

Quand deux molécules impliquées dans la régulation de l'humeur se rencontrent

Modulation réciproque du transporteur de la sérotonine et de la NO-synthase neuronale

Philippe Marin, Benjamin Chanrion, Joël Bockaert

Institut de Génomique Fonctionnelle,
Université de Montpellier, CNRS UMRS 5203,
Inserm U661, 141, rue de la Cardonille,
F-34094 Montpellier Cedex 5, France.

philippe.marin@igf.cnrs.fr

benjamin.chanrion@igf.cnrs.fr

joel.bockaert@igf.cnrs.fr

► La sérotonine est un neurotransmetteur qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'humeur. Dans le contexte de nombreux troubles psychiatriques comme la dépression, la conduite suicidaire, l'anxiété, l'agressivité, l'addiction et la schizophrénie, un dysfonctionnement des systèmes sérotoninergiques est observé. L'activité de ces systèmes est étroitement contrôlée par la recapture dans le neurone présynaptique de la sérotonine libérée dans le milieu extracellulaire grâce un transporteur de haute affinité dépendant du Na⁺ et du Cl⁻ : le transporteur de la sérotonine ou SERT [1]. Le SERT est une cible majeure des antidépresseurs (inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine et inhibiteurs mixtes de recapture de sérotonine et de noradrénaline) et de certaines drogues d'abus comme la cocaïne, l'amphétamine et l'ecstasy [1, 2].

La régulation spatio-temporelle de l'activité des transporteurs des neurotransmetteurs fait intervenir des réseaux de protéines qui interagissent avec leurs domaines intracellulaires. Ainsi, différents partenaires protéiques du SERT ont été identifiés au cours des dernières années, le plus souvent grâce à des expériences de double-hybride réalisées chez la levure. Dans une étude venant d'être publiée dans *Proc Natl Acad Sci USA* [3], notre équipe de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier, associée à la division de Psychopharmacologie de l'Institut de Recherche Servier, a mis en œuvre une approche protéomique pour identifier de

façon globale les protéines qui interagissent avec l'extrémité carboxy-terminale du SERT, domaine encore peu exploré du point de vue des interactions. Cette approche, fondée sur des expériences de chromatographie d'affinité utilisant un peptide synthétique comme appât et sur l'identification des protéines retenues par affinité grâce à la spectrométrie de masse MALDI-TOF, a permis l'identification de plusieurs nouveaux partenaires potentiels du SERT.

Parmi ceux-ci, nous nous sommes focalisés sur une des trois enzymes à l'origine de la production de monoxyde d'azote (NO), la NO-synthase neuronale (nNOS), en raison de son implication dans la régulation de l'humeur et des connexions déjà décrites entre les systèmes sérotoninergiques et nitridergiques. Ainsi, les souris chez lesquelles le gène codant pour la nNOS a été invalidé (*nNOS*^{-/-}) ont des conduites agressives et impulsives [4]. Ces troubles comportementaux sont associés à une altération de la neurotransmission sérotoninergique. De plus, la nNOS est co-exprimée avec le SERT dans la majorité des neurones sérotoninergiques [5]. Enfin, plusieurs études ont mis en évidence une modulation de l'activité du SERT par le NO. En stimulant la production de GMPc et la protéine kinase G (PKG), le NO induit la phosphorylation du SERT sur un résidu thréonine, un processus à l'origine d'une augmentation de son activité intrinsèque et de la recapture de sérotonine [6]. À l'inverse, à fortes concentrations, le NO induit une S-nitrosylation du transporteur

sur des résidus cystéine, inhibant ainsi la recapture de sérotonine [7].

L'analyse fonctionnelle de l'interaction physique entre la nNOS et le SERT, réalisée dans un premier temps dans une lignée cellulaire, a permis de démontrer que celle-ci était à l'origine d'une diminution de l'expression du transporteur à la surface cellulaire et de la recapture de sérotonine [3]. De plus, contrairement aux schémas existants, cet effet était indépendant de l'activité catalytique de la nNOS et de la production de NO. Nous avons par la suite établi l'existence de cette régulation *in vivo* grâce à l'utilisation d'un peptide mimétique de l'extrémité carboxy-terminale du SERT, qui inhibe par compétition l'interaction entre le SERT et la nNOS. La fusion du peptide avec le domaine de transduction de la protéine TAT du VIH a permis son internalisation cellulaire. Un traitement de cultures de neurones issus du mésencéphale de souris par le peptide provoque une augmentation de la recapture de sérotonine alors qu'un peptide contrôle, qui n'inhibe pas l'interaction entre le transporteur et la NOS, ne modifie pas la vitesse de recapture de sérotonine. Enfin, l'injection intraveineuse du peptide mimétique chez la souris, qui est suivie de la pénétration du peptide dans les différentes régions du cerveau, provoque une augmentation de la recapture de sérotonine mesurée dans des synaptosomes, analogue à celle mesurée chez les souris *nNOS*^{-/-}. Le mécanisme impliqué dans l'inhibition de l'adressage du SERT à la membrane plasmique induite par son contact physique avec la nNOS reste à démontrer. Cette inhibition pourrait résulter d'une compétition entre la nNOS et le complexe COPII impliqué dans

l'export du réticulum endoplasmique des protéines membranaires nouvellement synthétisées, pour s'associer au SERT. En effet, deux sous-unités du complexe COPII, Sec23A et Sec24C, ont également été identifiées grâce au test protéomique mis en œuvre, et ces protéines sont recrutées par des motifs du domaine carboxy-terminal du transporteur également impliqués dans l'interaction avec la nNOS.

Notre étude montre également que l'interaction entre le SERT et la nNOS est à l'origine d'une régulation « réciproque » de l'activité fonctionnelle des deux partenaires. Ainsi, le contact physique entre les deux protéines permet une activation de la nNOS lors de la recapture de la sérotonine. De façon assez inhabituelle pour cette isoforme de NOS, cette activation a lieu indépendamment d'une augmentation du Ca^{2+} cytosolique, mais dépend de la calmoduline, à l'image de ce qui a été observé pour les autres formes de NOS [8]. Ce processus constitue un des tout premiers exemples d'une signalisation intracellulaire

déclenchée, non pas par un récepteur, mais par un transporteur. Un phénomène analogue a été mis en évidence il y a quelques années dans les plaquettes [9]. Ainsi, la recapture plaquettaire de sérotonine est à l'origine de la transamidation des petites protéines G RhoA et Rab4 (un processus également appelé sérotonylation) qui conduit à l'exocytose des granules de sécrétion.

En conclusion

L'association du SERT et de la nNOS, et la régulation réciproque de leur activité fonctionnelle, pourraient être à l'origine d'une modulation temporelle fine de la transmission sérotoninergique (Figure 1). L'augmentation de la sérotonine extracellulaire, suivie de sa recapture par le SERT, provoque une production de NO qui, via la phosphorylation du transporteur, augmenterait - dans un premier temps - l'efficacité de la recapture de séro-

nine. Le NO produit est également capable d'activer le facteur de transcription CREB, conduisant à une augmentation de l'expression des gènes cibles de CREB, parmi lesquels le gène codant pour la nNOS elle-même [10]. L'augmentation de l'expression de la nNOS, en inhibant l'adressage du transporteur à la membrane plasmique, diminue - dans un deuxième temps - la recapture de la sérotonine, prévenant une altération prolongée de la transmission sérotoninergique. L'influence de l'interaction entre le SERT et la nNOS sur la régulation de l'humeur est une question qui reste à analyser. L'effet du peptide mimétique bloquant l'association entre les deux partenaires dans des tests de dépression, d'anxiété et d'agressivité apportera probablement des éléments de réponse. ♦

When two molecules involved in the regulation of mood meet: mutual modulation of the serotonin transporter and neuronal NO-synthase

RÉFÉRENCES

- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters : structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 2003 ; 4 : 13-25.
- White KJ, Walline CC, Barker EL. Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development. *Aaps J* 2005 ; 7 : E421-33.
- Chanrion B, Mannoury La Cour C, Bertaso F, et al. Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 (sous presse).
- Nelson RJ, Trainor BC, Chiavegatto S, Demas GE. Pleiotropic contributions of nitric oxide to aggressive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2006 ; 30 : 346-55.
- Simpson KL, Waterhouse BD, Lin RC. Differential expression of nitric oxide in serotonergic projection neurons: neurochemical identification of dorsal raphe inputs to rodent trigeminal somatosensory targets. *J Comp Neurol* 2003 ; 466 : 495-512.
- Ramamoorthy S, Samuvel DJ, Buck ER, et al. Phosphorylation of threonine residue 276 is required for acute regulation of serotonin transporter by cyclic GMP. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 11639-47.
- Bryan-Lluka LJ, Papacostas MH, Paczkowski FA, Wanstall JC. Nitric oxide donors inhibit 5-hydroxytryptamine (5-HT) uptake by the human 5-HT transporter (SERT). *Br J Pharmacol* 2004 ; 143 : 63-70.
- Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 2001 ; 299 : 818-24.
- Walther DJ, Peter JU, Winter S, et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 2003 ; 115 : 851-62.
- Riccio A, Alvania RS, Lonze BE, et al. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* 2006 ; 21 : 283-94.

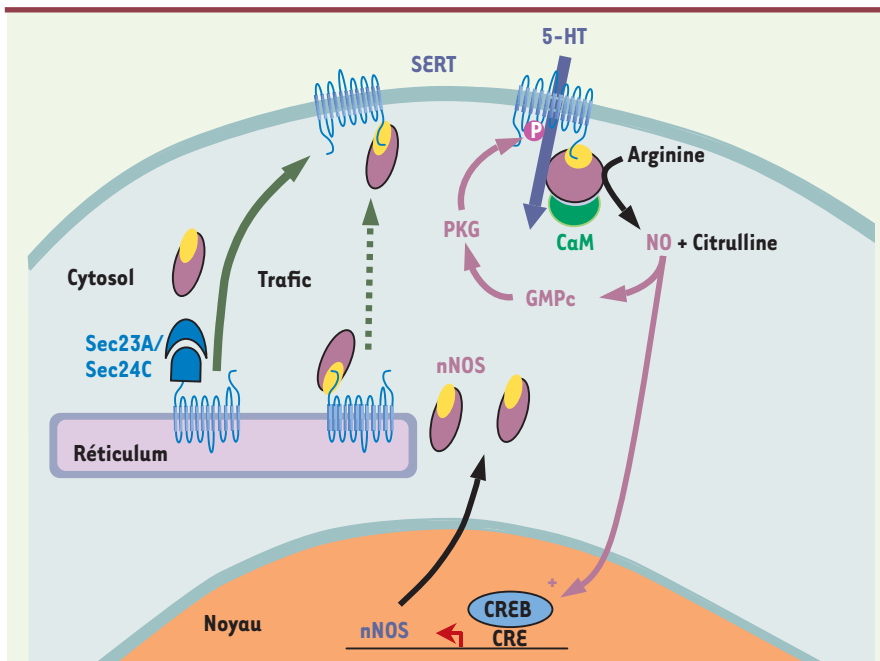


Figure 1. Interconnexions des systèmes nitridergiques et sérotoninergiques. L'interaction de la nNOS avec le domaine carboxy-terminal du SERT inhibe son transport vers la membrane plasmique, probablement en entrant en compétition avec les protéines du complexe d'export COPII (Sec24C/Sec23A), diminuant ainsi la recapture de sérotonine. Réciproquement, la recapture de sérotonine active la nNOS associée au SERT par un mécanisme dépendant de la Calmoduline (CaM). Le NO produit augmente dans un premier temps la recapture de sérotonine via la cascade GMPc/PKG et la phosphorylation du SERT sur un résidu thréonine. Le NO active également le facteur de transcription CREB, provoquant une augmentation de l'expression de la nNOS. L'interaction de la nNOS nouvellement synthétisée avec le SERT inhibe dans un second temps la recapture de sérotonine.