Millipore AB2302). Les membranes sont ensuite lavées avec du T-BST et incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la horseradish péroxydase (1/5000) durant 1 h à température ambiante. L'immunoréactivité est détectée par chimioluminescence (Enhanced Chemiluminescence ou ECL, GE, Healthcare) à l'aide du Chemidoc (Biorad).

E. Expériences d'immunohistochimie

Les souris traitées ou non, sont euthanasiées avec une dose létale d'euthasol administrée en i.p. Une perfusion intracardiaque est ensuite effectuée avec une solution d'ACSF. Les cerveaux sont post-fixés pendant la nuit dans une solution contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) et du tampon phosphate de sodium 0,1 M (PBS, pH 7,4). Des coupes coronales de CPF (40 µM) sont réalisées au vibratome (Leica VT1000S) et stockées à -20°C dans une solution cryoprotectrice en attendant d'être utilisées.

Les tranches sont rincées puis incubées 2h à température ambiante dans une solution de saturation (1% de Triton X-100, 10% de sérum de chèvre, 0,1 M PBS) puis mise à incuber pendant 36h à 4°, avec des anticorps primaires : lapin anti-5-HT 1 : 500 (Immunostar #20080) et lapin anti-SERT 1 : 500 (Sigma # PC177L). Les tranches sont ensuite incubées pendant 2h à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaires conjugué Alexa 594 (rouge) ou Alexa 488 (vert). Les tranches sont montées entre lame et lamelle puis les immunomarquages sont analysés sous un objectif 40 × à immersion dans l'huile à l'aide d'un microscope confocal (Carl Zeiss LSM 780) ou sous un objectif 20x au microscope Apotome Zeiss. Les images sont ensuite analysées grâce au logiciel Fiji d'Image J.

Analyses statistiques des résultats

L'ensemble des résultats obtenus en comportement et biochimie est analysés à l'aide du logiciel GrahPad Prism (v. 9.0). En fonction des expériences, nous avons utilisé des tests statistiques différents,

précisé sur chacune des figures : unpaired Student t-test ou one-way ANOVA ou two-way ANOVA multiple comparaison suivi d'un test post-oc de Newman Keuls, Bonferroni ou Dunnett's. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. # : test de wilcoxon qui compare index de discrimination (ID) *vs* valeur théorique d'ID = 0Les données sont présentées avec des barres d'erreur indiquant l'erreur standard de la moyenne (SEM).

Résultats

I. La voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR comme cible thérapeutique pour prévenir l'apparition des déficits cognitifs dans des pathologies psychiatriques

A. Implication de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR dans un modèle pharmacologique de schizophrénie et bénéfices de son blocage précoce pour prévenir les déficits cognitifs

L'objectif principal de mon projet de thèse a été d'évaluer une nouvelle stratégie pour prévenir l'émergence des déficits cognitifs dans un modèle neuro-développemental de schizophrénie ayant une forte valeur translationnelle. Cette stratégie est basée sur le blocage précoce, durant l'adolescence, de la voie de signalisation mTOR induite par les récepteurs 5-HT$_6$ de la sérotonine.

a. Contexte de l'étude

Les troubles psychiatriques comme la schizophrénie, représentent l'un des principaux problèmes de santé publique actuels et devraient devenir un défi sanitaire mondial dans les prochaines années (Whiteford et al., 2015). La schizophrénie est un trouble mental d'origine neuro-développementale qui touche ~1% de la population mondiale, associé à un poids socio-économique important. Les mécanismes neurobiologiques sous-jacents restent mal compris malgré les nombreuses recherches cliniques et fondamentales réalisées au cours de ces dernières décennies. La schizophrénie est généralement diagnostiquée chez le jeune adulte (entre 18 et 25 ans) avec le premier épisode de psychose caractérisé, entre autres, par des délires, des hallucinations ou des propos incohérents. Elle se caractérise également par un large éventail de symptômes cognitifs comme une diminution de l'attention, des troubles de la mémoire, une inaptitude à résoudre les problèmes et des altérations de la cognition sociale. Les symptômes cognitifs sont les premiers symptômes qui apparaissent et sont prédictifs du risque de transition vers la schizophrénie (Birnbaum and Weinberger, 2017; Rapoport et al., 2012). Les antipsychotiques actuellement disponibles réduisent principalement les symptômes positifs (délires et hallucinations) et, dans une moindre mesure, les symptômes négatifs (manque de motivation, l'asociabilité et l'anhédonie), mais sont inefficaces sur les symptômes cognitifs. Les antipsychotiques actuels ont permis à certains patients d'améliorer leur qualité de vie, cependant la prise en charge clinique des symptômes reste insuffisante.

Les altérations du système sérotoninergique sont considérées comme une des causes principales des psychoses comme la schizophrénie (Berger et al., 2009). La sérotonine (5-Hydroxtryptamine, 5-HT) est un neurotransmetteur majeur du système nerveux central et périphérique qui module un grand nombre de fonctions vitales et de comportements notamment l'humeur et la cognition, le sommeil, l'appétit et l'agressivité (Jacobs and Azmitia, 1992). Cette diversité des fonctions de la 5-HT est assurée

par un grand nombre de récepteurs ayant des localisations distinctes dans le SNC et des propriétés de transduction du signal spécifiques (Bockaert et al., 2002; Hoyer et al., 2002). Parmi les cibles actuellement à l'étude pour atténuer les déficits cognitifs observés dans la schizophrénie, le récepteur 5-HT$_6$ de la sérotonine est particulièrement prometteur. Ces récepteurs sont exclusivement exprimés dans le SNC, à un stade précoce du développement du cerveau et contrôlent des processus neuro-développementaux clés tels que la migration neuronale et la croissance des neurites (Dayer et al., 2015). De plus, ils présentent des densités d'expression élevées dans les régions cérébrales impliquées dans les fonctions mnémoniques (Codony et al., 2011). Dans une étude précédente, mon équipe a montré que les récepteurs 5-HT$_6$, sont physiquement et fonctionnellement couplés à la voie de signalisation de la kinase mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR). De façon intéressante, l'activation de cette voie de signalisation mTOR ne se produit pas seulement en réponse à l'administration d'un agoniste, mais également dans des conditions physiopathologiques spécifiques. Ainsi l'activation soutenue de la voie mTOR induite par les récepteurs 5-HT$_6$, se produit spécifiquement dans le CPF et est à l'origine des déficits cognitifs observés dans deux modèles neuro-développementaux de schizophrénie (rats traités au stade néonatal avec de la PCP ou élevés en isolement après le sevrage) (Meffre et al., 2012). Ces observations sont en accord avec des résultats précédents indiquant que la dérégulation de la signalisation mTOR (principalement son activation soutenue) est un événement clé qui sous-tend les déficits cognitifs observés dans diverses pathologies dont des formes génétiques rares des troubles du spectre autistique comme la sclérose tubéreuse et le syndrome de l'X fragile (Bockaert and Marin, 2015; Ehninger and Silva, 2011; Troca-Marín et al., 2012). Cependant, les mécanismes par lesquels, une activation soutenue de la voie mTOR sous le contrôle des récepteurs 5-HT$_6$ entraine des altérations de la cognition dans la schizophrénie restent à établir.

Améliorer les traitements symptomatiques de la schizophrénie est donc un enjeu important, cependant une meilleure prise en charge des patients requiert de nouvelles stratégies basées sur des traitements administrés à un stade précoce de la maladie chez les sujets à haut-risque de conversion vers la schizophrénie (Millan et al., 2016). La fenêtre thérapeutique optimale pour ralentir ou stopper la progression de la maladie est probablement l'adolescence, période critique de maturation des circuits neuronaux au niveau du CPF. Nous avons récemment démontré qu'une exposition chronique au THC pendant l'adolescence entraîne une activation de la voie mTOR dans le CPF qui persiste à l'âge adulte et provoque un phénotype similaire à ce que nous avons observé dans les modèles neuro-développementaux de schizophrénie (Meffre et al., 2012). De plus, cette activation persistante est à l'origine des déficits cognitifs et des altérations synaptiques observés chez les souris adultes ayant reçu du THC chroniquement pendant l'adolescence (Berthoux et al., 2020). Nous avons également montré que le blocage précoce de la voie de signalisation mTOR sous le contrôle des récepteurs 5-HT$_6$ pendant la période critique de maturation du CPF prévient l'apparition de déficits cognitifs chez ces souris adultes. A l'inverse, le blocage plus tardif de cette voie de signalisation, réalisé au stade adulte, n'induit pas un tel effet pro-cognitif (voir partie II des résultats).

Sur la base de ces données, nous avons voulu déterminer si ces résultats pouvaient être étendus aux modèles précliniques de schizophrénie. Mon premier objectif a été de déterminer si le blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR prévenait l'apparition de déficits cognitifs, qui sont les premiers signes de conversion vers la schizophrénie chez les sujets à haut-risque. Agir en amont de la voie mTOR en ciblant les récepteurs de la sérotonine offre une opportunité thérapeutique unique pour traiter les troubles psychiatriques liés à une dérégulation de la voie mTOR. Cette stratégie induira probablement des effets secondaires rmoins prononcés qu'une inhibition directe de mTOR qui est une protéine kinase

ubiquitaire jouant un rôle central dans de nombreux processus physiologiques (Bockaert and Marin, 2015; Switon et al., 2017).

Les objectifs de mon projet de thèse ont été de :

1) Caractériser l'impact du blocage précoce, durant l'adolescence de la voie 5-HT$_6$-mTOR sur les déficits cognitifs observés à l'âge adulte dans un modèle neuro-développemental de schizophrénie (souris injectées à la PCP au stade néonatal).
2) Déterminer si l'activation persistante de la voie mTOR déclenchée par le récepteur 5-HT$_6$ est médiée par l'activité constitutive du récepteur 5-HT$_6$ ou par l'augmentation de la libération de 5-HT.
3) Caractériser les altérations synaptiques induites au niveau du CPF dans le modèle PCP et déterminer si un blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR pourrait les prévenir.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé le modèle pharmacologique de schizophrénie chez la souris qui récapitule les troubles cognitifs et autres changements comportementaux caractéristiques de la schizophrénie (**Figure 38**). Ce modèle pharmacologique consiste en des injections de phencyclidine à un stade néonatal chez la souris (10 mg/kg, s.c., 7ème, 9ème et 11ème jour après la naissance (Nakatani-Pawlak et al., 2009). Pour rappel ces souris PCP présentent des anomalies comportementales retrouvées dans la schizophrénie telles que l'altération de l'inhibition du réflexe de sursaut acoustique (PPI, qui reflète un déficit dans le traitement des informations sensorielles entrante) et un déclin des performances cognitives (déficit dans la reconnaissance de nouveaux objets).

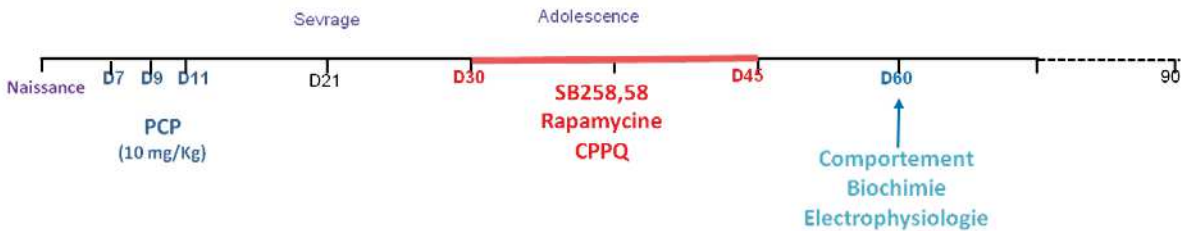


Figure 38 : Schéma expérimental utilisé. Les souris sauvages ou 5-HT$_6^{-/-}$ sont injectées avec de la PCP (10mg/kg, souris PCP) ou avec une solution saline (souris Veh) aux jours 7, 9 et 11 post-nataux. Durant l'adolescence, jours 30 à 45, les souris Veh, PCP, Veh 5-HT$_6^{-/-}$ et PCP 5-HT$_6^{-/-}$ sont injectées soit avec le SB258585, la rapamycine, le CCPQ ou avec une solution véhicule. Les expériences biochimiques, comportementales ou électrophysiologiques sont ensuite réalisées à l'âge adulte, à partir de J60).

b. Résultats

1. Activation non physiologique et soutenue de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR à l'âge adulte au niveau du CPF dans le modèle PCP

Une analyse biochimique effectuée à partir de tranches de CPF prélevées à l'âge adulte (P60) chez la souris a permis de mettre en évidence une activation soutenue et non physiologique de la voie de signalisation mTOR, comme cela avait été précédemment observé chez le rat (Meffre et al., 2012). En effet, une augmentation significative du niveau de phosphorylation de la protéine kinase mTOR et de son substrat, la protéine kinase p70S6 est observée en Western blots sur des extraits de CPF issus de souris PCP adultes, par rapport aux souris contrôles (**Figure 39**). L'administration du SB258585, un agoniste inverse des récepteurs 5-HT$_6$ (à 2,5 mg/kg) ou de rapamycine, inhibiteur de mTOR (à 1,5 mg/kg), durant toute la période de l'adolescence (J30 à J45) permet de prévenir l'activation de cette voie de signalisation à l'âge adulte dans le modèle PCP. Le traitement avec le SB258585 ou la rapamycine administré pendant l'adolescence n'induit pas de modification du niveau de phosphorylation des protéines mTOR ou p70S6k chez les souris contrôles.

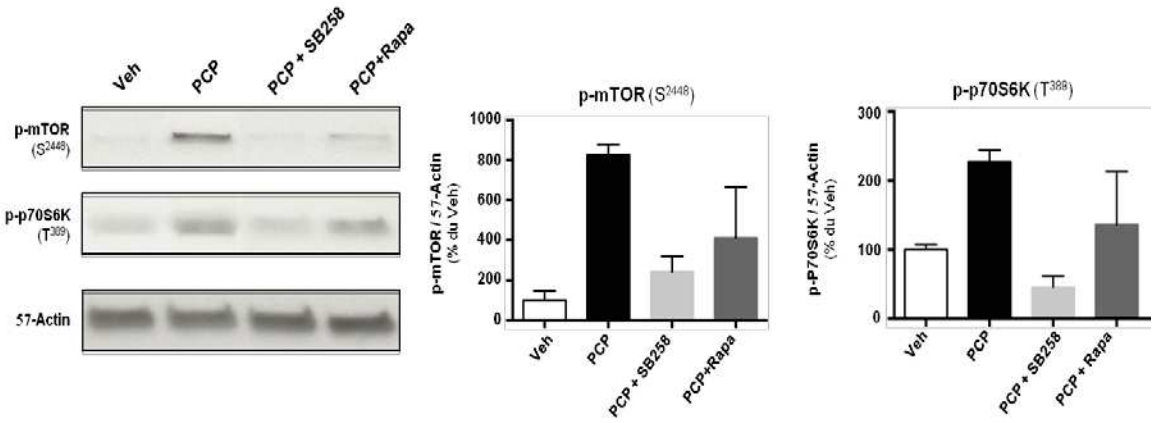


Figure 39 : Le blocage précoce, durant l'adolescence de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR prévient à l'âge adulte la suractivation de la voie mTOR au niveau du CPF dans le modèle PCP. Western blots et histogrammes associés montrant dans le modèle PCP les phosphorylations au niveau du résidu S^{2448} de la protéine kinase mTOR et au niveau du résidu T^{389} de la protéine kinase p70S6. Le traitement durant l'adolescence via l'administration de SB258585 ou de rapamycine permet de prévenir cette activation soutenue par rapport aux souris contrôles (n=3).

2. Le blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR prévient les déficits cognitifs induits dans le modèle PCP

Différents tests comportementaux ont mis en évidence la présence de déficits cognitifs dans le modèle PCP. En effet, comme les rats PCP (Meffre et al., 2012), les souris PCP présentent par rapport aux souris contrôles, ayant été injectées avec la solution véhicule, des altérations dans la mémoire de reconnaissance mis en évidence grâce au test de reconnaissance d'objets (NOR, **Figure 40**), des altérations dans la mémoire associative observées grâce au test de placement d'objets (OIP, **Figure 41**) ainsi que des déficits de mémoire sociale (test de crawley, **Figure 42B**) mais pas de sociabilité (**Figure 42A**).

Les souris PCP traitées avec le SB258585 ou la rapamycine, durant l'adolescence, présentent quant à elles des performances similaires aux souris contrôles. Ces résultats démontrent donc que le blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR constitue une stratégie prometteuse pour prévenir les déficits cognitifs observés dans un modèle préclinique de schizophrénie. Les traitements administrés durant l'adolescence aux souris contrôles (Veh) ne modifient pas le comportement de ces souris à l'âge adulte.

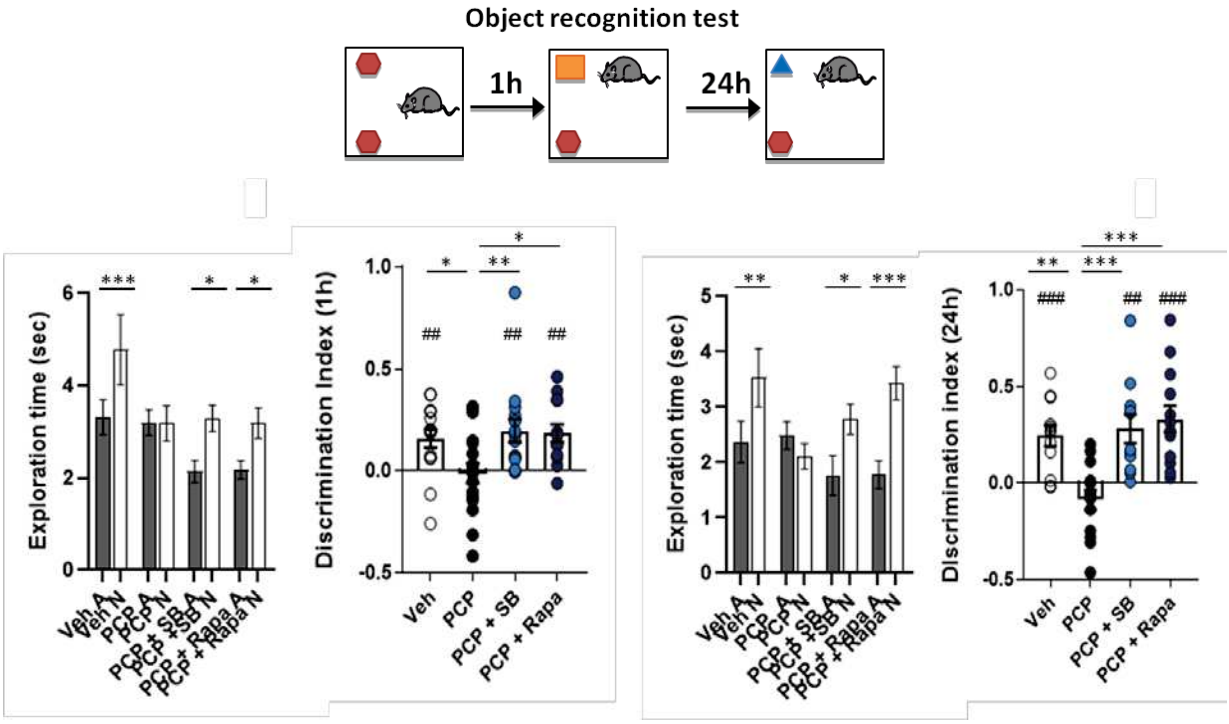


Figure 40 : Altération de la mémoire de reconnaissance dans le modèle PCP prévenue par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. Les souris PCP (1h : n = 17 ; 24h : n = 14) présentent par rapport aux souris contrôles (Veh, 1h : n = 15 ; 24h n = 12) une diminution de l'index de discrimination à 1h et 24h. L'administration précoce de SB258585 (1h : n = 15 ; 24h : n = 11) ou de rapamycine (1h : n = 13 ; 24h : n = 13) permet de prévenir les déficits dans la mémoire de reconnaissance observés à l'âge adulte. Index discrimination (1h) : Veh : 0,16 ± 0,04 ; PCP : -0,03 ± 0,05 ; PCP + SB258585 : 0,19 ± 0,06 ; PCP + RAPA : 0,18 ± 0,04. Index discrimination (24h) : Veh : 0,24 ± 0,05 ; PCP : -0,09 ± 0,05 ; PCP + SB258585 : 0,28 ± 0,08 ; PCP + RAPA : 0,33 ± 0,07. Temps d'explorations : A = ancien objet ; N = nouvel objet. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Pour les temps d'explorations, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés. # : test de wilcoxon qui compare index de discrimination (ID) *vs* valeur théorique d'ID = 0.

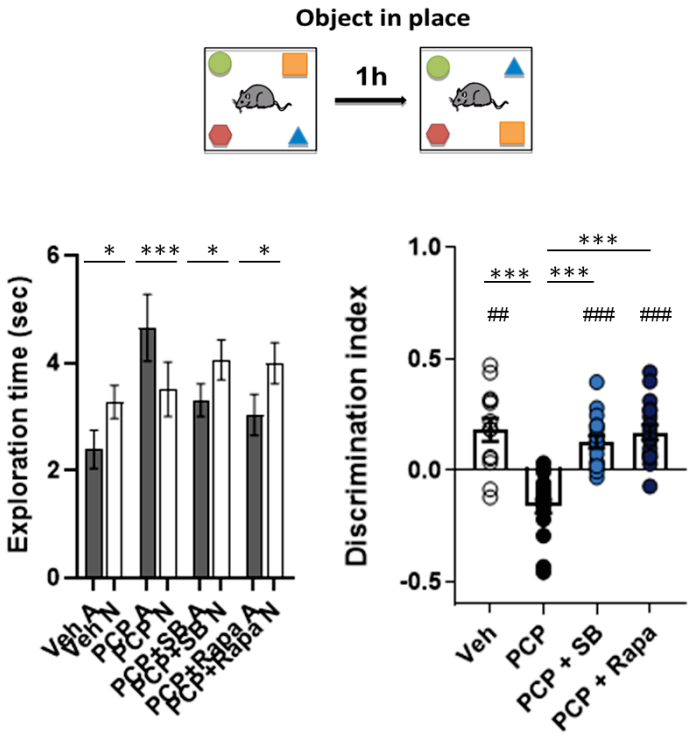


Figure 41 : Altération de la mémoire associative dans le modèle PCP prévenue par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. Les souris PCP (n = 21) présentent par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 13) une diminution de l'index de discrimination. Ce test montre que l'administration précoce de SB258585 (n = 17) ou de rapamycine (n = 17) permet de prévenir les déficits de mémoire associative à l'âge adulte. Index discrimination (1h) : Veh : 0,18 ± 0,05 ; PCP : -0,16 ± 0,03 ; PCP + SB258585 : 0,13 ± 0,03 ; PCP + RAPA : 0,17 ± 0,03. . Temps d'explorations : A = objets non permutés ; N = objets permutés. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Pour les temps d'explorations, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés. # : test de wilcoxon qui compare index de discrimination (ID) *vs* valeur théorique d'ID = 0.

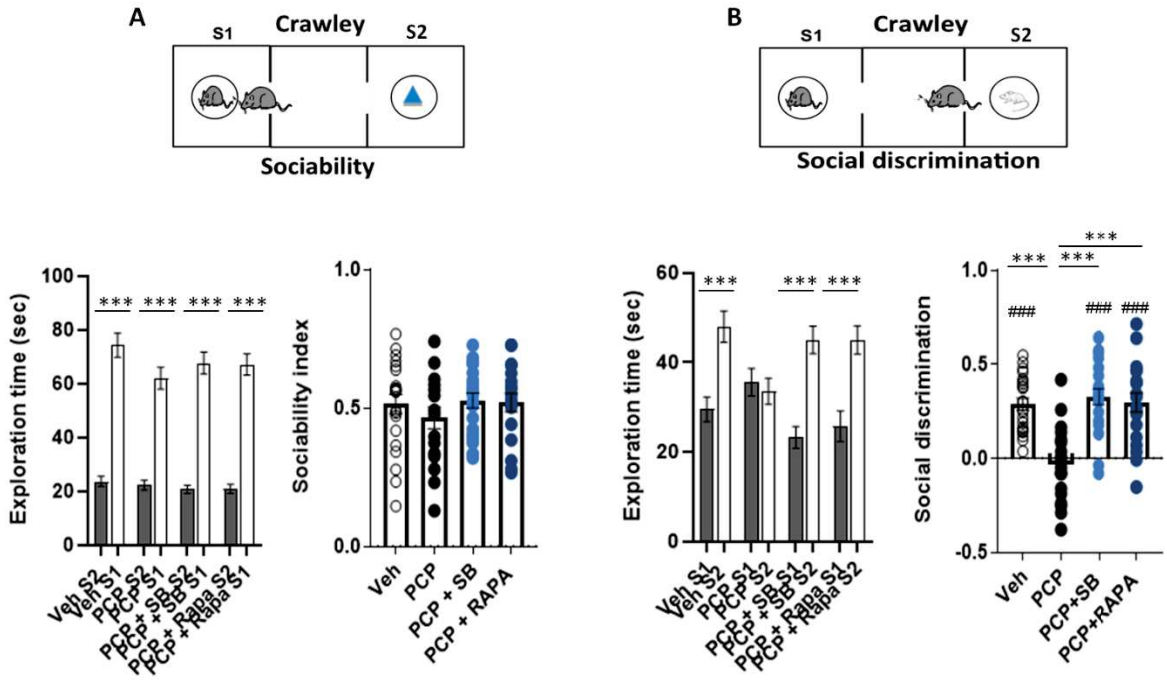


Figure 42 : Altération de la discrimination sociale dans le modèle PCP prévenue par l'inhibition durant l'adolescence de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. **A**. Les souris PCP (n = 18) ne présentent pas de différence au niveau de l'index de sociabilité par rapport aux souris contrôles (n = 22). **B**. En revanche, les souris PCP (n = 18) présentent des déficits significatifs de la discrimination sociale par rapport aux souris contrôles (n = 22). L'administration précoce de SB258585 (n = 20) ou de rapamycine (n = 19) prévient ces déficits à l'âge adulte. Index de sociabilité : Veh : 0,51 ± 0,03 ; PCP : 0,5 ± 0,04 ; PCP + SB258585 : 0,53 ± 0,03 ; PCP + RAPA : 0,52 ± 0,03. Discrimination sociale : Veh : 0,29 ± 0,03 ; PCP : -0,04 ± 0,05 ; PCP + SB258585 : 0,33 ± 0,04 ; PCP + RAPA : 0,30 ± 0,05. Index de discrimination : S1 = souris familière ; S2 = Objet. Index de discrimination : S1 = souris familière ; S2 = souris nouvelle. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. ***$P < 0.001$. Pour le temps d'exploration, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés.

Pour confirmer le rôle essentiel des récepteurs 5-HT$_6$ dans l'activation non-physiologique de mTOR et les altérations cognitives dans le modèle PCP, les expériences réalisées précédemment ont été effectuées sur des souris n'exprimant pas le récepteur 5-HT$_6$ (souris knockout 5-HT$_6^{-/-}$). Les souris 5-HT$_6^{-/-}$ injectées au stade néonatal avec la PCP ne présentent pas à l'âge adulte d'altération au niveau de la mémoire de reconnaissance (**Figure 43A**) et de la mémoire associative (**Figure 43B**), ni au niveau de la sociabilité (**Figure 44A**) et de la discrimination sociale (**Figure 44B**). Confirmant ainsi l'implication des récepteurs 5-HT$_6$ dans l'apparition des déficits cognitifs observés dans ce modèle préclinique de schizophrénie.

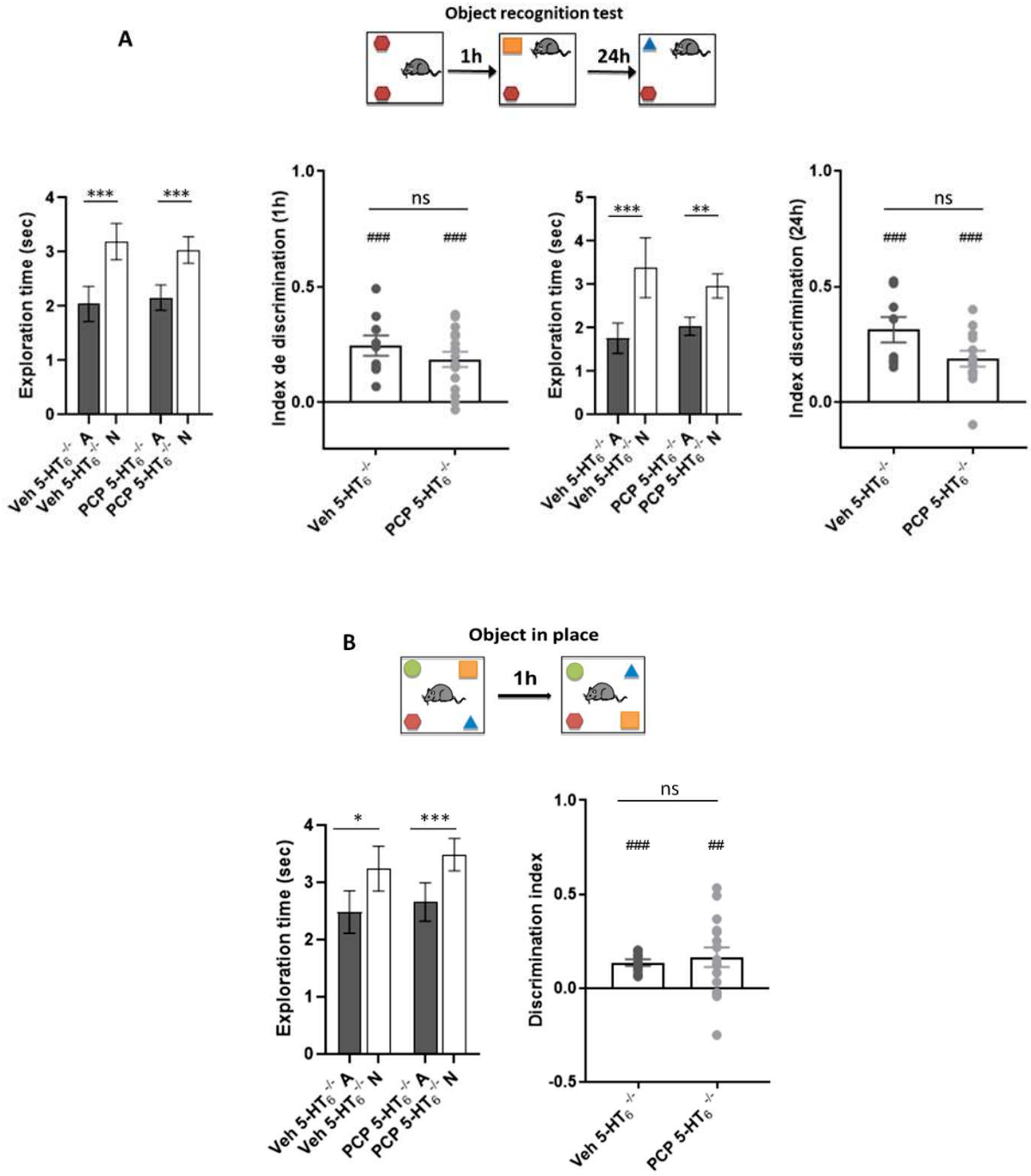


Figure 43 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-HT$_6^{-/-}$ n'affecte pas la mémoire de reconnaissance et la mémoire associative. **A**. Les souris PCP 5-HT$_6^{-/-}$ (1h : n = 16 ; 24h : n = 13) ne présentent pas de différence par rapport aux souris Veh 5-HT$_6^{-/-}$ (1h : n = 9 ; 24h : n = 8) dans le test évaluant la mémoire de reconnaissance à l'âge adulte. Index discrimination (1h) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 0,25 ± 0,04 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 0,19, ± 0,03. Index discrimination (24h) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 0,31 ± 0,06 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 0,19 ± 0,03. **B**. De la même façon les souris PCP 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 16) ne présentent pas de différence significative par rapport aux souris Veh 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 9) dans le test évaluant la mémoire associative à l'âge adulte. Index discrimination (1h) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 0,14 ± 0,18 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 0,17 ± 0,05. Analyses statistiques : Unpaired t-test, n.s pour non significatif, $P > 0.05$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Pour le temps d'exploration, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés.

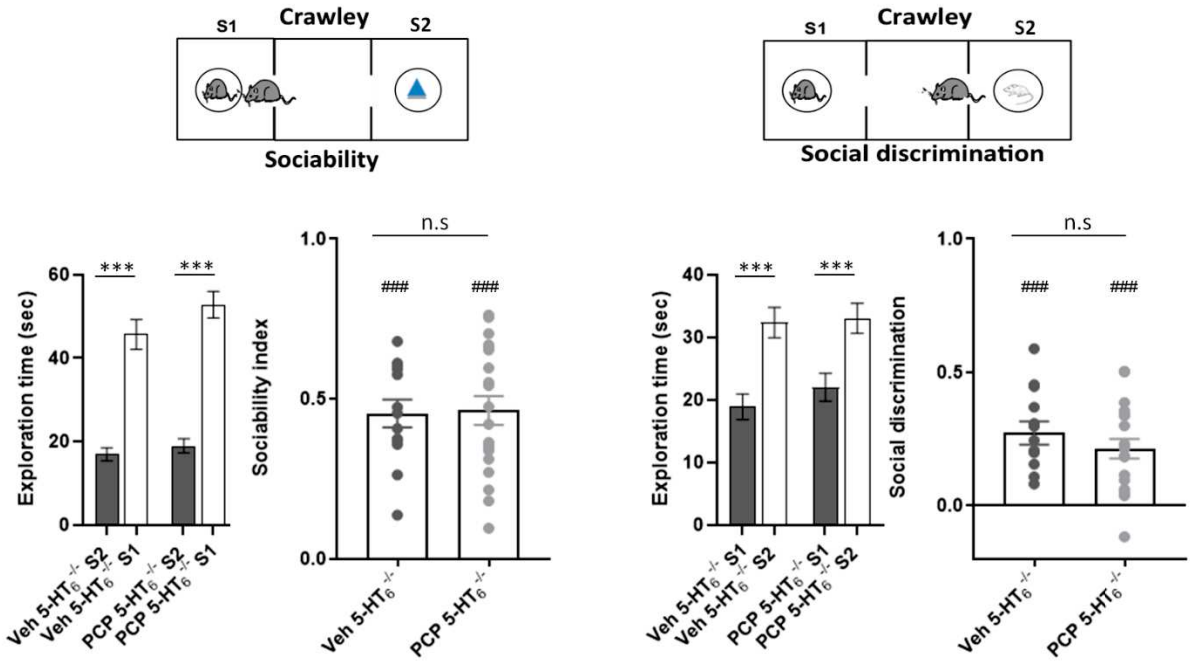
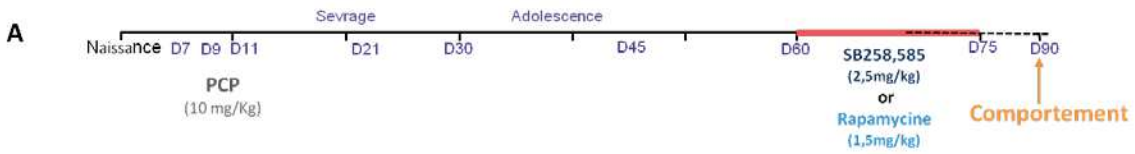


Figure 44 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-HT$_6^{-/-}$ n'altère ni la sociabilité ni la discrimination sociale. Les souris PCP 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 20) ne présentent pas de différence significative dans l'index de sociabilité (**A**) et de discrimination sociale (**B**) par rapport aux souris Veh 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 13). Index sociabilité : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 0,45 ± 0,04 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 0,46 ± 0,05. Discrimination sociale : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 0,27 ± 0,04 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 0,21 ± 0,04. Analyses statistiques : Unpaired t-test, n.s pour non significatif, $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$. Pour le temps d'exploration, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés.

3. L'adolescence correspond à la fenêtre thérapeutique idéale pour administrer le traitement

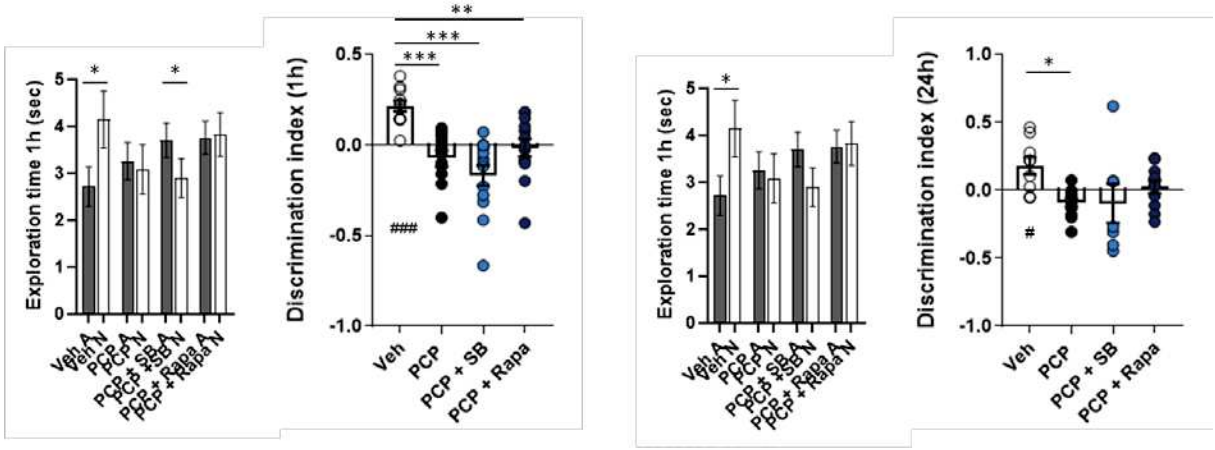
Afin de valider l'importance du traitement précoce, administré pendant la période critique de l'adolescence, le SB258585 et la rapamycine ont été injectés à l'âge adulte (de J60 à J75) aux souris contrôles et souris PCP pendant deux semaines (**Figure 45A**). L'effet de ce blocage a été analysé au minimum deux semaines après la dernière injection du traitement, à partir de J90. Dans ces conditions, les souris PCP traitées avec le SB258585 ou la rapamycine présentent des performances altérées dans les tests de reconnaissance du nouvel objet (**Figure 45B**), de mémoire associative (**Figure 45C**) et de discrimination sociale (**Figure 45D**), par rapport aux souris contrôles. L'analyse biochimique des extraits de CPF de ces animaux est en cours d'étude pour analyser le niveau des formes phosphorylées de mTOR et p70S6K.

En revanche, l'administration aigüe de SB258585 à l'âge adulte aux souris PCP 30min avant d'effectuer le test d'OIP permet de reverser les déficits (**Figure 46**). Ces résultats, en aigü, sont en accord avec ceux observés précédemment chez le rat (Meffre et al., 2012).



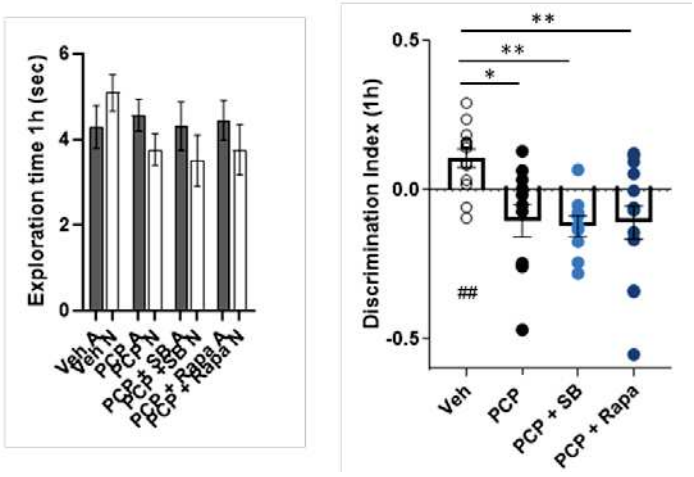
B

Object recognition test



C

OIP



D

Sociability – Social discrimination

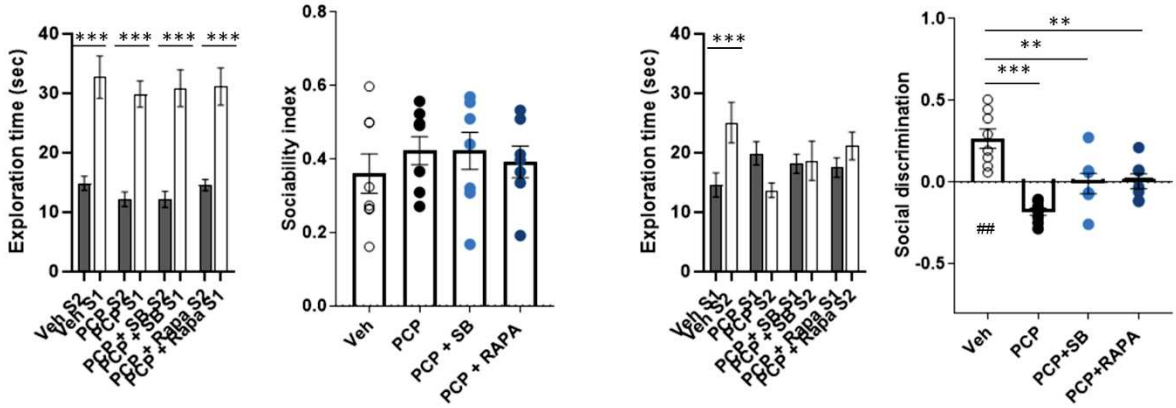


Figure 45 : Le blocage subchronique de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR à l'âge adulte ne permet pas de reverser l'ensemble des déficits cognitifs observés dans ce modèle. **A**. Description du schéma expérimental utilisé pour l'administration des inhibiteurs de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR à l'âge adulte. **B**. Les souris PCP (1h : n = 11 ; 24h : n = 11) présentent des altérations par rapport aux souris contrôles (Veh, 1h : n = 11 ; 24h : n = 9) dans le test évaluant la mémoire de reconnaissance à l'âge adulte. L'administration tardive de SB258585 (1h : n = 13 ; 24h : n = 7) ou de rapamycine (1h : n = 13 ; 24h : n = 11) ne permet pas d'abolir les déficits cognitifs observés dans le modèle PCP. Index discrimination (1h) : Veh : 0,21 ± 0,03 ; PCP : -0,07 ± 0,04 ; PCP + SB258585 : -0,17 ± 0,06 ; PCP + RAPA : -0,02 ± 0,05. Index discrimination (24h) : Veh : 0,18 ± 0,06 ; PCP : -0,09 ± 0,03 ; PCP + SB258585 : -0,09 ± 0,14 ; PCP + RAPA : 0,02 ± 0,05. **C**. De la même façon les souris PCP (n = 11) présentent des altérations dans le test évaluant la mémoire associative à l'âge adulte par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 13). L'administration tardive de SB258585 (n = 9) ou de rapamycine (n = 13) ne permet pas de reverser ces déficits. Index discrimination (1h) : Veh : 0,10 ± 0,03 ; PCP : -0,10 ± 0,05 ; PCP + SB258585 : -0,12 ± 0,03 ; PCP + RAPA : -0,11 ± 0,06. **D**. Les souris PCP (n = 8) ne presentent pas d'altération de sociabilité par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 8). En revanche, ces souris PCP (n = 7) présentent des déficits dans la discrimination sociale par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 8). L'administration tardive de SB258585 (n = 7) ou de rapamycine (n = 7) ne permet pas de reverser les déficits observés dans ce test. Index de sociabilité : Veh : 0,36 ± 0,05 ; PCP : 0,42 ± 0,04 ; PCP + SB258585 : 0,42 ± 0,05 ; PCP + RAPA : 0,40 ± 0,04. Discrimination sociale : Veh : 0,27 ± 0,06 ; PCP : -0,18 ± 0,02 ; PCP + SB258585 : -0,01 ± 0,06 ; PCP + RAPA : 0,003 ± 0,05. Analyses statistiques : Unpaired t-test, n.s pour non significatif, $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$. Pour le temps d'exploration, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés.

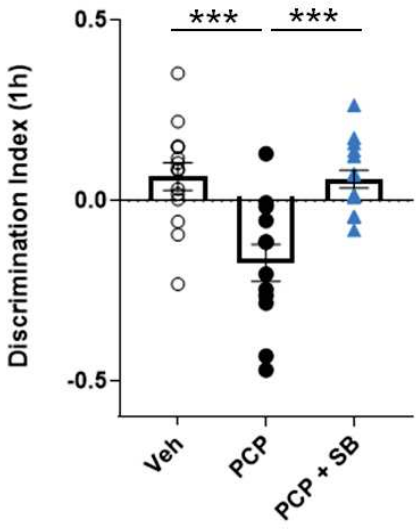


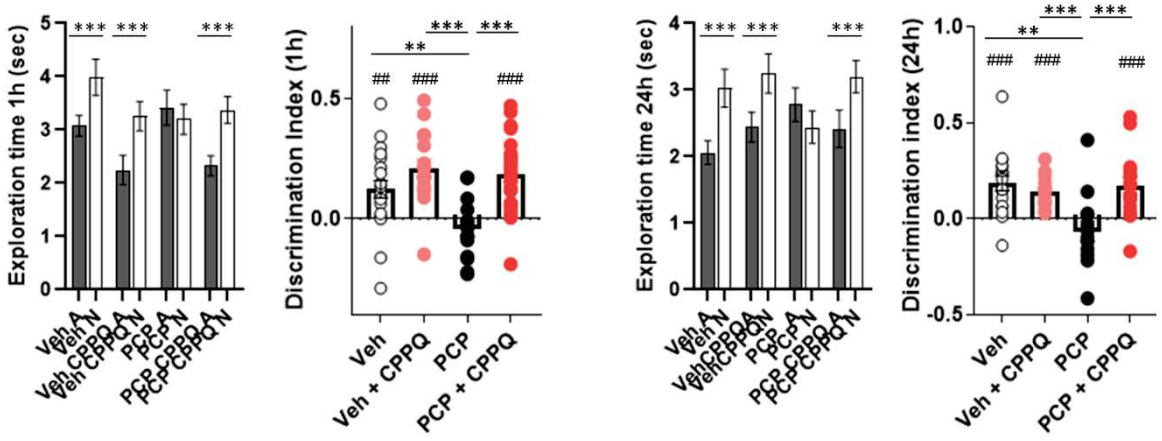
Figure 46 : Le traitement aigü administré à l'âge adulte avec le SB258585 permet de reverser les déficits de mémoire associative dans le modèle PCP. Les souris PCP (n = 12) présentent des altérations par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 14) dans le test évaluant la mémoire associative à l'âge adulte. L'administration à l'âge adulte, 30 min avant le test, de SB258585 (n = 15) permet d'abolir les déficits observés dans ce test. Index discrimination (1h) : Veh : 0,07 ± 0,04 ; PCP : -0,17 ± 0,05 ; PCP + SB258585 : 0,06 ± 0,02. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. ***$P < 0.001$.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'administration du traitement à l'âge adulte est efficace comme traitement symptomatique mais pas comme traitement curatif. En effet, le blocage de la voie 5-HT$_6$-mTOR après la période critique de maturation du CPF ne permet pas d'abolir de façon définitive et durable l'activation de la voie mTOR, et donc de prévenir les déficits cognitifs associés contrairement à ce qui a été observé lorsque le traitement est administré pendant la période de l'adolescence. L'analyse biochimique des extraits de CPF est en cours d'étude afin de déterminer si l'activation de la voie mTOR est toujours présente chez ces animaux ou non.

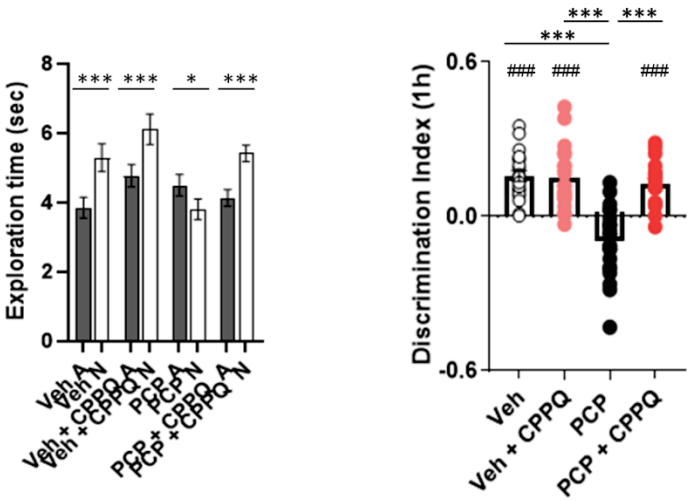
4. L'activation soutenue de la voie 5-HT$_6$-mTOR semble résulter d'une altération de la transmission sérotoninergique et non pas d'une augmentation de l'activité constitutive du récepteur.

Les récepteur 5-HT$_6$ sont connus pour présenter un niveau élevé d'activité constitutive *in vitro* et *in vivo* (Deraredj Nadim et al., 2016). L'activation non physiologique de mTOR observée dans le modèle PCP peut résulter d'une augmentation de l'activité constitutive des récepteurs 5-HT$_6$ ou d'une augmentation de leur activité causée par une hausse de la libération de sérotonine. Pour le determiner les expériences de comportements ont été renouvelées en administrant durant l'adolescence le CPPQ ((S)-1-[(3-chlorophenyl)sulfonyl]-4-(pyrrolidine-3-yl-amino)-1H-pyrrolo[3,2-c]quinolone) (2,5 mg/kg, i.p.), un antagoniste neutre 5-HT$_6$ qui permet de bloquer l'activation du récepteur (sans affecter son activité constitutive). Ce composé a récemment été synthétisé et caractérisé par nos collaborateurs (Pawel Zajdel et Katarzyna Grychowska, Pologne) (Grychowska et al., 2019). J'ai ainsi pu montrer que l'administration de CPPQ prévient les déficits cognitifs observés dans le modèle PCP (**Figure 47**) renforçant ainsi l'hypothèse d'une augmentation de la transmission sérotoninergique au niveau du CPF dans ce modèle pharmacologique de schizophrénie.

A


Object recognition test
Exploration time 1h (sec)
Discrimination Index (1h)
Exploration time 24h (sec)
Discrimination index (24h)
Veh A
Veh N
Veh CPPQ A
Veh CPPQ N
PCP A
PCP N
PCP CPPQ A
PCP CPPQ N
Veh
Veh + CPPQ
PCP
PCP + CPPQ

B


OIP
Exploration time (sec)
Discrimination Index (1h)
Veh A
Veh N
Veh + CPPQ A
Veh + CPPQ N
PCP A
PCP N
PCP + CPPQ A
PCP + CPPQ N
Veh
Veh + CPPQ
PCP
PCP + CPPQ

C

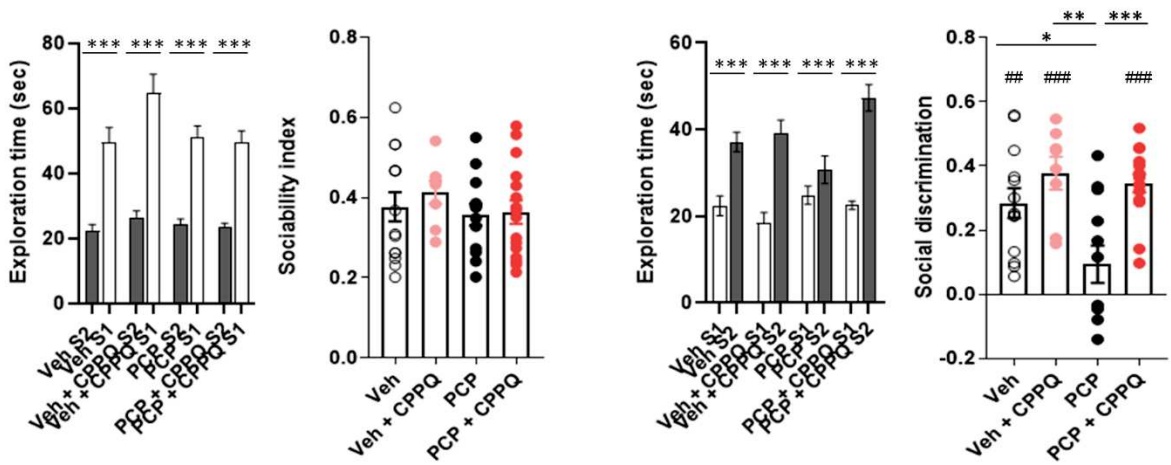

Sociability – Social discrimination
Exploration time (sec)
Sociability index
Social discrimination
Veh S2
Veh S1
Veh + CPPQ S2
Veh + CPPQ S1
PCP S2
PCP S1
PCP + CPPQ S2
PCP + CPPQ S1
Veh
Veh + CPPQ
PCP
PCP + CPPQ

Figure 47 : L'administration de CPPQ, un antagoniste neutre des récepteurs 5-HT$_6$, aux souris PCP durant l'adolescence prévient l'apparition des déficits dans la mémoire de reconnaissance, la mémoire associative et la discrimination sociale. **A**. Les souris PCP + CPPQ ne présentent pas de différence significative par rapport aux souris contrôles contrairement aux souris PCP dans le test évaluant la mémoire de reconnaissance à l'âge adulte. Index discrimination (1h) : Veh (n=21) : 0,12 ± 0,04 ; PCP (n=15) : -0,04 ± 0,03 ; Veh + CPPQ : 0,21 ± 0,04 ; PCP + CPPQ (n=24) : 0,18 ± 0,03. Index discrimination (24h) : Veh (n=18) : 0,18 ± 0,04 ; PCP (n=14) : -0,07 ± 0,05 ; Veh + CPPQ : 0,14 ± 0,02 ; PCP + CPPQ (n=18) : 0,17 ± 0,04. **B**. De la même façon les souris PCP + CPPQ ne présentent pas de différence par rapport aux souris contrôles dans le test évaluant la mémoire associative à l'âge adulte. Index discrimination (1h) : Veh (n=20) : 0,16 ± 0,02 ; PCP (n=21) : -0,10 ± 0,03 ; Veh + CPPQ : 0,15 ± 0,03 ; PCP + CPPQ (n=19) : 0,13 ± 0,02. **C**. L'administration de CPPQ aux souris PCP pendant l'adolescence permet de reverser les déficits à l'âge adulte. Index de sociabilité : Veh (n = 14) : 0,38 ± 0,04 ; Veh + CPPQ : 0,41 ± 0,03 ; PCP (n = 12) : 0,36 ± 0,03 ; PCP + CPPQ (n= 15) : 0,36 ± 0,03. Discrimination sociale : Veh : 0,29 ± 0,05 ; Veh + CPPQ : 0,38 ± 0,05 ; PCP : 0,09 ± 0,06 ; PCP + CPPQ : 0,34 ± 0,03. Analyses statistiques : One-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison, n.s. pour non significatif $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$. Pour le temps d'exploration, un two-way Anova suivi d'un Bonferroni's test pour multiple comparaison ont été réalisés.

J'ai également analysé l'activité locomotrice et le phénotype anxieux des animaux en réalisant respectivement le test du cyclotron (**Figure 48**) et de l'EPM (**Figure 49**). Dans ces deux tests, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les souris contrôles et les souris 5-HT$_6^{-/-}$ injectées Veh ou PCP. Nous pouvons conclure que les déficits observés dans le modèle PCP sont purement cognitifs.



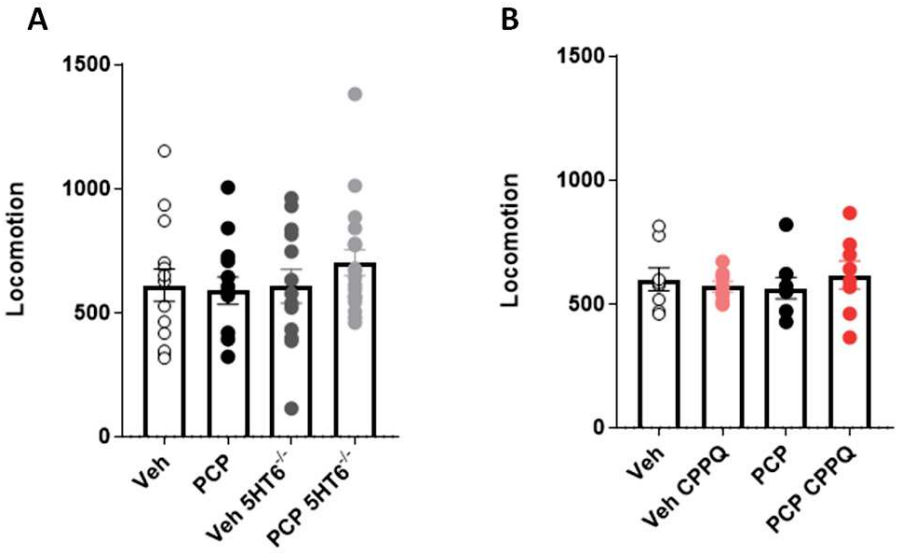
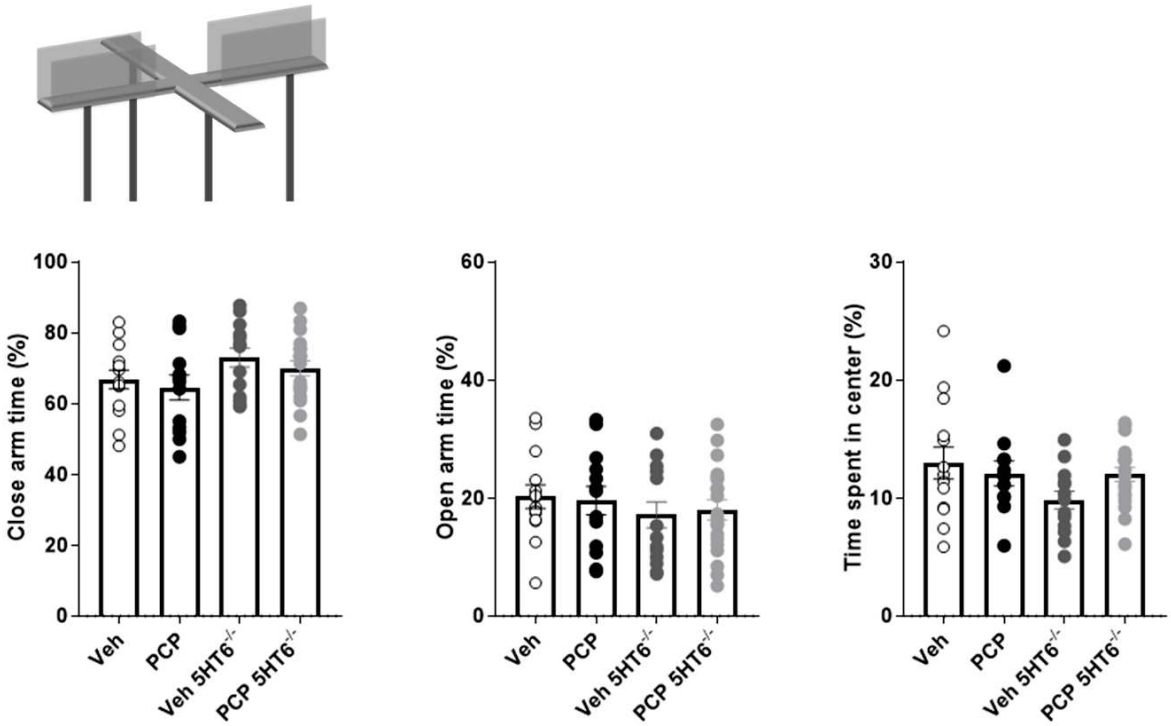


Figure 48 : Les souris Veh et 5-HT$_6^{-/-}$ injectées au CPPQ ou PCP ne présentent pas d'altération au niveau de la locomotion. **A**. Veh, n = 14 ; 610,5 ± 65,7 ; PCP, n = 13 ; 589,3 ± 54,8 ; Veh 5-HT$_6^{-/-}$, n = 13 ; 606,7 ± 68,2 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$, n = 19 ; 702,0 ± 52,4. **B**. Veh, n = 8 ; 599,1 ± 46,6 ; PCP, n = 8 ; 563,3 ± 43,2 ; Veh + CPPQ, n = 8 ; 570,0 ± 21,1 ; PCP + CPPQ, n = 8 ; 616,8 ± 56,0. Analyses statistiques, one way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. n.s. non significatif $P > 0.05$.



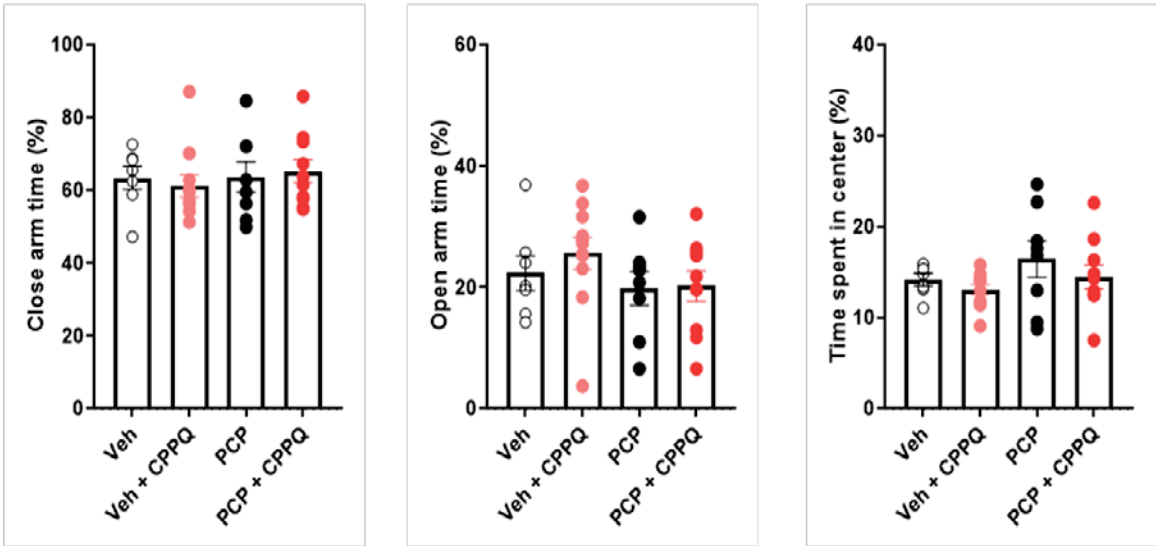


Figure 49 : Les souris Veh et 5-HT$_6^{-/-}$ injectées au CPPQ ou PCP ne présentent pas un état anxieux. Les graphes présentent le temps en pourcentage que passent les souris dans les bras ouverts, fermés et au centre afin d'évaluer l'anxiété. **Panel du haut** : Veh, n = 14 ; PCP, n = 13 ; Veh 5-HT$_6^{-/-}$, n = 14 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$, n = 20. Bras fermés : Veh : 66,81 ± 2,70 ; PCP : 64,56 ± 3,56 ; Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 73,00 ± 2,69 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 70,00 ± 2,07. Bras ouverts : Veh : 20,23 ± 1,99 ; PCP : 19,59 ± 2,40 ; Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 17,16 ± 2,21 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 17,99 ± 1,70. Temps centre : Veh : 12,96 ± 1,34 ; PCP : 12,10 ± 1,05 ; Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 9,85 ± 0,75 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 12,01 ± 0,60. **Panel du bas** : Veh, n = 7 ; PCP, n = 8 ; Veh + CPPQ, n = 11 ; PCP + CPPQ, n = 10. Bras fermés : Veh : 63,43 ± 3,18 ; PCP : 63,71 ± 4,19 ; Veh + CPPQ : 61,24 ± 3,08 ; PCP + CPPQ : 65,27 ± 3,17. Bras ouverts : Veh : 22,35 ± 2,88 ; PCP : 19,84 ± 2,79 ; Veh + CPPQ : 25,64 ± 2,67 ; PCP + CPPQ : 20,23 ± 2,47. Temps centre : Veh : 14,22 ± 0,67 ; PCP : 16,45 ± 2,03 ; Veh + CPPQ : 13,11 ± 0,575 ; PCP + CPPQ : 14,5 ± 1,29. Analyses statistiques : one way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. n.s. son significant $P > 0$.

5. Les altérations de la transmission synaptique inhibitrice et excitatrice, observées au niveau du CPF des souris PCP, sont prévenues par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique au sein du CPF dans le modèle PCP. J'ai réalisé des enregistrements de patch-clamp en configuration cellule entière sur les neurones pyramidaux de la couche V du CPF qui intègrent les informations des aires corticales et sous corticales. J'ai analysé l'amplitude et la fréquence des courants miniatures postsynaptiques de type excitateurs (mEPSC) et inhibiteurs (mIPSC). Dans un premier temps, j'ai analysée la transmission synaptique glutamatergique globale (sans bloquer la transmission GABAergique inhibitrice). J'ai observé une augmentation de la fréquence des événements mEPSC, sans modification de l'amplitude (**Figure 50**) suggérant une transmission glutamatergique basale plus importante chez les souris PCP que chez les souris contrôles. Afin de déterminer si cette altération de la transmission est dûe à une augmentation de la transmission excitatrice et/ou une diminution de la transmission GABAergique, j'ai perfusé de la picrotoxine (inhibiteur des récepteurs GABA$_A$) dans la chambre d'enregistrement afin d'analyser la composante excitatrice « pure » intégrée par les neurones enregistrés (mEPSCs). Aucune différence significative n'a été observée, tant au niveau de la fréquence que de l'amplitude de ces évènements, entre les souris PCP et les souris contrôles (**Figure 51**). A l'inverse, lorsque des inhibiteurs de la transmission synaptique excitatrice sont perfusés dans la chambre d'enregistrement afin d'isoler les courants inhibiteurs (mIPSCs), j'ai observé une diminution significative de la fréquence des mIPSCs pour les neurones issus des souris PCP par rapport aux souris

contrôles, sans modification de leur amplitude (**Figure 52**). Ces résultats suggèrent un déficit de la transmission GABAergique très probablement d'origine présynaptique dû soit à une diminution de la probabilité de libération de GABA, soit à une diminution du nombre de synapses GABAergiques. Les souris PCP traitées avec le SB258585 ou la rapamycine durant l'adolescence présentent une fréquence des mIPSCs similaire à celle observée chez les animaux contrôles (**Figure 52**), suggérant que le blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR prévient les altérations de la transmission inhibitrice observées chez l'adulte.

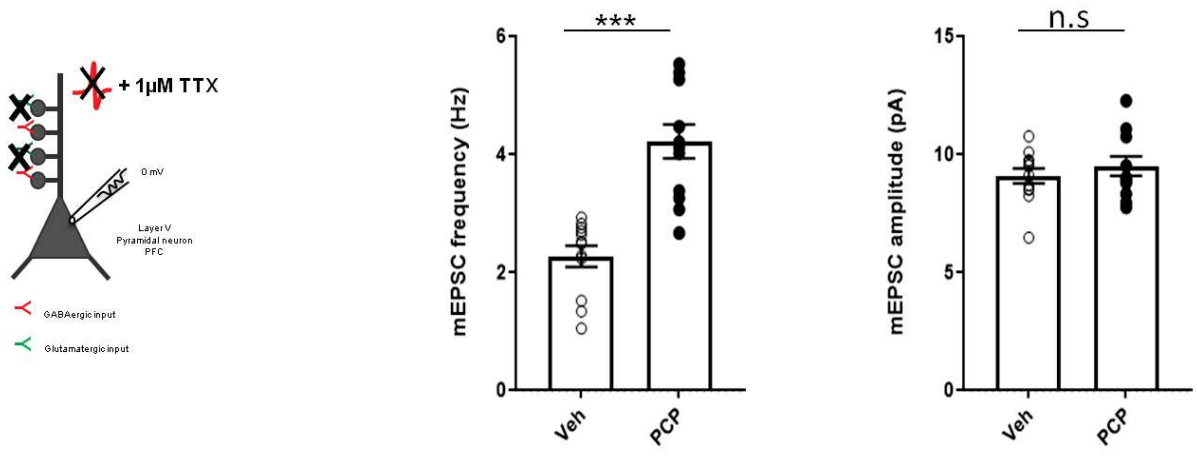


Figure 50 : Augmentation de la transmission glutamatergique « globale » dans le modèle PCP. Les souris PCP présentent une augmentation de la fréquence des mEPSC « globaux » enregistrés sans picrotoxine, par rapport aux souris contrôle (Veh, n = 12 ; PCP, n = 12). Fréquence (en Hz) : Veh : 2,27 ± 0,18 ; PCP : 4,22 ± 0,29. Amplitude sans picrotoxine (en pA) : Veh : 9,09 ± 0,32 ; PCP : 9,51 ± 0,40. Analyse statistique : Unpaired t-test, n.s pour non significatif, ***$P < 0.001$.

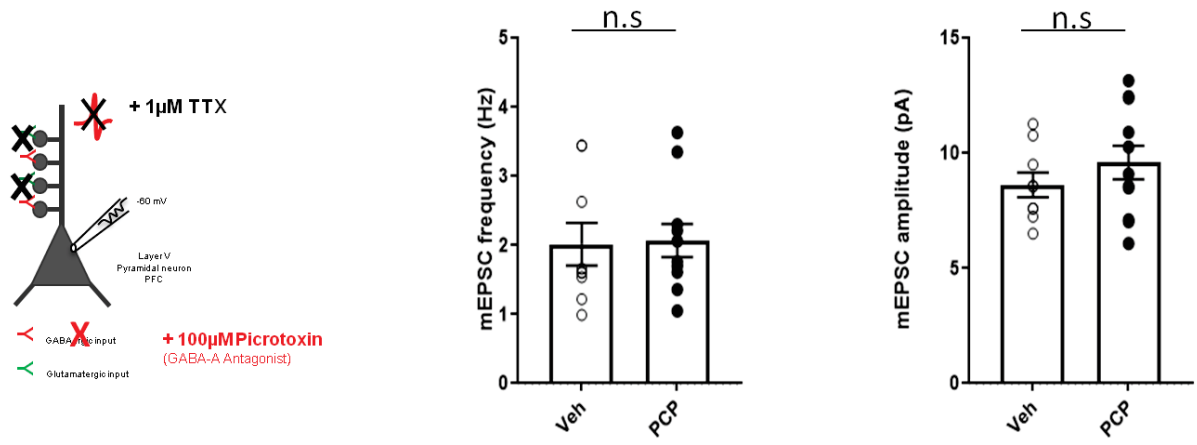


Figure 51 : Transmission glutamatergique « pure » dans le modèle PCP. Les souris PCP ne présentent pas de modification de fréquence et d'amplitude des évènements mEPSC enregistrés en présence de picrotoxine, par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 9 ; PCP, n = 11). Fréquence avec picrotoxine (en Hz) : Veh : 2,01 ± 0,31 ; PCP : 2,07 ± 0,24. Amplitude avec picrotoxine (en pA) : Veh : 8,62 ± 0,54 ; PCP : 9,60 ± 0,73. Analyse statistique : Unpaired t-test, n.s pour non significatif.

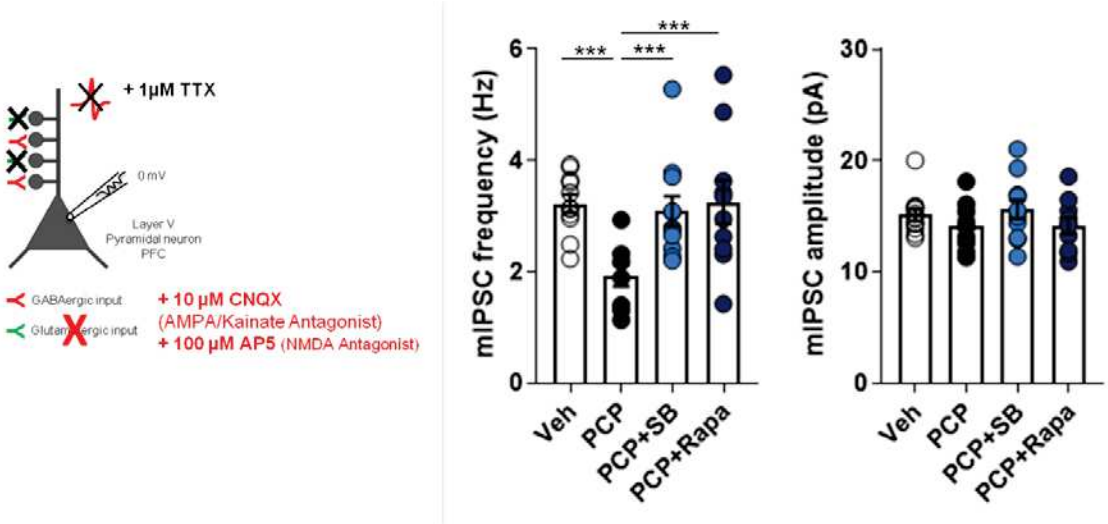


Figure 52 : Altération de la transmission GABAergique prévenue par le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. Les souris PCP (n = 9) présentent une diminution de la fréquence des courants mIPSC, sans modification de l'amplitude, par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 11). Le blocage précoce durant l'adolescence de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR, avec le SB258585 (n = 11) ou la rapamycine (n = 10) permet de prévenir les altérations observées au niveau de la transmission synaptique inhibitrice. Fréquence (en Hz) : Veh : 3,22 ± 0,16 ; PCP : 1,93 ± 0,19 ; PCP + SB258585 : 3,09 ± 0,27 ; PCP + RAPA : 3,25 ± 0,39. Amplitude (en pA) : Veh : 15,15 ± 0,56 ; PCP : 14,10 ± 0,73 ; PCP + SB258585 : 15,61 ± 0,85 ; PCP + RAPA : 14,17 ± 0,74. Analyses statistiques : one way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison, ***$P < 0.001$.

Ainsi, les souris PCP montrent donc une altération dans la balance excitation/inhibition. Cette altération serait due à une dérégulation de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR car nous avons pu mettre en évidence que le blocage de cette voie de signalisation pendant l'adolescence permet de prévenir les modifications dans le modèle PCP. De plus, aucune modification au niveau des transmissions excitatrices et inhibitrice n'a été observée lorsque les enregistrements (**Figure 53 et 54**) ont été réalisés sur les neurones pyramidaux de la couche V issus de souris 5-HT$_6^{-/-}$ traitées à la PCP.

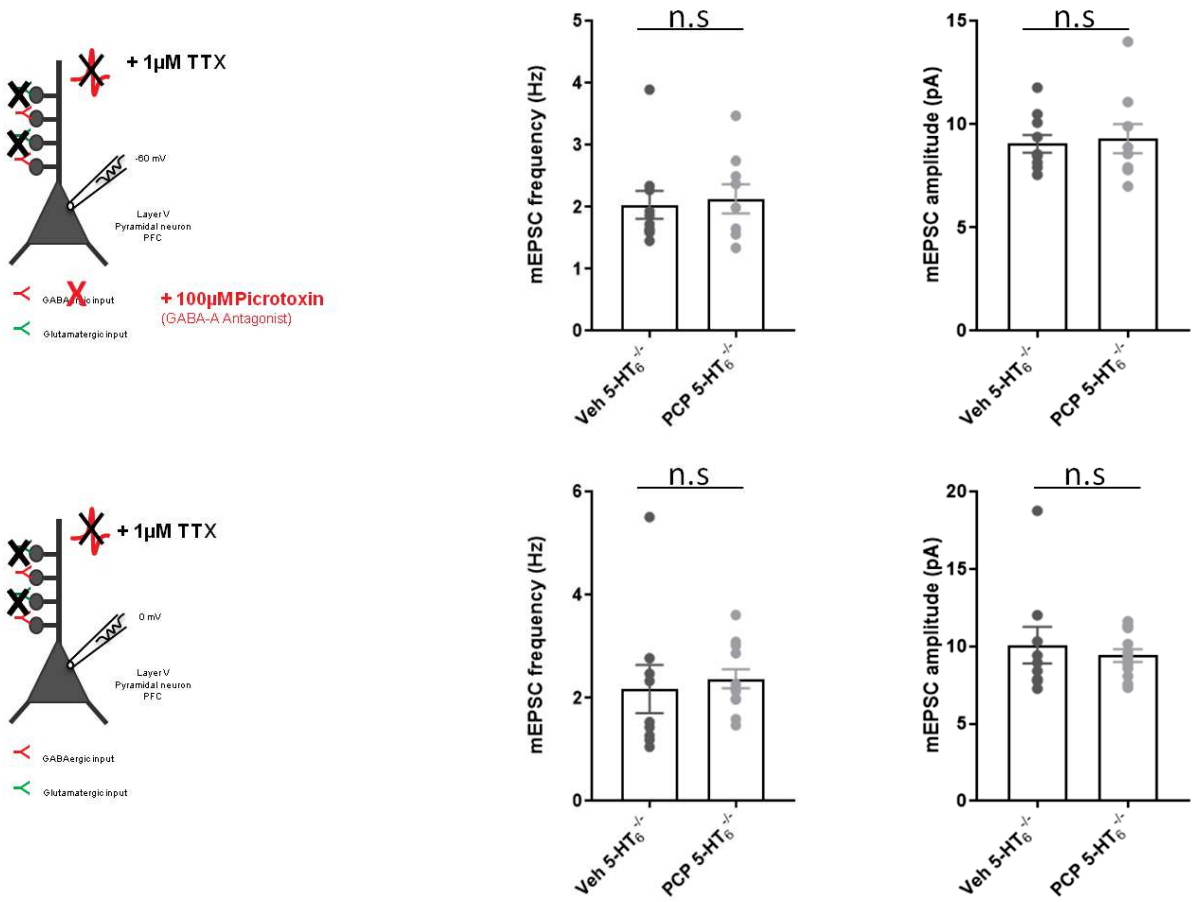


Figure 53 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-HT$_6^{-/-}$ n'induit pas d'altération de la transmission glutamatergique. Les souris Veh 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 10 ; n = 9) et PCP 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 9 ; n = 12) ne présentent pas d'altération au niveau de la fréquence et de l'amplitude des courants mEPSC que ce soit en présence ou non de picrotoxine. Fréquence avec picrotoxine (en Hz) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 2,03 ± 0,23 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 2,13 ± 0,23. Amplitude avec picrotoxine (pA) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 9,05 ± 0,43 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 9,30 ± 0,71. Fréquence sans picrotoxine (en Hz) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 2,17 ± 0,47 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 2,37 ± 0,19. Amplitude sans picrotoxine (en pA) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 10,09 ± 1,19 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 9,40 ± 0,42. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. n.s pour non significatif $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

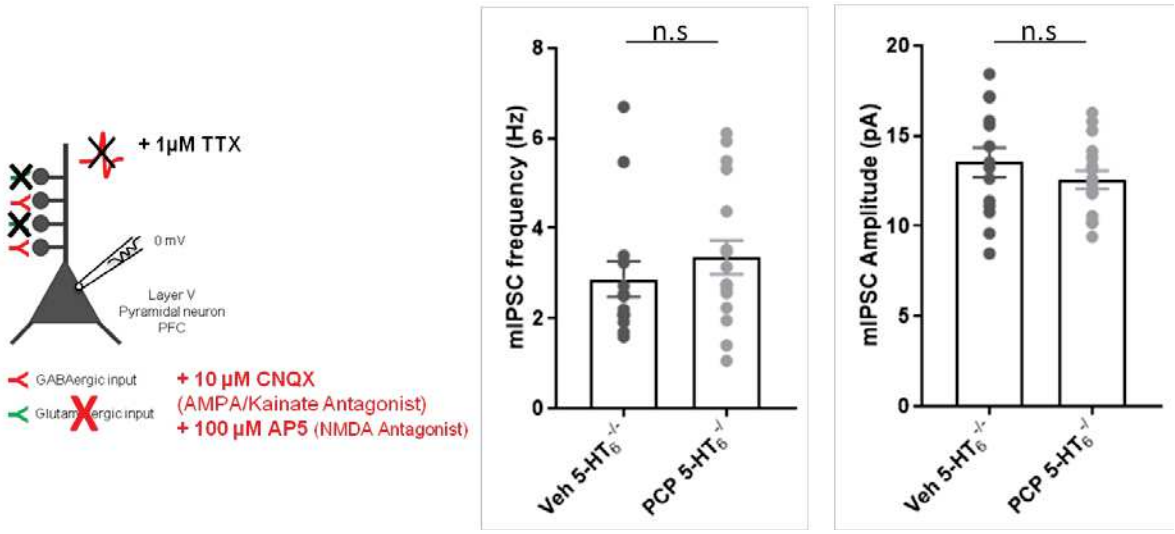


Figure 54 : L'injection de PCP au stade néonatal aux souris 5-HT$_6^{-/-}$ n'induit pas d'altération de la transmission GABAergique. Les souris Veh 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 14) et PCP 5-HT$_6^{-/-}$ (n = 17) ne présentent pas d'altération au niveau de la fréquence et de l'amplitude des courants mIPSC. Fréquence (en Hz) : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 2,87 ± 0,39 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 3,35 ± 0,38. Amplitude : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 13,53 ± 0,81 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 12,56 ± 0,50. Analyses statistiques : Unpaired t-test, n.s pour non significatif.

6. L'activation persistante de la voie mTOR modifie les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du cortex préfrontal dans le modèle PCP

Au vu des altérations dans la balance excitation/inhibition observées dans le modèle PCP, je me suis intéressée aux propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF. Cette étude est essentielle car les messages nerveux échangés entre les différentes structures cérébrales sont codés par des trains de potentiels d'action. Dans un premier temps, le potentiel de membrane des neurones pyramidaux de la couche V du CPF a été mesuré. Les neurones des souris PCP présentent un potentiel de membrane significativement plus dépolarisé (PCP : -62,06 ± 0,96 mV) que celui des neurones issus des souris contrôles (Veh : -72,14 ± 0,83 mV; $p < 0,0001$ *vs* PCP) (**Figure 55**). Le traitement administré durant l'adolescence avec le SB258585 ou la rapamycine, a permis de prévenir ces altérations du potentiel de membrane (PCP + SB258 : -70,54 ± 0,78 mV; $p < 0,001$ *vs* PCP ; PCP + RAPA : -71,45 ± 0,60 mV; $p < 0,001$ *vs* PCP) (**Figure 55**). Les neurones issus des souris PCP présentent également, par rapport aux neurones des souris contrôles, une diminution de la *rhéobase* qui correspond à l'intensité minimale de courant permettant de déclencher un potentiel d'action (Veh : 550 ± 33 ohm et PCP : 310 ± 30 ohm; $p < 0,001$ *vs* PCP). Une nouvelle fois, le traitement administré durant l'adolescence permet de prévenir les altérations observées (PCP + SB258585 : 487 ± 39 ohm; $p < 0,01$ *vs* PCP ; PCP + RAPA : 487 ± 24 ohm; $p < 0,01$ *vs* PCP). Par contre, ni le potentiel seuil de déclenchement du potentiel d'action (Veh : -37,63 ± 0,41 mV et PCP : -39,09 ± 0,46 mV; n.s *vs* PCP), ni le firing (Veh : 3,10 ± 0,30 et PCP : 3,50 ± 0,29 ; n.s *vs* PCP) ne sont modifiés entre les différentes conditions (**Figure 55**). Tout comme l'agoniste inverse, l'administration de l'antagoniste neutre des récepteurs 5-HT$_6$ pendant l'adolescence, le CPPQ, permet de restaurer les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux dont le potentiel seuil (PCP + CPPQ : -70,70 ± 0,55 mV ; $p < 0,001$ *vs* PCP) et la rhéobase (PCP + CPPQ : 583 ± 29 ohm ; $p < 0,001$ *vs* PCP) (**Figure 56**). Ces résultats montrent donc que les neurones pyramidaux de la couche V du CPF des souris PCP adultes présentent des altérations de leurs propriétés intrinsèques qui peuvent être prévenues grâce au blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR avec le SB258585, le CPPQ ou la rapamycine. De plus, les souris 5-HT$_6^{-/-}$ injectées avec la PCP au stade néonatal ne présentent pas de modification de ces propriétés au niveau des neurones pyramidaux de la couche V (**Figure 57**).

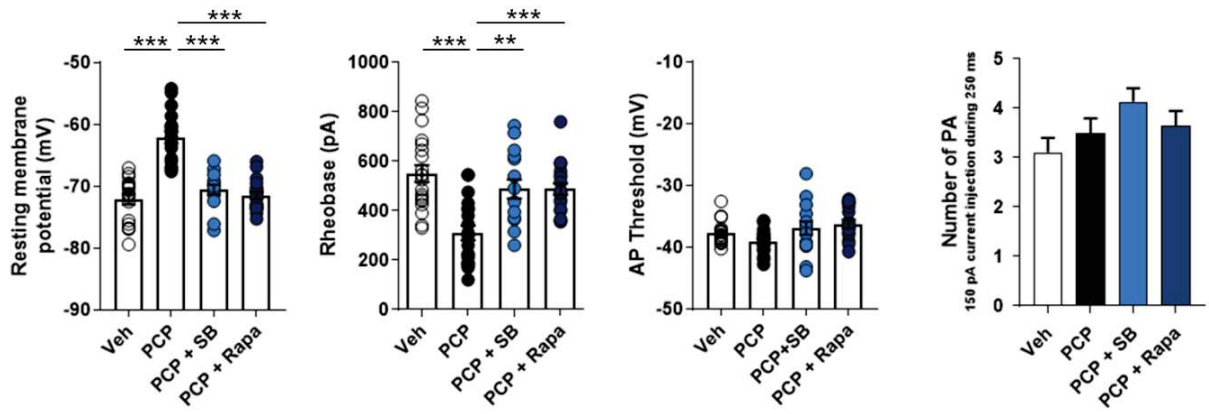


Figure 55 : Le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR prévient les altérations au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF dans le modèle PCP. Les souris PCP (n = 19) présentent une diminution du potentiel de membrane au repos, une diminution de la rhéobase, sans modification du potentiel seuil et du firing, par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 19). Les traitements administrés durant l'adolescence avec le SB258585 (n = 15) ou la rapamycine (n = 18) permettent de prévenir les altérations des propriétés intrinsèques dans le modèle PCP. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. n.s. non significatif $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

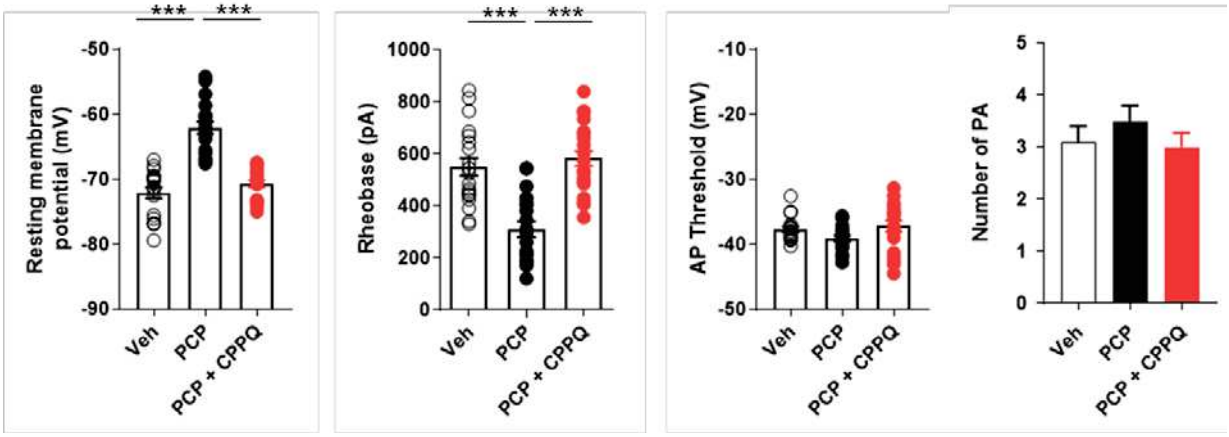


Figure 56 : Le blocage précoce du récepteur 5-HT$_6$ avec un antagoniste neutre, le CPPQ, prévient les altérations au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF dans le modèle PCP. Le traitement durant l'adolescence avec un antagoniste neutre, le CPPQ (n = 18), permet de restaurer les propriétés intrinsèques altérées dans le modèle PCP. Les valeurs des Veh et PCP sont celles obtenues précédemment (**Figure 55).** Ces résultats montrent que l'activité constitutive du récepteur n'est pas impliquée dans les changements obsevés. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. n.s. non significatif $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

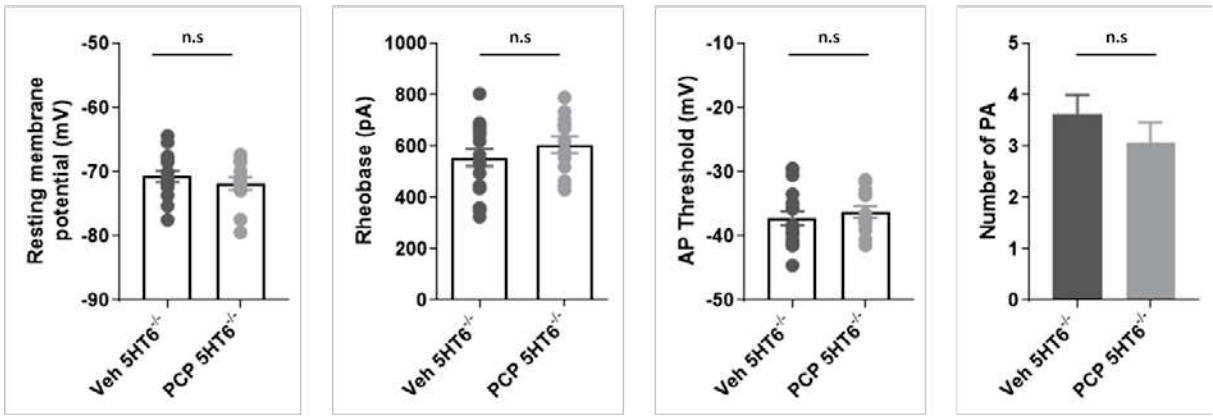


Figure 57 : Les souris 5-HT$_6^{-/-}$ injectées avec la PCP au stade néonatal ne présentent pas d'altération au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF. Veh 5-HT$_6^{-/-}$, n = 17 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$, n = 13. Potentiel de membrane : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: -70,69 ± 0,83 mV; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: -71,78 ± 0,95 mV**.** Rhéoase : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 555 ± 33 ohm ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 606 ± 32 ohm. Potentiel seuil : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: -37,22 ± 1,08 mV; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: -36,27 ± 0,94 mV. Firing : Veh 5-HT$_6^{-/-}$: 3,63 ± 0,38 ; PCP 5-HT$_6^{-/-}$: 3,08 ± 0,38. Analyse statistique : Unpaired t-test, n.s pour non significatif.

Différentes études ont démontré que les canaux HCN1 (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation Channels), perméables au sodium et au potassium, participent au maintien des propriétés intrinsèques telles que le contrôle du potentiel de membrane, l'initiation des potentiels d'action et le maintien de l'excitabilité neuronale (Robinson and Siegelbaum, 2003). Ils ont également un rôle important dans la mémoire de travail (Thuault et al., 2013).

Afin d'explorer l'implication des canaux HCN1 dans les modifications des propriétés intrinsèques observées dans le modèle PCP, un inhibiteur des canaux HCN1, le ZD7288, a été perfusé dans la chambre d'enregistrement, sur les tranches de CPF. Le blocage des canaux HCN1 restaure le potentiel de membrane (PCP + ZD : -72,99 ± 1,01 mV; $p < 0,001$ *vs* PCP) et la rhéobase (PCP + ZD : 583 ± 29 ohm; $p < 0,001$ *vs* PCP) des neurones issus des souris PCP à des valeurs similaires à celles mesurées pour les neurones des souris contrôles (**Figure 58**). Ce résultat suggère que les altérations des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF observées chez les souris PCP impliquent l'activation des canaux HCN1. J'ai donc mesuré l'activation de ces canaux en enregistrant les potentiels qu'ils génèrent lorsqu'ils sont activés (potentiels sag). L'amplitude des potentiels sag est significativement plus élevée pour les neurones pyramidaux de la couche V du CPF issus des souris PCP que pour les neurones des souris contrôles (**Figure 59**). L'amplitude des potentiels sag est restaurée chez les souris ayant reçu le traitement soit avec le SB258585 soit avec la rapamycine pendant l'adolescence. Ainsi le traitement précoce permet de prévenir l'hyperactivation des canaux HCN1 observée dans le modèle PCP (**Figure 60**).

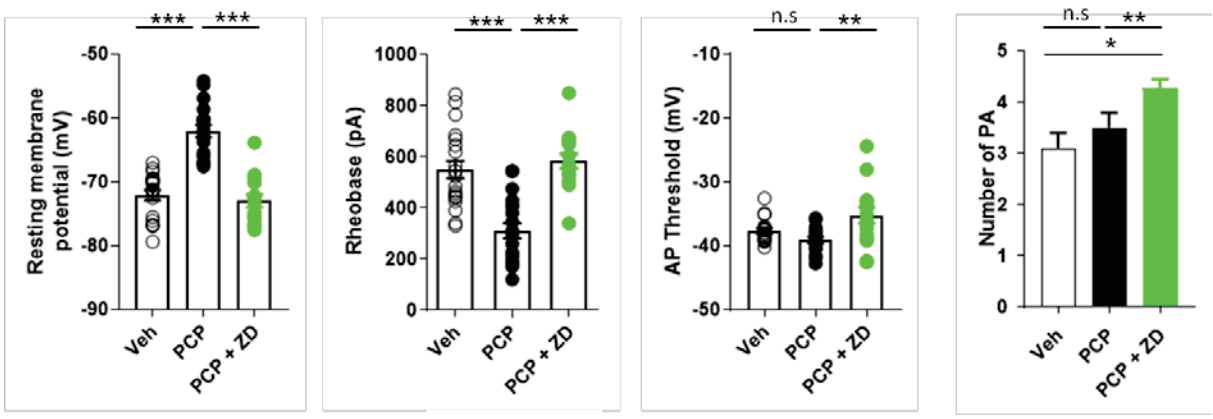


Figure 58 : Les changements au niveau des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF dans le modèle PCP sont dus à une dérégulation des canaux HCN1. La perfusion de ZD dans la chambre d'enregistrement (PCP ; n = 15) permet de restaurer le potentiel de membrane et la rhéobase des neurones corticaux issus des souris PCP. Les valeurs des Veh et PCP sont celles obtenues précédemment (**Figure 55**). PCP + ZD : Potentiel de membrane -72,99 ± 1,01 mV. Rhéobase : 583 ± 29 ohm. Potentiel seuil : -35,23 ± 1,26 mV. Firing : 4,27 ± 0,18. Analyses statistiques : one-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. n.s. non significatif, $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

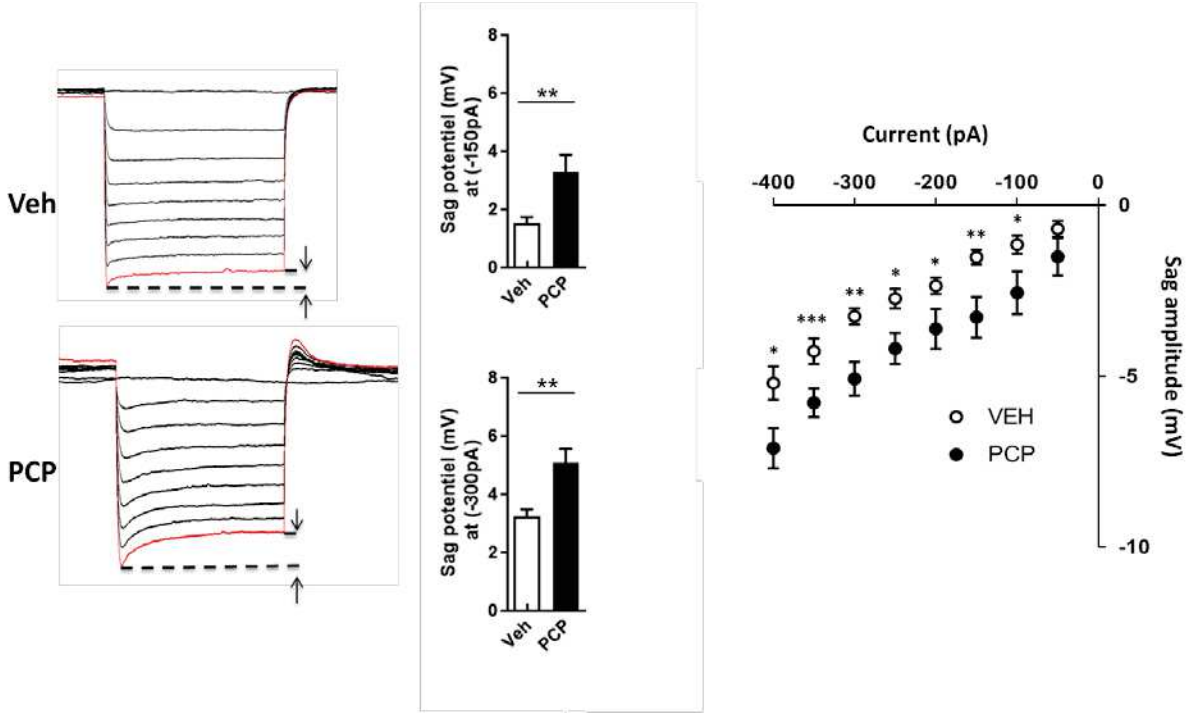


Figure 59 : Activation du canal HCN1 dans le modèle PCP. L'enregistrement des potentiels Sag induits sur des tranches aigües de CPF permet d'observer une augmentation de l'amplitude du potentiel Sag, caractéristique de l'activation des canaux HCN1, dans les neurones corticaux des souris PCP (n = 7) par rapport aux souris contrôles (Veh, n = 9). Sag (-150pA) : Veh : 1,52 ± 0,21 mV ; PCP : 3,27 ± 0,60 mV. Sag (-300pA) : Veh : 3,24 ± 0,23 mV ; PCP : 5,07 ± 0,49 mV. Analyse statistique : unpaired t-test, n.s. non significatif, $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

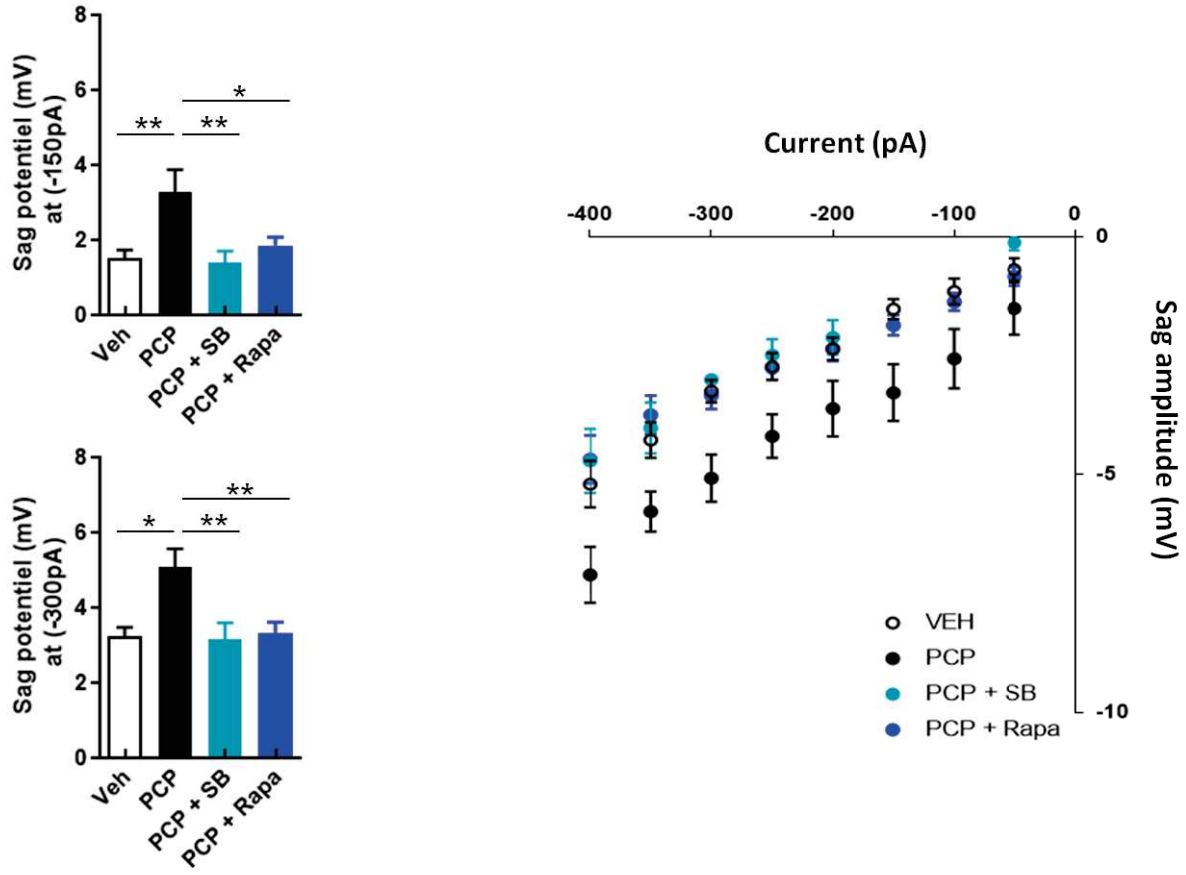


Figure 60 : Le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR permet de prévenir l'hyperactivation des canaux HCN1. L'amplitude du potentiel Sag est diminuée chez les souris PCP traitées durant toute l'adolescence avec le SB28585 (n = 9) et la rapamycine (n = 15) par rapport aux souris PCP (n = 7). Sag (-150pA) : PCP + SB258585 : 1,40 ± 0,30 mV ; PCP + RAPA : 1,86 ± 0,21 mV. Sag (-300pA) : PCP + SB258585 : 3,16 ± 0,43 mV ; PCP + RAPA : 3,33 ± 0,29 mV. Analyse statistique : unpaired t-test, n.s. non significatif, $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

Ainsi, au cours de cette étude j'ai pu mettre en évidence (**Figure 61**) dans un modèle pharmacologique de schizophrénie que les souris présentent à l'âge adulte : **1)** une activation non-physiologique et soutenue de la voie mTOR spécifiquement dans le CPF, **2)** des déficits de mémoire sociale (test de crawley), de mémoire de reconnaissance (test de reconnaissance d'un objet dit nouveau – NOR) et de mémoire associative (test de modification de placement d'objets – OIP), **3)** une diminution de la transmission synaptique inhibitrice entraînant un déséquilibre de la balance excitation/inhibition au niveau du CPF associée à **4)** une altération des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF due à une dérégulation des canaux HCN1 (courant Ih).

Chacune des altérations observées à l'âge adulte dans le modèle PCP est prévenue (**Figure 61**) par le blocage précoce durant l'adolescence de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. En effet, durant l'adolescence (J30-J45), l'administration de l'inhibiteur de mTOR , la rapamycine (1,5 mg/kg), d'un agoniste inverse du récepteur 5-HT$_6$, le SB258585 (2,5 mg/kg), ou d'un antagoniste neutre des récepteurs 5-HT$_6$, le CPPQ (2,5mg/kg) **1)** prévient l'activation soutenue et non-physiologique de mTOR au niveau du CPF, **2)** rétablit la transmission synaptique inhibitrice, les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche V du CPF ainsi que l'activité des canaux HCN1, et **3)** prévient les

déficits cognitifs observés à l'âge adulte. Le fait que les deux molécules ciblant le récepteur, l'agoniste inverse et l'antagoniste neutre, prévient l'ensemble de ces altérations suggèrent que l'activation de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR dépend d'une modification de la transmission sérotoninergique plutôt que d'une activité constitutive du récepteur.

J'ai également démontré que si ce traitement avec le SB258585 est administré aux souris PCP à l'âge adulte (de J60 à J75), ils n'induisent qu'un bénéfice transitoire (**Figure 61**) (effet seulement si le test est réalisé quelques minutes après le traitement). En effet, quinze jours après la dernière injection du traitement, les déficits cognitifs sont toujours présents démontrant que le traitement administré à l'âge adulte ne constitue qu'un traitement symptomatique. Ces données renforcent la pertinence d'administrer le traitement précocement afin de prévenir l'émergence des déficits cognitifs observés dans la schizophrénie.

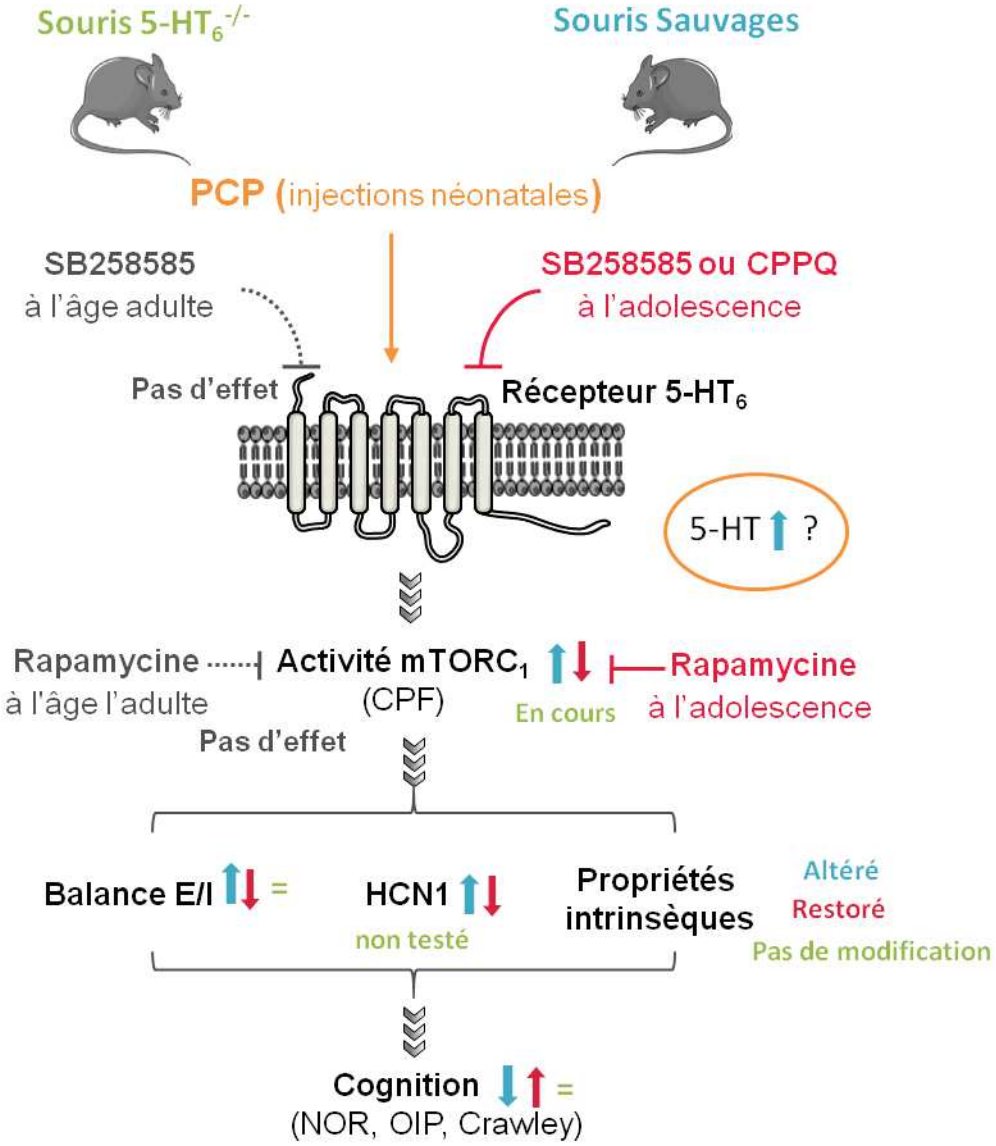


Figure 61 : Schéma récapitulatif des altérations observées dans le modèle d'injections néonatales de PCP et des bénéfices d'un blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. En vert : effets de la PCP sur les souris 5-HT$_6^{-/-}$. En bleu : effets de la PCP injectées au stade néonatal aux souris sauvages. Effets du traitement avec les inhibiteurs de la voie de signalisations 5-HT$_6$-mTOR administrés durant l'adolescence (en rouge) et à l'âge adulte (en gris) aux souris sauvages injectées à la PCP au stade néonatal.

L'ensemble de ces résultats indique que le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR constitue donc une stratégie efficace pour prévenir les altérations synaptiques et les déficits cognitifs associés, dans un modèle pharmacologique et neuro-développemental de la schizophrénie.

B. Implication de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR dans un modèle de consommation chronique de cannabis durant l'adolescence

a. Contexte de l'étude

Le cannabis est une des drogues récréatives dont la consommation est la plus répandue dans le monde. Au cours des dernières décennies, elle n'a cessé d'accroître et de se banaliser chez les adolescents et les jeunes adultes. L'augmentation de la concentration de THC (delta9-tetrahydrocannabinol, principal produit psychoactif) dans les plants cultivés, la fréquence plus importate de la prise de cannabis et l'abaissement de l'âge de sa consommation chez les jeunes, rendent la situation inquiétante (World drug report) (Hall and Babor, 2000). En effet, plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence un taux plus élevé de psychose chez les fumeurs de cannabis (augmentation du risque de 40 % environ) et soulignent l'existence d'un effet dose (teneur en THC), avec un risque multiplié par deux chez les plus gros consommateurs (Arseneault et al., 2002; Ashton, 2003; Bossong and Niesink, 2010; Haney and Evins, 2016; Henquet et al., 2005; Linszen et al., 1994; Martinez-Arevalo et al., 1994; Moore et al., 2007). Ces études suggèrent que l'abus de cannabis durant l'adolescence, qui comme nous l'avons vu précédemment, peut être considérée comme une période critique de maturation du CPF favorise l'apparition subséquente de déficits irréversibles dans les fonctions exécutives, la mémoire de travail, l'apprentissage et l'attention par exemple (Tirado-Muñoz et al., 2020). Ces déficits, qui affectent considérablement la qualité de vie des patients et leur insertion socio-professionnelle, sont similaires à ceux observés dans la schizophrénie, suggérant des mécanismes moléculaires communs.

L'objectif de cette étude a été de :

1) caractériser au niveau du CPF les perturbations synaptiques induites par une consommation chronique de cannabis durant l'adolescence chez la souris ainsi que dans un modèle développemental de schizophrénie ;

2) démontrer que la voie mTOR est impliquée dans ces dérégulations synaptiques et les déficits cognitifs associés ;

3) déterminer si la voie 5-HT$_6$-mTOR peut constituer une cible thérapeutique innovante (traitement précoce par des antagonistes 5-HT$_6$) pour traiter ou prévenir ces déficits à l'âge adulte. Le but a donc été d'évaluer les bénéfices à l'âge adulte d'un blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR dans un modèle de consommation chronique de THC durant l'adolescence.

b. Résumé des résultats

Ainsi nous avons pu mettre en évidence qu'une consommation chronique de cannabis durant l'adolescence entraine à l'âge adulte une activation non physiologique et soutenue de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR, au niveau du CPF associée à :

- Des déficits cognitifs tels que des altérations dans la sociabilité et la mémoire de travail.
- Une altération dans la balance excitation/inhibition avec une augmentation de la transmission synaptique glutamatergique et une diminution de la transmission GABAergique au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du CPF.
- Une dérégulation de la plasticité synaptique avec notamment une altération de la LTD
- Une altération des propriétés intrinsèques associée à une hyperactivation des canaux HCN1 dépendante de l'AMPc intracellulaire.

Nous avons également démontré que le blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR avec la rapamycine ou le SB258585, administrés pendant l'adolescence, permet d'abolir chez les animaux adultes l'ensemble des altérations synaptiques et neuronales ainsi que les déficits cognitifs associés. Enfin, l'administration durant l'adolescence de l'antagoniste neutre des récepteurs 5-HT$_6$, le CPPQ, prévient l'activation non physiologique de mTOR ainsi que les altérations observées au niveau des propriétés intrinsèques. Cela suggère que celles-ci ne sont pas dues à une augmentation de l'activité constitutive du récepteur mais très probablement à l'activation des récepteurs 5-HT$_6$ par leur ligand endogène, la sérotonine.

L'ensemble de ces altérations n'est pas prévenu par le blocage « tardif » de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR, à l'âge adulte (c'est-à-dire après la période critique de maturation du CPF) dans ce modèle. L'adolescence correspond donc à la fenêtre thérapeutique la plus optimale pour bloquer cette voie de signalisation et prévenir l'apparition des déficits.

Article

SOURCE DATA | TRANSPARENT PROCESS

EMBO Molecular Medicine

Early 5-HT$_6$ receptor blockade prevents symptom onset in a model of adolescent cannabis abuse

Coralie Berthoux[1], Al Mahdy Hamieh[1,†], Angelina Rogliardo[1,†], Emilie L Doucet[1], Camille Coudert[1,2], Fabrice Ango[1], Katarzyna Grychowska[3], Séverine Chaumont-Dubel[1], Pawel Zajdel[3], Rafael Maldonado[4],Joël Bockaert[1], Philippe Marin[1,‡] & Carine Bécamel[1,‡,*]

Abstract

Cannabis abuse during adolescence confers an increased risk for developing later in life cognitive deficits reminiscent of those observed in schizophrenia, suggesting common pathological mechanisms that remain poorly characterized. In line with previous findings that revealed a role of 5-HT$_6$ receptor-operated mTOR activation in cognitive deficits of rodent developmental models of schizophrenia, we show that chronic administration of Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) to mice during adolescence induces a long-lasting activation of mTOR in prefrontal cortex (PFC), alterations of excitatory/inhibitory balance, intrinsic properties of layer V pyramidal neurons, and long-term depression, as well as cognitive deficits in adulthood. All are prevented by administrating a 5-HT$_6$ receptor antagonist or rapamycin, during adolescence. In contrast, they are still present 2 weeks after the same treatments delivered at the adult stage. Collectively, these findings suggest a role of 5-HT$_6$ receptor-operated mTOR signaling in abnormalities of cortical network wiring elicited by THC at a critical period of PFC maturation and highlight the potential of 5-HT$_6$ receptor antagonists as early therapy to prevent cognitive symptom onset in adolescent cannabis abusers.

Keywords 5HT$_6$ receptor; adolescent cannabis abusers; cognitive deficits; mTOR; synaptic transmission

Subject Categories Pharmacology & Drug Discovery; Development; Neuroscience

DOI 10.15252/emmm.201910605 | Received 15 March 2019 | Revised 5 March 2020 | Accepted 10 March 2020 | Published online 24 April 2020

EMBO Mol Med (2020) 12: e10605

Introduction

Cannabis is the most commonly used recreational drug worldwide, and the last 30 years have been marked by a dramatic increase in cannabis consumption at an increasingly early age by young people in most developed countries (Hall & Babor, 2000). Epidemiological studies suggest that cannabis abuse during adolescence confers an increased risk for developing later in life psychotic symptoms and neurocognitive alterations reminiscent of those observed in schizophrenia (D'Souza *et al*, 2009; Evins *et al*, 2012). Moreover, neuroimaging studies in adolescent cannabis users revealed structural abnormalities and altered neural activity in the prefrontal cortex (PFC) during resting state and several types of cognitive paradigms, suggesting a critical role of this brain region in the core cognitive symptoms associated with cannabis abuse during adoles- cence (Schweinsburg *et al*, 2008; Batalla *et al*, 2013). Likewise, chronic administration of D^9-tetrahydrocannabinol (THC), the main psychoactive constituent of cannabis, to adolescent rats, induces behavioral alterations and cognitive deficits in adulthood that reflect, at least in part, PFC dysfunction (Schneider & Koch, 2003; O'Shea *et al*, 2006; Malone *et al*, 2010; Renard *et al*, 2013, 2017; Rubino & Parolaro, 2013, 2016; Zamberletti *et al*, 2014).

The PFC undergoes highly orchestrated maturation processes during adolescence. These include sprouting and pruning of synapses, refinement of circuit connectivity and of various neurotransmitter systems, such as glutamatergic, GABAergic, dopaminergic, and endocannabinoid systems (Spear, 2000; Rubino & Parolaro, 2016). It is conceivable that any interference with these maturational events such as chronic cannabis consumption during adolescence would lead to irreversible alterations of PFC connectivity and functionality that represent a risk factor for neuropsychiatric disorders in adulthood (Arseneault *et al*, 2004; Stefanis *et al*, 2004; Renard *et al*, 2014). Consistent with this hypothesis and underscor- ing the vulnerability of the adolescent brain to cannabis exposure, chronic administration of THC to adult rats (at similar doses to those injected in adolescent animals) does not reproduce the long- lasting cognitive deficits observed in THC-injected adolescent animals (Spear, 2000; Rubino & Parolaro, 2013).

Among the targets currently under investigation to alleviate cognitive deficits associated with various neuropsychiatric

1 IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France
2 Department of Adult Psychiatry, Montpellier University Hospital, Montpellier, France
3 Department of Medicinal Chemistry, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland
4 Neuropharmacology Laboratory, Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain
*Corresponding author. Tel: +33 434 35 92 15; Fax: + 33 467 54 24 32; E-mail: carine.becamel@igf.cnrs.fr

† These authors contributed equally to this work as second authors

‡ These authors contributed equally to this work as last authors

disorders, including schizophrenia, the serotonin 5-HT_6 receptor still raises particular interest in view of its high expression level in brain regions involved in mnemonic functions and the pro-cognitive effects of 5-HT_6 receptor blockade in a broad range of cognitiveparadigms in rodents (Codony *et al*, 2011; Yun & Rhim, 2011). In an effort to identify signaling mechanisms underlying cognition control by the 5-HT_6 receptor, we previously demonstrated that receptor- operated activation of mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) in PFC underlies cognitive deficits in two rat developmental models of schizophrenia, namely neonatal phencyclidine administration and rearing in social isolation after weaning (Meffre *et al*, 2012). These results are consistent with the role of non-physiological mTOR activation in cognitive impairment observed in genetic forms of autism spectrum disorders (ASD) and Down's syndrome (Ehninger *et al*, 2008; Ehninger & Silva, 2011; Troca-Marin *et al*, 2012). Likewise, a previous study has shown that acute THC administration to adult mice induces an activation of mTOR that underlies the associated amnesic-like effects (Puighermanal *et al*, 2009).

In addition to its well-described role in cognition, the 5-HT_6 receptor has recently emerged as a key regulator of neurodevelopmental processes such as neuronal migration (Dayer *et al*, 2015), neurite growth (Duhr *et al*, 2014), and dendritic protrusion (Rah-man *et al*, 2017). Though the role of mTOR, under the control of 5-HT_6 receptor, in these neurodevelopmental mechanisms remains to be established, a large body of evidence indicates that the proper structural and functional development of brain circuitry depends on the fine tuning of mTOR signaling that has also a key influence upon synaptic transmission and synaptic plasticity in the mature brain (Swiech *et al*, 2008; Kim *et al*, 2009; Bockaert & Marin, 2015).

In light of these findings, we hypothesized that chronic cannabis abuse during adolescence might induce a persistent non-physiological activation of mTOR in adolescent brain that might lead to abnormalities in PFC maturation and cognitive impairment at the adult stage. The implication of 5-HT_6 receptors in these deficits and the underlying alterations of synaptic transmission remain to be established, an issue we have explored in the present study, using mice injected daily with THC between post-natal days (PNDs) 30 and 45 as a model of cannabis abuse during adolescence. We show that this treatment induces a sustained activation of mTOR signaling in PFC, an alteration of both GABAergic and glutamatergic synaptic transmissions and impairment of LTD in the PFC at layer I/V synapses and deficits in novel object recognition, sociability, and social discrimination in adulthood, which are all prevented by early administration (during adolescence) of the 5-HT_6 receptor antagonist SB258585 or the mTOR inhibitor rapamycin. Additional experiments were undertaken to characterize THC-induced modifications of intrinsic properties of layer V pyramidal neurons and whetherthey can be prevented by blocking 5-HT_6 receptor-operated mTOR signaling during adolescence.

Results

5-HT_6 receptors mediate delayed mTOR activation elicitedby THC administration to adolescent mice

We used a preclinical model of cannabis abuse in adolescent mice, consisting of daily administration of THC (5 mg/kg, i.p.) betweenPNDs 30 and 45 (Fig 1A). This treatment induced in adulthood a marked increase in the phosphorylation level of mTOR at $Ser^{2448}$and of its substrate 70 kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) at Thr^{389} in the PFC (Fig 1B) but not in the hippocampus (Appendix Fig S1), compared to control mice injected with saline solution (vehicle), indicative of a sustained activation of mTOR signaling in PFC. As expected, THC administration did not promote mTOR activation in cannabinoid type 1 (CB_1) receptor-deficient

Figure 1. Administration of THC during adolescence to mice induces mTOR activation in the PFC and cognitive deficits in adulthood that depend on 5-HT_6 receptors.

A. Schema of the experimental paradigm used for drug administration. Mice were injected daily with THC (5 mg/kg) or vehicle (Veh) during adolescence, from PNDs 30to 45. SB258585 (SB, 2.5 mg/kg) or rapamycin (Rapa, 1.5 mg/kg) was administered concomitantly with THC or vehicle. Biochemical and behavioral experiments were performed from PND 60.

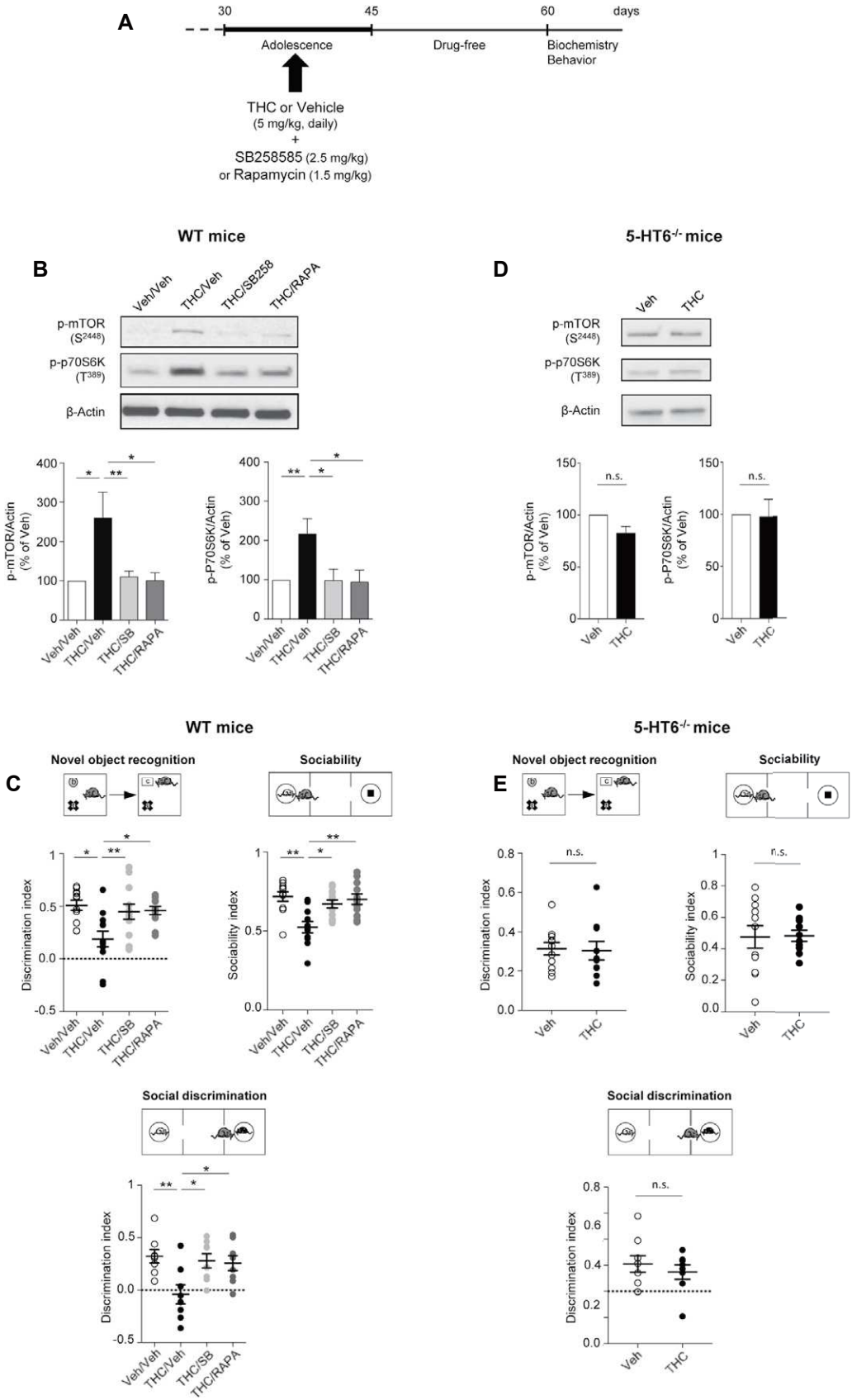
B. Top: representative Western blots assessing mTOR phosphorylation at S^{2448} and p70S6K phosphorylation at T^{389} as indexes of mTOR activity in PFC of adult WT mice are illustrated. Bottom: data represent the ratios of immunoreactive signals of the anti-phospho-mTOR (S^{2448}) or anti-phospho-p70S6K (T^{389}) antibodies to the immunoreactive signal of the anti-b-actin antibody and are expressed in % of values in vehicle-injected WT mice. They are the means SEM of results obtained in five mice per group. *P < 0.05; **P < 0.01, one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test.

C. Top: schemas illustrating the behavioral tasks performed in WT mice. Bottom: the plots represent the discrimination index for the novel object recognition task (vehicle: N = 11, THC: N = 11, THC + SB: N = 11, THC + Rapa: N = 12), the sociability index (vehicle: N = 11, THC: N = 11, THC + SB: N = 11, THC + Rapa: N = 12), and the discrimination index for the social discrimination task (N = 8 for each group), measured in each condition. *P < 0.05, **P < 0.01, one-way ANOVA followed by Bonferroni test (bars and error bars correspond to the mean SEM, the dotted line to a discrimination index (exploration of novel object — exploration of familiar object/total object exploration) equal to zero).

D. Top: representative Western blots assessing mTOR phosphorylation at S^{2448} and p70S6K phosphorylation at T^{389} in the PFC of adult 5-$HT_6^{-/-}$ mice are illustrated. Bottom: data represent the ratios of immunoreactive signals of the anti-phospho-mTOR (S^{2448}) or anti-phospho-p70S6K (T^{389}) antibodies to the immunoreactive signal of the anti-b-actin antibody and are expressed in % of values in vehicle-injected 5-$HT_6^{-/-}$ mice. They are the means SEM of results obtained in four mice per group. n.s. P > 0.05, one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test.

E Top: schemas illustrating the behavioral tasks in 5-$HT_6^{-/-}$ mice. Bottom: the plots represent the discrimination index for the novel object recognition test (discrimination index: 0.30 0.05, N = 10, and 0.31 0.03, N = 11, for THC + vehicle and vehicle + vehicle conditions, respectively, P > 0.05), the 3-chamber social preference test (sociability index: 0.49 0.04, N = 10, and 0.48 0.07, N = 11, for THC + vehicle and vehicle + vehicle conditions, respectively, P > 0.05) and the social discrimination test (discrimination index: 0.15 0.06, N = 8, and 0.21 0.06, N = 8, for THC + vehicle and vehicle + vehicle conditions, respectively, P > 0.05), measured in each condition. One-way ANOVA followed by Bonferroni test (bars and error bars correspond to the mean SEM, the dotted line corresponds to a discrimination index equal to zero).

 ª 2020 The Authors


A
30
45
60
days
Adolescence
Drug-free
Biochemistry
Behavior
THC or Vehicle
(5 mg/kg, daily)
+
SB258585 (2.5 mg/kg)
or Rapamycin (1.5 mg/kg)
WT mice
5-HT6-/- mice
B
D
Veh/Veh
THC/Veh
THC/SB258
THC/RAPA
Veh
THC
p-mTOR (S2448)
p-p70S6K (T389)
β-Actin
p-mTOR/Actin (% of Veh)
p-P70S6K/Actin (% of Veh)
n.s.
C
E
Novel object recognition
Sociability
Discrimination index
Sociability index
Social discrimination

mice ($CB_1^{-/-}$ mice, Fig EV1A), confirming that THC mediates its effects through CB_1 receptors. The persistent elevation of phospho- rylated mTOR and p70S6K elicited by THC administration during adolescence was prevented by the concomitant injection (between PNDs 30 and 45) of either SB258585 (2.5 mg/kg), a 5-HT_6 receptor antagonist (Hirst *et al*, 2000), or rapamycin (1.5 mg/kg), a pharma- cological mTOR inhibitor (Fig 1B). Administration of SB258585 or rapamycin during adolescence did not significantly affect the basal phosphorylation state of mTOR and p70S6K in the PFC of vehicle- injected mice (Appendix Fig S2A). Further supporting the role of 5- HT_6 receptors in the THC-mediated effects, administration of THC during adolescence did not induce mTOR activation in the PFC of 5- HT_6 receptor-deficient mice (5-$HT_6^{-/-}$ mice, Fig 1D).

$5HT_6$ receptors are known to exhibit a high level of constitutive activity both *in vitro* and *in vivo* (Kohen *et al*, 2001; Purohit *et al*, 2003; Duhr *et al*, 2014; Deraredj Nadim *et al*, 2016) that is inhibited by SB258585 (Duhr *et al*, 2014), which thus behaves as an inverse agonist. Administration of the recently characterized $5HT_6$ recep-tor neutral antagonist CPPQ ((S)-1-[(3-chlorophenyl)sulfonyl]-4-(pyrrolidine-3-yl-amino)-1H-pyrrolo[3,2-c]quinolone, 2.5 mg/kg) (Deraredj Nadim *et al*, 2016; Grychowska *et al*, 2019) to mice injected with THC during adolescence prevented the persistent elevation of mTOR and p70S6K phosphorylation observed in adulthood(Fig EV1B), suggesting that mTOR activation is due to the activation of 5-HT_6 receptors by endogenously released 5-HT rather than agonist-independent activity.

Immunostaining of CB_1 and 5-HT_6 receptors showed distinct neuronal localizations of both receptors in the mouse PFC. Consistent with previous findings, CB_1 receptors are mainly local- ized presynaptically on GABAergic neurons (as shown by their co-localization with the presynaptic protein Bassoon, Fig 2A, and the GABAergic marker GAD65, Fig 2B; Eggan & Lewis, 2007; Cathel *et al*, 2014) while negligible receptor amounts were detected on 5-HT terminals (Fig 2D). A fraction of CB_1 receptors was also found at the postsynapse (co-localization with PSD-95, Fig 2C), corroborating previous findings (Maroso *et al*, 2016). Conversely, 5-HT_6 receptors are mostly localized at the postsy- napse (Fig 2E–G). Furthermore, no co-localization of CB_1 and $5HT_6$ receptors was found within PFC neurons (Fig 2H). Collec- tively, these anatomical observations suggest that the long-lasting activation of mTOR signaling in the PFC of THC-injected mice does not result from a crosstalk between CB_1 and 5-HT_6 receptor- operated signaling but rather from a cross-correlative action on the neuronal cortical network.

Early blockade of 5-HT_6 receptor-operated mTOR signaling prevents cognitive deficits induced by THC administration during adolescence

As previously observed in the rat (O'Shea *et al*, 2006), mice exposed to THC during adolescence showed later in life deficits in behavioral tasks assessing cognitive functions that depend on PFC among other regions: the novel object recognition test (discrimination index: 0.19 0.07, $N = 12$, and 0.51 0.05, $N = 11$, for THC + vehicle and for vehicle + vehicle conditions, respectively, $P < 0.001$, Fig 1C, left panel), the 3-chamber social preference test (sociability index: 0.71 0.03, $N = 11$, and 0.52 0.03, $N = 11$, for THC + vehicle and for vehicle + vehicle conditions, respectively, $P < 0.001$, Fig 1C, right panel) and the social discrimination test (discrimination index: −0.04 0.09, $N = 8$, and 0.32 0.06, $N = 8$, for THC + vehicle and for vehicle + vehicle conditions, respectively, $P < 0.01$, Fig 1C, bottom panel). In contrast, administration of THC to mice during adolescence did not alter locomotion nor induced an anxiety pheno- type in adulthood (Fig EV2).

Given the deleterious influence of non-physiological mTOR activation upon cognition in various neuropsychiatric conditions (Hoeffer & Klann, 2010; Bockaert & Marin, 2015) and its role in cognitive deficits induced by cannabis intake, we next explored whether blocking 5-HT_6 receptor-elicited mTOR elevation in adolescent mice exposed to THC prevents the associated cogni- tive impairments in adulthood. THC-injected mice treated with SB258585 or rapamycin during adolescence showed a similarperformance as vehicle-injected animals in the novel object recognition task (discrimination index: 0.45 0.07, $N = 12$, and 0.46 0.04, $N = 11$, for THC + SB and THC + Rapa conditions, respectively, $P > 0.05$ vs. vehicle/vehicle mice, Fig 1C, left panel), the social preference test (social index: 0.67 0.02,$N = 12$, and 0.70 0.03, $N = 11$, for THC + SB and for THC + Rapa conditions, respectively, $P > 0.05$ vs. vehicle mice, Fig 1C, right panel) and the social discrimination test (discrimi- nation index: 0.28 0.06, $N = 8$, and 0.25 0.07, $N = 8$, for THC + SB and for THC + Rapa conditions, respectively, $P > 0.05$vs. vehicle mice, Fig 1C, bottom panel). SB258585 or rapamycin administration to vehicle-treated mice did not alter their perfor- mance in each of these tests (Appendix Fig S2B). Likewise, THC administration to 5-$HT_6^{-/-}$mice during adolescence did not alter their performance in these three behavioral tasks (Fig 1E). Collectively, these results demonstrate that the chronic intake of THC during adolescence induces a 5-HT_6 receptor-dependent

Figure 2. Localization of 5-HT_6 and CB_1 receptors in the prefrontal cortex.

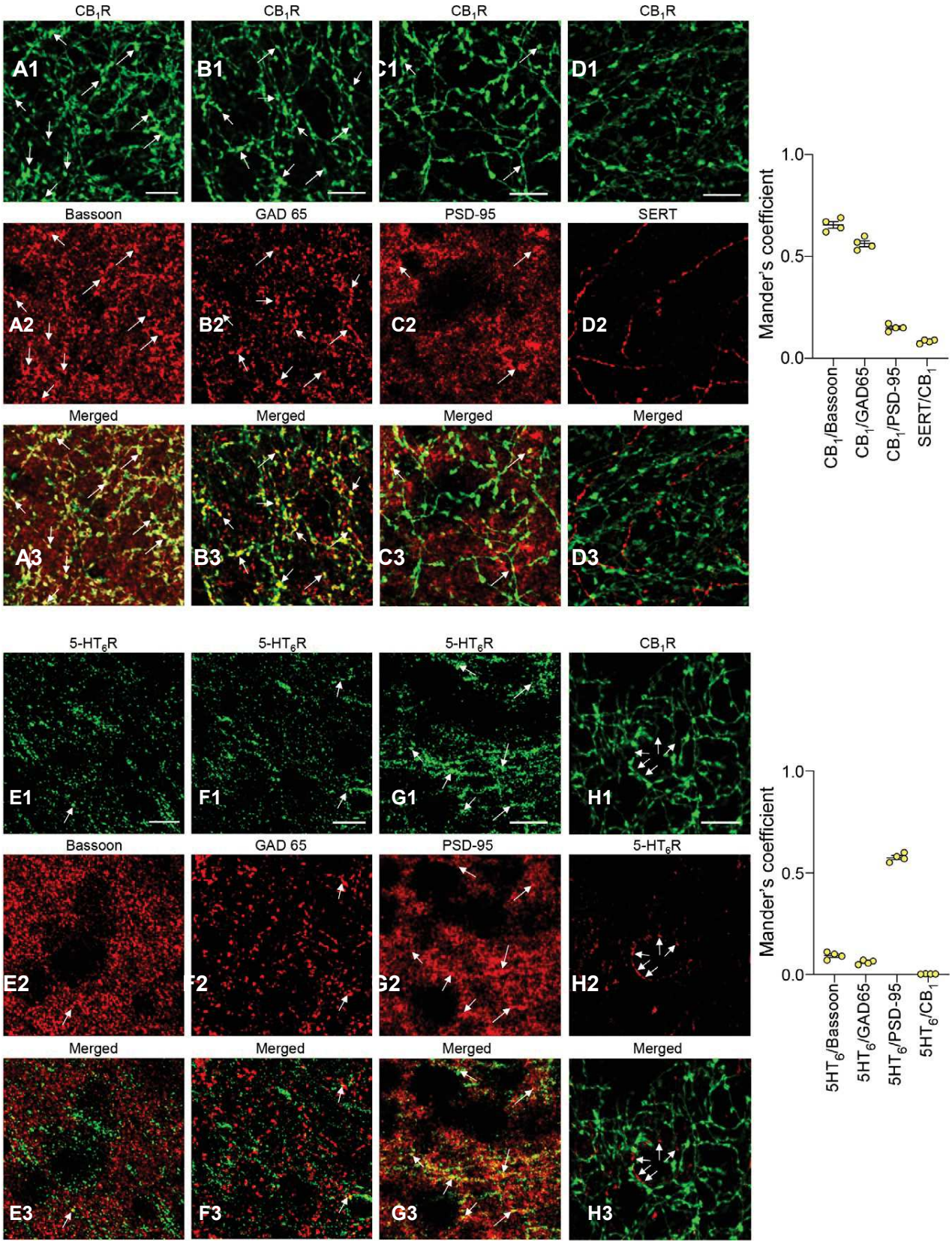
A-E The PFC was stained with CB_1 receptor (A1-D1, green) or $5HT_6$ receptor (E1-H1, green), Bassoon (A2 and E2, red), GAD65 (B2 and F2, red), PSD-95 (C2 and G2, red), or SERT (D2 and H2, red) antibodies. Merge images are also depicted (A3-H3). CB_1 receptors were mainly co-localized with the presynaptic marker Bassoon (white arrows, A3), mostly within GABAergic boutons (white arrows, B3) and to a lesser extend with PSD-95 (white arrows, C3) and SERT (D3), while 5-HT_6 receptors were mainly co-localized with PSD-95 (white arrows, G3). No co-localization of CB_1 and 5-HT_6 receptors was detected (white arrows indicate the 5-HT_6 staining, H3).

Scale bar: 10 lm. The scatter plot represents the co-localization analysis for CB_1 and 5-HT_6 receptor immunostainings. *Graph on the top.* Mander's split coefficient was used to identify the fraction of CB_1 receptors that co-localizes with Bassoon (Mander's coefficient: 0.66 0.02, $n = 4$), GAD65 (Mander's coefficient:

0.56 0.01, $n = 4$), PSD95 (Mander's coefficient: 0.15 0.01, $n = 4$), or SERT (Mander's coefficient: 0.082 0.004, $n = 4$). *Graph on the bottom*. Mander's split coefficient was used to identify the fraction of 5-HT_6 receptors that co-localizes with Bassoon (Mander's coefficient: 0.09 0.01, $n = 4$), GAD65 (Mander's coefficient: 0.059 0.004, $n = 4$), PSD95 (Mander's coefficient: 0.58 0.01, $n = 4$), or CB1 receptors (Mander's coefficient: 0.0020 0.0004, $n = 4$). Bars and error bars correspond to the mean SEM.

Source data are available online for this figure.

 a 2020 The Authors


CB1R
A1
B1
C1
D1
Bassoon
GAD 65
PSD-95
SERT
A2
B2
C2
D2
Merged
A3
B3
C3
D3
Mander's coefficient
1.0
0.5
0.0
CB1/Bassoon
CB1/GAD65
CB1/PSD-95
SERT/CB1
5-HT6R
E1
F1
G1
H1
E2
F2
G2
H2
E3
F3
G3
H3
5HT6/Bassoon
5HT6/GAD65
5HT6/PSD-95
5HT6/CB1

long-lasting activation of mTOR signaling in the PFC that causes cognitive deficits in adulthood.

Effects of THC administration and of blocking the 5-HT$_6$/mTORpathway in adulthood

To explore whether blocking 5-HT$_6$ receptor-mediated mTOR activation during adulthood could also have a delayed beneficial influence upon cognition, mice injected with THC during adolescence were treated with SB258585 (2.5 mg/kg) or rapamycin(1.5 mg/kg) during 2 weeks *at the adult stage* (daily injections from PND 60 to 75). Biochemical analysis and behavioral studies were performed 2 weeks after the last injection of the 5-HT$_6$ receptor antagonist or rapamycin (PND 90, Fig 3A). A significant increase in phosphorylated mTOR and p70S6K was observed at PND 90 in THC-injected mice, compared with vehicle-injected mice, and this mTOR overactivation was not affected by SB258585 or rapamycin administration at the adult stage (Fig 3B). Moreover, performances were similar in the THC-injected mice treated or not with SB258585 or rapamycin in adulthood in thenovel object recognition task (Fig 3C). These results demonstratethat blocking the 5-HT$_6$/mTOR signaling pathway at the adult stage in mice injected with THC during adolescence does not abolish the long-lasting activation of mTOR and, consequently, does not induce persistent cognitive improvements.

We also administered THC from PNDs 60 to 75 (Fig EV3A) to determine whether its long-term deleterious effects upon mTOR signaling and cognition are really restricted to the juvenile period. Analysis of mTOR signaling 15 days after the last THC injection (PND 90) did not present any change in the phosphorylation state of mTOR and p70S6K in THC-treated mice (Fig EV3B). Correspond- ingly, THC administration at the adult stage did not induce a persis- tent deficit in novelty discrimination in the novel object recognition test in the same time frame (Fig EV3C).

Alterations of GABAergic and glutamatergic synaptic transmissions in THC-injected mice during adolescence are prevented by early blockade of 5-HT$_6$-elicited mTOR activation

To determine whether chronic THC consumption during adoles- cence affects prefrontal synaptic transmission in adulthood, we analyzed the excitatory and inhibitory synaptic transmissions in acute slices of medial PFC. We performed whole-cell patch-clamp recordings of layer V pyramidal neurons, which integrate excitatory inputs from cortical and sub-cortical areas and measured the ampli- tude and the frequency of both GABA receptor-mediated miniatureinhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) and AMPA receptor- mediated miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs). THC-injected mice showed a robust decrease in mIPSC frequency, whereas their amplitude was not affected (Fig 4B), suggesting a defect in GABA release. Furthermore, in experimental conditions where the inhibitory transmission was initially blocked, mEPSC frequency was significantly increased with no change in their amplitude (Fig 4C). THC-induced alterations of GABAergic and glutamatergic transmissions were abolished by SB258585 or rapa- mycin administration during adolescence (Fig 4B and C). In mice injected with vehicle during adolescence, neither SB258585 nor rapamycin administration significantly affected mIPSC or mEPSC

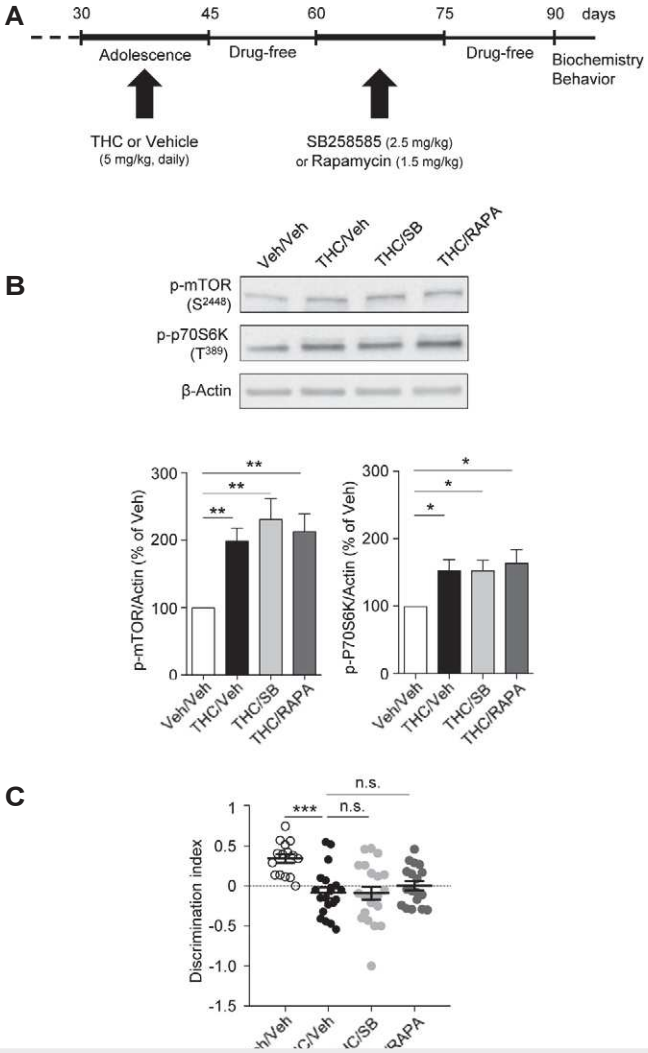


Figure 3. THC-induced long-lasting mTOR activation and cognitive deficits are not inhibited by the administration of SB258585 or rapamycinin adulthood.

A Schema of the experimental paradigm used for drug administration. Mice were injected daily with THC (5 mg/kg) or vehicle (Veh) during adolescence,from PNDs 30 to 45. Vehicle and THC-injected mice were treated daily witheither vehicle or SB258585 (SB, 2.5 mg/kg) or rapamycin (Rapa, 1.5 mg/kg) from PNDs 60 to 75. Biochemical and behavioral experiments were performed from PND 90.

B Top: representative Western blots assessing mTOR activity in PFC are illustrated. Bottom: data represent the ratios of immunoreactive signals of the anti-phospho-mTOR (S^{2448}) or anti-phospho-p70S6K (T^{389}) antibodies to the immunoreactive signal of the anti-b-actin antibody and are expressed

in % of values in vehicle-injected mice. They are the means SEM of results obtained in six mice per group. *P < 0.05; **P < 0.01, one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test.

C The plots represent the discrimination index measured in each condition. ***P < 0.001, one-way ANOVA followed by Bonferroni test. The discrimination index for the novel object recognition task is 0.34 0.06(N = 14) and –0.08 0.07 (N = 20), for mice injected with vehicle and THC, respectively, P < 0.001 and –0.09 0.08 (N = 21) and 0.00 0.06 (N = 18), for mice treated with THC + SB and THC + Rapa, respectively, P > 0.05 vs. THC-injected mice (error bars correspond to the mean SEM, the dotted line to a discrimination index equal to zero).

ª 2020 The Authors

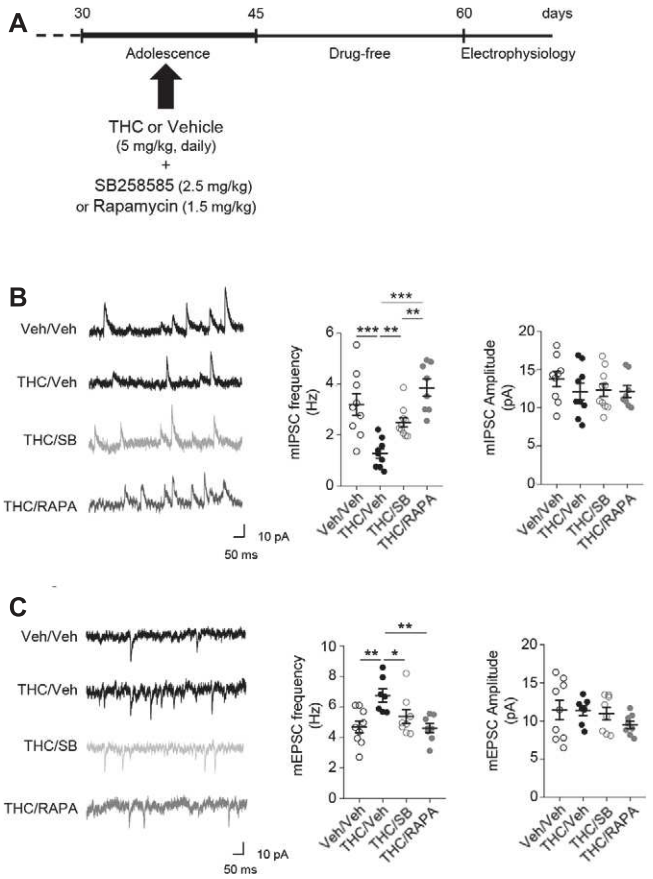


Figure 4. THC-induced alterations of prefrontal inhibitory and excitatory synaptic transmissions are prevented by administration ofSB258585 or rapamycin during adolescence.

A Schema of the experimental paradigm used for drug administration. Mice were injected daily with THC (5 mg/kg) or vehicle (Veh) during adolescence, from PNDs 30 to 45. SB258585 (SB, 2.5 mg/kg) or rapamycin (Rapa, 1.5 mg/kg) was administered concomitantly with THC or vehicle. Electrophysiological recordings were performed from PND 60.

B Left: representative traces of GABA mIPSCs recorded in layer V pyramidal neurons are illustrated. Right: the histograms represent means SEM of GABA mIPSC frequency and amplitude measured during the last minute of recording. The mIPSC frequency is: 3.2 0.4 Hz and 1.3 0.2 Hz for vehicle (n = 9 from N = 4) and THC (n = 7 from N = 4) conditions, respectively, $P < 0.001$ and 2.5 0.2 and 4.1 0.4 Hz for THC + SB (n = 8 from N = 4) and THC + Rapa (n = 8 from N = 4) conditions, respectively, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ vs. THC-injected mice.

C Left: representative traces of AMPA mEPSCs recorded in layer V pyramidal neurons are illustrated. Right: the histograms represent means SEM of AMPA mEPSC frequency and amplitude measured during the last minute of recording, n = neurons from 3 to 5 mice per group. The mEPSC frequency is 4.7 0.4 Hz for vehicle (n = 9 from N = 7) and 6.8 0.4 Hz for THC (n = 9 from N = 5) conditions, respectively, $P < 0.01$and 5.3 0.5 and 4.6 0.3 Hz for THC + SB (n = 10 from N = 6) and THC + Rapa (n = 9 from N = 5) conditions, respectively, $P < 0.05$ and $P < 0.01$ vs. THC-injected mice. In B and C, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test.

frequency and amplitude (Appendix Fig S3). These results suggest that cannabis abuse during adolescence induces a sustained alter- ation of GABAergic and glutamatergic synaptic transmissions in PFC. This leads to a disruption in the excitatory/inhibitory (E/I) balance that can be prevented by blocking 5-HT$_6$ receptor-operated mTOR signaling.

THC administration during adolescence induces changes in the intrinsic properties of layer V PFC pyramidal neurons through modulation of HCN1 channels

Spike timing results from dynamic interactions between synaptic activity and intrinsic neuronal excitability. We assessed whether persistent activation of mTOR elicited by THC administration during adolescence might affect the intrinsic electrophysiological properties and the firing rate of layer V pyramidal neurons by monitoring four different parameters: the resting membrane potential (RMP), the action potential (AP) threshold, the rheobase (i.e., minimal current required to induce neuronal firing), and the firing rate (i.e., number of APs for a 150 pA injected current during 250 ms). THC adminis- tration during adolescence significantly increased the resting membrane potential (Fig 5A) and lowered the AP threshold (Fig 5B) and the rheobase (Fig 5C), without affecting the firing rate, in adult- hood (Fig 5D). Moreover, the concomitant administration of SB258585 or rapamycin prevented these changes (Fig 5A–C) but had no effect on the intrinsic neuronal properties of layer V PFC pyramidal neurons from vehicle-injected mice (Appendix Fig S4). Mimicking the effects of SB258585, concomitant administration of the neutral 5-HT$_6$ receptor antagonist, CPPQ, to THC-injected mice during adolescence also prevented the observed alterations of the resting membrane potential, the rheobase, and the AP threshold(Fig EV4A–C) of PFC pyramidal neurons, without affecting their fir- ing rate (Fig EV4D). Collectively, these results indicate that THC intake during adolescence induces long-lasting changes in the intrin- sic neuronal properties of prefrontal layer V pyramidal neurons that are prevented by the early blockade of the 5-HT$_6$/mTOR pathway.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1) is the predominant isoform of HCN channels, a family of voltage-gated ion channels responsible for the hyperpolarization-activated current (I_h) that modulates spike firing and synaptic potential integration (He *et al*, 2014; Shah, 2014) by influencing the rest- ing membrane potential of pyramidal neurons. Notably, HCN1 channels enable intrinsic persistent firing of prefrontal layer V pyra- midal neurons and are necessary for PFC-dependent behavioral tasks such as executive function during working memory episodes (Thuault *et al*, 2013). Furthermore, HCN1 channels have been involved in CB$_1$ receptor-induced deficits in LTP in hippocampal pyramidal neurons located in the superficial portion of the CA1 pyramidal cell layer and in spatial memory formation (Maroso *et al*, 2016). We thus examined whether THC administration during adolescence likewise modifies the activity of HCN1 channels in PFC neurons and measured the voltage sag as an index of postsynaptic I_h in layer V pyramidal neurons, using whole-cell patch-clamp record- ings in a current-clamp configuration. Following injection of incre- mental negative currents (50-pA increment from −400 to 0 pA), the sag amplitude was increased in layer V pyramidal neurons from THC-injected mice, compared with vehicle-injected mice (Fig 5E). Furthermore, administration of SB258585 or rapamycin during adolescence restored a normal sag potential amplitude in THC- injected mice (Fig 5E).

To confirm that HCN1 channels contribute to modifications of the intrinsic neuronal properties, we bath applied onto the PFC

a 2020 The Authors

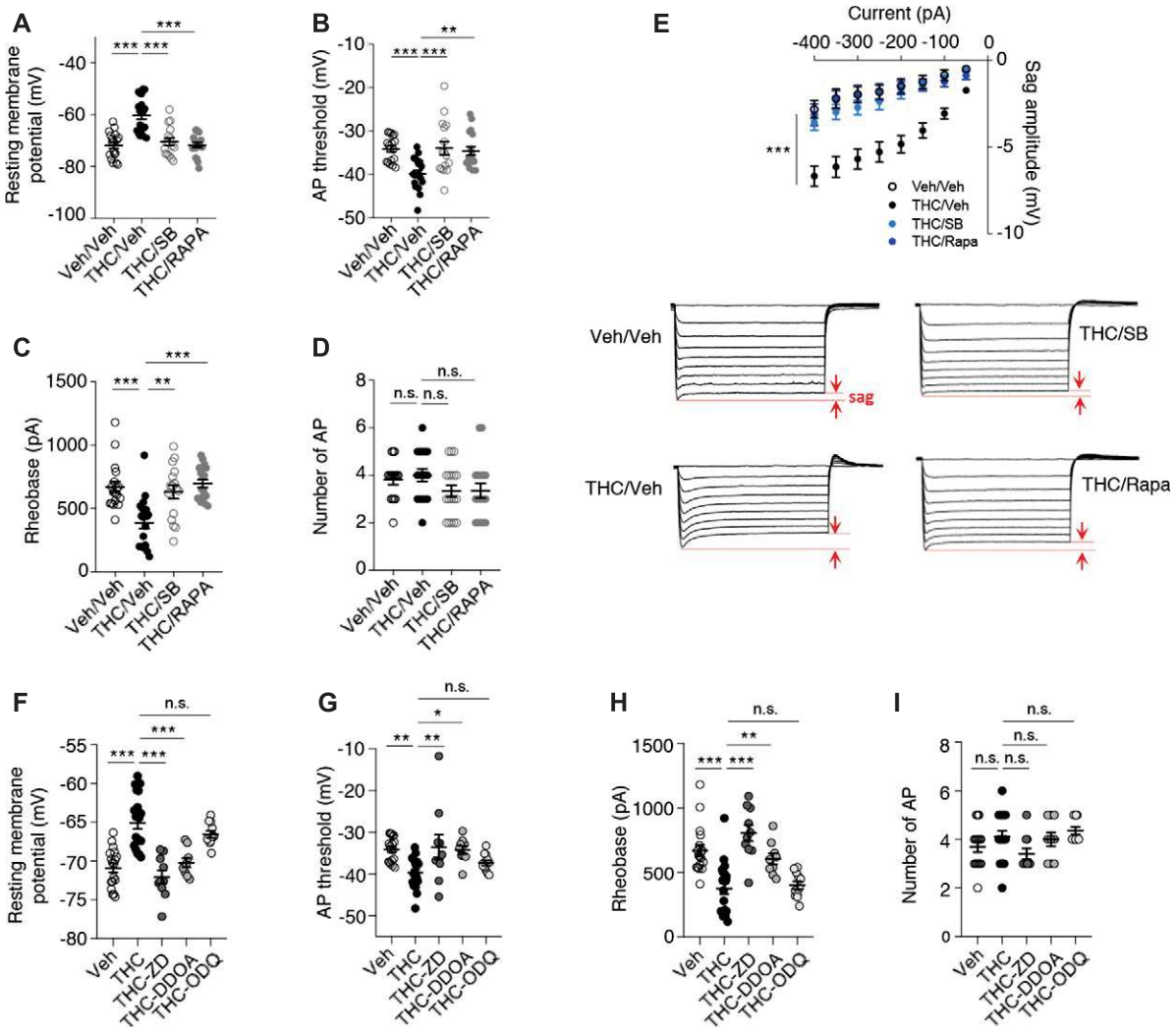


Figure 5. Administration of THC during adolescence changes intrinsic properties of layer V pyramidal neurons.

A–D Mice were injected daily with THC (5 mg/kg) or vehicle (Veh) during adolescence, from PND 30 to 45. SB258585 (SB, 2.5 mg/kg) or rapamycin (Rapa, 1.5 mg/kg) wasadministered concomitantly with THC (n = 20 from N = 5) or vehicle (n = 18 from N = 6). Electrophysiological recordings were performed from PND 60. (A) The resting membrane potential (RMP) was determined immediately after whole-cell formation: −71.8 1.2 and −60.1 1.5 mV for vehicle and THC conditions, respectively, $P < 0.001$. (B) Action potentials were evoked by a ramp current injection with a 10-pA step for 2 ms, and only the first action potential (AP) was usedto estimate the AP threshold: −34.1 0.7 and −39.7 0.8 mV for vehicle- and THC-injected mice, respectively, $P < 0.001$. (C) The rheobase represents the minimal current required to induce neuronal firing, and it was lowered in THC condition: 670 43 and 376 43 pA for vehicle and THC conditions, respectively, $P < 0.001$. (D) The firing rate induced by a 150-pA current injection during 250 ms is expressed as the number of APs. In (A–D), the plots represent means SEM of RMPs, AP thresholds, rheobases and firing rates, respectively. ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Bonferroni test. Concomitant administrationof SB258585 or rapamycin prevented all the observed changes (RMP: −70.1 1.4 and −72.1 1.0 mV for THC + SB258585 (n = 16 from N = 5) and THC + Rapamycin (n = 18 from N = 5) conditions, respectively, $P < 0.001$ vs. THC-injected mice; AP threshold: −33.0 1.7 and −34.8 1.0 mV for THC + SB258585 and THC + Rapamycin conditions, respectively, $P < 0.001$ vs. THC-injected mice; Rheobase: 624 51 and 686 33 pA for THC + SB258585 and THC + Rapamycin conditions, respectively, $P < 0.001$ vs. THC mice.

E Top: Voltage sag in response to hyperpolarizing current injection (50-pA increments, from −400 to 0 pA) in PFC pyramidal neurons from mice injected with vehicle (Veh, n = 10 from N = 5), THC (n = 11 from N = 5), THC + SB258585 (THC/SB, n = 7 from N = 4), or THC + Rapa (THC/Rapa, n = 7 from N = 4) during adolescence. ***$P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Bonferroni test, vs. THC-injected mice. Errors bars correspond to the mean SEM. Voltage sag is indicated by arrowheads.

F–I Effect of ZD7288 (ZD, 10 μM, n = 10 from N = 3), DDOA (15 μM, n = 9 from N = 4), or ODQ (10 μM, n = 12 from N = 4) on intrinsic properties of PFC pyramidal neurons. THC and vehicle conditions are similar to those on (A–D). (F) resting potential membrane: THC + ZD: −74.14 1.70 mV, $P < 0.001$ vs. THC condition, THC + DDOA: −70.47 1.19 mV, $P < 0.001$ vs. THC condition, THC + ODQ: −63.10 0.81 mV, $P < 0.001$ vs. THC condition, (G) AP threshold: THC + ZD: −33.59 2.96 mV, $P < 0.01$ vs. THC condition, THC + DDOA: −34.28 0.98 mV, $P < 0.001$ vs. THC condition, THC + ODQ: −36.84 0.79 mV, $P < 0.001$ vs. THC condition (H) rheobase: THC + ZD: 806 63 pA, $P < 0.001$ vs. THC condition, THC + DDOA: 607 43 pA, $P < 0.001$ vs. THC condition, THC + ODQ: 422 34 pA, $P < 0.001$ vs. THC condition, and (I) firing rate. Note that vehicle- and THC-injected mice are the same as those used in experiments illustrated in (A–D). ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$, n.s. $P > 0.05$ one-way ANOVA followed by Bonferroni test.

 a 2020 The Authors

slices an organic HCN1 antagonist ZD7288 at a concentration of 10 lM that minimizes non-specific effects on synaptic transmission (Chevaleyre & Castillo, 2002). Application of ZD7288 restored the resting membrane potential, the AP threshold and the rheobase of layer V pyramidal neurons from THC-injected mice to values close to those observed in vehicle-treated animals (Fig 5F–I), reminiscent of the effects induced by administration of SB258585 or rapamycin during adolescence, whereas it did not modify the intrinsic properties nor the firing pattern of neurons from vehicle-treated mice (Appendix Fig S5). As previously shown (Thuault *et al*, 2013), the pharmacological inhibition of HCN1 did not significantly alter the firing rate in layer V pyramidal neurons from vehicle-injected animals (Fig 4I and Appendix Fig S5).

HCN1 are gated by both cAMP and cGMP (He *et al*, 2014). Any increase in cAMP or cGMP would thus cause a depolarizing shiftin the activation curve for I_h. Consistent with this hypothesis, a recent study has shown that CB_1 receptors modulate HCN1 activity and increase postsynaptic I_h through a cGMP-dependent pathway (Maroso *et al*, 2016). In order to determine whether the alteration of HCN1 activity is mediated by an increase in intracellular cGMP,we perfused 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 lM), a selective inhibitor of guanylate cyclase (the enzyme responsible for cGMP production) (Boulton *et al*, 1995) into the recording pipette. Postsynaptic application of ODQ did not modify the intrinsic neuronal properties of neurons from THC-injected mice (Fig 5F–I). In contrast, perfusion of the selective adenylate cyclase inhibitor $2^0,3^0$-dideoxyadenosine (DDOA, 15 lM; Pelkey *et al*, 2008) restored the resting membrane potential (Fig 5F), theAP threshold (Fig 5G) and the rheobase (Fig 5H) of layer V pyra- midal neurons from THC-injected mice to values similar to those observed in vehicle-treated animals. Application of DDOA or ODQ did not modify the intrinsic properties nor the firing pattern of neurons from vehicle-injected mice (Appendix Fig S5). Collec- tively, these results suggest a role for cAMP in the HCN1-mediated alterations of neuronal intrinsic properties of PFC pyramidal neurons.

LTD impairment induced by adolescent THC exposure is prevented by early blockade of 5-HT_6 receptors

Previous studies have shown that exposure of rats to THC during adolescence disrupts endocannabinoid-dependent long-term depres- sion (LTD) in the PFC at adulthood (Rubino *et al*, 2015). Corrobo- rating these findings, we found that electrically induced LTD at PFC layer I/V synapses was impaired in mice treated with THC during adolescence (Fig 6A and B). As expected, the concomitant adminis- tration of SB258586 during adolescence restored normal LTD at these synapses (Fig 6A and B), indicating that long-term modifi- cations of synaptic plasticity induced by adolescent exposure to THC depend on 5-HT_6 receptor activation during this critical period of PFC maturation.

Discussion

Previous studies have shown that an acute administration of THC in adult mice induces a transient mTOR activation in the hippocampus that leads to an alteration in protein translation in this brain area and amnesic-like effects in memory tasks depending of hippocampal function (Puighermanal *et al*, 2009, 2013). In contrast, in the present study, we showed that chronic exposure to THC during adolescence induces a sustained activation of mTOR signaling in the PFC but not in the hippocampus, reminiscent of previous observa- tions in two neurodevelopmental models of schizophrenia, rats treated with phencyclidine at the neonatal stage or reared in social isolation after the weaning (Meffre *et al*, 2012). These findings are consistent with the hypothesis that common signaling mechanisms might contribute to cognitive symptoms in patients with schizophre- nia and cannabis abusers during adolescence. They also suggest that THC intake might differentially influence mTOR activity depending on its mode of administration and the age of delivery: whereas an acute administration at the adult stage induces a transient elevation of mTOR signaling in the hippocampus (Puighermanal *et al*, 2009,

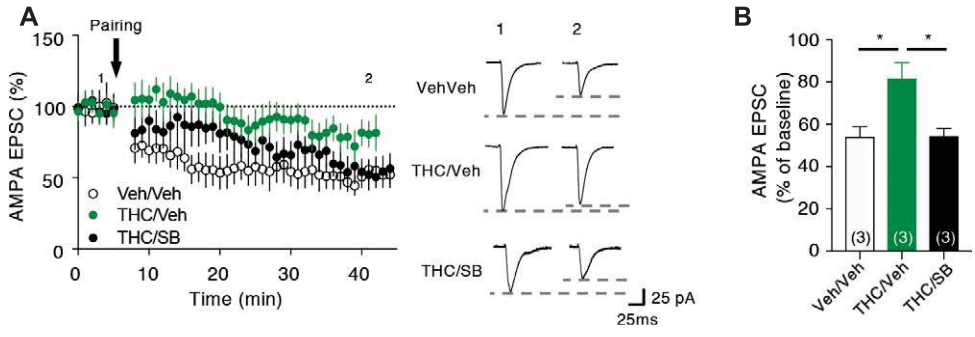


Figure 6. THC-induced impairment of LTD at PFC layer I/V synapses is prevented by the administration of SB258585 during adolescence.

A In left, normalized peak amplitudes of isolated AMPA EPSCs recorded at −60 mV, before, and after pairing protocol, are illustrated. Representative traces of AMPA EPSCs before (1) or after (2) the pairing protocol are also illustrated (right panel) for each experimental condition: vehicle-injected mice (white circles, n = 3 from N = 3), THC-injected mice (green circles, n = 3 from N = 3), and THC-injected mice treated with SB258585 during adolescence (black circles, n = 3 from N = 3). Barsand errors bars correspond to mean SEM.

B The histogram represents the means SEM of AMPA EPSCs in % of baseline, measured during the last 5 min of baseline or the last 5 min of recording, for each experimental condition: vehicle-injected mice (white bar, n = 3 from N = 3), THC-injected mice (green bar, n = 3 from N = 3), and THC-injected mice treated with SB258585 during adolescence (black bar, n = 3 from N = 3), n.s. $P > 0.05$, $^*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's test.

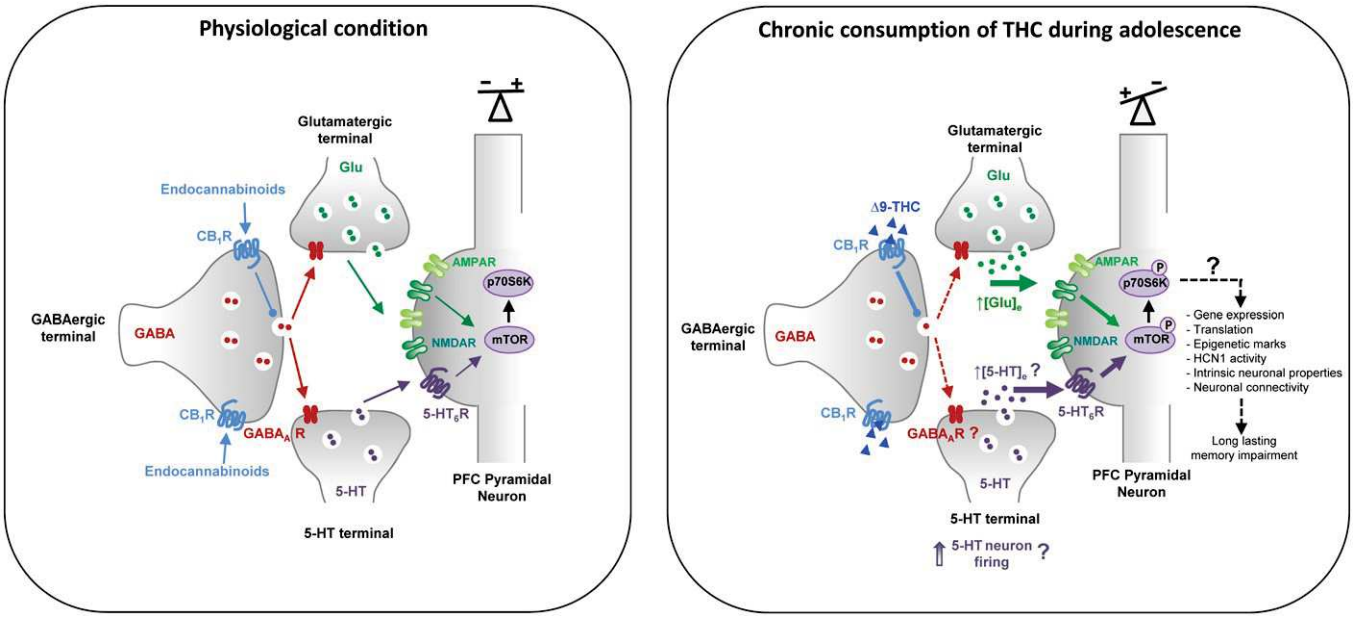


Figure 7. Model illustrating the possible mechanism induced in the prefrontal cortex by chronic consumption of THC during adolescence that leads to long-lasting cognitive impairment.

Left panel: physiological condition. Right panel: chronic consumption of THC during adolescence induces an overactivation of prefrontal CB_1 receptors that are mainly located on GABAergic terminals. As previously established in adult mice that received an acute THC treatment (Puighermanal *et al*, 2009), this might lead to a decrease in GABA release and, subsequently, to an increase in the glutamatergic tone. Likewise, adolescent THC consumption might also increase serotoninergic tone leading to a sustained activation of 5-HT_6 receptor located on pyramidal neurons which is prerequisite for the long-lasting stimulation mTOR signaling pathway. This in turn leads to an alteration in intrinsic neuronal properties and cognitive deficits in adulthood. The non-physiological activation of mTOR and resulting imbalance in the excitatory/inhibitory equilibrium during adolescence might also interfere with maturational events occurring in the adolescent PFC leading to a persistent rearrangement of cortical networks affecting the serotonergic system itself and, ultimately, to a persistent mTOR activation. For the clarity of the figure, CB_1 receptors were only represented on GABAergic terminals. The presence of GABA-A receptors onto glutamatergic and serotoninergic terminals were previously suggested in Alle and Geiger (2007); Ruiz *et al* (2010); Yamamoto *et al* (2011); and Cerrito *et al* (1998), respectively.

2013), chronic intake during adolescence leads to a long-lasting mTOR activation in the PFC that persists in adulthood. The mecha- nisms underlying THC-elicited mTOR activation following acute administration at the adult stage or chronic intake during adoles- cence also differ. Activation of mTOR induced by THC in adult mice is mainly mediated by CB_1 receptors located in GABAergic termi- nals, leading to an inhibition of GABAergic tone in the hippocam- pus. This in turn enhances pyramidal glutamatergic inputs and promotes NMDA receptor-dependent mTOR activation in pyramidal neurons (Puighermanal *et al*, 2009, 2013). Though such a mecha- nism might likewise contribute to the initial phase of prefrontal mTOR activation in mice exposed chronically to THC during adoles- cence, the activation of mTOR during the entire adolescent period clearly depends on 5-HT_6 receptor activation (Fig 7). Indeed, it was not observed in 5-$HT_6^{-/-}$ mice and was prevented by the adminis- tration of a 5-HT_6 receptor *neutral antagonist* during the adoles- cence period, but not by the 5-HT_6 receptor blockade at the adult stage. The latter observation indicates it might result from a non- physiological 5-HT_6 receptor activation by endogenously released 5- HT rather than constitutive activity, which might be caused by CB_1 receptor-mediated decrease in GABA release and the disinhibition of5-HT terminals (Fig 7) in the PFC.

The mechanism underlying the persistent activation of mTOR in adulthood remains more uncertain. It is conceivable that adolescent exposure to THC and the resulting non-physiological mTOR activation interfere with the maturation of the GABAergic system that undergoes refinement in the PFC until the end of adolescence (Kilb, 2012; Zamberletti *et al*, 2014). This might lead to a sustained increase in PFC serotonergic tone (Teissier *et al*, 2017) and, conse- quently, a persistent 5-HT_6 receptor activation by endogenously released 5-HT.

A recent RNA-seq study in rats treated with THC during adoles- cence showed a decreased expression of Raptor mRNA 2 weeks after the THC treatment, while the level of mTOR mRNA was not affected (Miller *et al*, 2019). This suggests that the enhanced mTOR activity in THC-treated animals does not result from an increased expression of proteins of the mTOR complex 1 (mTORC1), but rather from an increase in mTOR catalytic activity, consistent with the observed increase in Ser^{2448} phosphorylation state.

The sustained increase mTOR signaling in PFC of THC-treated mice plays a key role in the emergence of cognitive deficits in adult- hood. Indeed, the cognitive deficits induced by THC intake during adolescence were abolished by the concomitant administration of either 5-HT_6 receptor antagonists or rapamycin and were absent in the 5-$HT_6^{-/-}$ mice. Notably, the same treatments (followed by the same washout period) administered in adulthood did not induce a prolonged rescue of these deficits. Furthermore, THC administration in adulthood did not induce such a prolonged activation of mTOR signaling and associated cognitive deficits. Collectively, these obser- vations confirm that the adolescence is a period of vulnerability to

 a 2020 The Authors

extrinsic risk factors such as drug abuse that irreversibly affect brain signaling processes crucial for cognitive functions (Higuera-Matas*et al*, 2015; Renard *et al*, 2016; Saravia *et al*, 2019).

The sustained activation of mTOR signaling, under the control of 5-HT_6 receptors, elicited in PFC by adolescent THC exposure might induce cognitive deficits in adulthood through different mechanisms. First, mTOR plays a critical role in various neurodevelopmental processes, including neuronal progenitor proliferation, neuronal migration, growth of dendrites and axons, and synaptogenesis (Bockaert & Marin, 2015). Corroborating these observations, a large body of evidence indicates a deleterious influence of aberrant mTOR signaling upon cognition in rodent models of neurodevelopmental disorders (Ehninger *et al*, 2008; Sharma *et al*, 2010; Ricciardi *et al*, 2011; Meffre *et al*, 2012; Troca-Marin *et al*, 2012; Huber *et al*, 2015), indicating that the deregulation of mTOR signaling in specific brain areas at critical developmental periods can compromise cognition later in life. Second, mTOR activation level finely controls dendritic spine pruning and shaping of synaptic connections at later stages of brain maturation but contrasting effects of mTOR overactivation upon spine density and morphology have been reported in autism models (Tavazoie *et al*, 2005; Tang *et al*, 2014). THC expo- sure during adolescence results in premature pruning of spines and protracted atrophy of distal apical trees associated with alteration of synaptic markers that might lead to a reduction in the complexity of pyramidal neurons and a reduced capacity for plasticity in neural circuits central for normal adult behavior (Rubino *et al*, 2015; Miller *et al*, 2019). The role of mTOR in structural abnormalities induced by adolescent exposure to THC remains to be established. Finally, a recent study revealed that exposure of adolescent rats to THC affects selective histone modifications that impact the expression of genes associated with synaptic plasticity. Again, changes in histone modifications are more widespread and pronounced after adolescent exposure than after adult exposure, suggesting specific adolescent vulnerability (Miller *et al*, 2019; Prini *et al*, 2018). As mTOR activity controls the phosphorylation state of proteins involved in histone post-translational modifications and chromatin remodeling (Citro *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2017), the sustained mTOR activation inPFC of mice exposed to THC during adolescence might also contri- bute to some epigenetic mechanisms underlying the development of cognitive deficits (Prini *et al*, 2018).

Irrespective of the structural changes and the molecular mechanisms elicited by the sustained non-physiological mTOR activation induced by chronic THC consumption during adolescence, we showed that it induces a disruption in the excitatory–inhibitory balance in PFC. This alteration in the E/I balance, which is a landmark of neurodevelopmental disorders (Dani *et al*, 2005; Bateup *et al*, 2013; Berryer *et al*, 2016) such as schizophrenia or autism (Benes *et al*, 1991; Vogels & Abbott, 2009; Marin, 2012), persisted until adulthood and resulted from a decrease in GABAergic transmission and an increase in glutamatergic trans- mission. It might also result from the 5-HT_6 receptor-dependent overactivation of mTOR, as the blockade of this pathway duringadolescence restored a normal E/I balance in adulthood in THC-injected mice.

In an effort to identify the molecular mechanisms underlying the disruption of the E/I balance following adolescent exposure to THC, we showed that this treatment induces an increase in HCN1 activity that leads to changes in intrinsic properties of PFC layer V pyramidal neurons characterized by a more depolarized resting membrane potential and a lower firing threshold. Previous RNA-seq studies demonstrated a decrease in HCN1 mRNA level 2 weeks after the chronic administration of THC to adolescent rats, suggesting that the observed increase in HCN1 activity does not result from an increase in HCN1 channel expression (Miller *et al*, 2019) but is rather reminiscent of previous findings indicating that CB_1 receptor activation induces deficits in hippocampal LTP and spatial memory formation through HCN channels (Maroso *et al*, 2016). The signal-ing cascade underlying CB_1 receptor-mediated activation of I_h in the hippocampus involves a c-Jun-N-terminal-kinase (JNK) that in turn increases cGMP formation through the activation of nitric oxide synthase (Maroso *et al*, 2016). In contrast, HCN1-dependent alterations of intrinsic properties of PFC pyramidal neurons elicited by administration of THC during adolescence were independent of cGMP, but rather involved a cAMP-dependent mechanism that might itself result from the sustained activation of adenylyl cyclase mediated by prefrontal 5-HT_6 receptors. Previous studies have also suggested that HCN1 channels regulate synaptic plasticity by dendritic integration of synaptic inputs to pyramidal neurons and thus play a role in learning and memory (Magee, 1999; Nolan *et al*, 2004). Indeed, alteration in HCN1 activity might also explain theimpairment of electrically induced LTD observed at PFC layer I/V synapses in mice injected with THC during adolescence.

It is well accepted that HCN1 are important during neuronal development and network wiring (Bender & Baram, 2008). Developing neurons have to modulate both their intrinsic properties as well as their firing to constantly adapt to their changing environment. Factors that interfere with this process and alter HCN1 activity may have long-lasting deleterious effects that lead to network dysfunction underlying cognitive impairment observed in several brain pathologies (Chen *et al*, 2001; Brewster *et al*, 2002). For instance, an alteration in HCN1 activity has been found in mouse models of Rett syndrome ($Mecp2^{-/y}$ mice) (Balakrishnan & Mironov, 2018) and Fragile X syndrome ($Fmr1^{-/y}$ mice) (Brager *et al*, 2012) as wellas in epilepsy (Dube *et al*, 2006).

In conclusion, the present study shows that a sustained, non-physiological mTOR activation under the control of 5-HT_6 receptors plays a key role in the alteration of intrinsic neuronal properties, E/I balance and synaptic plasticity in layer V pyramidal neurons of the PFC of adult mice exposed to cannabis during adolescence. It also shows that blocking 5-HT_6 receptor-elicited mTOR activation during this critical period of PFC maturation definitively prevents emer-gence of cognitive deficits in mice exposed to cannabis during adolescence, whereas its blockade in adulthood does not inducesuch a long-term pro-cognitive effect. It suggests that 5-HT_6 receptorantagonists, which recently failed in Phase III clinical trials as symp- tomatic treatment of cognitive symptoms in Alzheimer's disease (Atri *et al*, 2018; Khoury *et al*, 2018), might be repositioned as "disease-modifying" treatment to prevent emergence of cognitive deficits in adolescent cannabis abusers. Such a strategy based on early administration of 5-HT_6 receptor antagonists is certainly more relevant than mTOR blockade by pharmacological inhibitors, as it will specifically prevent the non-physiological activation of prefrontal mTOR without affecting physiological cerebral mTOR activity, which plays a key role in numerous physiological processes such as synaptic plasticity (Bockaert & Marin, 2015; Younts *et al*, 2016; Switon *et al*, 2017; Ryskalin *et al*, 2018). Accordingly, 5-HT_6

a 2020 The Authors

receptor antagonism will not reproduce the severe side effects induced by mTOR inhibitors such as rapamycin, which limit their clinical development for the treatment of psychiatric diseases. Given the deleterious influence of aberrant mTOR activation in several genetic forms of autism spectrum disorders (Ehninger *et al*, 2008; Ehninger & Silva, 2011; Huber *et al*, 2015; Sato, 2016; Ryskalin *et al*, 2018), administration of 5-HT_6 receptor antagonists as soon as adolescence might profitably be evaluated in autism. Finally, the recent progress in the identification of patients with high risk of transition to schizophrenia (Millan *et al*, 2016) suggests that such a strategy might also be extended to the more numerous population of patients with schizophrenia.

Materials and Methods

Animals

Wild-type male and female C57BL/6JRj mice were purchased from Janvier Laboratories. 5-$HT_6^{-/-}$ mice have a C57BL/6JRj background. Mice from both sexes were indifferently used in behavioral, electrophysiological, and biochemical experiments. Mice were received at PND 26 and housed under standardized conditions with a 12-h light/dark cycle, stable temperature (22 1°C), controlled humidity (55 10%), and free access to food and water. $CB1^{-/-}$mice and their littermates (background C57BL/6JRj) were housed in a specific area under standardized conditions as described above. Animal husbandry and experimental procedures were performed in compliance with the animal use and care guidelines of the Univer- sity of Montpellier, the French Agriculture Ministry, and the Euro- pean Council Directive (86/609/EEC). All the experiments were conducted from PND 60 or from PND 90 depending on the experi- mental conditions.

Drugs and treatments

D-9-tetrahydrocannabinol (THC) was purchased from THC Pharm. Picrotoxin (Sigma P1675), 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt hydrate (CNQX; Sigma C239), and *N*-ethyl-1,6-dihydro-1,2-dimethyl-6-(methylimino)-*N*-phenyl-4-pyrimidinamine hydrochloride (ZD7288; Sigma Z3777) were obtained from Sigma-Aldrich. 4-Iodo-N-[4-methoxy-3-(4-methylpiperazin-1-yl)-phenyl] benzene-sulfonamide (SB258585; Tocris #1961), tetrodotoxin (Tocris #1078) and D,L-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D,L-AP5; Tocris #0106) were purchased from Tocris and rapamycin from LC Laboratories (R5000). THC was dissolved in 5% ethanol and 5% cremophor in NaCl. Vehicle groups received this solution. THC was injected daily (5 mg/kg, i.p.) between PNDs 30 and 45. SB258585 (injected at 2.5 mg/kg, i.p.), rapamycin (injected at 1.5 mg/kg, i.p.), and CPPQ (injected at 2.5 mg/kg, i.p.) were dissolved in 5% DMSO and 5% Tween-80 in NaCl. All mice received the same number of injections. Correspondingly, control mice were successively injected with the vehicle used for THC and the vehicle used for SB258585/Rapamycin and are referred as Veh/Veh on the figures. Likewise, mice treated with the vehicle used for THC and SB/Rapa were referred as Veh/SB and Veh/Rapa, respectively, while mice treated with THC and the vehicle used for SB/Rapa were both referred to THC/Veh.

Slice preparation

Animals were anesthetized with isoflurane before sacrifice. Slices were performed as previously described (Barre *et al*, 2016; Berthoux *et al*, 2019). Brains were removed and rapidly transferred into ice-cold dissection buffer maintained in 5% CO_2/95% O_2 and contain-ing 25 mM $NaHCO_3$ (Sigma S5761), 1.25 mM NaH_2PO_4 (Sigma S8282), 2.5 mM KCl (Sigma P3911), 0.5 mM $CaCl_2$ (Sigma C5080), 7 mM $MgCl_2$ (Sigma M2670), 25 mM glucose (Sigma G7021), 110 mM choline chloride (Sigma C1879), 11.6 mM ascorbic acid (Sigma A4034), and 3.1 mM pyruvic acid (Sigma P3256). Coronal brain slices (300 lm) were cut in ice-cold dissection buffer using a vibratome (Leica VT1200S). Slices were then transferred to artificial cerebrospinal fluid (aCSF, containing 118 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26.2 mM $NaHCO_3$, 1 mM NaH_2PO_4, 11 mM glucose, 1.3 mM $MgCl_2$, 2.4 mM $CaCl_2$, and maintained in 5% CO_2/95% O_2), at room temperature (22–25°C).

Electrophysiological recordings

Patch recording pipettes (3–5 MΩ) were filled with intracellular solution (115 mM Cs-gluconate, 20 mM CsCl (Sigma C3011), 10 mM HEPES (Sigma H3375), 2.5 mM $MgCl_2$, 4 mM Na_2ATP (Sigma A2383), 0.4 mM NaGTP (Sigma G8877), 10 mM sodium phosphocreatine (Sigma P7936), and 0.6 mM EGTA (Sigma E4378), pH 7.3). Whole-cell recordings were obtained from layer V pyrami- dal neurons (300–400 lm from pial surface) of prelimbic PFC usinga Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments) under an Axio- scope2 microscope (Zeiss) equipped with infrared differential inter- ference contrast optics. Data were filtered at 2 kHz and sampled at 10 kHz using Digidata 1440A (Molecular Devices) under the control of pClamp 10 (Axon Instruments). There were no significant dif- ferences in input or series resistance among groups. For miniature postsynaptic currents, the recording chamber was perfused with ACSF supplemented with 1 lM tetrodoxin at 22–25°C. mEPSC and mIPSC recordings were performed in the presence of 0.1 mM picro- toxin and 0.1 mM CNQX with 0.1 mM D, L-AP5, respectively. Currents were monitored for 10 min, and the quantification wasmade during the last 2 min of recording with Clampfit 10.2 (Axon Instruments).

Intrinsic electrophysiological properties were assessed bycurrent-clamp recordings. Patch recording pipettes were filled with intracellular solution (120 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 1.8 mM $MgCl_2$, 4 mM Na_2ATP, 0.3 mM NaGTP, 14 mM Na-phosphocreatine, 0.2 mM EGTA, pH 7.2). Resting membrane potential of each cell was measured immediately after the whole-cell patch formation. Action potentials (APs) were evoked by a ramp current injection with 10-pA increments for 2 ms, and only the first AP was used to determine the AP threshold and the minimal current necessary to induce firing (rheobase). The firing rate was recorded by a current injection at 150 pA for 250 ms.

Hyperpolarization-activated cation current (I_h) was measured as the voltage sag to a 500 ms hyperpolarizing current injection (50-pA increment from −400 pA to 0). Synaptic transmissions were blocked by adding 0.1 mM picrotoxin, 0.01 mM CNQX, and 0.1 mM D,L-AP5.

Electrically induced LTD was generated by a pairing protocol consisting in seven trains of 50 Hz stimuli (100 pulses per train),

 ª 2020 The Authors

delivered at 0.1 Hz, as previously described (Berthoux *et al*, 2019). Currents were monitored for 6 min before tetanic stimulation. Quantification of AMPA EPSC amplitude was made during the last 5-min period before tetanic stimulation and during the last 5-min period of recording, using Clampfit 10.2 (Axon Instruments).

Analysis of mTOR activity in mouse PFC

Mice PFC were rapidly dissected and homogenized in ice-cold buffer containing 0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4, and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche). Homogenates were centrifuged at 1,000 × *g* for 10 min to remove nuclei and large debris. Protein concentration in supernatants (PFC protein extracts) was determined by the bicinchoninic acid method. Proteins were resolved on 4–15% gradient gels (Bio-Rad) and transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated in blocking buffer (Tris–HCl, 50 mM, pH 7.5; NaCl, 200 mM; Tween-20, 0.1%, and skimmed dried milk,5%) for 1 h at room temperature and overnight with primary antibodies in blocking buffer: rabbit anti-phospho-S^{2448} mTOR 1:1,000 (Cell Signaling #2971), rabbit anti-phospho-T^{389} p70S6K 1:1,000 (Cell Signaling #9205), and mouse anti-panActin 1:2,000 (Lab Vision MS-1295-B). Membranes were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1:4,000 in blocking buffer, Millipore #12-348 and 12-349, respectively) for 1 h at room temperature. Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence method (ECL detection reagent, GE Healthcare) using a ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad).

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg, i.p.; CevaSanteAnimale) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS, pH 7.4). Brains were post-fixed overnight in the same solution and stored at 4°C. Coronal slices (50 lm) were cut in the PFC with a vibratome (Leica VT1000S) and stored at −20°C in a cryoprotectant solution until being processed for immunohistochemistry. Briefly, brain sections were blocked in 1% Triton X-100, 10% goat serum, 0.1 M PBS for 2 h, and immunostained overnight with primary antibodies: rabbit anti-5-HT_6 receptor 1:500 (ab103016, Abcam), guinea-pig anti-CB_1 receptor 1:500 (Frontier Institute #ab2571593), mouse anti-PSD95 1:500 (NeuroMab #75-028), mouse anti-Bassoon 1:1,000 (Enzo Life Sciences, #ADI-VAM-P5003), mouse anti-GAD65 1:500 (Millipore #MAB351R), and rabbit anti-SERT 1:500 (Sigma #PC177L). Slices were then incubated with Alexa 594- or Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit (1:1,000, Jackson immunoresearch), Alexa 488-conjugated anti-guinea-pig IgG (1:1,000, Jackson immunoresearch) or Alexa 594-conjugated goat anti-mouse (1,000, Jackson immunoresearch). Sections were mounted and were analyzed under a 40× oil-immersion objective using a confocal microscope (Carl Zeiss LSM 780). Briefly, for each image, we determined a precise ROI that was applied for all images. Then, we performed segmentation by thresholding to generate binary images from each selection using the « Otsu » auto-threshold function. For co-localization analysis, we used Mander's split coefficients to iden- tify the fraction of CB_1 receptors or 5-HT_6 receptors that co-localizes with synaptic markers and the fraction of CB_1 that co-localizes with 5-HT_6 receptors using the macro « coloc 2 » from ImageJ.

Behavioral analysis

Novel object recognition task

One week before the test, mice were extensively handled: The first 2 days, the operator put his hand on the home cage of the animals to familiarize the animals to his presence, and the following days, the animals were handled few minutes per day by the operator. Testing was carried out in a Plexiglas box placed in a dimly lit room with clearly visible contextual cues (black on white patterns) on the surrounding walls. Mice were habituated to the arena for 10 min per day, on days 1 and 2. On days 3, mice performed the novel object recognition task. The mice had a 10-min training session, a 30-min retention interval during which they were transferred backto the home cage, and a 10-min test session. The objects were plas- tic toys (approximately 3 cm width, 3 cm length, 5 cm height) and were cleaned with 10% ethanol between sessions. The experiments were video-recorded, and exploration times (nose in contact or sniff-ing at < 1 cm) were measured by a blinded observer. Mice with total time exploration of less than 3 s in test session were excluded. Discrimination indexes [(exploration time of novel object − exploration time of familiar object)/total object exploration time] were compared between groups.

Social preference task

Testing was carried out in a rectangular, three-chamber box with dividing walls made of clear Plexiglas and an open middle section(60 cm length × 40 cm width in total, each compartment has a length of 20 cm), which allows free access to each chamber (Kaidanovich-Beilin *et al*, 2011). Before the test, each tested mouse was placed for 10 min in the middle compartment a three- chamber device, without the walls between the compartments, to allow free access to the three compartments. Then, a control mouse (same age, same sex as tested mice) was placed inside awire containment jail, located in one chamber. In the second chamber, an object was placed inside a wire containment jail. Then, the walls were removed between the compartments, to allow free access for the test mouse to explore each of the three chambers. Duration of direct contacts between the tested mouse and the containment jail or cup housing the conspecific or objectwas recorded for 10 min. The experiments were video-recorded, and exploration times (nose in contact or sniffing at < 1 cm) were measured by a blinded observer. Sociability indexes [(explo- ration time of congener − exploration time of object)/total explo- ration time] were compared between groups.

Social discrimination task

For the social novelty discrimination test (ability of an adult mouseto discriminate novel from familiar congeners), the same procedure as for the social preference task was used but the object in the wire containment jail was replaced by a mouse (same age, same sex as the tested mouse) during the second session. The walls between the compartments were then removed to allow free access to each of the three chambers for the tested mouse. The time of interaction thetest mice with each congener was recorded for 10 min. Mice with total time exploration of less than 3 s in test session were excluded. Social discrimination indexes [(exploration time of the novel congener − exploration time of familiar congener)/total exploration time] were compared between groups.

Elevated Plus Maze

Anxiety-related behavior was assessed in an Elevated Plus Maze (EPM) consisting in a black plexiglass apparatus with four elevated (50 cm above the floor) arms (26 cm long × 5 cm wide) set in cross from a neutral central square (5 × 5 cm). Two opposing arms, chip- board walls, and two opposing arms were devoid of walls (open arms), under dim lighting conditions (> 50 lux). Cumulative time spent in open (aversive) and closed (non-aversive) arms was recorded during a 5-min session.

Circular corridor

Locomotor activity was measured for 60 min in a circular corridor (14 cm wide, 18 cm in diameter) with four infrared beams placed at 90° angles (Imetronic, Pessac, France) in a low luminosity environ.

Statistical data analysis

For biochemistry, immunohistochemistry, and electrophysiology, a minimum of three animals was used in each group. Mice from both sexes were indifferently used, and they were submitted to behav- ioral experiments in a randomized sequential order. Behavioral recordings were blindly analyzed. Data were analyzed using GraphPad Prism software (v. 7.0). The homogeneity of sample vari- ance was tested using Brown–Forsythe's test. As long as no variance among groups was detected, ANOVA was performed. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed byNewman–Keuls test for electrophysiological and biochemical experi- ments, or by one-way ANOVA followed by Bonferroni test for behavioral experiments. Detailed statistics for figures are in the Appendix Table S1.

The paper explained

Problem

Cannabis is the most commonly abused illicit drug. Epidemiological studies suggest that cannabis abuse during adolescence confers an increased risk for developing later in life psychotic-like symptoms and cognitive deficits reminiscent to those observed in schizophrenia, suggesting common pathological mechanisms that remain poorly characterized. It is conceivable that cannabis consumption might interfere with maturational events occurring in the adolescent brain, leading to alterations of brain connectivity and functionality similar to those observed in individuals with schizophrenia. Due to the huge increase in the number of adolescents regularly consuming cannabis, at younger and younger age, and the increase in the concentration of Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) in currently used cannabis, there is an urgent need of innovative therapies for the clinical management and, ultimately, the prevention of psychotic and cognitive symptoms occur- ring in adulthood in adolescent cannabis abusers.

Results

In line with previous findings that revealed a role of mTOR activa- tion, under the control of serotonin 5-HT6 receptor, in cognitive defi- cits in rodent neurodevelopmental models of schizophrenia, we show that chronic administration of THC to mice during adolescence induces a long-lasting activation of mTOR in the prefrontal cortex (PFC) that persisted in adulthood. This sustained activation of mTOR, otherwise absent in 5-HT6 receptor-deficient mice, was prevented by concomitant administration of 5-HT6 receptor antagonists. THC administration during adolescence also affected excitatory and inhi- bitory transmission in PFC, intrinsic properties of layer V pyramidal neurons, and long-term depression at PFC layer I/V synapses, and induced deficits in social behaviors and cognition in adulthood. The synaptic and neuronal alterations as well as the associated cognitive deficits were also prevented by the blockade of 5-HT6 receptor-oper- ated mTOR signaling pathway during adolescence. In contrast, they were still present after the same treatments delivered at the adult stage.

Impact

These observations suggest a role of 5-HT6 receptor-operated mTOR signaling in abnormalities of cortical network wiring elicited by THC at a critical period of brain maturation. They also suggest 5-HT6 receptor antagonists that are well tolerated and still in clinical evalu- ation as cognitive enhancers in dementia might be repositioned as early treatment to prevent the emergence of cognitive deficits at the adult stage in adolescent cannabis abusers.

Acknowledgements

We wish to thank Dr Laurent Fagni for critical reading of the manuscript and the animal facility's staffs of the Institute of Functional Genomics for the daily care of animals, especially Steeve Thirard and Denis Greuet. This study was supported by grants from CNRS, INSERM, University of Montpellier, Labex EpiGenMed, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, "Physiopathologiede l'Addiction program", contract no DPA20140629800), Fondation FondaMen-tal and ANR (Contract no 17-CE16-0013-01). C. Berthoux was a recipient of a fellowship from the Gouvernement de la Nouvelle Calédonie.

Author contributions

CBer performed electrophysiology experiments. CBer, CC and AR performed biochemistry experiments; AMH designed, performed and analyzed behavioral experiments. AR and ELD performed and analyzed behavioral experiments; AR and FA performed immunohistochemistry. PZ and KG synthesized and provided CPPQ. SCD provided the 5-$HT_6^{-/-}$ mouse cohort. RM provided the $CB1^{-/-}$ mouse cohort. CBéc, JB and PM designed the experiments and super- vised the study; CBéc, PM and CBer wrote the manuscript.

References

Alle H, Geiger JR (2007) GABAergic spill-over transmission onto hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27: 942 – 950

Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM (2004) Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry* 184: 110 – 117

Atri A, Frolich L, Ballard C, Tariot PN, Molinuevo JL, Boneva N, Windfeld K, Raket LL, Cummings JL (2018) Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease: three randomized clinical trials. *JAMA* 319: 130 – 142

Balakrishnan S, Mironov SL (2018) Rescue of hyperexcitability in hippocampal CA1 neurons from Mecp2 (—/y) mouse through surface potential neutralization. *PLoS One* 13: e01950

 a 2020 The Authors

Barre A, Berthoux C, De Bundel D, Valjent E, Bockaert J, Marin P, Becamel C (2016) Presynaptic serotonin 2A receptors modulate thalamocortical plasticity and associative learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E1382 – E1391

Batalla A, Bhattacharyya S, Yucel M, Fusar-Poli P, Crippa JA, Nogue S, Torrens M, Pujol J, Farre M, Martin-Santos R (2013) Structural and functional imaging studies in chronic cannabis users: a systematic review of adolescent and adult findings. *PLoS One* 8: e55821

Bateup HS, Johnson CA, Denefrio CL, Saulnier JL, Kornacker K, Sabatini BL (2013) Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of tuberous sclerosis. *Neuron* 78: 510 – 522

Bender RA, Baram TZ (2008) Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Prog Neurobiol* 86:129 – 140

Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL (1991) Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 48: 996 – 1001

Berryer MH, Chattopadhyaya B, Xing P, Riebe I, Bosoi C, Sanon N, Antoine-Bertrand J, Levesque M, Avoli M, Hamdan FF *et al* (2016) Decrease of SYNGAP1 in GABAergic cells impairs inhibitory synapse connectivity, synaptic inhibition and cognitive function. *Nat Commun* 7: 13340

Berthoux C, Barre A, Bockaert J, Marin P, Becamel C (2019) Sustained activation of postsynaptic 5-HT2A receptors gates plasticity at prefrontal cortex synapses. *Cereb Cortex* 29: 1659 – 1669

Bockaert J, Marin P (2015) mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol Rev* 95: 1157 – 1187

Boulton CL, Southam E, Garthwaite J (1995) Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* 69: 699 – 703

Brager DH, Akhavan AR, Johnston D (2012) Impaired dendritic expression and plasticity of h-channels in the fmr1(−/y) mouse model of fragile X syndrome. *Cell Rep* 1: 225 – 233

Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ (2002) Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 22: 4591 – 4599

Cathel AM, Reyes BA, Wang Q, Palma J, Mackie K, Van Bockstaele EJ, Kirby LG (2014) Cannabinoid modulation of alpha2 adrenergic receptor function in rodent medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 40: 3202 – 3214

Cerrito F, Aloisi G, Arminio P, Fanini D (1998) A new GABA-A receptor subtype coupled with Ca^{++}/Cl^{-} synporter modulates aminergic release from rat brain neuron terminals. *J Neurosci Res* 51: 15 – 22

Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I (2001) Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* 7: 331 – 337

Chevaleyre V, Castillo PE (2002) Assessing the role of Ih channels in synaptic transmission and mossy fiber LTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9538 – 9543

Citro S, Miccolo C, Meloni L, Chiocca S (2015) PI3K/mTOR mediate mitogen-dependent HDAC1 phosphorylation in breast cancer: a novel regulation of estrogen receptor expression. *J Mol Cell Biol* 7: 132 – 142

Codony X, Vela JM, Ramirez MJ (2011) 5-HT(6) receptor and cognition. *Curr Opin Pharmacol* 11: 94 – 100

Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB (2005) Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitationand inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*102: 12560 – 12565

Dayer AG, Jacobshagen M, Chaumont-Dubel S, Marin P (2015) 5-HT6 receptor:a new player controlling the development of neural circuits. *ACS Chem Neurosci* 6: 951 – 960

Deraredj Nadim W, Chaumont-Dubel S, Madouri F, Cobret L, De Tauzia ML, Zajdel P, Benedetti H, Marin P, Morisset-Lopez S (2016) Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT6 receptor promotes receptor constitutive activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 12310 – 12315

D'Souza DC, Sewell RA, Ranganathan M (2009) Cannabis and psychosis/schizophrenia: human studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259: 413 – 431

Dube C, Richichi C, Bender RA, Chung G, Litt B, Baram TZ (2006) Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospectiveanalysis. *Brain* 129: 911 – 922

Duhr F, Deleris P, Raynaud F, Seveno M, Morisset-Lopez S, Mannoury la CourC, Millan MJ, Bockaert J, Marin P, Chaumont-Dubel S (2014) Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT6 receptors to promote neurite growth. *Nat Chem Biol* 10: 590 – 597

Eggan SM, Lewis DA (2007) Immunocytochemical distribution of the cannabinoid CB1 receptor in the primate neocortex: a regional and laminar analysis. *Cereb Cortex* 17: 175 – 191

Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ (2008) Reversal of learning deficits in a $Tsc2^{+/-}$ mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med* 14: 843 – 848

Ehninger D, Silva AJ (2011) Rapamycin for treating tuberous sclerosis and autism spectrum disorders. *Trends Mol Med* 17: 78 – 87

Evins AE, Green AI, Kane JM, Murray RM (2012) The effect of marijuana use on the risk for schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 73: 1463 – 1468

Grychowska K, Chaumont-Dubel S, Kurczab R, Koczurkiewicz P, Deville C, Krawczyk M, Pietrus W, Satala G, Buda S, Piska K *et al* (2019) Dual 5-HT6and D3 receptor antagonists in a group of 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinolines with neuroprotective and procognitive activity. *ACS Chem Neurosci* 10: 3183 – 3196

Hall W, Babor TF (2000) Cannabis use and public health: assessing the burden. *Addiction* 95: 485 – 490

He C, Chen F, Li B, Hu Z (2014) Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112: 1 – 23

Higuera-Matas A, Ucha M, Ambrosio E (2015) Long-term consequences of perinatal and adolescent cannabinoid exposure on neural and psychological processes. *Neurosci Biobehav Rev* 55: 119 – 146

Hirst WD, Minton JA, Bromidge SM, Moss SF, Latter AJ, Riley G, Routledge C, Middlemiss DN, Price GW (2000) Characterization of [(125)I]-SB-258585 binding to human recombinant and native 5-HT(6) receptors in rat, pig and human brain tissue. *Br J Pharmacol* 130: 1597 – 1605

Hoeffer CA, Klann E (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33: 67 – 75

Huber KM, Klann E, Costa-Mattioli M, Zukin RS (2015) Dysregulation of mammalian target of rapamycin signaling in mouse models of autism. *J Neurosci* 35: 13836 – 13842

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR (2011) Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp* 48: e2473

Khoury R, Grysman N, Gold J, Patel K, Grossberg GT (2018) The role of 5 HT6-receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin Investig Drugs* 27: 523 – 533

Kilb W (2012) Development of the GABAergic system from birth to adolescence. *Neuroscientist* 18: 613 – 630

Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL (2009) DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* 63: 761 – 773

a 2020 The Authors

Kohen R, Fashingbauer LA, Heidmann DE, Guthrie CR, Hamblin MW (2001) Cloning of the mouse 5-HT6 serotonin receptor and mutagenesis studiesof the third cytoplasmic loop. *Brain Res Mol Brain Res* 90: 110 – 117

Magee JC (1999) Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* 2: 508 – 514

Malone DT, Hill MN, Rubino T (2010) Adolescent cannabis use and psychosis: epidemiology and neurodevelopmental models. *Br J Pharmacol* 160: 511 – 522

Marin O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13: 107 – 120

Maroso M, Szabo GG, Kim HK, Alexander A, Bui AD, Lee SH, Lutz B, Soltesz I (2016) Cannabinoid control of learning and memory through HCN channels. *Neuron* 89: 1059 – 1073

Meffre J, Chaumont-Dubel S, Mannoury la Cour C, Loiseau F, Watson DJ, Dekeyne A, Seveno M, Rivet JM, Gaven F, Deleris P *et al* (2012) 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med* 4: 1043 – 1056

Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, Gallinat J, Giedd J, Grayson DR, Heinrichs M *et al* (2016) Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov*15: 485 – 515

Miller ML, Chadwick B, Dickstein DL, Purushothaman I, Egervari G, Rahman T, Tessereau C, Hof PR, Roussos P, Shen L *et al* (2019) Adolescent exposure to Delta(9)-tetrahydrocannabinol alters the transcriptional trajectory and dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons. *Mol Psychiatry* 24: 588 – 600

Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsaki G, Siegelbaum SA, Kandel ER *et al* (2004) A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119:719 – 732

O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction inrats. *J Psychopharmacol* 20: 611 – 621

Pelkey KA, Topolnik L, Yuan XQ, Lacaille JC, McBain CJ (2008) State-dependent cAMP sensitivity of presynaptic function underlies metaplasticity in a hippocampal feedforward inhibitory circuit. *Neuron* 60: 980 – 987

Prini P, Rusconi F, Zamberletti E, Gabaglio M, Penna F, Fasano M, Battaglioli E, Parolaro D, Rubino T (2018) Adolescent THC exposure in female rats leads to cognitive deficits through a mechanism involving chromatin modifications in the prefrontal cortex. *J Psychiatry Neurosci*43: 87 – 101

Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12: 1152 – 1158

Puighermanal E, Busquets-Garcia A, Gomis-Gonzalez M, Marsicano G, Maldonado R, Ozaita A (2013) Dissociation of the pharmacological effectsof THC by mTOR blockade. *Neuropsychopharmacology* 38: 1334 – 1343

Purohit A, Herrick-Davis K, Teitler M (2003) Creation, expression, and characterization of a constitutively active mutant of the human serotonin5-HT6 receptor. *Synapse* 47: 218 – 224

Rahman MA, Kim H, Lee KH, Yun HM, Hong JH, Kim Y, Choo H, Park M, Rhim H (2017) 5-Hydroxytryptamine 6 Receptor (5-HT6R)-mediated morphological changes via RhoA-dependent pathways. *Mol Cells* 40: 495 – 502

Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G (2013) Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison. *Psychopharmacology* 225: 781 – 790

Renard J, Krebs MO, Le Pen G, Jay TM (2014) Long-term consequences of adolescent cannabinoid exposure in adult psychopathology. *Front Neurosci*8: 361

Renard J, Rushlow WJ, Laviolette SR (2016) What can rats tell us about adolescent cannabis exposure? Insights from preclinical research. *Can J Psychiatry* 61: 328 – 334

Renard J, Rosen LG, Loureiro M, De Oliveira C, Schmid S, Rushlow WJ, Laviolette SR (2017) Adolescent cannabinoid exposure induces a persistentsub-cortical hyper-dopaminergic state and associated molecular adaptations in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 27: 1297 – 1310

Ricciardi S, Boggio EM, Grosso S, Lonetti G, Forlani G, Stefanelli G, Calcagno E, Morello N, Landsberger N, Biffo S *et al* (2011) Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum Mol Genet* 20: 1182 – 1196

Rubino T, Parolaro D (2013) Cannabis abuse in adolescence and the risk of psychosis: a brief review of the preclinical evidence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 52: 41 – 44

Rubino T, Prini P, Piscitelli F, Zamberletti E, Trusel M, Melis M, Sagheddu C, Ligresti A, Tonini R, Di Marzo V *et al* (2015) Adolescent exposure to THC in female rats disrupts developmental changes in the prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 73: 60 – 69

Rubino T, Parolaro D (2016) The impact of exposure to cannabinoids in adolescence: insights from animal models. *Biol Psychiatry* 79: 578 – 585

Ruiz A, Campanac E, Scott RS, Rusakov DA, Kullmann DM (2010) Presynaptic GABAA receptors enhance transmission and LTP induction at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Neurosci* 13: 431 – 438

Ryskalin L, Limanaqi F, Frati A, Busceti CL, Fornai F (2018) mTOR-related brain dysfunctions in neuropsychiatric disorders. *Int J Mol Sci* 19: E2226

Saravia R, Ten-Blanco M, Julia-Hernandez M, Gagliano H, Andero R, Armario A, Maldonado R, Berrendero F (2019) Concomitant THC and stress adolescent exposure induces impaired fear extinction and related neurobiological changes in adulthood. *Neuropharmacology* 144: 345 – 357

Sato A (2016) mTOR, a potential target to treat autism spectrum disorder. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 15: 533 – 543

Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory,and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1760 – 1769

Schweinsburg AD, Brown SA, Tapert SF (2008) The influence of marijuana use on neurocognitive functioning in adolescents. *Curr Drug Abuse Rev* 1: 99 – 111

Shah MM (2014) Cortical HCN channels: function, trafficking and plasticity. *J Physiol* 592: 2711 – 2719

Sharma A, Hoeffer CA, Takayasu Y, Miyawaki T, McBride SM, Klann E, ZukinRS (2010) Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J Neurosci* 30: 694 – 702

Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 417 – 463

Stefanis NC, Delespaul P, Henquet C, Bakoula C, Stefanis CN, Van Os J (2004) Early adolescent cannabis exposure and positive and negative dimensionsof psychosis. *Addiction* 99: 1333 – 1341

Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1784: 116 – 132

Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J (2017) Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience* 341: 112 – 153

Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, Sonders MS, Kanter E, Castagna C, Yamamoto A *et al* (2014) Loss of mTOR-dependent

 ª 2020 The Authors

macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 83:1131 – 1143
Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8: 1727 – 1734
Teissier A, Soiza-Reilly M, Gaspar P (2017) Refining the role of 5-HT in postnatal development of brain circuits. *Front Cell Neurosci* 11: 139
Thuault SJ, Malleret G, Constantinople CM, Nicholls R, Chen I, Zhu J, Panteleyev A, Vronskaya S, Nolan MF, Bruno R *et al* (2013) Prefrontalcortex HCN1 channels enable intrinsic persistent neural firing and executive memory function. *J Neurosci* 33: 13583 – 13599
Troca-Marin JA, Alves-Sampaio A, Montesinos ML (2012) Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. *Prog Neurobiol* 96: 268 – 282
Vogels TP, Abbott LF (2009) Gating multiple signals through detailed balanceof excitation and inhibition in spiking networks. *Nat Neurosci* 12: 483 – 491
Yamamoto S, Yoshimura M, Shin MC, Wakita M, Nonaka K, Akaike N (2011) GABA(A) receptor-mediated presynaptic inhibition on glutamatergic transmission. *Brain Res Bull* 84: 22 – 30
Younts TJ, Monday HR, Dudok B, Klein ME, Jordan BA, Katona I, Castillo PE (2016) Presynaptic protein synthesis is required for long-term plasticity of GABA release. *Neuron* 92: 479 – 492
Yun HM, Rhim H (2011) The serotonin-6 receptor as a novel therapeutic target. *Exp Neurobiol* 20: 159 – 168
Zamberletti E, Beggiato S, Steardo L Jr, Prini P, Antonelli T, Ferraro L, Rubino T, Parolaro D (2014) Alterations of prefrontal cortex GABAergic transmission inthe complex psychotic-like phenotype induced by adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats. *Neurobiol Dis* 63: 35 – 47
Zhang X, He X, Li Q, Kong X, Ou Z, Zhang L, Gong Z, Long D, Li J, Zhang M*et al* (2017) PI3K/AKT/mTOR signaling mediates valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells through epigenetic modifications. *Stem Cell Reports* 8: 1256 – 1269

License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the originalwork is properly cited

Ces deux études, réalisées dans deux modèles différents : un modèle pharmacologique neurodéveloppemental de schizophrénie et un modèle de consommation chronique de cannabis durant l'adolescence, permettent de mettre en avant que l'activation de la voie mTOR par le récepteur 5-HT_6 est un mécanisme commun à l'origine des déficits cognitifs observés dans ces deux modèles.

Nous avons également démontré que le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT_6-mTOR durant l'adolescence permet de prévenir dans ces deux modèles les altérations synaptiques et neuronales ainsi que les troubles cognitifs. Associés à une meilleure tolérance que pour les inhibiteurs de mTOR, ces résultats constituent une preuve de concept en faveur d'un repositionnement des antagonistes/agonistes inverses du récepteur 5-HT_6 comment traitement curatif. Ce traitement permettrait de ralentir ou arrêter l'évolution de la schizophrénie à un stade précoce de la maladie et ainsi prévenir l'émergence des déficits cognitifs chez les sujets à très haut-risque de transition.

II. Implication du récepteur 5-HT$_{2A}$ dans les symptômes négatifs de la schizophrénie

A. Contexte

Les symptômes négatifs de la schizophrénie se caractérisent par une catégorie de symptômes avec : l'apathie (état d'indifférence émotionnelle), l'anhédonie (difficulté à ressentir du plaisir), l'avolition (manque de motivation) et la difficulté à ressentir et exprimer des émotions (Yohn and Conn, 2019). On distingue les symptômes négatifs primaires (considérés comme partie intégrante de la physiopathologie de la schizophrénie) et les symptômes négatifs secondaires (considérés comme une conséquence des symptômes positifs, d'une dépression, des effets secondaires des antipsychotiques ou d'abus de substances). Ces symptômes sont peu pris en charge par les antipsychotiques actuellement disponibles. De plus, il est souvent difficile de réellement distinguer les symptômes négatifs de la schizophrénie des symptômes dépressifs. Il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'existence de ces symptômes.

Les récepteurs 5-HT$_{2A}$ sont abondamment exprimés dans le CPF notamment dans les neurones pyramidaux de la couche V dont ils contrôlent l'excitabilité (Béïque et al., 2004; Zhou and Hablitz, 1999). Les récepteurs 5-HT$_{2A}$ sont également exprimés dans d'autres structures comme le thalamus où ils ont été détectés au niveau présynaptique dans les fibres thalamiques du noyau medio dorsal qui projettent au niveau cortical (Jakab and Goldman-Rakic, 1998; Marek et al., 2001). Plusieurs études ont montré que l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$ au niveau du CPF induit une augmentation de l'activité spontanée (Aghajanian and Marek, 1999; Béïque et al., 2004). Les altérations de la boucle thalamo-corticale seraient associées en partie aux déficits cognitifs et symptômes négatifs observés chez les patients schizophrènes. Cependant, le rôle des récepteurs 5-HT$_{2A}$ dans la modulation de la transmission synaptique thalamo-corticales, qui jouent un rôle clef dans les fonctions exécutives, reste à ce jour méconnu.

Dans des études précédentes, en combinant des analyses éléctrophysiologiques sur tranches aigües de CPF, à des approches virales et comportementales mon équipe a caractérisé la fonction physiologique des récepteurs 5-HT$_{2A}$ au niveau des synapses thalamo-corticales et démontré que l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$ pré- et postsynaptiques à ce niveau module la transmission et la plasticité synaptique glutamatergique en favorisant l'induction de différents types de LTD (Barre et al., 2016; Berthoux et al., 2019). Ces modulations sont induites par la phosphorylation de la Ser^{1303} des sous-unités GluN2B des récepteurs NMDA (Barre et al., 2016) ou la phosphorylation de la Ser^{880} des sous unités GluA2 des récepteurs AMPA (Berthoux et al., 2019) au niveau synaptique.

La littérature rapporte que les souris traitées de façon chronique avec la PCP présentent des symptômes compatibles avec un phénotype dépressif, démontrés notamment par une augmentation de l'immobilité dans le FST (Noda et al., 1995, 2000). Certains travaux réalisés dans des modèles de rongeurs rapportent aussi une amélioration de ces symptômes après traitement avec des antipsychotiques atypiques ciblant le récepteur 5-HT$_{2A}$ (Noda et al., 1997), suggérant l'implication

probable des récepteurs 5-HT$_{2A}$. En accord avec cette hypothèse, d'autres travaux montrent une augmentation extracellulaire de sérotonine dans le modèle pharmacologique de schizophrénie (injection de PCP) (Martin et al., 1998; Noda et al., 1997), ce qui pourrait entraîner une activation prolongée des récepteurs 5-HT$_{2A}$. Au vu de ces résultats et sachant que ces récepteurs sont aussi la cible de certains antipsychotiques atypiques et d'antidépresseurs, nous nous sommes intéressés à l'implication de ces récepteurs dans les symptômes négatifs de la schizophrénie au travers d'expériences comportementales et de biochimie (**Figure 62**).

B. Les symptômes négatifs dans le modèle PCP dépendent des récepteurs 5-HT$_{2A}$

a. Expression de déficits comportementaux apparentés aux symptômes négatifs de la schizophrénie dans le modèle PCP

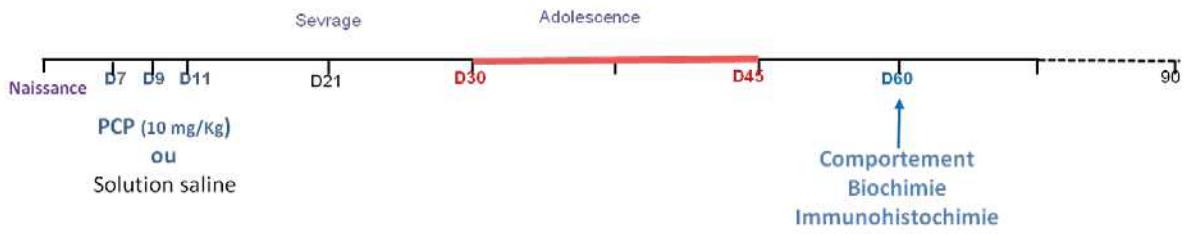


Figure 62 : Schéma expérimental utilisé pour le modèle PCP. Les souris contrôles (Veh) ou 5-HT$_{2A}^{-/-}$ sont injectées soit avec la PCP (10mg/kg) soit avec une solution saline, aux jours 7, 9 et 11 post-nataux. Les expériences comportementales sont ensuite réalisées à l'âge adulte (jour 60).

J'ai dans un premier temps évalué les symptômes négatifs (similaires aux symptômes dépressifs chez le rongeur) dans le modèle PCP. Les analyses comportementales effectuées montrent que les souris PCP présentent des altérations dans différents tests de dépression ou d'anhédonie (**Figure 63**) par rapport aux souris contrôles (Veh). Les souris PCP présentent un temps d'immobilité supérieur (PCP : 176,7 ± 8,5 sec) par rapport aux souris contrôles (Veh : 123,2 ± 11,6 sec ; $p < 0,001$ *vs* PCP) dans le test de nage forcée (FST), ce qui traduit un état de démotivation, dépression. Ces souris présentent aussi une diminution de la préférence au sucrose (PCP : 0,54 ± 0,04) par rapport aux souris contrôles (Veh : 0,76 ± 0,02 ; $p < 0,001$ *vs* PCP), ce qui traduit de l'anhédonie dans ce modèle. Enfin, dans le splash test qui permet d'évaluer le comportement de toilettage après vaporisation d'une solution de sucrose sur le pelage, les souris PCP présentent une diminution du temps de nettoyage (grooming) (PCP : 50,73 ± 4,9 sec) par rapport aux souris contrôles (Veh : 79,44 ± 6,28 sec ; $p < 0,01$ *vs* PCP) ainsi qu'une augmentation de la latence pour initier le grooming (PCP : 20,71 ± 2,73). Ces données traduisent un état anxio-depressif chez l'animal.

L'ensemble de ces comportements fait partie des symptômes négatifs retrouvés chez les patients schizophrènes. Il est important de noter que la frontière entre les symptômes négatifs et les troubles dépressifs de comorbidité est cliniquement floue chez les patients schizophrènes. Dans les modèles murins, aucun test comportemental ne peut faire le *distinguo*.

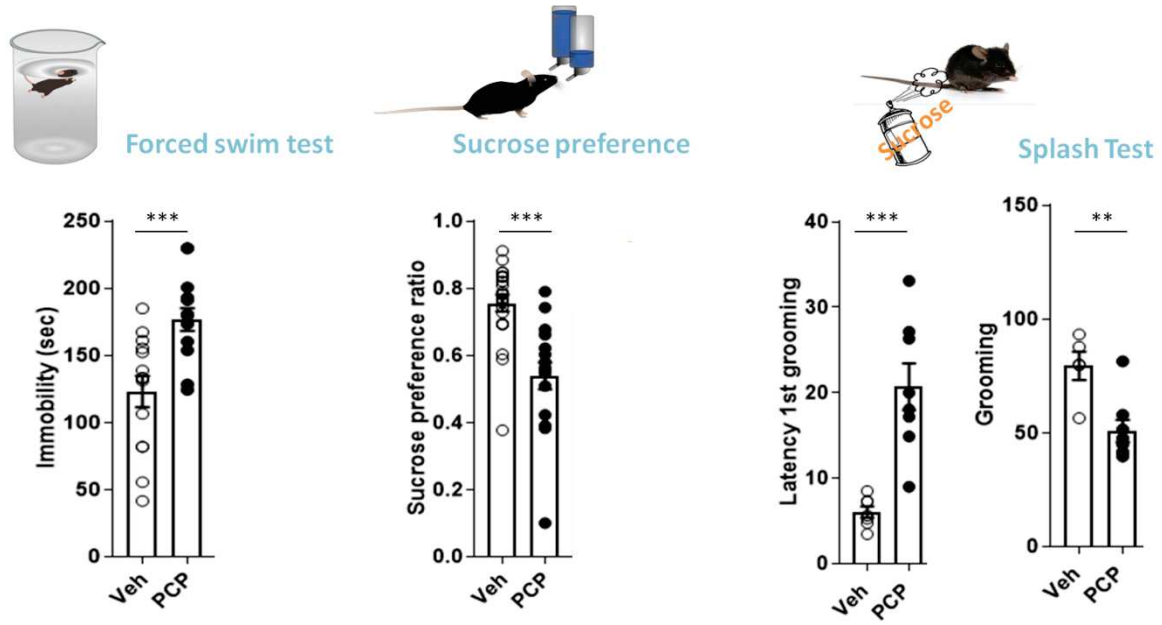


Figure 63 : Les souris PCP présentent des déficits semblables aux symptômes négatifs observés dans la schizophrénie. Histogrammes quantitatifs représentant respectivement : le temps d'immobilité dans le test de nage forcé (Forced swim test – FST) ; le ratio de préférence au sucrose dans le test de préférence sucrose et le temps de « nettoyage » (grooming) et la latence avant le premier grooming pour le splash test. FST : Veh, n = 14, 123,2 ± 11,6 sec ; PCP, n = 14, 176,7 ± 8,5 sec. Préférence sucrose : Veh, n = 22, 0,76 ± 0,03 ; PCP, n = 17, 0,54 ± 0,04. Splash test : Veh, n = 7 ; PCP, n = 8 – temps avant premier grooming : Veh, 6,03 ± 0,67 sec ; PCP, 20,71 ± 2,73 sec – temps de grooming : Veh, 79,44 ± 6,28 sec ; PCP, 50,73 ± 4,89 sec. Analyse statistique unpaired t-test, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Afin de déterminer si les récepteurs 5-HT$_{2A}$ sont impliqués dans ces symptômes, j'ai réalisé les mêmes expériences sur les souris 5-HT$_{2A}^{-/-}$ injectées soit avec de la PCP (PCP 5-HT$_{2A}^{-/-}$), soit avec la solution saline (Veh 5-HT$_{2A}^{-/-}$) au stade néonatal (**Figure 64**). Les souris PCP 5-HT$_{2A}^{-/-}$ ne présentent pas de différences significatives par rapport aux souris Veh 5-HT$_{2A}^{-/-}$ dans aucun de ces trois tests. L'ensemble de ces résultats suggère que les souris PCP présentent des symptômes de type négatifs qui dépendent des récepteurs 5-HT$_{2A}$.

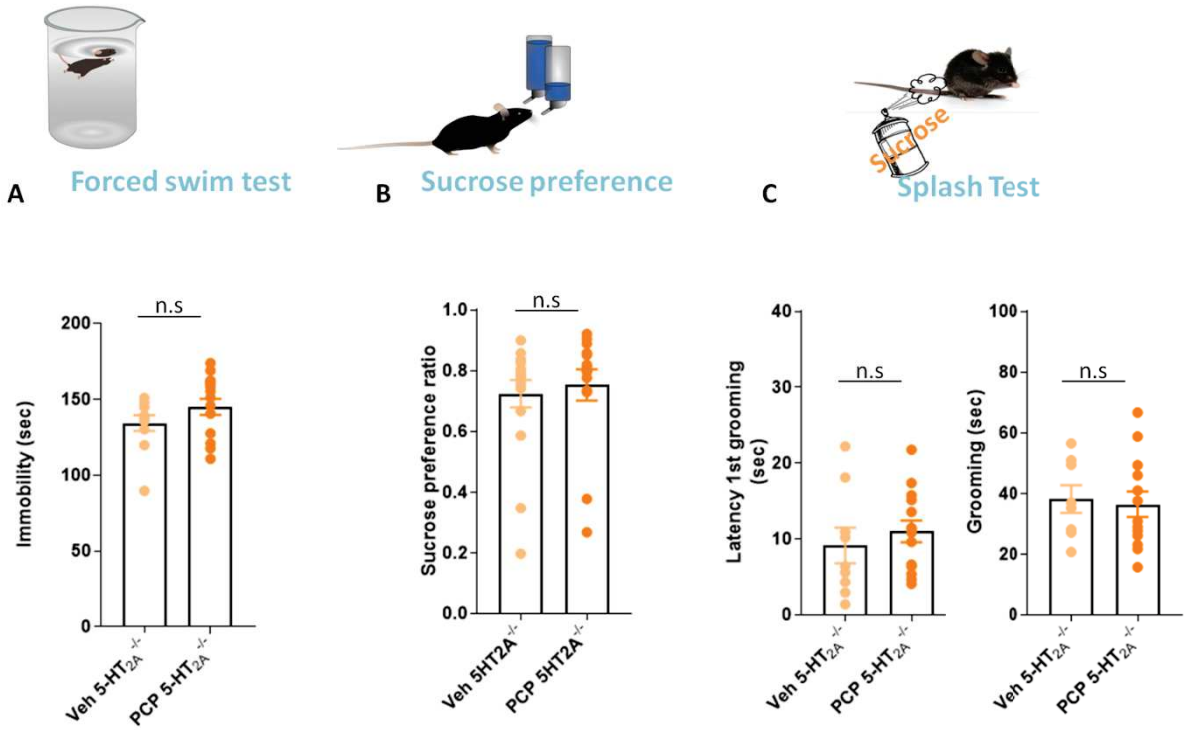


Figure 64 : Implication des récepteurs 5-HT2A dans les symptômes négatifs présents dans le modèle PCP. FST : Veh 5-HT$_{2A}^{-/-}$ n = 11, 134,3 ± 5,2 ; PCP 5-HT$_{2A}^{-/-}$ n = 15, 145,0 ± 5,3 ; Préférence sucrose : Veh 5-HT$_{2A}^{-/-}$, n = 17, 0,72 ± 0,05 ; PCP 5-HT$_{2A}^{-/-}$, n = 14, 0,75 ± 0,05. Splash test : temps avant premier grooming : Veh 5-HT$_{2A}^{-/-}$, n = 9, 9,12 ± 2,35 sec ; PCP 5-HT$_{2A}^{-/-}$, n = 14, 10,99 ± 1,42 sec – temps de grooming : Veh 5-HT$_{2A}^{-/-}$, n = 8, 38,13 ± 4,56 sec ; PCP 5-HT$_{2A}^{-/-}$, n = 13, 32,12 ± 3,83 sec. Analyses statistiques : n.s. non significatif $P > 0.05$.

Enfin, nous avons testé l'efficacité d'un antagoniste des récepteurs 5-HT$_{2A}$ pour confirmer les résultats obtenus chez les souris mutantes 5-HT$_{2A}^{-/-}$. Nous avons choisi la Clozapine qui est utilisée comme antipsychotique chez les patients schizophrènes. L'administration de Clozapine 30min avant les tests, aux souris PCP adultes abolit les symptômes négatifs (FST et préférence sucrose) observés dans ce modèle confirmant l'implication des récepteurs 5-HT$_{2A}$ dans l'expression de ces symptômes chez la souris (**Figure 65**).

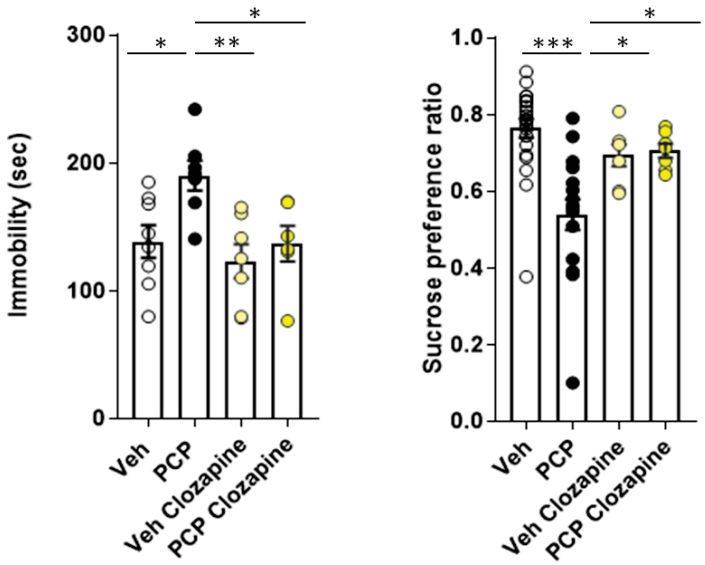


Figure 65 : L'injection de clozapine aux souris PCP permet de prévenir les déficits observés. Les souris PCP injectées à la clozapine, 30min avant les tests présentent un temps d'immobilité dans le FST diminué et un temps de préférence au sucrose augmenté. FST (en sec) : Veh, n = 8, 138,6 ± 12,8 ; PCP, n = 7, 190,2 ± 11,8 ; Veh clozapine, n = 7, 123,0 ± 13,37 ; PCP clozapine, n = 7, 136,8 ± 14,0. Préférence sucrose : Veh, n = 22, 0,76 ± 0,02 ; PCP, n = 17, 0,54 ± 0,04 ; Veh clozapine, n = 7, 0,70 ± 0,03 ; PCP clozapine, n = 7, 0,71 ± 0,02. Analyses statistiques : One-way Anova suivi d'un Dunnett's test pour multiple comparaison. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

b. Expression des récepteurs 5-HT$_{2A}$ augmentée dans le modèle PCP associée à une modulation de la transmission glutamatergique

Parallèlement aux analyses comportementales, j'ai réalisé (en collaboration avec Camille Coudert, interne en psychiatrie au CHU de Montpellier et étudiante en Master 2 Biologie-Santé) une analyse biochimique sur les extraits de CPF des animaux PCP afin d'étudier l'état de phosphorylation des récepteurs ionotropiques du glutamate dont mon laboratoire avait démontré une augmentation de l'état de phosphorylation suite à l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$. Cette analyse a été réalisée par western-blot, à partir d'extraits de CPF de souris. Dans le modèle PCP, nous observons une augmentation de l'état de phosphorylation des sous unités GluN2B des récepteurs NMDA, de la sous unité GluA2 des récepteurs AMPA ainsi que de la protéine ERK, un des effecteurs de la voie de signalisation Gq dépendante induite par les récepteurs 5-HT$_{2A}$, par rapport aux souris contrôles (les quantifications sont en cours d'analyse). Ces états de phosphorylation augmentés ne sont pas observés chez les souris 5-HT$_{2A}^{-/-}$ injectées avec la PCP au stade néonatal suggérant qu'ils sont spécifiquement induits par l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$ (**Figure 66**).

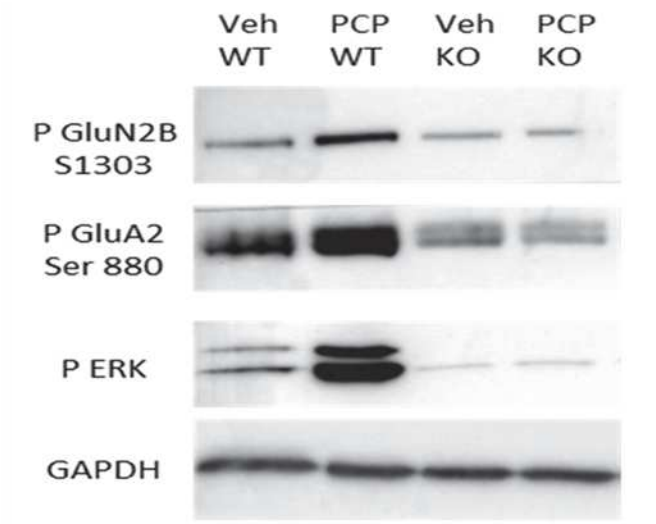


Figure 66 : Etat de phosphorylation des récepteurs ionotropiques du glutamate et de la protéine ERK dans le CPF de souris contrôles ou 5-HT$_{2A}^{-/-}$ injectées ou non avec la PCP *Résultats obtenus par Camille Coudert.*

Afin de déterminer si l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$ (observée biochimiquement dans le modèle PCP) est induite par une altération de la transmission sérotoninergique (hypothèse d'après les résultats obtenus), nous avons réalisé une analyse immunohistochimique sur des tranches de CPF de souris PCP ou contrôles en utilisant des anticorps dirigés contre la sérotonine, le ligand endogène des récepteurs 5-HT$_{2A}$, et contre SERT, le transporteur de la sérotonine (marqueur des fibres sérotoninergiques). Les souris PCP présentent un taux de marquage 5-HT significativement inférieur aux contrôles sans altération du marquage SERT (**Figure 67**).

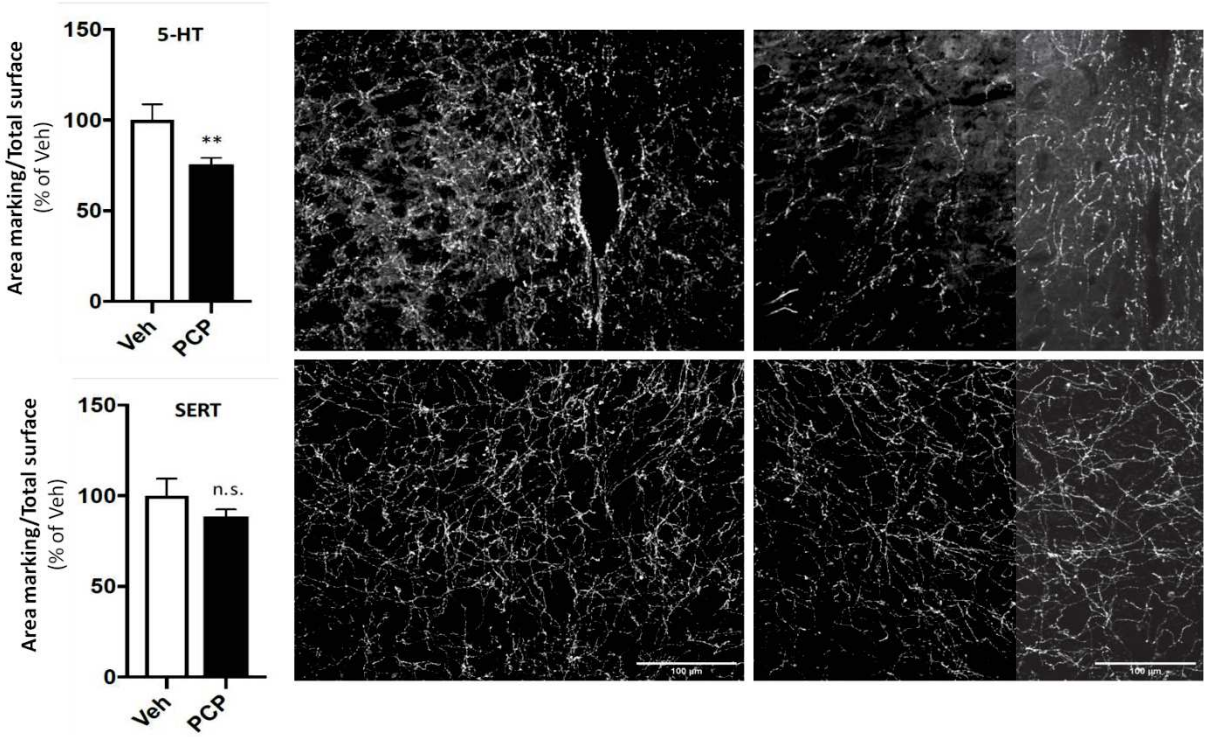


Figure 67 : Augmentation de la transmission sérotoninergique dans le modèle PCP. Immunofluorescences et quantifications de la surface de marquage de 5-HT et SERT entre les souris Veh et PCP. Aire de marquage analysée au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du CPF (tranches de 50 µm). Analyse statistique, unpaired t-Test. n.s. non significatif $P > 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

Ces résultats suggèrent une diminution de la quantité de sérotonine (5-HT) dans les fibres sérotoninergiques pouvant être due à une diminution d'innervation sérotoninergique, une augmentation de sa libération, et/ou une diminution de sa synthèse. Le marquage obtenu avec l'anticorps SERT étant similaire dans les deux conditions (souris Veh et PCP) et au vu des résultats que nous avons obtenus lors de notre analyse biochimique, notre hypothèse est qu'il y aurait une augmentation/dérégulation de la libération de sérotonine chez les souris PCP. Ceci peut expliquer l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$ (mais aussi des récepteurs 5-HT$_6$) dans ce modèle.

Ensuite, nous avons évalué en analyse biochimique le niveau d'expression des récepteurs 5-HT$_{2A}$ au niveau du CPF des souris PCP par rapport aux souris Veh. Les souris PCP présentent un niveau d'expression des récepteurs 5-HT$_{2A}$ significativement supérieur par rapport aux souris Veh (**Figure 68**). Ces résultats suggèrent l'apparition d'un phénomène neurodéveloppemental d'adaptation (de type hebbian) suite à un excès de sérotonine.

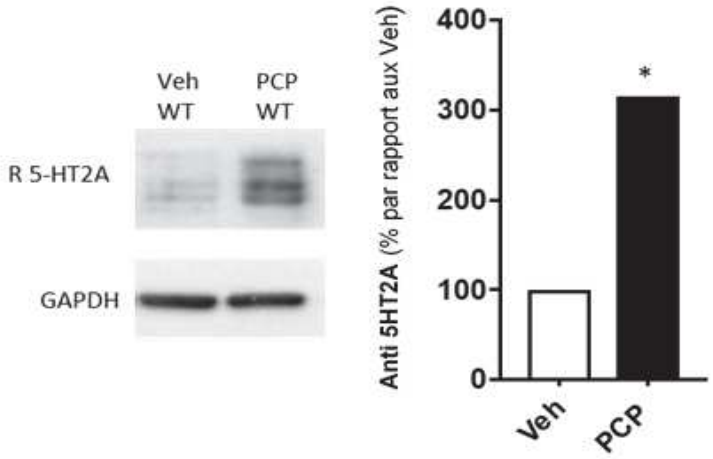


Figure 68 : Augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT$_{2A}$ dans le modèle PCP. Western blot et histogrammes quantitatifs associés montrant le taux des récepteurs 5-HT$_{2A}$ (en %) entre les souris contrôles (Veh, n = 3) et les souris PCP (n = 3). Analyses statistiques : Unpaired t-test. *P < 0.05. *Résultats obtenus par Camille Coudert – Etudiante M2.*

Dans cette étude, nous avons démontré que les souris PCP présentent des symptômes de type négatif dépendant de l'activation des récepteurs 5-HT$_{2A}$. Les résultats obtenus en immunohistochimie suggèrent que cette activation dépend d'une augmentation de la libération de 5-HT dans le modèle PCP. De plus, nous avons démontré que les souris PCP présentent au niveau du CPF, un niveau d'expression de récepteurs 5-HT$_{2A}$ supérieur à celui des souris contrôles. Ce résultat étonnant pourrait être dû à un mécanisme neurodéveloppemental adaptatif en réponse à l'excès de 5-HT. Ainsi, le phénotype observé chez les souris PCP pourrait être secondaire à une activation soutenue des récepteurs 5-HT$_{2A}$ au niveau du CPF, entraînant ainsi des altérations de la plasticité cérébrale au niveau neurodéveloppemental. Afin de confirmer et d'approfondir ces hypothèses, d'autres travaux vont être nécessaires. Notamment, il faudra confirmer l'hypothèse d'une augmentation de la transmission sérotoninergique en dosant le niveau de sérotonine extra-cérébrale au niveau du CPF (expériences de microdialyse, en cours avec l'équipe d'Alain Gardier, Paris-Saclay) et vérifier en immunofluorescence la présence de l'enzyme limitante de la formation de la sérotonine, la 5-hydroxytryptophane (5-HTP).

Discussion et perspectives

Malgré de grandes avancées réalisées ces dernières années dans le traitement de la schizophrénie, cette maladie reste encore mal prise en charge. Comme nous avons pu le voir, les antipsychotiques disponibles sur le marché sont efficaces pour traiter les symptômes positifs comme les hallucinations et délires paranoïdes mais ont un effet mineur sur les symptômes négatifs et sont inefficaces sur les déficits cognitifs observés dans cette pathologie. A cela s'ajoutent de nombreux effets secondaires suite à la prise d'antipsychotiques, entraînant souvent l'arrêt de la prise du traitement par les patients. Traiter ces symptômes devient donc un enjeu majeur, et en particulier les symptômes cognitifs, qui sont les premiers à apparaître et qui sont très handicapants dans le quotidien des personnes malades. L'adolescence est une période de grands changements et correspond à la période d'émergence de ces symptômes, cependant on sait aussi que durant cette période le cerveau, plus particulièrement le CPF, va subir une réorganisation majeure et qu'il est associé à une grande plasticité. Ces phénomènes permettent une forte capacité de régénération et de réadaptation, il faudrait donc intervenir de façon très précoce, dès le début de la maladie ou avant l'apparition des premiers symptômes (chez les personnes à très haut-risque de conversion) afin d'éviter leur émergence.

Mon travail de thèse s'est intéressé aux bénéfices d'un blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR pour prévenir les déficits cognitifs de la schizophrénie, dans un modèle pharmacologique, le modèle PCP. Je me suis également intéressée à l'implication des récepteurs de la sérotonine 5-HT$_{2A}$ dans les symptômes négatifs observés dans ce modèle d'étude. L'ensemble de mon étude démontre l'altération du système sérotoninergique dans ce modèle et le fort intérêt thérapeutique de ces deux récepteurs de la sérotonine.

I. Bénéfices d'un blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR sur les déficits cognitifs de la schizophrénie

Dans ce travail, nous avons démontré l'importance du blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR pour prévenir les altérations neuronales et synaptiques associées aux déficits cognitifs observés dans le modèle pharmacologique PCP de la schizophrénie. Nous avons ainsi décrit une activation non physiologique et soutenue de la voie mTOR spécifiquement dans le CPF, qui peut être prévenue par un blocage précoce durant l'adolescence des récepteurs 5-HT$_6$. Les résultats montrent que la fenêtre thérapeutique idéale pour empêcher l'apparition des déficits cognitifs à l'âge adulte est l'adolescence, période critique de maturation du CPF. Comme nous l'avons vu précédemment, pendant cette période, le CPF va subir des réorganisations structurelles et fonctionnelles majeures associées à des phénomènes de grande plasticité, entraînant à la fois une très grande vulnérabilité aux facteurs environnementaux, comme le cannabis, qui peuvent devenir des facteurs de risques de développer des pathologies psychiatriques. Cependant, cette restructuration est aussi très intéressante d'un point de vue thérapeutique. En effet, une intervention à ce moment-là pourrait modifier les réseaux neuronaux du CPF et donc probablement les origines des déficits cognitifs et cela de façon durable. Ainsi, un traitement administré à l'âge adulte, n'a pas d'effet à long terme sur les déficits observés dans le modèle et ne constitue donc qu'un traitement symptomatique.

Au laboratoire, nous avons depuis peu la lignée Disc1-L100P, ces souris représentent un modèle génétique de la schizophrénie. En effet, comme nous avons pu le voir dans la partie « Introduction », ces souris regroupent plusieurs caractéristiques histologies et comportementales de la schizophrénie (Brandon and Sawa, 2011; Clapcote et al., 2007; Lee et al., 2011). De plus, il a été montré dans un modèle DISC1 une association entre l'activation non physiologique de la voie mTOR et des déficits cognitifs de la même façon que nous l'avons observé dans le modèle PCP et THC. Zhou et al., ont ainsi montré les bénéfices d'un traitement aigu avec de la rapamycine pour abolir le déficit observé dans le test de reconnaissance d'objets dans un modèle conditionnel de KO DISC1 (suppression de la protéine Disc1, spécifiquement dans les neurones du gyrus denté) (Zhou et al., 2013). Ainsi il serait intéressant au travers d'expériences de biochimie, électrophysiologie et comportement d'évaluer si le blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR permettrait de prévenir les altérations synaptiques et neuronales ainsi que les déficits cognitifs associés dans le modèle Disc1-L100P.

Nous avons obtenu les mêmes bénéfices du blocage précoce de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR dans un modèle de consommation chronique de THC pendant l'adolescence dans lequel la dérégulation de la voie 5-HT$_6$-mTOR est également associée à des déficits cognitifs (Berthoux et al. 2020) démontrant la pertinence de cette stratégie de modification de la maladie basée sur l'administration précoce d'antagonistes 5-HT$_6$, stratégie qui pourrait être étendue à d'autres pathologies comme par exemple les troubles du spectre autistique, qui partagent avec la schizophrénie, de nombreuses caractéristiques neurodéveloppementales causées par une activation précoce et aberrante de la voie de signalisation mTOR (**Figure 69**).

A. Dérégulation des interneurones PV

Nous avons montré dans le modèle PCP – un modèle pharmacologique de la schizophrénie – des altérations synaptiques au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du CPF. Nous soulignons notamment une modification des propriétés intrinsèques et une altération au niveau de la balance excitation/inhibition qui seraient à l'origine des déficits cognitifs observés. La dérégulation dans cette balance est cruciale dans le développement de la pathologie. Nous avons vu dans la partie « Introduction » que les interneurones PV jouent un rôle majeur dans le maintien de cette balance (Ferguson and Gao, 2018). De plus, il a été montré que l'expression de la PV dans les interneurones GABAergiques est tardive et va se poursuivre tout au long de l'adolescence (Le Magueresse and Monyer, 2013). Cette expression durant l'adolescence est capitale pour le bon fonctionnement des interneurones GABAergiques au niveau du CPF à l'âge adulte (Caballero et al., 2020) notamment pour maintenir la plasticité synaptique (Caballero et al., 2014; Caillard et al., 2000). Des altérations se produisant à ce moment-là du développement du réseau GABAergique entrainent diverses vulnérabilités pouvant être à l'origine de l'apparition de pathologies psychiatriques se manifestant plus tardivement (Caballero and Tseng, 2016). Ainsi, une diminution de GAD67 – l'enzyme permettant la synthèse de GABA – ainsi qu'une diminution des niveaux de PV dans les interneurones PV+ du CPF associées à une hypofonction des interneurones PV+ a été observée chez les patients schizophrènes (Glausier and Lewis, 2017). Bien que nous ne l'ayons pas quantifié dans notre modèle chez la souris, la diminution de ces deux marqueurs GABAergiques a été observée au niveau du CPF dans un modèle d'injections subchroniques de PCP chez le rat (Amitai et al., 2012). Pour la suite, il serait intéressant de quantifier l'expression de l'ARNm de ces marqueurs, l'expression des protéines (western-blots

et/ou immunohistochimie) et du GABA par microdialyses, dans le modèle d'injections néonatales de PCP. Il semble essentiel de réaliser cette étude à différent moment du développement, en début et fin de l'adolescence ainsi qu'à l'âge adulte et cela en présence ou en absence des inhibiteurs de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. Fort du modèle 5-HT$_6^{-/-}$, il sera possible aussi de regarder ces niveaux d'expressions dans le modèle PCP chez les souris 5-HT$_6^{-/-}$. Cela nous permettrait d'en savoir plus sur les bénéfices du blocage précoce de cette voie de signalisation ainsi que sur la mécanistique permettant, *in fine*, d'abolir les troubles comportementaux observés.

Enfin, la transmission GABAergique et plus spécifiquement celle impliquant les interneurones PV+ corticaux, est nécessaire pour le maintien des oscillations gamma. Ces oscillations sont indispensables pour intégrer les informations des différentes zones du cerveau et jouent donc un rôle majeur dans la cognition, la mémoire et l'apprentissage. Chez les patients schizophrènes des altérations dans l'activité de ces oscillations ont été observées au niveau du CPF et seraient à l'origine des altérations de la mémoire de travail (Basar-Eroglu et al., 2007; Dienel and Lewis, 2019). Une étude de Kjaerby et al., a montré une augmentation des oscillations gamma dans le CPF suite à des injections de PCP au stade néonatal chez le rat (Kjaerby et al., 2017). Il serait aussi intéressant d'analyser dans le modèle PCP chez la souris que j'ai utilisé durant mon travail de thèse, les oscillations gamma et évaluer les effets du blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR sur ces oscillations.

B. Altérations moléculaires

En plus de l'analyse des rythmes corticaux, il est important de s'intéresser aux altérations moléculaires et aux changements neurochimiques induits par l'injection en néonatal de PCP mais aussi par le blocage durant l'adolescence de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR.

Il serait intéressant d'étudier le profil d'activation de la voie mTOR dans le CPF dans le modèle pharmacologique PCP et dans le modèle génétique Disc1-L100P. L'activité mTOR pourrait-être évaluée par Western-blot, comme nous l'avons fait pendant ma thèse, et par immunohistochimie à l'aide d'anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de la protéine mTOR et de certains de ses substrats. Cette étude nous permettrait de définir les fenêtres temporelles d'activation de mTOR, la/les couche(s) corticale(s) ainsi que le(s) type(s) de neurones où mTOR est activée. Cela nous permettrait également de déterminer si la fenêtre temporelle d'activation de mTOR est identique entre les deux modèles.

L'activation soutenue de la protéine mTOR observée dans le CPF des souris PCP suggère qu'elle puisse déclencher des événements de phosphorylations spécifiques au niveau neuronal. De façon plus globale, il serait donc intéressant d'identifier et quantifier les modifications du phosphoprotéome induites dans le CPF des deux modèles de schizophrénie et de déterminer si le blocage précoce de la voie 5-HT$_6$-mTOR peut prévenir ces changements. Cette analyse devrait permettre d'identifier les signalisations et les substrats moléculaires impliqués dans les altérations synaptiques observées chez les souris PCP et dépendants de la voie de signalisation mTOR activée par le récepteur 5-HT$_6$.

La plupart des voies de signalisation contrôlent des mécanismes importants de la régulation de l'expression des gènes tels que les mécanismes épigénétiques qui peuvent générer des modifications à long terme dans les neurones. Cependant, les modifications épigénétiques induites par des récepteurs synaptiques comme les récepteurs 5-HT, et leur rôle dans les maladies psychiatriques restent encore à ce jour peu caractérisés. Sachant que mTOR contrôle l'état de phosphorylation de protéines impliquées notamment dans les mécanismes épigénétiques, son activation physiologique ou

non-physiologique dans le CPF pourrait entraîner des modifications de l'expression de gènes sous-jacentes à l'expression et à la stabilisation des déficits cognitifs observés dans la schizophrénie. Ainsi, des analyses transcriptomiques (expression génique) et épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones et réarrangements de la chromatine) dans les neurones pyramidaux et les interneurones GABAergiques du CPF des souris PCP permettraient d'évaluer l'impact de l'activation de la voie de signalisation mTOR. Afin de purifier les neurones pyramidaux nous pourrions utiliser les souris Thy1-YFP +/- PCP (la protéine Yellow Fluorescence Protein est contrôlée par le promoteur neuronal Thy1 qui est exprimé spécifiquement dans les neurones pyramidaux de la couche V du CPF chez ces souris). Pour les interneurones GABAergiques, nous pourrions utiliser la lignée de souris GAD67-GFP +/- PCP (GFP pour Green Fluorescent Protein sous le contrôle du promoteur GAD67, qui lui est exclusivement exprimé par les interneurones GABAergique).

La caractérisation des mécanismes de régulation intervenant au niveau nucléaire ouvrira de nouvelles perspectives. Ce domaine de recherche reste largement inexploré dans les pathologies psychiatriques et pourrait permettre de caractériser les modifications durables induites par la voie de signalisation mTOR, elle-même déclenchée par le récepteur 5-HT$_6$.

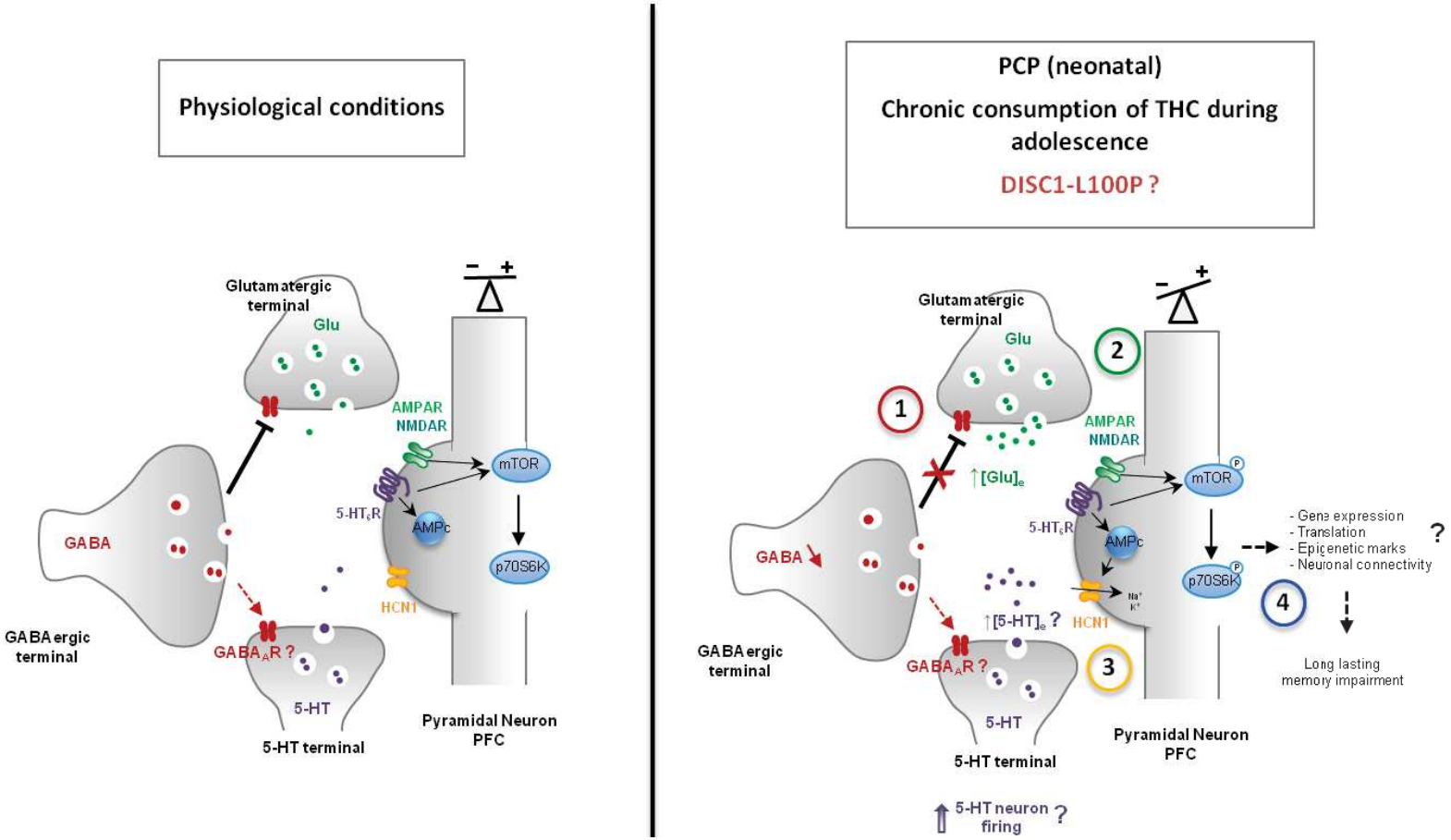


Figure 69 : Schéma récapitulatifs des altérations observées dans les modèles de consommation chronique de THC et d'injections de la PCP au stade néonatal, et des mécanismes possiblement impliqués. A droite : conditions physiologiques. A gauche : il est observé dans ces modèles une diminution de la libération GABAergique (1) entraînant une augmentation de l'activité glutamatergique à l'origine d'une dérégulation de la balance excitation/inhibition (2). L'AMPc module positivement l'activation des canaux HCN1 (3) qui sont à l'origine de l'altération des propriétés intrinsèques. Leur hyperactivation pourrait avoir pour origine l'augmentation de sérotonine extracellulaire qui entraine une activation plus importante des récepteurs 5-HT$_6$ et *in fine* une régulation à la hausse du second messager de ces récepteurs : l'AMPc (3). Cette augmentation extracellulaire de sérotonine serait aussi à l'origine de la suractivation de la voie de signalisation 5-HT$_6$-mTOR. L'activation non physiologique et soutenue de la protéine mTOR (4) pourrait entraîner par exemple des modifications de la régulation traductionnelle et transcriptionnelle, de l'expression des gènes ou de la connectivité neuronale. Dans ces deux modèles l'ensemble des altérations observées entrainent des déficits cognitifs à long terme (modèle DISC1-L100P en cours d'étude).

II. Bénéfices d'un blocage des récepteurs 5-HT$_{2A}$ sur les symptômes négatifs de la schizophrénie

Dans notre étude nous avons montré que les souris PCP présentent des symptômes qui pourraient être associés à des symptômes négatifs et qui s'identifient chez la souris par des comportements dépressifs, caractérisés par une augmentation significative du temps d'immobilité dans le test de nage forcée ainsi que de l'anhédonie associée à une diminution significative de la préférence au sucrose. Cette augmentation du temps d'immobilité avait déjà été observée dans un modèle d'administration subchronique de PCP chez des souris adultes (Noda et al., 1995). Les symptômes négatifs de la schizophrénie et les symptômes de dépression sont similaires avec un manque de motivation et des comportements de « désespoir ». C'est pourquoi il est important de noter que le FST utilisé pour analyser les comportements dépressifs est validé pour évaluer aussi les symptômes négatifs dans les modèles murins (Chatterjee et al., 2012). Quant au test de préférence au sucrose, il est l'un des tests les plus utilisés pour caractériser l'anhédonie dans les modèles murins notamment.

D'après nos analyses immunohistochimiques du marquage des fibres sérotoninergique, il y a une diminution du marquage 5-HT dans le CPF des souris PCP qui pourrait traduire une augmentation de la libération de sérotonine dans ce modèle qui serait à l'origine d'une part de l'augmentation significative de l'activation de la voie de signalisation dépendante des récepteurs 5-HT$_{2A}$ et d'autre part de l'augmentation significative de l'activation de la voie de signalisation mTOR dépendante des récepteurs 5-HT$_6$ au niveau du CPF. L'augmentation de la libération de sérotonine au niveau du CPF médian a déjà été observée, notamment chez le rat adulte, suite à une administration aigüe de PCP (Martin et al., 1998). De façon intéressante, nous avons démontré que les souris injectées avec de la PCP au stade néonatal présentent une augmentation du niveau d'expression des récepteurs 5-HT$_{2A}$ par rapport aux souris contrôles. Les anticorps anti-récepteurs 5-HT$_6$ ne fonctionnant pas en Western-blot nous n'avons pas pu quantifier le niveau d'expression du récepteur dans le CPF des souris PCP.

Le traitement avec la clozapine dans le modèle néonatal PCP a permis de reverser les déficits observés dans le FST et dans la préférence au sucrose. Ceci est en corrélation avec les données de la littérature. En effet, il est rapporté dans un modèle d'injections subchroniques de PCP, que le temps d'immobilité dans le FST est diminué par les antipsychotiques atypiques comme la clozapine (Noda et al., 2000). De façon intéressante, il est montré que l'utilisation d'antipsychotiques de première génération comme l'haloperidol ne permet pas de diminuer ce temps d'immobilité (Adem et al., 2019). Enfin nous avons démontré que certains symptômes négatifs sont absents chez les souris 5-HT$_{2A}^{-/-}$ ayant été injectées avec de la PCP au stade néonatal démontrant l'implication de ce récepteur dans l'expression de ces symptômes.

Pour la suite de l'étude, il serait intéressant de reproduire ces expériences dans un modèle génétique de schizophrénie, le modèle Disc1-L100P afin de déterminer si ces résultats peuvent être généralisés aux différents modèles précliniques de la pathologie.

Nous pourrions également confirmer l'altération de la transmission sérotoninergique dans ces deux modèles de schizophrénie en utilisant une inhibition chimiogénétique de la libération de 5-HT. Pour cela, il sera possible d'exprimer le récepteur inhibiteur DREADD hM4D-mCherry (récepteur activé seulement par des ligands synthétiques) spécifiquement dans les neurones 5-HT du NRD grâce à l'utilisation d'un adénovirus exprimant ce récepteur et qui sera injecté par chirurgie stéréotaxique à

des souris SERTcre (Fernandez et al., 2017). L'activation du récepteur DREADD hM4D par un ligand synthétique comme la clozapine N-oxyde (CNO, qui pourrait être délivrée dans l'eau de boisson durant l'adolescence J30 à J45) bloquerait ainsi spécifiquement l'activité des neurones 5-HT et, par conséquent, la libération de sérotonine pendant cette période. Nous pourrions ensuite analyser le niveau d'activation de la voie mTOR au niveau du CPF ainsi que les effets sur le comportement des animaux adultes afin de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse.

Enfin, un dosage neurochimique des neurotransmetteurs (glutamate, GABA et monoamines) au niveau du CPF des souris PCP et Disc1-L100P, à différents moments du développement (début, fin d'adolescence, et à l'âge adulte) nous permettrait de conforter notre hypothèse de l'augmentation de la transmission sérotoninergique et d'un déséquilibre de la balance excitation/inhibition dans les modèles de schizophrénie.

Bibliographie

A

Abi-Dargham, A. (2007). Alterations of Serotonin Transmission in Schizophrenia. In International Review of Neurobiology, (Academic Press), pp. 133–164.

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

Adell, A. (2020). Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. Biomolecules *10*, 947.

Adem, A., Madjid, N., Stiedl, O., Bonito-Oliva, A., Konradsson-Geuken, Å., Holst, S., Fisone, G., and Ögren, S.O. (2019). Atypical but not typical antipsychotic drugs ameliorate phencyclidine-induced emotional memory impairments in mice. Eur. Neuropsychopharmacol. *29*, 616–628.

Aghajanian, G.K., and Marek, G.J. (1999). Serotonin, via 5-HT2A receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. Brain Res. *825*, 161–171.

Almeida, R.G., and Lyons, D.A. (2017). On Myelinated Axon Plasticity and Neuronal Circuit Formation and Function. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *37*, 10023–10034.

Amitai, N., Kuczenski, R., Behrens, M.M., and Markou, A. (2012). Repeated phencyclidine administration alters glutamate release and decreases GABA markers in the prefrontal cortex of rats. Neuropharmacology *62*, 1422–1431.

Amodeo, D.A., Peterson, S., Pahua, A., Posadas, R., Hernandez, A., Hefner, E., Qi, D., and Vega, J. (2018). 5-HT6 receptor agonist EMD386088 impairs behavioral flexibility and working memory. Behav. Brain Res. *349*, 8–15.

Anastasio, N.C., and Johnson, K.M. (2008). Atypical Antischizophrenic Drugs Prevent Changes in Cortical N-Methyl-D-Aspartate Receptors and Behavior Following Sub-chronic Phencyclidine Administration in Developing Rat Pups. Pharmacol. Biochem. Behav. *90*, 569–577.

Anderson, S.W., Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D., and Damasio, A.R. (1999). Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. Nat. Neurosci. *2*, 1032–1037.

Andrews, M., Tousi, B., and Sabbagh, M.N. (2018). 5HT6 Antagonists in the Treatment of Alzheimer's Dementia: Current Progress. Neurol. Ther. *7*, 51–58.

Andrews, P.W., Bharwani, A., Lee, K.R., Fox, M., and Thomson, J.A. (2015). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. Neurosci. Biobehav. Rev. *51*, 164–188.

Ansorge, M.S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., and Gingrich, J.A. (2004). Early-Life Blockade of the 5-HT Transporter Alters Emotional Behavior in Adult Mice. Science *306*, 879–881.

Arnt, J., Bang-Andersen, B., Grayson, B., Bymaster, F.P., Cohen, M.P., DeLapp, N.W., Giethlen, B., Kreilgaard, M., McKinzie, D.L., Neill, J.C., et al. (2010). Lu AE58054, a 5-HT6 antagonist, reverses cognitive impairment induced by subchronic phencyclidine in a novel object recognition test in rats. Int. J. Neuropsychopharmacol. *13*, 1021–1033.

Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A., and Moffitt, T.E. (2002). Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. BMJ *325*, 1212–1213.

Ashton, C.H. (2003). Comparing cannabis with tobacco: Those who start taking cannabis young have the greatest problems. BMJ *327*, 165.

Atri, A., Frölich, L., Ballard, C., Tariot, P.N., Molinuevo, J.L., Boneva, N., Windfeld, K., Raket, L.L., and Cummings, J.L. (2018). Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease: Three Randomized Clinical Trials. JAMA *319*, 130–142.

B

Bacqué-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., Delbecque, J.-P., Bouguiyoud, N., Di Giovanni, G., Cattaert, D., and De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonin in Animal Cognition and Behavior. Int. J. Mol. Sci. *21*, 1649.

Baghel, M.S., Singh, B., Dhuriya, Y.K., Shukla, R.K., Patro, N., Khanna, V.K., Patro, I.K., and Thakur, M.K. (2018). Postnatal exposure to poly (I:C) impairs learning and memory through changes in synaptic plasticity gene expression in developing rat brain. Neurobiol. Learn. Mem. *155*, 379–389.

Bagni, C., and Zukin, R.S. (2019). A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. Neuron *101*, 1070–1088.

Baker, S.C., Konova, A.B., Daw, N.D., and Horga, G. (2019). A distinct inferential mechanism for delusions in schizophrenia. Brain *142*, 1797–1812.

Ballon, J.S., Dean, K.A., and Cadenhead, K.S. (2008). Obstetrical complications in people at risk for developing schizophrenia. Schizophr. Res. *98*, 307–311.

Barbas (1989). Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey - Barbas - 1989 - Journal of Comparative Neurology - Wiley Online Library.

Barnes, N.M., Ahern, G.P., Becamel, C., Bockaert, J., Camilleri, M., Chaumont-Dubel, S., Claeysen, S., Cunningham, K.A., Fone, K.C., Gershon, M., et al. (2021). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. Pharmacol. Rev. *73*, 310–520.

Barre, A., Berthoux, C., De Bundel, D., Valjent, E., Bockaert, J., Marin, P., and Bécamel, C. (2016). Presynaptic serotonin 2A receptors modulate thalamocortical plasticity and associative learning. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E1382–E1391.

Basar-Eroglu, C., Brand, A., Hildebrandt, H., Karolina Kedzior, K., Mathes, B., and Schmiedt, C. (2007). Working memory related gamma oscillations in schizophrenia patients. Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol. *64*, 39–45.

Bear, M.F., and Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. Curr. Opin. Neurobiol. *4*, 389–399.

Bécamel, C., Berthoux, C., Barre, A., and Marin, P. (2017). Growing Evidence for Heterogeneous Synaptic Localization of 5-HT2A Receptors. ACS Chem. Neurosci. *8*, 897–899.

Bechara, A., Tranel, D., and Damasio, H. (2000). Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. Brain J. Neurol. *123 (Pt 11)*, 2189–2202.

Béïque, J.-C., Campbell, B., Perring, P., Hamblin, M.W., Walker, P., Mladenovic, L., and Andrade, R. (2004). Serotonergic Regulation of Membrane Potential in Developing Rat Prefrontal Cortex: Coordinated Expression of 5-Hydroxytryptamine (5-HT)1A, 5-HT2A, and 5-HT7 Receptors. J. Neurosci. *24*, 4807–4817.

Berger, M., Gray, J.A., and Roth, B.L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. Annu. Rev. Med. *60*, 355–366.

Bergoug, M., Doudeau, M., Godin, F., Mosrin, C., Vallée, B., and Bénédetti, H. (2020). Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. Cells *9*, 2365.

Berthoux, C., Barre, A., Bockaert, J., Marin, P., and Bécamel, C. (2019). Sustained Activation of Postsynaptic 5-HT2A Receptors Gates Plasticity at Prefrontal Cortex Synapses. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *29*, 1659–1669.

Berthoux, C., Hamieh, A.M., Rogliardo, A., Doucet, E.L., Coudert, C., Ango, F., Grychowska, K., Chaumont-Dubel, S., Zajdel, P., Maldonado, R., et al. (2020). Early 5- HT $_6$ receptor blockade prevents symptom onset in a model of adolescent cannabis abuse. EMBO Mol. Med. *12*.

Beszłej, J., Wieczorek, T., Kobyłko, A., Piotrowski, P., Siwicki, D., Weiser, A., Fila-Witecka, K., Rymaszewska, J., and Tabakow, P. (2019). Deep brain stimulation: new possibilities for the treatment of mental disorders. Psychiatr. Pol. *53*, 789–806.

Bicks, L.K., Koike, H., Akbarian, S., and Morishita, H. (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. Front. Psychol. *6*, 1805.

Bijata, M., Labus, J., Guseva, D., Stawarski, M., Butzlaff, M., Dzwonek, J., Schneeberg, J., Böhm, K., Michaluk, P., Rusakov, D.A., et al. (2017). Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix. Cell Rep. *19*, 1767–1782.

Birnbaum, R., and Weinberger, D.R. (2017). Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci. *18*, 727–740.

Blackwood, D.H.R., Fordyce, A., Walker, M.T., St. Clair, D.M., Porteous, D.J., and Muir, W.J. (2001). Schizophrenia and Affective Disorders—Cosegregation with a Translocation at Chromosome 1q42 That Directly Disrupts Brain-Expressed Genes: Clinical and P300 Findings in a Family. Am. J. Hum. Genet. *69*, 428–433.

Bleich, A., Brown, S.L., Kahn, R., and van Praag, H.M. (1988). The role of serotonin in schizophrenia. Schizophr. Bull. *14*, 297–315.

Bockaert, J., and Marin, P. (2015). mTOR in Brain Physiology and Pathologies. Physiol. Rev. *95*, 1157–1187.

Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO J. *18*, 1723–1729.

Bockaert, J., Claeysen, S., Bécamel, C., Pinloche, S., and Dumuis, A. (2002). G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. Int. Rev. Cytol. *212*, 63–132.

Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003). The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. FEBS Lett. *546*, 65–72.

Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M.L., King, J., Shih, J.C., Blakely, R.D., Deneris, E.S., and Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. Nature *472*, 347–350.

Bordi, M., Darji, S., Sato, Y., Mellén, M., Berg, M.J., Kumar, A., Jiang, Y., and Nixon, R.A. (2019). mTOR hyperactivation in Down Syndrome underlies deficits in autophagy induction, autophagosome formation, and mitophagy. Cell Death Dis. *10*, 1–17.

Borkowska, M., Millar, J.K., and Price, D.J. (2016). Altered Disrupted-in-Schizophrenia-1 Function Affects the Development of Cortical Parvalbumin Interneurons by an Indirect Mechanism. PLoS ONE *11*, e0156082.

Bossong, M.G., and Niesink, R.J.M. (2010). Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. Prog. Neurobiol. *92*, 370–385.

Brady, R.O., Gonsalvez, I., Lee, I., Öngür, D., Seidman, L.J., Schmahmann, J.D., Eack, S.M., Keshavan, M.S., Pascual-Leone, A., and Halko, M.A. (2019). Cerebellar-Prefrontal Network Connectivity and Negative Symptoms in Schizophrenia. Am. J. Psychiatry *176*, 512–520.

Brandon, N.J., and Sawa, A. (2011). Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness via DISC1. Nat. Rev. Neurosci. *12*, 707–722.

Brandon, N.J., Millar, J.K., Korth, C., Sive, H., Singh, K.K., and Sawa, A. (2009). Understanding the Role of DISC1 in Psychiatric Disease and during Normal Development. J. Neurosci. *29*, 12768–12775.

Breier, A. (1995). Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action. Schizophr. Res. *14*, 187–202.

Brodsky, M., Gibson, A.W., Smirnov, D., Nair, S.G., and Neumaier, J.F. (2016). Striatal 5-HT 6 Receptors Regulate Cocaine Reinforcement in a Pathway-Selective Manner. Neuropsychopharmacology *41*, 2377–2387.

Brodsky, M., Lesiak, A.J., Croicu, A., Cohenca, N., Sullivan, J.M., and Neumaier, J.F. (2017). 5-HT6 receptor blockade regulates primary cilia morphology in striatal neurons. Brain Res. *1660*, 10–19.

de Bruin, N.M.W.J., and Kruse, C.G. (2015). 5-HT6 Receptor Antagonists: Potential Efficacy for the Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia. Curr. Pharm. Des. *21*, 3739–3759.

de Bruin, N.M.W.J., McCreary, A.C., van Loevezijn, A., de Vries, T.J., Venhorst, J., van Drimmelen, M., and Kruse, C.G. (2013a). A novel highly selective 5-HT6 receptor antagonist attenuates ethanol and nicotine seeking but does not affect inhibitory response control in Wistar rats. Behav. Brain Res. *236*, 157–165.

de Bruin, N.M.W.J., van Drimmelen, M., Kops, M., van Elk, J., Wetering, M.M. de, and Schwienbacher, I. (2013b). Effects of risperidone, clozapine and the 5-HT6 antagonist GSK-742457 on PCP-induced deficits in reversal learning in the two-lever operant task in male Sprague Dawley rats. Behav. Brain Res. *244*, 15–28.

de Bruin, N.M.W.J., van Loevezijn, A., Wicke, K.M., de Haan, M., Venhorst, J., Lange, J.H.M., de Groote, L., van der Neut, M.A.W., Prickaerts, J., Andriambeloson, E., et al. (2016). The selective 5-HT6 receptor antagonist SLV has putative cognitive- and social interaction enhancing properties in rodent models of cognitive impairment. Neurobiol. Learn. Mem. *133*, 100–117.

Brummelte, S., Mc Glanaghy, E., Bonnin, A., and Oberlander, T.F. (2017). Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. Neuroscience *342*, 212–231.

Burns, A.M.N., Erickson, D.H., and Brenner, C.A. (2014). Cognitive-behavioral therapy for medication-resistant psychosis: a meta-analytic review. Psychiatr. Serv. Wash. DC *65*, 874–880.

Burris, K.D., Molski, T.F., Xu, C., Ryan, E., Tottori, K., Kikuchi, T., Yocca, F.D., and Molinoff, P.B. (2002). Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. *302*, 381–389.

Bush, G., Vogt, B.A., Holmes, J., Dale, A.M., Greve, D., Jenike, M.A., and Rosen, B.R. (2002). Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 523–528.

Buznikov, G.A. (1984). The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis. Pharmacol. Ther. *25*, 23–59.

C

Caballero, A., and Tseng, K.Y. (2016). GABAergic function as a limiting factor for prefrontal maturation during adolescence. Trends Neurosci. *39*, 441–448.

Caballero, A., Thomases, D.R., Flores-Barrera, E., Cass, D.K., and Tseng, K.Y. (2014). Emergence of GABAergic-dependent regulation of input-specific plasticity in the adult rat prefrontal cortex during adolescence. Psychopharmacology (Berl.) *231*, 1789–1796.

Caballero, A., Flores-Barrera, E., Thomases, D.R., and Tseng, K.Y. (2020). Downregulation of parvalbumin expression in the prefrontal cortex during adolescence causes enduring prefrontal disinhibition in adulthood. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *45*, 1527–1535.

Cadinu, D., Grayson, B., Podda, G., Harte, M.K., Doostdar, N., and Neill, J.C. (2018). NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. Neuropharmacology *142*, 41–62.

Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M.R., and Marty, A. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 13372–13377.

Calama, E., García, M., Jarque, M.J., Morán, A., Martín, M.L., and San Román, L. (2003). 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilator responses in the hindquarters of the anaesthetized rat, involve beta2-adrenoceptors. J. Pharm. Pharmacol. *55*, 1371–1378.

Canitano, R., and Pallagrosi, M. (2017). Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia Spectrum Disorders: Excitation/Inhibition Imbalance and Developmental Trajectories. Front. Psychiatry *8*.

Carbon, M., and Correll, C.U. (2014). Thinking and acting beyond the positive: the role of the cognitive and negative symptoms in schizophrenia. CNS Spectr. *19 Suppl 1*, 38–52; quiz 35–37, 53.

Cardarelli, R.A., Martin, R., Jaaro-Peled, H., Sawa, A., Powell, E.M., and O'Donnell, P. (2018). Dominant-Negative DISC1 Alters the Dopaminergic Modulation of Inhibitory Interneurons in the Mouse Prefrontal Cortex. Mol. Neuropsychiatry *4*, 20–29.

Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., and Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. Nature *459*, 663–667.

Carlén, M., Meletis, K., Siegle, J.H., Cardin, J.A., Futai, K., Vierling-Claassen, D., Rühlmann, C., Jones, S.R., Deisseroth, K., Sheng, M., et al. (2012). A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. Mol. Psychiatry *17*, 537–548.

Carlsson, A., and Lindqvist, M. (1963). EFFECT OF CHLORPROMAZINE OR HALOPERIDOL ON FORMATION OF 3METHOXYTYRAMINE AND NORMETANEPHRINE IN MOUSE BRAIN. Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.) *20*, 140–144.

Carmichael, S.T., and Price, J.L. (1994). Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. J. Comp. Neurol. *346*, 366–402.

Casey, B.J., Jones, R.M., and Hare, T.A. (2008). The Adolescent Brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1124*, 111–126.

Castañé, A., Kargieman, L., Celada, P., Bortolozzi, A., and Artigas, F. (2015). 5-HT2A receptors are involved in cognitive but not antidepressant effects of fluoxetine. Eur. Neuropsychopharmacol. *25*, 1353–1361.

Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H.I., Araiza-Saldaña, C.I., Ambriz-Tututi, M., Vidal-Cantú, G.C., and Granados-Soto, V. (2009). Role of peripheral and spinal 5-HT6 receptors according to the rat formalin test. Neuroscience *162*, 444–452.

Chang, J.Y., and Sehgal, S.N. (1991). Pharmacology of rapamycin: a new immunosuppressive agent. Br. J. Rheumatol. *30 Suppl 2*, 62–65.

Charnay, Y., and Leger, L. (2010). Brain serotonergic circuitries. Dialogues Clin. Neurosci. *12*, 471–487.

Charrier, N., Chevreul, K., and Durand-Zaleski, I. (2013). Le coût de la schizophrénie : revue de la littérature internationale. L'Encéphale *39*, S49–S56.

Chatterjee, M., Jaiswal, M., and Palit, G. (2012). Comparative evaluation of forced swim test and tail suspension test as models of negative symptom of schizophrenia in rodents. ISRN Psychiatry *2012*, 595141.

Chattopadhyaya, B., and Cristo, G.D. (2012). GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. Front. Psychiatry *3*, 51.

Chaumette, B., Kebir, O., and Krebs, M.-O. (2017). Génétique et épigénétique de la schizophrénie et des psychoses. Biol. Aujourdhui *211*, 69–82.

Chaumont-Dubel, S., Dupuy, V., Bockaert, J., Bécamel, C., and Marin, P. (2020). The 5-HT6 receptor interactome: New insight in receptor signaling and its impact on brain physiology and pathologies. Neuropharmacology *172*, 107839.

Cheng, A., Scott, A.L., Ladenheim, B., Chen, K., Ouyang, X., Lathia, J.D., Mughal, M., Cadet, J.L., Mattson, M.P., and Shih, J.C. (2010). Monoamine oxidases regulate telencephalic neural progenitors in late embryonic and early postnatal development. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 10752–10762.

Chesney, E., Goodwin, G.M., and Fazel, S. (2014). Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. World Psychiatry *13*, 153–160.

Chugani, H.T., Behen, M.E., Muzik, O., Juhász, C., Nagy, F., and Chugani, D.C. (2001). Local brain functional activity following early deprivation: a study of postinstitutionalized Romanian orphans. NeuroImage *14*, 1290–1301.

Clair, D.S., Blackwood, D., Muir, W., Baillie, D., Hubbard, A., Wright, A., and Evans, H.J. (1989). No linkage of chromosome 5q11-q13 markers to schizophrenia in Scottish families. Nature *339*, 305–309.

Clapcote, S.J., Lipina, T.V., Millar, J.K., Mackie, S., Christie, S., Ogawa, F., Lerch, J.P., Trimble, K., Uchiyama, M., Sakuraba, Y., et al. (2007). Behavioral Phenotypes of Disc1 Missense Mutations in Mice. Neuron *54*, 387–402.

Clark, C.T., Weissbach, H., and Udenfriend, S. (1954). 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase: Preparation and Properties. J. Biol. Chem. *210*, 139–148.

Clarke, H.F., Dalley, J.W., Crofts, H.S., Robbins, T.W., and Roberts, A.C. (2004). Cognitive Inflexibility After Prefrontal Serotonin Depletion. Science *304*, 878–880.

Cleynen, I., Engchuan, W., Hestand, M.S., Heung, T., Holleman, A.M., Johnston, H.R., Monfeuga, T., McDonald-McGinn, D.M., Gur, R.E., Morrow, B.E., et al. (2020). Genetic contributors to risk of schizophrenia in the presence of a 22q11.2 deletion. Mol. Psychiatry 1–15.

Codony, X., Vela, J.M., and Ramírez, M.J. (2011). 5-HT6 receptor and cognition. Curr. Opin. Pharmacol. *11*, 94–100.

Corripio, I., Sarró, S., McKenna, P.J., Molet, J., Álvarez, E., Pomarol-Clotet, E., and Portella, M.J. (2016). Clinical Improvement in a Treatment-Resistant Patient With Schizophrenia Treated With Deep Brain Stimulation. Biol. Psychiatry *80*, e69–e70.

Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M.-A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., et al. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 13525–13530.

Crabtree, G.W., Sun, Z., Kvajo, M., Broek, J.A.C., Fénelon, K., McKellar, H., Xiao, L., Xu, B., Bahn, S., O'Donnell, J.M., et al. (2017). Alteration of Neuronal Excitability and Short-Term Synaptic Plasticity in the Prefrontal Cortex of a Mouse Model of Mental Illness. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *37*, 4158–4180.

Cui, L., Sun, W., Yu, M., Li, N., Guo, L., Gu, H., and Zhou, Y. (2016). Disrupted-in-schizophrenia1 (DISC1) L100P mutation alters synaptic transmission and plasticity in the hippocampus and causes recognition memory deficits. Mol. Brain *9*, 89.

Cummings, J.L. (1993). Frontal-subcortical circuits and human behavior. Arch. Neurol. *50*, 873–880.

Cummings, J., Ballard, C., Tariot, P., Owen, R., Foff, E., Youakim, J., Norton, J., and Stankovic, S. (2018). Pimavanserin: Potential Treatment For Dementia-Related Psychosis. J. Prev. Alzheimers Dis. *5*, 253–258.

Curatolo, P., Moavero, R., Scheppingen, J. van, and Aronica, E. (2018). mTOR dysregulation and tuberous sclerosis-related epilepsy. Expert Rev. Neurother. *18*, 185–201.

D

Da Silva Costa-Aze, V., Quiedeville, A., Boulouard, M., and Dauphin, F. (2012). 5-HT6 receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice. Psychopharmacology (Berl.) *222*, 99–115.

Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Neurosci. Biobehav. Rev. *28*, 771–784.

Davis, J., Eyre, H., Jacka, F.N., Dodd, S., Dean, O., McEwen, S., Debnath, M., McGrath, J., Maes, M., Amminger, P., et al. (2016). A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. Neurosci. Biobehav. Rev. *65*, 185–194.

Dawson, L.A., Nguyen, H.Q., and Li, P. (2000). In vivo effects of the 5-HT6 antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. Br. J. Pharmacol. *130*, 23–26.

Dawson, L.A., Nguyen, H.Q., and Li, P. (2001). The 5-HT6 Receptor Antagonist SB-271046 Selectively Enhances Excitatory Neurotransmission in the Rat Frontal Cortex and Hippocampus. Neuropsychopharmacology *25*, 662–668.

Dayer, A.G., Jacobshagen, M., Chaumont-Dubel, S., and Marin, P. (2015). 5-HT6 Receptor: A New Player Controlling the Development of Neural Circuits. ACS Chem. Neurosci. *6*, 951–960.

De Berardis, D., Rapini, G., Olivieri, L., Di Nicola, D., Tomasetti, C., Valchera, A., Fornaro, M., Di Fabio, F., Perna, G., Di Nicola, M., et al. (2018). Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine. Ther. Adv. Drug Saf. *9*, 237–256.

Delgado, P.L., Charney, D.S., Price, L.H., Aghajanian, G.K., Landis, H., and Heninger, G.R. (1990). Serotonin Function and the Mechanism of Antidepressant Action: Reversal of Antidepressant-Induced Remission by Rapid Depletion of Plasma Tryptophan. Arch. Gen. Psychiatry *47*, 411–418.

Deneris, E., and Gaspar, P. (2018). Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *7*.

Deraredj Nadim, W., Chaumont-Dubel, S., Madouri, F., Cobret, L., De Tauzia, M.-L., Zajdel, P., Bénédetti, H., Marin, P., and Morisset-Lopez, S. (2016). Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT6 receptor promotes receptor constitutive activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 12310–12315.

Devegowda, V.N., Hong, J.-R., Cho, S., Lim, E.J., Choo, H., Keum, G., Rhim, H., and Nam, G. (2013). Synthesis and the 5-HT6 receptor antagonistic effect of 3-arylsulfonylamino-5,6-dihydro-6-substituted pyrazolo[3,4]pyridinones for neuropathic pain treatment. Bioorg. Med. Chem. Lett. *23*, 4696–4700.

Díaz-Mataix, L., Scorza, M.C., Bortolozzi, A., Toth, M., Celada, P., and Artigas, F. (2005). Involvement of 5-HT1A Receptors in Prefrontal Cortex in the Modulation of Dopaminergic Activity: Role in Atypical Antipsychotic Action. J. Neurosci. *25*, 10831–10843.

Dienel, S.J., and Lewis, D.A. (2019). Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. Neurobiol. Dis. *131*, 104208.

Dollfus, S., and Lyne, J. (2017). Negative symptoms: History of the concept and their position in diagnosis of schizophrenia. Schizophr. Res. *186*, 3–7.

Dolmazon, V., Alenina, N., Markossian, S., Mancip, J., van de Vrede, Y., Fontaine, E., Dehay, C., Kennedy, H., Bader, M., Savatier, P., et al. (2011). Forced expression of LIM homeodomain transcription factor 1b enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into serotonergic neurons. Stem Cells Dev. *20*, 301–311.

Domino, E.F., and Luby, E.D. (2012). Phencyclidine/schizophrenia: one view toward the past, the other to the future. Schizophr. Bull. *38*, 914–919.

Donovan, L.J., Spencer, W.C., Kitt, M.M., Eastman, B.A., Lobur, K.J., Jiao, K., Silver, J., and Deneris, E.S. Lmx1b is required at multiple stages to build expansive serotonergic axon architectures. ELife *8*, e48788.

Drop, M., Canale, V., Chaumont-Dubel, S., Kurczab, R., Satała, G., Bantreil, X., Walczak, M., Koczurkiewicz-Adamczyk, P., Latacz, G., Gwizdak, A., et al. (2021). 2-Phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamide as a New Scaffold for

Developing 5-HT6 Receptor Inverse Agonists with Cognition-Enhancing Activity. ACS Chem. Neurosci. *12*, 1228–1240.

Dudek, M., Marcinkowska, M., Bucki, A., Olczyk, A., and Kołaczkowski, M. (2015). Idalopirdine – a small molecule antagonist of 5-HT6 with therapeutic potential against obesity. Metab. Brain Dis. *30*, 1487–1494.

Duhr, F., Déléris, P., Raynaud, F., Séveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Bockaert, J., Marin, P., and Chaumont-Dubel, S. (2014). Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT 6 receptors to promote neurite growth. Nat. Chem. Biol. *10*, 590–597.

Duman, R.S., Aghajanian, G.K., Sanacora, G., and Krystal, J.H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. Nat. Med. *22*, 238–249.

E

Eggers, A.E. (2013). A serotonin hypothesis of schizophrenia. Med. Hypotheses *80*, 791–794.

Ehninger, D., and Silva, A.J. (2011). Rapamycin for treating Tuberous sclerosis and Autism spectrum disorders. Trends Mol. Med. *17*, 78–87.

Elliott, M.C., Tanaka, P.M., Schwark, R.W., and Andrade, R. (2018). Serotonin Differentially Regulates L5 Pyramidal Cell Classes of the Medial Prefrontal Cortex in Rats and Mice. ENeuro *5*.

Evers, E.A.T., van der Veen, F.M., Jolles, J., Deutz, N.E.P., and Schmitt, J.A.J. (2006). Acute tryptophan depletion improves performance and modulates the BOLD response during a Stroop task in healthy females. NeuroImage *32*, 248–255.

F

Fazzari, P., Paternain, A.V., Valiente, M., Pla, R., Luján, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marín, O., and Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. Nature *464*, 1376–1380.

Feldman, D.E. (2009). Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. Annu. Rev. Neurosci. *32*, 33–55.

Feliciano, D.M. (2020). The Neurodevelopmental Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex (TSC). Front. Neuroanat. *0*.

Ferguson, B.R., and Gao, W.-J. (2018). PV Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. Front. Neural Circuits *12*.

Fernandez, S.P., Cauli, B., Cabezas, C., Muzerelle, A., Poncer, J.-C., and Gaspar, P. (2016). Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain. Brain Struct. Funct. *221*, 4007–4025.

Fernandez, S.P., Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Barik, J., Gruart, A., Delgado-García, J.M., and Gaspar, P. (2017). Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. Neuropsychopharmacology *42*, 512–523.

Fidalgo, S., Ivanov, D.K., and Wood, S.H. (2013). Serotonin: from top to bottom. Biogerontology *14*, 21–45.

Filbey, F., and Yezhuvath, U. (2013). Functional connectivity in inhibitory control networks and severity of cannabis use disorder. Am. J. Drug Alcohol Abuse *39*, 382–391.

Flagstad, P., Mørk, A., Glenthøj, B.Y., van Beek, J., Michael-Titus, A.T., and Didriksen, M. (2004). Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *29*, 2052–2064.

Fonseca, B.D., Smith, E.M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M., and Pause, A. (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. Semin. Cell Dev. Biol. *36*, 102–112.

Foulkes, L., and Blakemore, S.-J. (2018). Studying individual differences in human adolescent brain development. Nat. Neurosci. *21*, 315–323.

Fowler, D., Hodgekins, J., Garety, P., Freeman, D., Kuipers, E., Dunn, G., Smith, B., and Bebbington, P.E. (2012). Negative Cognition, Depressed Mood, and Paranoia: A Longitudinal Pathway Analysis Using Structural Equation Modeling. Schizophr. Bull. *38*, 1063–1073.

Frassetto, A., Zhang, J., Lao, J.Z., White, A., Metzger, J.M., Fong, T.M., and Chen, R.Z. (2008). Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT6 receptor. Brain Res. *1236*, 140–144.

Frazer, S., Otomo, K., and Dayer, A. (2015). Early-life serotonin dysregulation affects the migration and positioning of cortical interneuron subtypes. Transl. Psychiatry *5*, e644.

Froudist-Walsh, S., Bloomfield, M.A., Veronese, M., Kroll, J., Karolis, V.R., Jauhar, S., Bonoldi, I., McGuire, P.K., Kapur, S., Murray, R.M., et al. (2017). The effect of perinatal brain injury on dopaminergic function and hippocampal volume in adult life. ELife *6*.

Fu, W., and Hall, M.N. (2020). Regulation of mTORC2 Signaling. Genes *11*, 1045.

Furr, A., Lapiz-Bluhm, M.D., and Morilak, D.A. (2012). 5-HT2A receptors in the orbitofrontal cortex facilitate reversal learning and contribute to the beneficial cognitive effects of chronic citalopram treatment in rats. Int. J. Neuropsychopharmacol. *15*, 1295–1305.

G

Gaddum, J.H., and Picarelli, Z.P. (1997). Two kinds of tryptamine receptor. 1957. Br. J. Pharmacol. *120*, 134–139; discussion 132-133.

Galici, R., Echemendia, N.G., Rodriguez, A.L., and Conn, P.J. (2005). A selective allosteric potentiator of metabotropic glutamate (mGlu) 2 receptors has effects similar to an orthosteric mGlu2/3 receptor agonist in mouse models predictive of antipsychotic activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. *315*, 1181–1187.

Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 1002–1012.

Gelman, D.M., and Marín, O. (2010). Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. Eur. J. Neurosci. *31*, 2136–2141.

Geng, F., Tian, J., Wu, J.-L., Luo, Y., Zou, W.-J., Peng, C., and Lu, G.-F. (2018). Dorsomedial prefrontal cortex 5-HT6 receptors regulate anxiety-like behavior. Cogn. Affect. Behav. Neurosci. *18*, 58–67.

Gérard, C., Mestikawy, S.E., Lebrand, C., Adrien, J., Ruat, M., Traiffort, E., Hamon, M., and Martres, M.-P. (1996). Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT6 receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. Synapse *23*, 164–173.

Gérard, C., Martres, M.-P., Lefèvre, K., Miquel, M.-C., Vergé, D., Lanfumey, L., Doucet, E., Hamon, M., and El Mestikawy, S. (1997). Immuno-localization of serotonin 5-HT6 receptor-like material in the rat central nervous system. Brain Res. *746*, 207–219.

Giannopoulou, I., Pagida, M.A., Briana, D.D., and Panayotacopoulou, M.T. (2018). Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. Hormones *17*, 25–32.

Giedd, J.N. (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1021*, 77–85.

Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., and Vadlamudi, S. (2005). Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNFα, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal–fetal unit of the rat. J. Neuroimmunol. *159*, 106–112.

Giulia, L., Michele, R., Alberto, S., and Cinzia, N. (2020). Maternal Vitamin D and its Role in Determining Fetal Origins of Mental Health. Curr. Pharm. Des. *26*, 2497–2509.

Glausier, J., and Lewis, D. (2017). GABA and Schizophrenia: where we stand and where we need to go. Schizophr. Res. *181*, 2–3.

Gobbi, G., Atkin, T., Zytynski, T., Wang, S., Askari, S., Boruff, J., Ware, M., Marmorstein, N., Cipriani, A., Dendukuri, N., et al. (2019). Association of Cannabis Use in Adolescence and Risk of Depression, Anxiety, and Suicidality in Young Adulthood: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Psychiatry *76*, 426–434.

Goeden, N., Velasquez, J., Arnold, K.A., Chan, Y., Lund, B.T., Anderson, G.M., and Bonnin, A. (2016). Maternal Inflammation Disrupts Fetal Neurodevelopment via Increased Placental Output of Serotonin to the Fetal Brain. J. Neurosci. *36*, 6041–6049.

Goldberg, E.M., and Coulter, D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 337–349.

Golden, N.L., Kuhnert, B.R., Sokol, R.J., Martier, S., and Williams, T. (1987). Neonatal manifestations of maternal phencyclidine exposure. J. Perinat. Med. *15*, 185–191.

González-Maeso, J., Weisstaub, N.V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Lira, A., Bradley-Moore, M., Ge, Y., Zhou, Q., et al. (2007). Hallucinogens Recruit Specific Cortical 5-HT2A Receptor-Mediated Signaling Pathways to Affect Behavior. Neuron *53*, 439–452.

González-Maeso, J., Ang, R., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N.V., López-Giménez, J.F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L.F., Milligan, G., et al. (2008). Identification of a Novel Serotonin/Glutamate Receptor Complex Implicated in Psychosis. Nature *452*, 93–97.

Goodfellow, N.M., Benekareddy, M., Vaidya, V.A., and Lambe, E.K. (2009). Layer II/III of the Prefrontal Cortex: Inhibition by the Serotonin 5-HT1A Receptor in Development and Stress. J. Neurosci. *29*, 10094–10103.

Göthert, M. (2013). Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification. Pharmacol. Rep. PR *65*, 771–786.

Gravius, A., Laszy, J., Pietraszek, M., Sághy, K., Nagel, J., Chambon, C., Wegener, N., Valastro, B., Danysz, W., and Gyertyán, I. (2011). Effects of 5-HT6 antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. Behav. Pharmacol. *22*, 122–135.

Grayson, B., Barnes, S.A., Markou, A., Piercy, C., Podda, G., and Neill, J.C. (2016). Postnatal Phencyclidine (PCP) as a Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia Pathophysiology and Symptomatology: A Review. In Neurotoxin Modeling of Brain Disorders—Life-Long Outcomes in Behavioral Teratology, R.M. Kostrzewa, and T. Archer, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 403–428.

Greifenstein, F.E., Devault, M., Yoshitake, J., and Gajewski, J.E. (1958). A study of a 1-aryl cyclo hexyl amine for anesthesia. Anesth. Analg. *37*, 283–294.

Grychowska, K., Chaumont-Dubel, S., Kurczab, R., Koczurkiewicz, P., Deville, C., Krawczyk, M., Pietruś, W., Satała, G., Buda, S., Piska, K., et al. (2019). Dual 5-HT6 and D3 Receptor Antagonists in a Group of 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinolines with Neuroprotective and Procognitive Activity. ACS Chem. Neurosci. *10*, 3183–3196.

Gururajan, A., and Buuse, M. van den (2014). Is the mTOR-signalling cascade disrupted in Schizophrenia? J. Neurochem. *129*, 377–387.

H

Ha, C.M., Park, D., Kim, Y., Na, M., Panda, S., Won, S., Kim, H., Ryu, H., Park, Z.Y., Rasenick, M.M., et al. (2015). SNX14 is a bifunctional negative regulator for neuronal 5-HT6 receptor signaling. J. Cell Sci. *128*, 1848–1861.

Haaf, M., Leicht, G., Curic, S., and Mulert, C. (2018). Glutamatergic Deficits in Schizophrenia - Biomarkers and Pharmacological Interventions within the Ketamine Model. Curr. Pharm. Biotechnol. *19*, 293–307.

Halberstadt, A.L. (2015). Recent Advances in the Neuropsychopharmacology of Serotonergic Hallucinogens. Behav. Brain Res. *277*, 99–120.

Halberstadt, A.L., and Geyer, M.A. (2018). Effect of Hallucinogens on Unconditioned Behavior. In Behavioral Neurobiology of Psychedelic Drugs, A.L. Halberstadt, F.X. Vollenweider, and D.E. Nichols, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 159–199.

Hall, W., and Babor, T.F. (2000). Cannabis use and public health: assessing the burden. Addict. Abingdon Engl. *95*, 485–490.

Hall, R.A., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. J. Cell Biol. *145*, 927–932.

Hamieh, A.M., Babin, D., Sablé, E., Hernier, A.M., and Castagné, V. (2021). Neonatal phencyclidine and social isolation in the rat: effects of clozapine on locomotor activity, social recognition, prepulse inhibition, and executive functions deficits. Psychopharmacology (Berl.) *238*, 517–528.

Hamon, M., Doucet, E., Lefèvre, K., Miquel, M.-C., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J., and Vergé, D. (1999). Antibodies and Antisense Oligonucleotide for Probing the Distribution and Putative Functions of Central 5-HT 6 Receptors. Neuropsychopharmacology *21*, 68–76.

Haney, M., and Evins, A.E. (2016). Does Cannabis Cause, Exacerbate or Ameliorate Psychiatric Disorders? An Oversimplified Debate Discussed. Neuropsychopharmacology *41*, 393.

Hanks, J.B., and González-Maeso, J. (2013). Animal models of serotonergic psychedelics. ACS Chem. Neurosci. *4*, 33–42.

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.-P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism*. J. Biol. Chem. *273*, 14484–14494.

Hardisty, R.M., and Stacey, R.S. (1955). 5-hydroxytryptamine in normal human platelets. J. Physiol. *130*, 711–720.

Harrison, P.J. (2015). Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. *29*, 85–96.

Harvey, P.D. (2009). Pharmacological cognitive enhancement in schizophrenia. Neuropsychol. Rev. *19*, 324–335.

Harvey, J.A., Quinn, J.L., Liu, R., Aloyo, V.J., and Romano, A.G. (2004). Selective remodeling of rabbit frontal cortex: relationship between 5-HT2A receptor density and associative learning. Psychopharmacology (Berl.) *172*, 435–442.

Hatat, B., Yahiaoui, S., Lecoutey, C., Davis, A., Freret, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C., and Dallemagne, P. (2019). A Novel in vivo Anti-amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT4R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT6R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Interest Against Alzheimer's Disease. Front. Aging Neurosci. *11*.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. *18*, 1926–1945.

Heinrichs, R.W., and Zakzanis, K.K. (1998). Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. Neuropsychology *12*, 426–445.

Helboe, L., Egebjerg, J., and de Jong, I.E.M. (2015). Distribution of serotonin receptor 5-HT6 mRNA in rat neuronal subpopulations: A double in situ hybridization study. Neuroscience *310*, 442–454.

Henquet, C., Murray, R., Linszen, D., and van Os, J. (2005). The Environment and Schizophrenia: The Role of Cannabis Use. Schizophr. Bull. *31*, 608–612.

Heredia, D.J., Gershon, M.D., Koh, S.D., Corrigan, R.D., Okamoto, T., and Smith, T.K. (2013). Important role of mucosal serotonin in colonic propulsion and peristaltic reflexes: in vitro analyses in mice lacking tryptophan hydroxylase 1. J. Physiol. *591*, 5939–5957.

Higgins, J., Gore, R., Gutkind, D., Mednick, S.A., Parnas, J., Schulsinger, F., and Cannon, T.D. (1997). Effects of child-rearing by schizophrenic mothers: a 25-year follow-up. Acta Psychiatr. Scand. *96*, 402–404.

Hilker, R., Helenius, D., Fagerlund, B., Skytthe, A., Christensen, K., Werge, T.M., Nordentoft, M., and Glenthøj, B. (2018). Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. Biol. Psychiatry *83*, 492–498.

Hirose, S. (2003). The causes of underdiagnosing akathisia. Schizophr. Bull. *29*, 547–558.

Hirst, W.D., Abrahamsen, B., Blaney, F.E., Calver, A.R., Aloj, L., Price, G.W., and Medhurst, A.D. (2003). Differences in the Central Nervous System Distribution and Pharmacology of the Mouse 5-Hydroxytryptamine-6 Receptor Compared with Rat and Human Receptors Investigated by Radioligand Binding, Site-Directed Mutagenesis, and Molecular Modeling. Mol. Pharmacol. *64*, 1295–1308.

Holz, A., Mülsch, F., Schwarz, M.K., Hollmann, M., Döbrössy, M.D., Coenen, V.A., Bartos, M., Normann, C., Biber, K., van Calker, D., et al. (2019). Enhanced mGlu5 Signaling in Excitatory Neurons Promotes Rapid Antidepressant Effects via AMPA Receptor Activation. Neuron *104*, 338-352.e7.

Hornung, J.-P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. J. Chem. Neuroanat. *26*, 331–343.

Howes, O.D., and Murray, R.M. (2014). Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. Lancet Lond. Engl. *383*, 1677–1687.

Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacol. Rev. *46*, 157–203.

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

Huang, S.-H., Wu, W.-R., Lee, L.-M., Huang, P.-R., and Chen, J.-C. (2018). mTOR signaling in the nucleus accumbens mediates behavioral sensitization to methamphetamine. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *86*, 331–339.

Hubel, D.H., and Wiesel, T.N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. J. Physiol. *206*, 419–436.

I

Idris, N., Neill, J., Grayson, B., Bang-Andersen, B., Witten, L.M., Brennum, L.T., and Arnt, J. (2010). Sertindole improves sub-chronic PCP-induced reversal learning and episodic memory deficits in rodents: involvement of 5-HT(6) and 5-HT (2A) receptor mechanisms. Psychopharmacology (Berl.) *208*, 23–36.

Inoki, K. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. Genes Dev. *17*, 1829–1834.

J

Jaaro-Peled, H., (2009). Gene models of schizophrenia : DISC1 mouse models. Progress in brain research, Vol.179, Chapter 9.

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

Jacobshagen, M., Niquille, M., Chaumont-Dubel, S., Marin, P., and Dayer, A. (2014). The serotonin 6 receptor controls neuronal migration during corticogenesis via a ligand-independent Cdk5-dependent mechanism. Dev. Camb. Engl. *141*, 3370–3377.

Jakab, R.L., and Goldman-Rakic, P.S. (1998). 5-Hydroxytryptamine2A serotonin receptors in the primate cerebral cortex: Possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 735–740.

Jardri, R., Hugdahl, K., Hughes, M., Brunelin, J., Waters, F., Alderson-Day, B., Smailes, D., Sterzer, P., Corlett, P.R., Leptourgos, P., et al. (2016). Are Hallucinations Due to an Imbalance Between Excitatory and Inhibitory Influences on the Brain? Schizophr. Bull. *42*, 1124–1134.

Javitt, D.C., and Zukin, S.R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. Am. J. Psychiatry *148*, 1301–1308.

Jayarajan, P., Nirogi, R., Shinde, A., Goura, V., Babu, V.A., Yathavakilla, S., and Bhyrapuneni, G. (2015). 5-HT6 receptor antagonist attenuates the memory deficits associated with neuropathic pain and improves the efficacy of gabapentinoids. Pharmacol. Rep. *67*, 934–942.

Jernigan, C.S., Goswami, D.B., Austin, M.C., Iyo, A.H., Chandran, A., Stockmeier, C.A., and Karolewicz, B. (2011). The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *35*, 1774–1779.

Jiang, J.Y., Falcone, J.L., Curci, S., and Hofer, A.M. (2019). Direct visualization of cAMP signaling in primary cilia reveals up-regulation of ciliary GPCR activity following Hedgehog activation. Proc. Natl. Acad. Sci. 201819730.

Jones, C., Watson, D., and Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. Br. J. Pharmacol. *164*, 1162–1194.

de Jong, I.E.M., and Mørk, A. (2017). Antagonism of the 5-HT6 receptor – Preclinical rationale for the treatment of Alzheimer's disease. Neuropharmacology *125*, 50–63.

Jutras-Aswad, D., DiNieri, J.A., Harkany, T., and Hurd, Y.L. (2009). Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. *259*, 395–412.

K

K V, A., Mohan, A.S., and Chakravarty, S. (2020). Rapid acting antidepressants in the mTOR pathway: Current evidence. Brain Res. Bull. *163*, 170–177.

Kanes, S.J., Tokarczyk, J., Siegel, S.J., Bilker, W., Abel, T., and Kelly, M.P. (2007). ROLIPRAM: A SPECIFIC PHOSPHODIESTERASE 4 INHIBITOR WITH POTENTIAL ANTIPSYCHOTIC ACTIVITY. Neuroscience *144*, 239–246.

Karila, D., Freret, T., Bouet, V., Boulouard, M., Dallemagne, P., and Rochais, C. (2015). Therapeutic Potential of 5-HT6 Receptor Agonists. J. Med. Chem. *58*, 7901–7912.

Kaumann, A.J., and Levy, F.O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. Pharmacol. Ther. *111*, 674–706.

Kehrer, C., Maziashvili, N., Dugladze, T., and Gloveli, T. (2008). Altered Excitatory-Inhibitory Balance in the NMDA-Hypofunction Model of Schizophrenia. Front. Mol. Neurosci. *1*.

Keks, N., Hope, J., Schwartz, D., McLennan, H., Copolov, D., and Meadows, G. (2020). Comparative Tolerability of Dopamine D2/3 Receptor Partial Agonists for Schizophrenia. CNS Drugs *34*, 473–507.

Kim, G.-W., Kim, Y.-H., and Jeong, G.-W. (2017). Whole brain volume changes and its correlation with clinical symptom severity in patients with schizophrenia: A DARTEL-based VBM study. PLoS ONE *12*, e0177251.

Kim, S.-H., Kim, D.H., Lee, K.H., Im, S.-K., Hur, E.-M., Chung, K.C., and Rhim, H. (2014). Direct Interaction and Functional Coupling between Human 5-HT6 Receptor and the Light Chain 1 Subunit of the Microtubule-Associated Protein 1B (MAP1B-LC1). PLOS ONE *9*, e91402.

Kim, S.-H., Seo, M., Hwang, H., Moon, D.-M., Son, G.H., Kim, K., and Rhim, and H. (2019). Physical and Functional Interaction between 5-HT6 Receptor and Nova-1. *28*, 17–29.

King, M.V., Sleight, A.J., Woolley, M.L., Topham, I.A., Marsden, C.A., and Fone, K.C.F. (2004). 5-HT6 receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation--an effect sensitive to NMDA receptor antagonism. Neuropharmacology *47*, 195–204.

Kirkpatrick, B., Fenton, W.S., Carpenter, W.T., and Marder, S.R. (2006). The NIMH-MATRICS Consensus Statement on Negative Symptoms. Schizophr. Bull. *32*, 214–219.

Kjaerby, C., Broberg, B.V., Kristiansen, U., and Dalby, N.O. (2014). Impaired GABAergic inhibition in the prefrontal cortex of early postnatal phencyclidine (PCP)-treated rats. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *24*, 2522–2532.

Kjaerby, C., Hovelsø, N., Dalby, N.O., and Sotty, F. (2017). Phencyclidine administration during neurodevelopment alters network activity in prefrontal cortex and hippocampus in adult rats. J. Neurophysiol. *118*, 1002–1011.

Klosterkötter, J., Hellmich, M., Steinmeyer, E.M., and Schultze-Lutter, F. (2001). Diagnosing schizophrenia in the initial prodromal phase. Arch. Gen. Psychiatry *58*, 158–164.

Ko, M.-C., Lee, L.J.-H., Li, Y., and Lee, L.-J. (2014). Long-term consequences of neonatal fluoxetine exposure in adult rats. Dev. Neurobiol. *74*, 1038–1051.

Kohen, R., Metcalf, M.A., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J.E., Meltzer, H.Y., Sibley, D.R., Roth, B.L., and Hamblin, M.W. (1996). Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT6 Serotonin Receptor. J. Neurochem. *66*, 47–56.

Kohen, R., Fashingbauer, L.A., Heidmann, D.E., Guthrie, C.R., and Hamblin, M.W. (2001). Cloning of the mouse 5-HT6 serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. Brain Res. Mol. Brain Res. *90*, 110–117.

Kometer, M., Cahn, B.R., Andel, D., Carter, O.L., and Vollenweider, F.X. (2011). The 5-HT2A/1A Agonist Psilocybin Disrupts Modal Object Completion Associated with Visual Hallucinations. Biol. Psychiatry *69*, 399–406.

Kowalska, M., Fijałkowski, Ł., and Nowaczyk, A. (2021). Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ-Aminobutyric Acid Transporters. Int. J. Mol. Sci. *22*, 6293.

Krebs, M.-O., Kebir, O., and Jay, T.M. (2019). Exposure to cannabinoids can lead to persistent cognitive and psychiatric disorders. Eur. J. Pain *23*, 1225–1233.

Krebs, M.-O., Demars, F., Frajerman, A., Kebir, O., and Jay, T. (2020). Cannabis et neurodéveloppement. Bull. Acad. Natl. Med. *204*, 561–569.

Krogmann, A., Peters, L., Hardenberg, L. von, Bödeker, K., Nöhles, V.B., and Correll, C.U. (2019). Keeping up with the therapeutic advances in schizophrenia: a review of novel and emerging pharmacological entities. CNS Spectr. *24*, 38–69.

Krystal, J.H., D'Souza, D.C., Karper, L.P., Bennett, A., Abi-Dargham, A., Abi-Saab, D., Cassello, K., Bowers, M.B., Vegso, S., Heninger, G.R., et al. (1999). Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. Psychopharmacology (Berl.) *145*, 193–204.

Kuroki, T., Nagao, N., and Nakahara, T. (2008). Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin–dopamine hypothesis. In Progress in Brain Research, G. Di Giovann, V. Di Matteo, and E. Esposito, eds. (Elsevier), pp. 199–212.

Kwan, K.Y., Šestan, N., and Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. Dev. Camb. Engl. *139*, 1535–1546.

L

Laclef, C., and Métin, C. (2018). Conserved rules in embryonic development of cortical interneurons. Semin. Cell Dev. Biol. *76*, 86–100.

Lacroix, L.P., Dawson, L.A., Hagan, J.J., and Heidbreder, C.A. (2004). 5-HT6 receptor antagonist SB-271046 enhances extracellular levels of monoamines in the rat medial prefrontal cortex. Synap. N. Y. N *51*, 158–164.

Lambe, E.K., Fillman, S.G., Webster, M.J., and Weickert, C.S. (2011). Serotonin Receptor Expression in Human Prefrontal Cortex: Balancing Excitation and Inhibition across Postnatal Development. PLOS ONE *6*, e22799.

Large, M., Sharma, S., Compton, M.T., Slade, T., and Nielssen, O. (2011). Cannabis Use and Earlier Onset of Psychosis: A Systematic Meta-analysis. Arch. Gen. Psychiatry *68*, 555–561.

Larsen, B., and Luna, B. (2018). Adolescence as a neurobiological critical period for the development of higher-order cognition. Neurosci. Biobehav. Rev. *94*, 179–195.

Larson, M.K., Walker, E.F., and Compton, M.T. (2010). Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. Expert Rev. Neurother. *10*, 1347–1359.

Larsson, S., Andreassen, O.A., Aas, M., Røssberg, J.I., Mork, E., Steen, N.E., Barrett, E.A., Lagerberg, T.V., Peleikis, D., Agartz, I., et al. (2013). High prevalence of childhood trauma in patients with schizophrenia spectrum and affective disorder. Compr. Psychiatry *54*, 123–127.

Laruelle, M., and Abi-Dargham, A. (1999). Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. *13*, 358–371.

Le Magueresse, C., and Monyer, H. (2013). GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. Neuron *77*, 388–405.

Lee, F.H.F., Kaidanovich-Beilin, O., Roder, J.C., Woodgett, J.R., and Wong, A.H.C. (2011). Genetic inactivation of GSK3α rescues spine deficits in Disc1-L100P mutant mice. Schizophr. Res. *129*, 74–79.

Lesiak, A.J., Brodsky, M., Cohenca, N., Croicu, A.G., and Neumaier, J.F. (2018). Restoration of Physiological Expression of 5-HT $_6$ Receptor into the Primary Cilia of Null Mutant Neurons Lengthens Both Primary Cilia and Dendrites. Mol. Pharmacol. *94*, 731–742.

Levaux, M.-N., Larøi, F., Danion, J.-M., and Van der Linden, M. (2009). Remédiation cognitive des patients schizophrènes dans les pays francophones. EMC - Psychiatr. *6*, 1–6.

Lewis, D.A. (2011). The chandelier neuron in schizophrenia. Dev. Neurobiol. *71*, 118–127.

Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y.-Y., Mann, J.J., Margolis, K.G., Yang, Q.M., Kim, D.O., Côté, F., Mallet, J., and Gershon, M.D. (2011). Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 8998–9009.

Lidov, H.G., and Molliver, M.E. (1982). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. Brain Res. Bull. *9*, 559–604.

Lidov, H.G.W., Grzanna, R., and Molliver, M.E. (1980). The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat—an immunohistochemical analysis. Neuroscience *5*, 207–227.

Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S.E., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., et al. (2005). Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. N. Engl. J. Med. *353*, 1209–1223.

Linszen, D.H., Dingemans, P.M., and Lenior, M.E. (1994). Cannabis abuse and the course of recent-onset schizophrenic disorders. Arch. Gen. Psychiatry *51*, 273–279.

Lipina, T., and Roder, J. (2010). A new model of the disrupted latent inhibition in C57BL/6J mice after bupropion treatment. Psychopharmacology (Berl.) *208*, 487–498.

Lipina, T.V., Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Fletcher, P.J., Seeman, P., Sawa, A., and Roder, J.C. (2010). Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. Genes Brain Behav. *9*, 777–789.

Lipton, J.O., and Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. Neuron *84*, 275–291.

Litman, R.E., Smith, M.A., Doherty, J.J., Cross, A., Raines, S., Gertsik, L., and Zukin, S.R. (2016). AZD8529, a positive allosteric modulator at the mGluR2 receptor, does not improve symptoms in schizophrenia: A proof of principle study. Schizophr. Res. *172*, 152–157.

Liu, C., Maejima, T., Wyler, S.C., Casadesus, G., Herlitze, S., and Deneris, E.S. (2010). Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. Nat. Neurosci. *13*, 1190–1198.

Liu, C., Wen, Y., Huang, H., Lin, W., Huang, M., Lin, R., and Ma, Y. (2019). Over-expression of 5-HT6 Receptor and Activated Jab-1/p-c-Jun Play Important Roles in Pilocarpine-Induced Seizures and Learning-Memory Impairment. J. Mol. Neurosci. *67*, 388–399.

Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., Chen, H., Zhu, D.-Y., and Zhou, Q.-G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. Nat. Protoc. *13*, 1686–1698.

Liy-Salmeron, G., and Meneses, A. (2008). Effects of 5-HT drugs in prefrontal cortex during memory formation and the ketamine amnesia-model. Hippocampus *18*, 965–974.

Lodge, D., and Mercier, M.S. (2015). Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. Br. J. Pharmacol. *172*, 4254–4276.

Loiseau, F., Dekeyne, A., and Millan, M.J. (2008). Pro-cognitive effects of 5-HT6 receptor antagonists in the social recognition procedure in rats: implication of the frontal cortex. Psychopharmacology (Berl.) *196*, 93–104.

López-Muñoz, F., Alamo, C., Cuenca, E., Shen, W.W., Clervoy, P., and Rubio, G. (2005). History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. Ann. Clin. Psychiatry Off. J. Am. Acad. Clin. Psychiatr. *17*, 113–135.

Lorke, D.E., Lu, G., Cho, E., and Yew, D.T. (2006). Serotonin 5-HT2A and 5-HT6 receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. BMC Neurosci. *7*, 36.

Luby, E.D., Cohen, B.D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J.S., and Kelley, R. (1959). Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. AMA Arch. Neurol. Psychiatry *81*, 363–369.

Lyon, G.J., Abi-Dargham, A., Moore, H., Lieberman, J.A., Javitch, J.A., and Sulzer, D. (2011). Presynaptic Regulation of Dopamine Transmission in Schizophrenia. Schizophr. Bull. *37*, 108–117.

M

MacDonald, A.W., Cohen, J.D., Stenger, V.A., and Carter, C.S. (2000). Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control. Science *288*, 1835–1838.

Maddaloni, G., Bertero, A., Pratelli, M., Barsotti, N., Boonstra, A., Giorgi, A., Migliarini, S., and Pasqualetti, M. (2017). Development of Serotonergic Fibers in the Post-Natal Mouse Brain. Front. Cell. Neurosci. *0*.

Maksymetz, J., Moran, S.P., and Conn, P.J. (2017). Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. Mol. Brain *10*, 15.

Malchow, B., Hasan, A., Fusar-Poli, P., Schmitt, A., Falkai, P., and Wobrock, T. (2013). Cannabis abuse and brain morphology in schizophrenia: a review of the available evidence. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. *263*, 3–13.

Manocha, M., and Khan, W.I. (2012). Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. Clin. Transl. Gastroenterol. *3*, e13.

Mao, Y., Ge, X., Frank, C.L., Madison, J.M., Koehler, A.N., Doud, M.K., Tassa, C., Berry, E.M., Soda, T., Singh, K.K., et al. (2009). Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3β/β-Catenin Signaling. Cell *136*, 1017–1031.

Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Schmid, L., Vatteroni, E., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., et al. (2012). Distribution of Serotonin Receptor of Type 6 (5-HT6) in Human Brain Post-mortem. A Pharmacology, Autoradiography and Immunohistochemistry Study. Neurochem. Res. *37*, 920–927.

Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Testa, G., Schmid, L., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., et al. (2013). Serotonin receptor of type 6 (5-HT6) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: An immunohistochemical and immunofluorescence study. Neurochem. Int. *62*, 182–188.

Marcos, B., Gil-Bea, F.J., Hirst, W.D., García-Alloza, M., and Ramírez, M.J. (2006). Lack of localization of 5-HT6 receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT6 receptor-mediated acetylcholine release. Eur. J. Neurosci. *24*, 1299–1306.

Marcos, B., Chuang, T.T., Gil-Bea, F.J., and Ramirez, M.J. (2008a). Effects of 5-HT6 receptor antagonism and cholinesterase inhibition in models of cognitive impairment in the rat. Br. J. Pharmacol. *155*, 434–440.

Marcos, B., García-Alloza, M., Gil-Bea, F.J., Chuang, T.T., Francis, P.T., Chen, C.P., Tsang, S.W.T.Y., Lai, M.K.P., and Ramirez, M.J. (2008b). Involvement of an Altered 5-HT 6 Receptor Function in Behavioral Symptoms of Alzheimer's Disease. J. Alzheimers Dis. *14*, 43–50.

Marder, S.R., and Galderisi, S. (2017). The current conceptualization of negative symptoms in schizophrenia. World Psychiatry *16*, 14–24.

Marek, G.J., Wright, R.A., Gewirtz, J.C., and Schoepp, D.D. (2001). A major role for thalamocortical afferents in serotonergic hallucinogen receptor function in the rat neocortex. Neuroscience *105*, 379–392.

Marin, P., Becamel, C., and Bockaert, A.D. and J. (2011). 5-HT Receptor-Associated Protein Networks: New Targets for Drug Discovery in Psychiatric Disorders?

Marín-Padilla, M. (2014). The mammalian neocortex new pyramidal neuron: a new conception. Front. Neuroanat. *7*, 51.

Markham, A. (2017). Telotristat Ethyl: First Global Approval. Drugs *77*, 793–798.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat. Rev. Neurosci. *5*, 793–807.

Martin, P., Carlsson, M.L., and Hjorth, S. (1998). Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. Neuroreport *9*, 2985–2988.

Martin, P.-Y., Doly, S., Hamieh, A.M., Chapuy, E., Canale, V., Drop, M., Chaumont-Dubel, S., Bantreil, X., Lamaty, F., Bojarski, A., et al. (2020). mTOR activation by constitutively active serotonin6 receptors as new paradigm in neuropathic pain and its treatment. Prog. Neurobiol. 101846.

Martinez-Arevalo, M.J., Calcedo-Ordoñez, A., and Varo-Prieto, J.R. (1994). Cannabis Consumption as a Prognostic Factor in Schizophrenia. Br. J. Psychiatry *164*, 679–681.

Matias, S., Lottem, E., Dugué, G.P., and Mainen, Z.F. Activity patterns of serotonin neurons underlying cognitive flexibility. ELife *6*, e20552.

Mato, S., Del Olmo, E., and Pazos, A. (2003). Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. Eur. J. Neurosci. *17*, 1747–1754.

Mayeux, R., Stern, Y., Cote, L., and Williams, J.B. (1984). Altered serotonin metabolism in depressed patients with parkinson's disease. Neurology *34*, 642–646.

McGirr, A., Lipina, T.V., Mun, H.-S., Georgiou, J., Al-Amri, A.H., Ng, E., Zhai, D., Elliott, C., Cameron, R.T., Mullins, J.G., et al. (2016). Specific Inhibition of Phosphodiesterase-4B Results in Anxiolysis and Facilitates Memory Acquisition. Neuropsychopharmacology *41*, 1080–1092.

McIsaac, W.M., and Page, I.H. (1959). The Metabolism of Serotonin (5-Hydroxytryptamine). J. Biol. Chem. *234*, 858–864.

McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Gopal, P.P., Baek, W.S., and Golden, J.A. (2004). Axon mediated interneuron migration. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *63*, 932–941.

McNally, J., and McCarley, R. (2016). Gamma band oscillations: a key to understanding schizophrenia symptoms and neural circuit abnormalities. Curr. Opin. Psychiatry *29*, 202–210.

Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D.J.G., Dekeyne, A., Séveno, M., Rivet, J.-M., Gaven, F., Déléris, P., et al. (2012). 5-HT6 receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. EMBO Mol. Med. *4*, 1043–1056.

Mehta, U.M., Naik, S.S., Thanki, M.V., and Thirthalli, J. (2019). Investigational and Therapeutic Applications of Transcranial Magnetic Stimulation in Schizophrenia. Curr. Psychiatry Rep. *21*, 89.

Meltzer, H.Y. (1989). Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. Psychopharmacology (Berl.) *99*, S18–S27.

Mihaljevi, A., and Janovi, Š. COGNITIVE DEFICIT IN SCHIZOPHRENIA: AN OVERVIEW. *31*, 4.

Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., and Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. Trends Pharmacol. Sci. *29*, 454–464.

Millan, M.J., Andrieux, A., Bartzokis, G., Cadenhead, K., Dazzan, P., Fusar-Poli, P., Gallinat, J., Giedd, J., Grayson, D.R., Heinrichs, M., et al. (2016). Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. Nat. Rev. Drug Discov. *15*, 485–515.

Millan, M.J., Dekeyne, A., Gobert, A., Brocco, M., Mannoury la Cour, C., Ortuno, J.-C., Watson, D., and Fone, K.C.F. (2020). Dual-acting agents for improving cognition and real-world function in Alzheimer's disease: Focus on 5-HT6 and D3 receptors as hubs. Neuropharmacology 108099.

Millar, J.K., Pickard, B.S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S.R., Malloy, M.P., Chubb, J.E., Huston, E., Baillie, G.S., et al. (2005). DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. Science *310*, 1187–1191.

Mitchell, E.S., and Neumaier, J.F. (2005). 5-HT6 receptors: a novel target for cognitive enhancement. Pharmacol. Ther. *108*, 320–333.

Moghadam, A.A., Vose, L.R., Miry, O., Zhang, X.-L., and Stanton, P.K. (2021). Pairing of neonatal phencyclidine exposure and acute adolescent stress in male rats as a novel developmental model of schizophrenia. Behav. Brain Res. *409*, 113308.

Molnár, Z., Clowry, G.J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R.F., Hüppi, P.S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E.S., et al. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. J. Anat. *235*, 432–451.

Montez, D.F., Calabro, F.J., and Luna, B. The expression of established cognitive brain states stabilizes with working memory development. ELife *6*, e25606.

Moore, T.H., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R., Jones, P.B., Burke, M., and Lewis, G. (2007). Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. The Lancet *370*, 319–328.

Morelon, E., Mamzer-Bruneel, M.F., Peraldi, M.N., and Kreis, H. (2001). Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. *16*, 18–20.

Mørk, A., Russell, R.V., de Jong, I.E.M., and Smagin, G. (2017). Effects of the 5-HT6 receptor antagonist idalopirdine on extracellular levels of monoamines, glutamate and acetylcholine in the rat medial prefrontal cortex. Eur. J. Pharmacol. *799*, 1–6.

Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., and Nabeshima, T. (2007). Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. Neurochem. Int. *51*, 173–184.

N

Nakatani-Pawlak, A., Yamaguchi, K., Tatsumi, Y., Mizoguchi, H., and Yoneda, Y. (2009). Neonatal phencyclidine treatment in mice induces behavioral, histological and neurochemical abnormalities in adulthood. Biol. Pharm. Bull. *32*, 1576–1583.

Narboux-Nême, N., Angenard, G., Mosienko, V., Klempin, F., Pitychoutis, P.M., Deneris, E., Bader, M., Giros, B., Alenina, N., and Gaspar, P. (2013). Postnatal growth defects in mice with constitutive depletion of central serotonin. ACS Chem. Neurosci. *4*, 171–181.

Neasta, J., Ben Hamida, S., Yowell, Q., Carnicella, S., and Ron, D. (2010). Role for mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in neuroadaptations underlying alcohol-related disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 20093–20098.

Nicholas, J.M., Lipshitz, J., and Schreiber, E.C. (1982). Phencyclidine: its transfer across the placenta as well as into breast milk. Am. J. Obstet. Gynecol. *143*, 143–146.

Nielsen, S.M., Toftdahl, N.G., Nordentoft, M., and Hjorthøj, C. (2017). Association between alcohol, cannabis, and other illicit substance abuse and risk of developing schizophrenia: a nationwide population based register study. Psychol. Med. *47*, 1668–1677.

Nikiforuk, A. (2014). The procognitive effects of 5-HT6 receptor ligands in animal models of schizophrenia. Rev. Neurosci. *25*, 367–382.

Nikiforuk, A., and Popik, P. (2013). Amisulpride promotes cognitive flexibility in rats: The role of 5-HT7 receptors. Behav. Brain Res. *248*, 136–140.

Nikiforuk, A., Kos, T., and Wesołowska, A. (2011). The 5-HT6 receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. Psychopharmacology (Berl.) *217*, 411–418.

Noda, Y., Yamada, K., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (1995). Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. Br. J. Pharmacol. *116*, 2531–2537.

Noda, Y., Mamiya, T., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (1997). Effects of antidepressants on phencyclidine-induced enhancement of immobility in a forced swimming test in mice. Eur. J. Pharmacol. *324*, 135–140.

Noda, Y., Kamei, H., Mamiya, T., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (2000). Repeated phencyclidine treatment induces negative symptom-like behavior in forced swimming test in mice: imbalance of prefrontal serotonergic and dopaminergic functions. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *23*, 375–387.

Novick, D., Haro, J.M., Suarez, D., Vieta, E., and Naber, D. (2009). Recovery in the outpatient setting: 36-month results from the Schizophrenia Outpatients Health Outcomes (SOHO) study. Schizophr. Res. *108*, 223–230.

Nowak, E.C., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Ahonen, C., Bennett, K.A., Le Mercier, I., Ha, D.-G., and Noelle, R.J. (2012). Tryptophan hydroxylase-1 regulates immune tolerance and inflammation. J. Exp. Med. *209*, 2127–2135.

Nowakowski, T.J., Bhaduri, A., Pollen, A.A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M.A., Di Lullo, E., Haeussler, M., Sandoval-Espinosa, C., Liu, S.J., Velmeshev, D., et al. (2017). Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. Science *358*, 1318–1323.

Nucifora, F.C., Woznica, E., Lee, B.J., Cascella, N., and Sawa, A. (2019). Treatment Resistant Schizophrenia: Clinical, Biological, and Therapeutic Perspectives. Neurobiol. Dis. *131*, 104257.

O

Ohmura, Y., Tsutsui-Kimura, I., Sasamori, H., Nebuka, M., Nishitani, N., Tanaka, K.F., Yamanaka, A., and Yoshioka, M. (2020). Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. Neuropharmacology *167*, 107703.

Oliveira, A.F., and Yasuda, R. (2014). Neurofibromin Is the Major Ras Inactivator in Dendritic Spines. J. Neurosci. *34*, 776–783.

Olsen, M.A., Nawoschik, S.P., Schurman, B.R., Schmitt, H.L., Burno, M., Smith, D.L., and Schechter, L.E. (1999). Identification of a human 5-HT6 receptor variant produced by alternative splicing. Mol. Brain Res. *64*, 255–263.

Olson, C.O., Pejhan, S., Kroft, D., Sheikholeslami, K., Fuss, D., Buist, M., Ali Sher, A., Del Bigio, M.R., Sztainberg, Y., Siu, V.M., et al. (2018). MECP2 Mutation Interrupts Nucleolin-mTOR-P70S6K Signaling in Rett Syndrome Patients. Front. Genet. *9*, 635.

Ooms, M., Tsujikawa, T., Lohith, T.G., Mabins, S.N., Zoghbi, S.S., Sumitomo, A., Jaaro-Peled, H., Kimura, Y., Telu, S., Pike, V.W., et al. (2019). [11C](R)-Rolipram positron emission tomography detects DISC1 inhibition of phosphodiesterase type 4 in live Disc1 locus-impaired mice. J. Cereb. Blood Flow Metab. *39*, 1306–1313.

Ortiz-Medina, M.B., Perea, M., Torales, J., Ventriglio, A., Vitrani, G., Aguilar, L., and Roncero, C. (2018). Cannabis consumption and psychosis or schizophrenia development. Int. J. Soc. Psychiatry *64*, 690–704.

van Os, J., Kenis, G., and Rutten, B.P.F. (2010). The environment and schizophrenia. Nature *468*, 203–212.

O'Shea, M., Singh, M.E., Mcgregor, I.S., and Mallet, P.E. (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. J. Psychopharmacol. (Oxf.) *18*, 502–508.

Owen, M.J., Sawa, A., and Mortensen, P.B. (2016). Schizophrenia. The Lancet *388*, 86–97.

P

Pagida, M.A., Konstantinidou, A.E., Tsekoura, E., Mangoura, D., Patsouris, E., and Panayotacopoulou, M.T. (2013). Vulnerability of the Mesencephalic Dopaminergic Neurons of the Human Neonate to Prolonged Perinatal Hypoxia: An Immunohistochemical Study of Tyrosine Hydroxylase Expression in Autopsy Material. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *72*, 337–350.

Park, S.-C. (2019). Neurogenesis and antidepressant action. Cell Tissue Res. *377*, 95–106.

Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J.M., Samad, O.A., Krumlauf, R., Rijli, F.M., Brunet, J.-F., and Ericson, J. (2003). Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. Genes Dev. *17*, 729–737.

Peitl, V., Vidrih, B., Karlović, Z., Getaldić, B., Peitl, M., and Karlović, D. (2016). Platelet serotonin concentration and depressive symptoms in patients with schizophrenia. Psychiatry Res. *239*, 105–110.

Peroutka, S.J., and Snyder, S.H. (1979). Multiple Serotonin Receptors: Differential Binding of [3H]5-Hydroxytryptamine, [3H]Lysergic Acid Diethylamide and [3H]Spiroperidol. Mol. Pharmacol. *16*, 687–699.

Petanjek, Z., Judaš, M., Šimic, G., Rasin, M.R., Uylings, H.B.M., Rakic, P., and Kostovic, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 13281–13286.

Pfeiffer, M., Betizeau, M., Waltispurger, J., Pfister, S.S., Douglas, R.J., Kennedy, H., and Dehay, C. (2016). Unsupervised lineage-based characterization of primate precursors reveals high proliferative and morphological diversity in the OSVZ. J. Comp. Neurol. *524*, 535–563.

Pilling, S., Bebbington, P., Kuipers, E., Garety, P., Geddes, J., Orbach, G., and Morgan, C. (2002). Psychological treatments in schizophrenia: I. Meta-analysis of family intervention and cognitive behaviour therapy. Psychol. Med. *32*, 763–782.

Pineda-Farias, J.B., Barragán-Iglesias, P., Valdivieso-Sánchez, A., Rodríguez-Silverio, J., Flores-Murrieta, F.J., Granados-Soto, V., and Rocha-González, H.I. (2017). Spinal 5-HT4 and 5-HT6 receptors contribute to the maintenance of neuropathic pain in rats. Pharmacol. Rep. PR *69*, 916–923.

Pletscher, A., Shore, P.A., and Brodie, B.B. (1955). Serotonin Release as a Possible Mechanism of Reserpine Action. Science *122*, 374–375.

Pokorny, T., Duerler, P., Seifritz, E., Vollenweider, F.X., and Preller, K.H. (undefined/ed). LSD acutely impairs working memory, executive functions, and cognitive flexibility, but not risk-based decision-making. Psychol. Med. 1–10.

Pompili, M., Amador, X.F., Girardi, P., Harkavy-Friedman, J., Harrow, M., Kaplan, K., Krausz, M., Lester, D., Meltzer, H.Y., Modestin, J., et al. (2007). Suicide risk in schizophrenia: learning from the past to change the future. Ann. Gen. Psychiatry *6*, 10.

Pope, H.G., Gruber, A.J., Hudson, J.I., Cohane, G., Huestis, M.A., and Yurgelun-Todd, D. (2003). Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? Drug Alcohol Depend. *69*, 303–310.

Popovic, D., Schmitt, A., Kaurani, L., Senner, F., Papiol, S., Malchow, B., Fischer, A., Schulze, T.G., Koutsouleris, N., and Falkai, P. (2019). Childhood Trauma in Schizophrenia: Current Findings and Research Perspectives. Front. Neurosci. *13*, 274.

Poulia, N., Delis, F., Brakatselos, C., Lekkas, P., Kokras, N., Dalla, C., and Antoniou, K. (2020). Escalating low-dose Δ9 -tetrahydrocannabinol exposure during adolescence induces differential behavioral and neurochemical effects in male and female adult rats. Eur. J. Neurosci. *52*, 2681–2693.

Pradhan, S.N. (1984). Phencyclidine (PCP): some human studies. Neurosci. Biobehav. Rev. *8*, 493–501.

Preller, K.H., Herdener, M., Pokorny, T., Planzer, A., Kraehenmann, R., Stämpfli, P., Liechti, M.E., Seifritz, E., and Vollenweider, F.X. (2017). The Fabric of Meaning and Subjective Effects in LSD-Induced States Depend on Serotonin 2A Receptor Activation. Curr. Biol. *27*, 451–457.

Puig, M.V., and Gulledge, A.T. (2011). Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. Mol. Neurobiol. *44*, 449–464.

Pujol, C.N., Dupuy, V., Séveno, M., Runtz, L., Bockaert, J., Marin, P., and Chaumont-Dubel, S. (2020). Dynamic interactions of the 5-HT6 receptor with protein partners control dendritic tree morphogenesis. Sci. Signal. *13*.

R

Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. Science *241*, 170–176.

Rapoport, J.L., Giedd, J.N., and Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. Mol. Psychiatry *17*, 1228–1238.

Rapport, M.M., Green, Arda.Alden., and Page, I.H. (1948). SERUM VASOCONSTRICTOR (SEROTONIN). J. Biol. Chem. *176*, 1243–1251.

Reinebrant, H.E., Wixey, J.A., and Buller, K.M. (2013). Neonatal hypoxia–ischaemia disrupts descending neural inputs to dorsal raphé nuclei. Neuroscience *248*, 427–435.

Reiprich, P., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2005). Neonatal NMDA receptor blockade disturbs neuronal migration in rat somatosensory cortex in vivo. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *15*, 349–358.

Renard, J., Vitalis, T., Rame, M., Krebs, M.-O., Lenkei, Z., Le Pen, G., and Jay, T.M. (2016). Chronic cannabinoid exposure during adolescence leads to long-term structural and functional changes in the prefrontal cortex. Eur. Neuropsychopharmacol. *26*, 55–64.

Renard, J., Rosen, L.G., Loureiro, M., De Oliveira, C., Schmid, S., Rushlow, W.J., and Laviolette, S.R. (2017). Adolescent Cannabinoid Exposure Induces a Persistent Sub-Cortical Hyper-Dopaminergic State and Associated Molecular Adaptations in the Prefrontal Cortex. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *27*, 1297–1310.

Ribeiro, E.L.A., de Mendonça Lima, T., Vieira, M.E.B., Storpirtis, S., and Aguiar, P.M. (2018). Efficacy and safety of aripiprazole for the treatment of schizophrenia: an overview of systematic reviews. Eur. J. Clin. Pharmacol. *74*, 1215–1233.

Ricciardi, S., Boggio, E.M., Grosso, S., Lonetti, G., Forlani, G., Stefanelli, G., Calcagno, E., Morello, N., Landsberger, N., Biffo, S., et al. (2011). Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. Hum. Mol. Genet. *20*, 1182–1196.

Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabó, G., Vutskits, L., Kiss, J.Z., and Dayer, A.G. (2009). Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. Mol. Psychiatry *14*, 280–290.

Riemer, C., Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J.R., Poli, S., Porter, R.H.P., and Bös, M. (2003). Influence of the 5-HT6 receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT6 receptor antagonist. J. Med. Chem. *46*, 1273–1276.

Robinson, R.B., and Siegelbaum, S.A. (2003). Hyperpolarization-Activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. Annu. Rev. Physiol. *65*, 453–480.

Rodríguez, G., Neugebauer, N.M., Yao, K.L., Meltzer, H.Y., Csernansky, J.G., and Dong, H. (2017). Δ9-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) administration after neonatal exposure to phencyclidine potentiates schizophrenia-related behavioral phenotypes in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. *159*, 6–11.

Rood, B.D., Calizo, L.H., Piel, D., Spangler, Z.P., Campbell, K., and Beck, S.G. (2014). Dorsal Raphe Serotonin Neurons in Mice: Immature Hyperexcitability Transitions to Adult State during First Three Postnatal Weeks Suggesting Sensitive Period for Environmental Perturbation. J. Neurosci. *34*, 4809–4821.

Rosenfeld, C.S. (2020). Placental serotonin signaling, pregnancy outcomes, and regulation of fetal brain development†. Biol. Reprod. *102*, 532–538.

Routledge, C., Bromidge, S.M., Moss, S.F., Price, G.W., Hirst, W., Newman, H., Riley, G., Gager, T., Stean, T., Upton, N., et al. (2000). Characterization of SB-271046: A potent, selective and orally active 5-HT6 receptor antagonist. Br. J. Pharmacol. *130*, 1606–1612.

Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J.M., Tardivellacombe, J., Diaz, J., Leurs, R., and Schwartz, J.C. (1993). A Novel Rat Serotonin (5-HT6) Receptor: Molecular Cloning, Localization and Stimulation of cAMP Accumulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *193*, 268–276.

Rubino, T., Prini, P., Piscitelli, F., Zamberletti, E., Trusel, M., Melis, M., Sagheddu, C., Ligresti, A., Tonini, R., Di Marzo, V., et al. (2015). Adolescent exposure to THC in female rats disrupts developmental changes in the prefrontal cortex. Neurobiol. Dis. *73*, 60–69.

Rubio-Abadal, E., Ochoa, S., Barajas, A., Baños, I., Dolz, M., Sanchez, B., Del Cacho, N., Carlson, J., Huerta-Ramos, E., and Usall, J. (2015). Birth weight and obstetric complications determine age at onset in first episode of psychosis. J. Psychiatr. Res. *65*, 108–114.

Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Dev. Neurobiol. *71*, 45–61.

Russo, E., Citraro, R., Donato, G., Camastra, C., Iuliano, R., Cuzzocrea, S., Constanti, A., and De Sarro, G. (2013). mTOR inhibition modulates epileptogenesis, seizures and depressive behavior in a genetic rat model of absence epilepsy. Neuropharmacology *69*, 25–36.

S

S. Schneider, L. (2000). A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's disease. Dialogues Clin. Neurosci. *2*, 111–128.

Sakurai, T., and Gamo, N.J. (2019). Cognitive functions associated with developing prefrontal cortex during adolescence and developmental neuropsychiatric disorders. Neurobiol. Dis. *131*, 104322.

Salih, H., Anghelescu, I., Kezic, I., Sinha, V., Hoeben, E., Van Nueten, L., De Smedt, H., and De Boer, P. (2015). Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterisation of JNJ-40411813, a positive allosteric modulator of mGluR2, in two randomised, double-blind phase-I studies. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. *29*, 414–425.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell *22*, 159–168.

Saré, R.M., Song, A., Loutaev, I., Cook, A., Maita, I., Lemons, A., Sheeler, C., and Smith, C.B. (2018). Negative Effects of Chronic Rapamycin Treatment on Behavior in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. Front. Mol. Neurosci. *10*, 452.

Sargin, D., Jeoung, H.-S., Goodfellow, N.M., and Lambe, E.K. (2019). Serotonin Regulation of the Prefrontal Cortex: Cognitive Relevance and the Impact of Developmental Perturbation. ACS Chem. Neurosci. *10*, 3078–3093.

Schechter, L.E., Lin, Q., Smith, D.L., Zhang, G., Shan, Q., Platt, B., Brandt, M.R., Dawson, L.A., Cole, D., Bernotas, R., et al. (2008). Neuropharmacological Profile of Novel and Selective 5-HT 6 Receptor Agonists: WAY-181187 and WAY-208466. Neuropsychopharmacology *33*, 1323–1335.

Scholes, K.E., Harrison, B.J., O'Neill, B.V., Leung, S., Croft, R.J., Pipingas, A., Phan, K.L., and Nathan, P.J. (2007). Acute serotonin and dopamine depletion improves attentional control: findings from the stroop task. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *32*, 1600–1610.

Sebben, M., Ansanay, H., Bockaert, J., and Dumuis, A. (1994). 5-HT6 receptors positively coupled to adenylyl cyclase in striatal neurones in culture. NeuroReport *5*, 2553–2557.

Seeman, M.V. (2019). Does Gender Influence Outcome in Schizophrenia? Psychiatr. Q. *90*, 173–184.

Séguéla, P., Watkins, K.C., and Descarries, L. (1989). Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. J. Comp. Neurol. *289*, 129–142.

Selemon, L.D., and Zecevic, N. (2015). Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. Transl. Psychiatry *5*, e623–e623.

Selemon, L.D., Kleinman, J.E., Herman, M.M., and Goldman-Rakic, P.S. (2002). Smaller Frontal Gray Matter Volume in Postmortem Schizophrenic Brains. Am. J. Psychiatry *159*, 1983–1991.

Sessa, B. (2008). Is it time to revisit the role of psychedelic drugs in enhancing human creativity? J. Psychopharmacol. (Oxf.) *22*, 821–827.

Shahidi, S., Hashemi-Firouzi, N., Asl, S.S., and Komaki, A. (2019). Serotonin type 6 receptor antagonist attenuates the impairment of long-term potentiation and memory induced by Abeta. Behav. Brain Res. *364*, 205–212.

Shajib, M.S., and Khan, W.I. (2015). The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. Acta Physiol. Oxf. Engl. *213*, 561–574.

Shallice, T. (1988). From Neuropsychology to Mental Structure (Cambridge University Press).

Shapiro, D.A., Renock, S., Arrington, E., Chiodo, L.A., Liu, L.-X., Sibley, D.R., Roth, B.L., and Mailman, R. (2003). Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *28*, 1400–1411.

Sharma, A., Hoeffer, C.A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S.M., Klann, E., and Zukin, R.S. (2010). Dysregulation of mTOR Signaling in Fragile X Syndrome. J. Neurosci. *30*, 694–702.

Shelton, R.C., Sanders-Bush, E., Manier, D.H., and Lewis, D.A. (2009). Elevated 5-HT 2A receptors in postmortem prefrontal cortex in major depression is associated with reduced activity of protein kinase A. Neuroscience *158*, 1406–1415.

Shen, S., Lang, B., Nakamoto, C., Zhang, F., Pu, J., Kuan, S.-L., Chatzi, C., He, S., Mackie, I., Brandon, N.J., et al. (2008). Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 10893–10904.

Shields, J., and Gottesman, I.I. (1972). Cross-National Diagnosis of Schizophrenia in Twins: The Heritability and Specificity of Schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry *27*, 725–730.

Shore, P.A., Pletscher, A., Tomich, E.G., Carlsson, A., Kuntzman, R., and Brodie, B.B. (1957). Role of Brain Serotonin in Reserpine Action. Ann. N. Y. Acad. Sci. *66*, 609–617.

Silbereis, J.C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., and Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. Neuron *89*, 248–268.

Siskind, D., McCartney, L., Goldschlager, R., and Kisely, S. (2016). Clozapine v. first- and second-generation antipsychotics in treatment-refractory schizophrenia: systematic review and meta-analysis. Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci. *209*, 385–392.

Skene, N.G., Bryois, J., Bakken, T.E., Breen, G., Crowley, J.J., Gaspar, H.A., Giusti-Rodriguez, P., Hodge, R.D., Miller, J.A., Muñoz-Manchado, A.B., et al. (2018). Genetic identification of brain cell types underlying schizophrenia. Nat. Genet. *50*, 825–833.

Soiza-Reilly, M., Meye, F.J., Olusakin, J., Telley, L., Petit, E., Chen, X., Mameli, M., Jabaudon, D., Sze, J.-Y., and Gaspar, P. (2019). SSRIs target prefrontal to raphe circuits during development modulating synaptic connectivity and emotional behavior. Mol. Psychiatry *24*, 726–745.

Song, N.-N., Xiu, J.-B., Huang, Y., Chen, J.-Y., Zhang, L., Gutknecht, L., Lesch, K.P., Li, H., and Ding, Y.-Q. (2011). Adult Raphe-Specific Deletion of Lmx1b Leads to Central Serotonin Deficiency. PLoS ONE *6*, e15998.

Speranza, L., Labus, J., Volpicelli, F., Guseva, D., Lacivita, E., Leopoldo, M., Bellenchi, G.C., di Porzio, U., Bijata, M., Perrone-Capano, C., et al. (2017). Serotonin 5-HT7 receptor increases the density of dendritic spines and facilitates synaptogenesis in forebrain neurons. J. Neurochem. *141*, 647–661.

Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid-β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. PLoS ONE *5*, e9979.

Stahl, S.M. (2018). Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. CNS Spectr. *23*, 187–191.

Stilo, S.A., and Murray, R.M. (2019). Non-Genetic Factors in Schizophrenia. Curr. Psychiatry Rep. *21*, 100.

Stoica, L., Zhu, P.J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S.C., and Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 3791–3796.

Stuber, G.D., Sparta, D.R., Stamatakis, A.M., van Leeuwen, W.A., Hardjoprajitno, J.E., Cho, S., Tye, K.M., Kempadoo, K.A., Zhang, F., Deisseroth, K., et al. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. Nature *475*, 377–380.

Suárez-Santiago, J.E., Briones-Aranda, A., Espinosa-Raya, J., and Picazo, O. (2017). Agonist E-6837 and antagonist SB-271046 of 5-HT6 receptors both reverse the depressive-like effect induced in mice by subchronic ketamine administration. Behav. Pharmacol. *28*, 582–585.

Sullivan, P.F., Kendler, K.S., and Neale, M.C. (2003). Schizophrenia as a Complex Trait: Evidence From a Meta-analysis of Twin Studies. Arch. Gen. Psychiatry *60*, 1187–1192.

Sun, Z., Wang, B., Chen, C., Li, C., and Zhang, Y. (2021). 5-HT6R null mutatrion induces synaptic and cognitive defects. Aging Cell *20*, e13369.

Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Qi, H., Carruthers, R., Witkin, J.M., Nomikos, G.G., and Greengard, P. (2007). Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT6 receptor stimulation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 4201–4209.

Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., and Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. Neuroscience *341*, 112–153.

Szok, D., Tajti, J., Nyári, A., and Vécsei, L. (2019). Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. Behav. Neurol. *2019*, e8685954.

T

Tamnes, C.K., Herting, M.M., Goddings, A.-L., Meuwese, R., Blakemore, S.-J., Dahl, R.E., Güroğlu, B., Raznahan, A., Sowell, E.R., Crone, E.A., et al. (2017). Development of the Cerebral Cortex across Adolescence: A Multisample Study of Inter-Related Longitudinal Changes in Cortical Volume, Surface Area, and Thickness. J. Neurosci. *37*, 3402–3412.

Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., and Schuman, E.M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. *99*, 467–472.

Tansey, K.E., Rees, E., Linden, D.E., Ripke, S., Chambert, K.D., Moran, J.L., McCarroll, S.A., Holmans, P., Kirov, G., Walters, J., et al. (2016). Common alleles contribute to schizophrenia in CNV carriers. Mol. Psychiatry *21*, 1085–1089.

Tassone, A., Madeo, G., Schirinzi, T., Vita, D., Puglisi, F., Ponterio, G., Borsini, F., Pisani, A., and Bonsi, P. (2011). Activation of 5-HT6 receptors inhibits corticostriatal glutamatergic transmission. Neuropharmacology *61*, 632–637.

Taylor, S.F., and Tso, I.F. (2015). GABA abnormalities in schizophrenia: A methodological review of in vivo studies. Schizophr. Res. *167*, 84–90.

Telzer, E.H., Miernicki, M.E., and Rudolph, K.D. (2018). Chronic Peer Victimization Heightens Neural Sensitivity to Risk Taking. Dev. Psychopathol. *30*, 13–26.

Tharyan, P., and Adams, C.E. (2005). Electroconvulsive therapy for schizophrenia. Cochrane Database Syst. Rev. CD000076.

Thuault, S.J., Malleret, G., Constantinople, C.M., Nicholls, R., Chen, I., Zhu, J., Panteleyev, A., Vronskaya, S., Nolan, M.F., Bruno, R., et al. (2013). Prefrontal cortex HCN1 channels enable intrinsic persistent neural firing and executive memory function. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 13583–13599.

Tirado-Muñoz, J., Lopez-Rodriguez, A.B., Fonseca, F., Farré, M., Torrens, M., and Viveros, M.-P. (2020). Effects of cannabis exposure in the prenatal and adolescent periods: Preclinical and clinical studies in both sexes. Front. Neuroendocrinol. *57*, 100841.

Troca-Marín, J.A., Alves-Sampaio, A., and Montesinos, M.L. (2012). Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. Prog. Neurobiol. *96*, 268–282.

Trojanowski, J.Q., and Jacobson, S. (1977). The morphology and laminar distribution of cortico-pulvinar neurons in the rhesus monkey. Exp. Brain Res. *28*, 51–62.

Tropea, D., Hardingham, N., Millar, K., and Fox, K. (2018). Mechanisms underlying the role of DISC1 in synaptic plasticity. J. Physiol. *596*, 2747–2771.

Trovó-Marqui, A.B., and Tajara, E.H. (2006). Neurofibromin: a general outlook. Clin. Genet. *70*, 1–13.

Trowbridge, S., Narboux-Nême, N., and Gaspar, P. (2011). Genetic Models of Serotonin (5-HT) Depletion: What do They Tell Us About the Developmental Role of 5-HT? Anat. Rec. *294*, 1615–1623.

Tsegay, E.W., Demise, D.G., Hailu, N.A., and Gufue, Z.H. (2020). Serotonin Type 6 and 7 Receptors as a Novel Therapeutic Target for the Treatment of Schizophrenia . Neuropsychiatr. Dis. Treat. *16*, 2499–2509.

Tsukada, T., Shimada, H., Sakata-Haga, H., Iizuka, H., and Hatta, T. (2019). Molecular mechanisms underlying the models of neurodevelopmental disorders in maternal immune activation relevant to the placenta. Congenit. Anom. *59*, 81–87.

Twamley, E.W., Jeste, D.V., and Bellack, A.S. (2003). A review of cognitive training in schizophrenia. Schizophr. Bull. *29*, 359–382.

U

Ucha, M., Roura-Martínez, D., Ambrosio, E., and Higuera-Matas, A. (2020). The role of the mTOR pathway in models of drug-induced reward and the behavioural constituents of addiction. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. *34*, 1176–1199.

V

Valenstein, E., Bowers, D., Verfaellie, M., Heilman, K.M., Day, A., and Watson, R.T. (1987). Retrosplenial amnesia. Brain J. Neurol. *110 (Pt 6)*, 1631–1646.

Valmaggia, L.R., Gaag, M. van der, Tarrier, N., Pijnenborg, M., and Slooff, C.J. (2005). Cognitive–behavioural therapy for refractory psychotic symptoms of schizophrenia resistant to atypical antipsychotic medication: Randomised controlled trial. Br. J. Psychiatry *186*, 324–330.

Van Skike, C.E., Jahrling, J.B., Olson, A.B., Sayre, N.L., Hussong, S.A., Ungvari, Z., Lechleiter, J.D., and Galvan, V. (2018). Inhibition of mTOR protects the blood-brain barrier in models of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. *314*, H693–H703.

Velligan, D.I., Mahurin, R.K., L. Eckert, S., Hazleton, B.C., and Miller, A. (1997). Relationship between specific types of communication deviance and attentional performance in patients with schizophrenia. Psychiatry Res. *70*, 9–20.

Vézina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975). RAPAMYCIN (AY-22, 989), A NEW ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC I. TAXONOMY OF THE PRODUCING STREPTOMYCETE AND ISOLATION OF THE ACTIVE PRINCIPLE. J. Antibiot. (Tokyo) *28*, 721–726.

Vialli, M., and Erspamer, V. (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. *27*, 81–99.

Vitalis, T., Ansorge, M.S., and Dayer, A.G. (2013). Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT3A and 5-HT6 receptor subtypes. Front. Cell. Neurosci. *7*.

Vogt, B.A. (2005). Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 533–544.

Volkow, N.D., Baler, R.D., Compton, W.M., and Weiss, S.R.B. (2014). Adverse Health Effects of Marijuana Use (Massachusetts Medical Society).

Vollenweider, F.X., Vollenweider-Scherpenhuyzen, M.F.I., Bäbler, A., Vogel, H., and Hell, D. (1998). Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. NeuroReport *9*, 3897–3902.

W

Wallace, J.A., and Lauder, J.M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. Brain Res. Bull. *10*, 459–479.

Walther, D.J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science *299*, 76.

Wang, C.Z., and Johnson, K.M. (2005). Differential effects of acute and subchronic administration on phencyclidine-induced neurodegeneration in the perinatal rat. J. Neurosci. Res. *81*, 284–292.

Wang, C., McInnis, J., West, J.B., Bao, J., Anastasio, N., Guidry, J.A., Ye, Y., Salvemini, D., and Johnson, K.M. (2003). Blockade of phencyclidine-induced cortical apoptosis and deficits in prepulse inhibition by M40403, a superoxide dismutase mimetic. J. Pharmacol. Exp. Ther. *304*, 266–271.

Wang, C.C., Man, G.C.W., Chu, C.Y., Borchert, A., Ugun-Klusek, A., Billett, E.E., Kühn, H., and Ufer, C. (2014). Serotonin Receptor 6 Mediates Defective Brain Development in Monoamine Oxidase A-deficient Mouse Embryos. J. Biol. Chem. *289*, 8252–8263.

Wang, H., Xu, J., Lazarovici, P., Quirion, R., and Zheng, W. (2018). cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. Front. Mol. Neurosci. *11*, 255.

Wang, L., Lv, Y., Deng, W., Peng, X., Xiao, Z., Xi, Z., Chen, G., and Wang, X. (2015). 5-HT6 Receptor Recruitment of mTOR Modulates Seizure Activity in Epilepsy. Mol. Neurobiol. *51*, 1292–1299.

Waters, F., and Fernyhough, C. (2017). Hallucinations: A Systematic Review of Points of Similarity and Difference Across Diagnostic Classes. Schizophr. Bull. *43*, 32–43.

Wei, J., Graziane, N.M., Wang, H., Zhong, P., Wang, Q., Liu, W., Hayashi-Takagi, A., Korth, C., Sawa, A., Brandon, N.J., et al. (2014). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by disrupted-in-schizophrenia-1. Biol. Psychiatry *75*, 414–424.

Weichhart, T. (2018). mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. Gerontology *64*, 127–134.

Wen, L., Lu, Y.-S., Zhu, X.-H., Li, X.-M., Woo, R.-S., Chen, Y.-J., Yin, D.-M., Lai, C., Terry, A.V., Vazdarjanova, A., et al. (2010). Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 1211–1216.

West, P.J., Marcy, V.R., Marino, M.J., and Schaffhauser, H. (2009). Activation of the 5-HT6 receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. Neuroscience *164*, 692–701.

Whiteford, H.A., Ferrari, A.J., Degenhardt, L., Feigin, V., and Vos, T. (2015). The global burden of mental, neurological and substance use disorders: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2010. PloS One *10*, e0116820.

Wickham, S., Taylor, P., Shevlin, M., and Bentall, R.P. (2014). The Impact of Social Deprivation on Paranoia, Hallucinations, Mania and Depression: The Role of Discrimination Social Support, Stress and Trust. PLOS ONE *9*, e105140.

Wilkinson, D., Windfeld, K., and Colding-Jørgensen, E. (2014). Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT6 receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. Lancet Neurol. *13*, 1092–1099.

William Moreau, A., Amar, M., Le Roux, N., Morel, N., and Fossier, P. (2010). Serotoninergic Fine-Tuning of the Excitation–Inhibition Balance in Rat Visual Cortical Networks. Cereb. Cortex *20*, 456–467.

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. Nat. Chem. Biol. *4*, 295–305.

Winship, I.R., Dursun, S.M., Baker, G.B., Balista, P.A., Kandratavicius, L., Maia-de-Oliveira, J.P., Hallak, J., and Howland, J.G. (2019). An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. Can. J. Psychiatry *64*, 5–17.

Wong, M.-L., and Licinio, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 343–351.

Woolley, M.L., and Fone, C.A.M. and K.C.F. (2004). 5-ht6 Receptors.

Woolley, M.L., Bentley, J.C., Sleight, A.J., Marsden, C.A., and Fone, K.C.F. (2001). A role for 5-ht6 receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. Neuropharmacology *41*, 210–219.

Wu, J., McCallum, S.E., Glick, S.D., and Huang, Y. (2011). Inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway by rapamycin blocks cocaine-induced locomotor sensitization. Neuroscience *172*, 104–109.

X

Xing, B., Han, G., Wang, M.-J., Snyder, M.A., and Gao, W.-J. (2018). Juvenile treatment with mGluR2/3 agonist prevents schizophrenia-like phenotypes in adult by acting through GSK3β. Neuropharmacology *137*, 359–371.

Xing, L., Kalebic, N., Namba, T., Vaid, S., Wimberger, P., and Huttner, W.B. (2020). Serotonin Receptor 2A Activation Promotes Evolutionarily Relevant Basal Progenitor Proliferation in the Developing Neocortex. Neuron *108*, 1113-1129.e6.

Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R., et al. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. Cell *62*, 599–608.

Xu, X., Chini, M., Bitzenhofer, S.H., and Hanganu-Opatz, I.L. (2019). Transient Knock-Down of Prefrontal DISC1 in Immune-Challenged Mice Causes Abnormal Long-Range Coupling and Cognitive Dysfunction throughout Development. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *39*, 1222–1235.

Y

Yabut, J.M., Crane, J.D., Green, A.E., Keating, D.J., Khan, W.I., and Steinberg, G.R. (2019). Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. Endocr. Rev. *40*, 1092–1107.

Yamasue, H., Iwanami, A., Hirayasu, Y., Yamada, H., Abe, O., Kuroki, N., Fukuda, R., Tsujii, K., Aoki, S., Ohtomo, K., et al. (2004). Localized volume reduction in prefrontal, temporolimbic, and paralimbic regions in schizophrenia: an MRI parcellation study. Psychiatry Res. Neuroimaging *131*, 195–207.

Yeterian, E.H., and Pandya, D.N. (1985). Corticothalamic connections of the posterior parietal cortex in the rhesus monkey. J. Comp. Neurol. *237*, 408–426.

Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. Nature *477*, 171–178.

Yohn, S.E., and Conn, P.J. (2019). Pick Your Model Wisely: Understanding the Negative Symptoms of Schizophrenia in Rodent Models. ACS Chem. Neurosci. *10*, 33–35.

Yoshimura, B., Sato, K., Sakamoto, S., Tsukahara, M., Yoshimura, Y., and So, R. (2019). Incidence and predictors of acute akathisia in severely ill patients with first-episode schizophrenia treated with aripiprazole or risperidone: secondary analysis of an observational study. Psychopharmacology (Berl.) *236*, 723–730.

Yu, W., Yen, Y.-C., Lee, Y.-H., Tan, S., Xiao, Y., Lokman, H., Ting, A.K.T., Ganegala, H., Kwon, T., Ho, W.-K., et al. (2019). Prenatal selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) exposure induces working memory and social recognition deficits by disrupting inhibitory synaptic networks in male mice. Mol. Brain *12*, 1–13.

Yun, H.-M., Kim, S., Kim, H.-J., Kostenis, E., Kim, J.I., Seong, J.Y., Baik, J.-H., and Rhim, H. (2007). The Novel Cellular Mechanism of Human 5-HT6 Receptor through an Interaction with Fyn. J. Biol. Chem. *282*, 5496–5505.

Yun, H.-M., Baik, J.-H., Kang, I., Jin, C., and Rhim, H. (2010). Physical Interaction of Jab1 with Human Serotonin 6 G-protein-coupled Receptor and Their Possible Roles in Cell Survival. J. Biol. Chem. *285*, 10016–10029.

Z

Zajdel, P., Marciniec, K., Satała, G., Canale, V., Kos, T., Partyka, A., Jastrzębska-Więsek, M., Wesołowska, A., Basińska-Ziobroń, A., Wójcikowski, J., et al. (2016). N1-Azinylsulfonyl-1H-indoles: 5-HT6 Receptor Antagonists with Procognitive and Antidepressant-Like Properties. ACS Med. Chem. Lett. *7*, 618–622.

Zhang, W., Liu, J., Feng, J., Jia, M., Zhang, G., and Wen, X. (2018). Downregulation of 5-hydroxytryptamine7 receptor in the medial prefrontal cortex ameliorates impulsive actions in animal models of schizophrenia. Behav. Brain Res. *341*, 212–223.

Zhang, X., Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science *305*, 217.

Zhang, Y.-M., Zhang, L., Wang, Y., Sun, Y.-N., Guo, Y., Du, C.-X., Zhang, J., Yao, L., Yu, S.-Q., and Liu, J. (2016). Activation and blockade of prelimbic 5-HT6 receptors produce different effects on depressive-like behaviors in unilateral 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. Neuropharmacology *110*, 25–36.

Zhou, F.M., and Hablitz, J.J. (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. J. Neurophysiol. *82*, 2989–2999.

Zhou, H., and Huang, S. (2010). The complexes of mammalian target of rapamycin. Curr. Protein Pept. Sci. *11*, 409–424.

Zhou, Y.D., and Fuster, J.M. (1997). Neuronal activity of somatosensory cortex in a cross-modal (visuo-haptic) memory task. Exp. Brain Res. *116*, 551–555.

Zhou, M., Li, W., Huang, S., Song, J., Kim, J.Y., Tian, X., Kang, E., Sano, Y., Liu, C., Balaji, J., et al. (2013). mTOR Inhibition ameliorates cognitive and affective deficits caused by Disc1 knockdown in adult-born dentate granule neurons. Neuron *77*, 647–654.

Zhou, Y., Fan, L., Qiu, C., and Jiang, T. (2015). Prefrontal cortex and the dysconnectivity hypothesis of schizophrenia. Neurosci. Bull. *31*, 207.

Zhu, C., Lin, R., Liu, C., Huang, M., Lin, F., Zhang, G., Zhang, Y., Miao, J., Lin, W., and Huang, H. (2020). The Antagonism of 5-HT6 Receptor Attenuates Current-Induced Spikes and Improves Long-Term Potentiation via the Regulation of M-Currents in a Pilocarpine-Induced Epilepsy Model. Front. Pharmacol. *0*.

Zhu, Z., Yang, C., Iyaswamy, A., Krishnamoorthi, S., Sreenivasmurthy, S.G., Liu, J., Wang, Z., Tong, B.C.-K., Song, J., Lu, J., et al. (2019). Balancing mTOR Signaling and Autophagy in the Treatment of Parkinson's Disease. Int. J. Mol. Sci. *20*, 728.