



HAL
open science

La phosphorylation du récepteur mGlu du glutamate : mécanisme clé de son cross talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT2A de la sérotonine

Samy Murat

► **To cite this version:**

Samy Murat. La phosphorylation du récepteur mGlu du glutamate : mécanisme clé de son cross talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT2A de la sérotonine. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT002 . tel-01762633

HAL Id: tel-01762633

<https://theses.hal.science/tel-01762633>

Submitted on 10 Apr 2018

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

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

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 phosphorylation du récepteur mGlu₂ du glutamate : mécanisme clé de son cross talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine

Présentée par Samy MURAT

Le 20 mars 2018

Sous la direction de Philippe MARIN
et Franck VANDERMOERE

Devant le jury composé de

Christophe HIRTZ, professeur, Institut de Médecine Régénérative et Biothérapies, Montpellier

Hervé DANIEL, professeur, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Paris

Denis HERVE, directeur de recherche, Institut du Fer à Moulin, Paris

Justine MASSON, chargée de recherche, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris

Philippe MARIN, directeur de recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Franck VANDERMOERE, chargé de recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

J'aimerais remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse de presque 4 ans au sein de l'Institut de Génomique Fonctionnelle.

Tout d'abord, je voudrais adresser mes remerciements les plus sincères à mes directeurs de thèse, Philippe Marin et Franck Vandermoere. Philippe, merci beaucoup pour votre confiance depuis toutes ces années, votre patience, votre disponibilité quotidienne, vos conseils et tout le temps précieux que vous m'avez consacré afin que cette thèse se déroule dans de bonnes conditions. Franck, je ne sais pas par où commencer... Je tenais réellement à vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre disponibilité, votre encadrement depuis toutes ces années et pour tout ce que vous m'avez appris. Je vous remercie pour votre implication, pour avoir su répondre à toutes mes interrogations et encouragé toutes ces années. Cela a été un réel plaisir de pouvoir travailler avec vous dans une bonne humeur quotidienne. Je vous souhaite à tous les deux une bonne continuation et plein de beaux projets pour la suite.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres de l'équipe qui m'a chaleureusement accueilli durant cette thèse. Merci beaucoup à vous Carine, Séverine et Sylvie pour votre bonne humeur et merci particulièrement à Sylvie pour tous tes conseils en biologie moléculaire et toutes ces conversations que nous avons eu. Merci beaucoup aussi à vous Joël pour tout ce que vous m'avez apporté durant la thèse, pour tous vos conseils et toutes ces conversations fortement enrichissantes qui ont aussi contribué au bon déroulement de cette thèse. Merci aussi à toi Eric pour ta bonne humeur constante et toutes ces conversations que nous avons eu, cela a été un réel plaisir.

Je tenais aussi à remercier tous les membres de la plateforme de protéomique de l'IGF que j'ai côtoyé durant la thèse Serge, Martial, Oana, Clément et Edith. Je vous souhaite à vous toutes et tous ainsi qu'aux nouveaux membres de la plateforme, Mathilde et Khadija, une bonne continuation et plein de beaux projets. Egalement, je voudrais remercier la plateforme de pharmacologie (Laurent, Damien, Claire et Isabelle) pour toute leur aide dans les expériences de FRET et de BRET et leurs disponibilités. Je vous souhaite une bonne continuation et plein de réussite dans vos projets. Je tenais aussi à remercier la plateforme animalerie iExplore (Karim, Denis, Quentin, Elodie et tout le personnel

de la plateforme) pour le bon déroulement des expériences, votre bonne humeur et votre patience. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite et une bonne continuation. Je tenais également aussi à remercier l'ensemble des services communs de l'IGF qui ont permis que cette thèse se déroule dans de bonnes conditions : - le service informatique (les Eric) ; - le service technique (Akli, Robert, Emmanuel et Bernard) ; - le service communication (Muriel, merci beaucoup pour toute ton aide, ta bonne humeur et ta disponibilité. Merci beaucoup pour nous avoir aidé à organiser tous ces événements SPIN et autres !) ; - le service laverie (Karen, Céline et Lionel), - le magasin (Sylvain) et l'ensemble des membres du service administratif pour toute leur aide (Anne, Victor, Carmen et Aurore). Je tenais aussi à remercier l'école doctorale CBS2 en particulier Michel Désarménien et aussi Sandrine Urvoy pour avoir su répondre à mes doutes et interrogations.

Je voudrais aussi remercier l'équipe d'Emmanuel Bourinet (Sophie, Antoine, Miriam, Pierre-François, les deux Pierre, Francina et Emmanuel) pour toute leur aide et leur bonne humeur quotidienne. Merci à vous Emmanuel et Pierre pour m'avoir fait découvrir le monde de l'électrophysiologie, j'ai été ravi de cette expérience et vous souhaite plein de réussite dans vos futurs projets !

Je tenais aussi à remercier l'équipe de Jean-Philippe Pin et Laurent Prézeau et particulièrement Philippe Rondard pour toutes ces conversations enrichissantes. Merci à toi aussi Julie pour ta bonne humeur et pour m'avoir fait confiance lors de mon intégration dans le comité jeunes chercheurs du GDR sur les RCPGs. Merci à vous aussi Mélanie, Ludovic, Michaël, Matthieu et Flavien pour votre bonne humeur, je vous souhaite plein de réussite dans vos projets ! Merci aussi à toutes les autres personnes de l'IGF Nord que j'ai pu côtoyer lors de mes allers-retours pour les expériences de FRET et de BRET entre autre ! Merci à vous Joyce, Thierry, Rémy, Pascal, Mathieu, Fanny, Cédric, Christiane, Bernard et Sébastien et toutes les autres personnes que j'ai croiser pour votre bonne humeur quotidienne et enthousiasme ! Merci beaucoup à vous aussi Freddy et Marga pour votre bonne humeur et vos conseils, je vous souhaite plein de succès dans vos futurs projets ! Je tiens à vous remercier vous aussi l'équipe des cancéro ! Merci beaucoup à vous Chris, Manue, François, Julie, Laure, Marco et Pierre pour votre bonne humeur quotidienne lors de mes passages dans les couloirs de l'IGF Nord ! Je vous souhaite à toutes et tous une bonne continuation et plein de belles choses pour la suite !

Je voudrais également remercier l'ensemble de mes collègues et amis thésards et post-docs qui ont été là au quotidien durant cette thèse. Merci à vous Amos, Hugo, Emilie et Simon et bien sûr Camille pour votre bonne humeur quotidienne, toutes ces conversations fortement stimulantes et tout ce que vous m'avez apporté durant cette thèse. Emilie, je te souhaite bien évidemment plein de belles choses pour la suite et surtout plein de beaux moments et de bonheur avec ta famille agrandie et ton futur petit ! Amos, merci encore pour tout et ta bonne humeur quotidienne, je te souhaite plein de belles choses pour la suite, une bonne fin de thèse qui je suis sûr sera grandiose et bon courage pour la suite ! Merci à vous aussi Hugo et Simon pour votre bonne humeur quotidienne, je vous souhaite à tous les deux plein de réussite et de bonnes choses tant sur le plan professionnel que personnel (et bon courage à toi aussi Hugo pour la suite et fin de la thèse !!). Camille, merci, merci et encore merci pour tout ce que tu as fait et continues à faire pour moi, il va falloir que tu continues un peu plus la lecture pour avoir les détails qui expliquent pourquoi sans toi rien de tout cela n'aurait été possible ! Ensuite, je voudrai remercier les anciens membres de l'équipe que j'ai pu croiser au cours de cette thèse. Merci à vous Fanny et Coralie pour tout ce que vous m'avez apporté, cela a été un réel plaisir de pouvoir une partie de votre thèse avec vous. Je vous souhaite plein de réussite dans vos futurs projets. Merci à toi aussi Elisabeth pour tout ce que tu m'as apporté, pour tous tes précieux conseils et pour avoir su partager ton expérience au quotidien, je te souhaite encore une fois une belle retraite. Merci à vous aussi Patrizia et Pascal pour tout ce que vous m'avez apporté, toutes nos conversations et conseils forts précieux. Merci à toi aussi Mahdy pour tout, pour toutes nos conversations, ta joie de vivre et bonne humeur quotidienne. Merci beaucoup à toi aussi Léonie pour ta bonne humeur et tous ces bons moments passés ensemble, je te souhaite tout le meilleur pour la suite de tes aventures ! Merci aussi à toute l'équipe de Nicola pour votre bonne humeur, je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite !

Je tenais aussi à remercier et à souhaiter bon courage aux nouveaux arrivants thésards Angéline, Caroline, Lucile, Vincent, Anne-Laure et Bérénice ! Je vous remercie beaucoup pour votre bonne humeur et tous ces moments qu'on a pu commencer à partager ensemble. Je vous souhaite bon courage, une bonne thèse, de belles manip et plein de bonnes choses pour la suite!

Egalement, je voudrais remercier tous les autres thésards et amis avec qui j'ai partagé mon quotidien durant la thèse et même avant en master, licence et même encore avant pour certains ! Merci beaucoup à toi Benoit pour tout ce que tu m'as apporté depuis notre rencontre en première année de médecine,

pour ta bonne humeur quotidienne et pour toutes ces conversations que nous avons eu à refaire parfois le monde ! J'ai été ravi de pouvoir aussi partager avec toi cette aventure avec l'association CBS2 et j'espère qu'on aura l'occasion d'en partager plein d'autres. Je te souhaite bien sur tout le meilleur pour la suite et bon courage pour ta future soutenance !! Merci à toi aussi Amélie pour toutes ces conversations et ta bonne humeur quotidienne. J'ai été vraiment content aussi de vivre cette aventure avec l'association CBS2 et aussi de pouvoir faire mes années de licence et master avec toi. Je te souhaite bon courage pour la fin aussi, la soutenance et plein de belles choses pour la suite !!

Merci aussi à tout le deuxième étage, l'équipe de Julie Perroy : Elise, Jennifer, Nathalie, Jeanne, Enora, Yann, Fédé, Sophie, Julie, Laurent et l'équipe d'Emmanuel Valjent : Manu, Pauline, Laura, Laïa et aussi Emma pour votre bonne humeur au quotidien, tous vos conseils et toutes ces conversations que nous avons eu ! Je vous remercie d'avoir fait que cette thèse se soit déroulée dans une bonne atmosphère. La culture va beaucoup me manquer Nathalie surtout le balai ! Merci aussi à vous l'équipe de Fabrice Ango : Fabrice, Céline et Raph, merci beaucoup pour m'avoir accueilli dans le labo pour la rédaction de la thèse et pour votre bonne humeur ! Merci aussi à Malik, les deux Pierre, Alex, Matthias et tout le premier étage pour m'avoir accueilli au sein du groupe des patcheurs ! J'en profite aussi pour te remercier Isabelle pour ta bonne humeur quotidienne, ta disponibilité et gentillesse. Merci à toi aussi David pour toutes ces conversations et ta bonne humeur quotidienne lors de mes passages dans le bureau du rez-de-chaussée, je te souhaite plein de belles choses pour la suite. Merci aussi à toi Edith pour tout, pour ta gentillesse et ta bonne humeur et je te souhaite aussi plein de belles choses pour la suite ! Je vous souhaite à toutes et tous beaucoup de succès pour la suite et plein de super projets !

Je tenais aussi à remercier toute la bande de l'asso CBS2 avec qui j'ai pu partager de supers moments. Merci à vous Camille, Matthias, Jennifer, Alex, Laëti, Laura, Vuthy et tous les autres membres de l'asso ! Je n'oublierai jamais tous ces beaux moments passés ensemble et vous souhaite plein de succès pour vos futurs projets.

Je tenais également à remercier Pédro et Geoffrey pour tout. Cela a été un réel plaisir de pouvoir partager tous ces moments avec vous et merci énormément pour tous vos conseils. Geoffrey, j'espère qu'on continuera nos soirées vieux films à refaire le monde devant une grosse pizza (avec peut être

l'ambition de se mettre plus au sport !!). Je vous souhaite bien sûr à tous les deux plein de réussite dans vos projets en médecine mais également dans votre vie personnelle.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble du laboratoire MMDN de la faculté des sciences de Montpellier pour tout ce que vous m'avez apporté durant mon stage de master 2 ! Merci beaucoup à vous Jean-Michel de m'avoir accueilli dans le laboratoire pendant presque 1 an ! Merci à vous Chantal, Nicolas, Michelle, Françoise, Anne, Sylvaine et les deux Mireille pour tous vos conseils et pour m'avoir fait découvrir le monde des poissons-zèbres ! Merci particulièrement à vous deux Sylvaine et Mireille pour votre encadrement, vos encouragements et toutes ces conversations enrichissantes durant le master et même durant la thèse ! Je vous souhaite à toutes et tous une bonne continuation et de beaux projets zébrés !

Je tenais aussi à remercier l'ensemble du comité jeune chercheur du GDR3545 sur les RCPGs pour m'avoir permis de vivre cette belle expérience ! Merci beaucoup à vous Ralf, Véronique, Sandra, Xavier, Julie et Lucie pour tous ces échanges scientifiques fortement enrichissants ! Je vous souhaite de beaux congrès, plein de workshops et de conférences remplis de RCPGs !

Je voudrais aussi remercier Laila et Claudine de la faculté des sciences de Montpellier pour m'avoir donné la chance de faire du monitorat durant la thèse. Cette expérience a vraiment été fortement enrichissante pour moi et je tenais sincèrement à vous remercier pour votre disponibilité, votre confiance et votre bonne humeur.

Je voudrai aussi remercier les deux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer avec Franck durant cette thèse ! Merci beaucoup à vous Jonathan et Mathilde pour votre investissement durant vos stages et votre bonne humeur quotidienne. Jonathan, merci encore pour tout et je te souhaite plein de belles choses tant sur la plan personnel que professionnel et un belle aventure australienne ! Mathilde, merci encore pour tout ce que tu as fait et ton investissement, j'ai été ravi de pouvoir travailler avec toi et te souhaite bon courage pour la suite en thèse et tes études de médecine !

Bien sûr je tiens à remercier et faire une spéciale dédicace à toi Camille, ma binôme thésarde et amie ! Je ne te remercierai jamais assez pour ta bonne humeur quotidienne, tes encouragements, ta bienveillance et tes conseils. Surtout, je tiens à te remercier pour m'avoir supporté, depuis ces presque 4 ans de thèse, avec toutes mes expressions sorties de l'âge de pierre, mes « bloppements » quotidiens

et d'avoir su freiner mes envies de milka daim et autres chocolats quand cela était nécessaire. J'ai pu faire beaucoup de progrès grâce à toi ! Courage pour cette fin de thèse qui, je suis sûr, sera superbe et à l'image de tes grandes qualités tant intellectuelles que personnelles ! Ne t'inquiète pas, on fêtera bien tout cela comme il se doit, moi, la mazette et les blops sommes tous avec toi ! Même si on n'a pas fini de se voir et que j'aurais largement l'occasion de te le redire, je te souhaite plein de belles choses pour la suite de tes projets et plein de petits bonheurs quotidiens !

Je tiens aussi à remercier tous mes amis et proches pour leurs encouragements quotidiens. Bien sûr, ma meilleure amie de toujours, Fanny ! Il est évident que je te dois une spéciale dédicace car, comme tu le sais, jamais je n'aurai pu arriver jusque-là si tu n'avais pas été là ! Depuis presque plus de 20 ans qu'on se connaît (ça fait drôle de dire ça... :p), tu as toujours été là dans les bons comme les mauvais moments. Je ne sais pas comment te remercier pour tout ce que tu m'as apporté, pour tout ce que tu continues et continueras sûrement de m'apporter pour les années futures. Merci aussi d'avoir été ma binôme des pauses midi durant cette thèse ! Ne t'inquiète pas, on continuera ces pauses même après la thèse en changeant peut être un peu nos habitudes alimentaires (ou pas on verra.. :p) ! De toute façon, je suis sûr qu'on aura encore plein d'autres aventures à vivre ensemble puis du moment que tu es là et qu'il y a du chocolat pas très loin, tout se passera bien j'en suis sûr !

Je souhaiterais aussi remercier particulièrement mon meilleur ami de toujours Simon. Merci d'avoir été là depuis toutes ces années ! Merci pour ton soutien durant cette thèse et toutes nos interminables conversations à refaire le monde ! Tu fais partis de ces personnes qui ont grandement influencé mes choix et fait qu'aujourd'hui j'en suis arrivé là et pour cela je ne te remercierai jamais assez ! Je suis sûr qu'on aura encore plein d'autres aventures à vivre ensemble et plein de restos encore à tester !

Je voudrais aussi remercier mes amis et anciens partenaires de première année de médecine Chen, Michel, Marine et Cyrielle ! Merci beaucoup à vous toutes et tous pour vos encouragements et votre bonne humeur ! Que de chemin parcouru depuis ce temps où on était encore sur les bancs de ce bon vieil amphi Giraud ! Je me rappelle encore Cyrielle de notre premier jour à la prépa jusqu'à la fin de cette première année, que de moments vécus depuis ce temps-là ! Je suis toujours aussi content de pouvoir continuer à vous voir quand on en a l'occasion, le samouraï est toujours vivant ! :p

Je tenais aussi à faire une spéciale dédicace et à remercier l'ensemble des membres de la clinique de rééducation du Castelet chez qui j'ai travaillé plusieurs années avant de commencer cette thèse. Merci

beaucoup à vous Madame DiFazio, Sophie, Maguelonne, Martine et Odile pour tout ce que vous m'avez apporté. Je souhaiterais également avoir une pensée particulière pour le Docteur DiFazio, un homme qui m'a beaucoup apporté tant sur le plan personnel que professionnel. Je tenais à vous remercier toutes et tous pour la confiance que vous m'avez témoignée durant toutes ces années et vos encouragements pour la suite.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble de ma famille maternelle et paternelle. Je souhaiterais également avoir une pensée particulière pour mon grand-père, Pierre, et ma grand-mère, Salamia, deux personnes qui ont énormément compté pour moi et qui m'ont tant apporté. Je voudrais aussi remercier grandement ma grand-mère maternelle, Lucie, pour son écoute, son soutien et tous ces bons moments, tu es une personne extraordinaire qui a fait que j'ai pu en arriver là aujourd'hui.

Enfin, je souhaiterais finir ces remerciements par dire un grand merci aux personnes qui comptent le plus pour moi et qui ont toujours su être présent dans les bons comme dans les mauvais moments, mes parents et ma sœur Laura. Sans vous rien de tout cela n'aurait été possible et je n'aurais certainement jamais pu en arriver jusque-là. Merci pour votre soutien quotidien depuis le début, votre confiance et pour vos encouragements pour la suite !

Résumé

Les récepteurs 5-HT_{2A} de la sérotonine et mGlu₂ du glutamate suscitent un grand intérêt vu la dérégulation des deux récepteurs observée dans la schizophrénie et leur statut de cibles des antipsychotiques dits atypiques et de nouvelle génération, respectivement. Même si les antipsychotiques atypiques ciblant le récepteur 5-HT_{2A} ont montré une efficacité contre les symptômes positifs, leur effet reste très limité contre les symptômes négatifs et cognitifs, et leurs effets secondaires nombreux. Depuis les années 1990, une nouvelle classe d'antipsychotiques ciblant le système glutamatergique, en particulier le récepteur mGlu₂, est en développement. Les tests cliniques n'ont montré leur efficacité que pour les patients n'ayant pas été traités auparavant par des antipsychotiques atypiques. Ceci suggère une interaction fonctionnelle forte entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ dans le mode d'action de ces deux classes d'antipsychotiques. De plus, plusieurs études ont démontré l'existence d'un hétéromère des deux récepteurs dans le cortex préfrontal qui semble important pour la réponse aux hallucinogènes et aux antipsychotiques ciblant l'un ou l'autre récepteur. Ainsi, étant donné l'impact du profil de phosphorylation adopté par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sur leur fonction, j'ai caractérisé au cours de ma thèse l'impact de la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} sur le profil de phosphorylation du récepteur mGlu₂ en réponse à différentes stimulations. Parmi les 5 sites de phosphorylation identifiés, la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ est potentialisée en réponse à la stimulation par un agoniste du récepteur mGlu₂ uniquement lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé. Ces résultats ont été validés grâce à la génération d'un nouvel anticorps dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de la Ser⁸⁴³ sur culture cellulaire HEK-293 et *in vivo* dans le cortex préfrontal de souris, région où les deux récepteurs sont co-exprimés. Des études fonctionnelles ont démontré que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ est nécessaire à la potentialisation de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ en réponse à ses agonistes et constitue un cross-talk fonctionnel entre les deux récepteurs puisque les agonistes du récepteur 5-HT_{2A} stimulent également la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂. Ainsi, mes résultats de thèse ont permis d'identifier la phosphorylation du récepteur mGlu₂ sur la Ser⁸⁴³ comme un événement moléculaire clé du cross-talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT_{2A} et apporte un élément important dans la compréhension du mode d'action des antipsychotiques atypiques et de nouvelle génération.

Abstract

The serotonin 5-HT_{2A} and glutamate mGlu₂ receptors keep on attracting particular attention given their implication in psychosis associated with schizophrenia and in the mechanism of action of atypical antipsychotics and of a new class of antipsychotics, respectively. Though atypical antipsychotics, targeting 5-HT_{2A} receptor, are efficient against positive symptoms, these drugs do not act against negative, cognitive symptoms and display many side effects. Since the 90's, new classes of antipsychotics triggering glutamatergic system, in particular mGlu₂ receptor, have been developed. Their clinical trials have shown efficacy only in patients who have not been previously treated with atypical antipsychotics. This suggests a strong interaction between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors in the mechanism of action of both classes of antipsychotics. Moreover, a large body of evidence indicates the presence, in prefrontal cortex, of 5-HT_{2A}/mGlu₂ heteromer that is important for the response to hallucinogens and antipsychotics targeting one receptor or the other. Thus, in view of the importance of the phosphorylation profile adopted by G-protein coupled receptor (GPCR) on their activity, I characterized the impact of 5-HT_{2A} receptor co-expression on the phosphorylation profile of mGlu₂ receptor in response to various stimulations. Among the five identified phosphorylated residues, the phosphorylation of Ser⁸⁴³ increases upon mGlu₂ receptor stimulation only when the 5-HT_{2A} receptor is co-expressed. A new antibody against the phosphorylated form of Ser⁸⁴³ confirmed these results in HEK-293 cells and in mouse prefrontal cortex, area where both receptors are co-expressed. Functional studies demonstrated that Ser⁸⁴³ phosphorylation is necessary to enhance G_{i/o} signaling of mGlu₂ receptor and constitutes a functional crosstalk between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptor since 5-HT_{2A} receptor agonists also stimulate Ser⁸⁴³ phosphorylation. Collectively, my thesis findings identify mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ as a key molecular event of the functional crosstalk with 5-HT_{2A} receptor that might be critical to understand the mechanism of action of atypical and potential future antipsychotics treatments.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	8
Abstract	9
Table des matières	10
Table des illustrations	14
Principales Abréviations	16
Introduction	22
I/ La schizophrénie	22
1/ Définition et symptomatologies	22
a/ Définition.....	22
b/ Symptomatologies.....	22
2/ Etiologie	24
a/ L'hypothèse génétique.....	24
b/ L'hypothèse neurodéveloppementale.....	27
c/ L'hypothèse neurochimique	30
3/ Les traitements symptomatiques	33
a/ Les antipsychotiques typiques ciblant le système dopaminergique	34
b/ Les antipsychotiques atypiques ciblant le système sérotoninergique	34
c/ Vers des antipsychotiques de nouvelle génération ciblant le système glutamatergique	36
II/ Les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ : deux cibles des antipsychotiques étroitement liées	41

1/ Localisation des récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂	41
a/ Le récepteur 5-HT _{2A}	41
b/ Le récepteur mGlu ₂	42
c/ Lien entre les récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂	42
2/ Interaction physique des récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂	44
3/ Cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂	44
a/ La signalisation biaisée du récepteur 5-HT _{2A}	44
b/ Lien fonctionnel entre les récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂	46
III/ Phosphorylation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).....	50
1/ Désensibilisation	50
2/ Signalisation et phosphorylation	53
3/ Sélectivité fonctionnelle et phosphorylation	53
4/ Hétérocomplexe et phosphorylation.....	54
Objectifs.....	55
Résultats	56
I/ La phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂, dépendante du récepteur 5-HT_{2A}, peut moduler son activité G_{i/o}	56
1/ Article.....	56
2/ Résumé des principaux résultats	57
a/ Caractérisation du profil de phosphorylation du récepteur mGlu ₂ par spectrométrie de masse. 57	
b/ Génération et validation d'un nouvel anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂	59
c/ Validation orthogonale des résultats de spectrométrie de masse	61

d/ Validation <i>in vivo</i> de la potentialisation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ par la co-expression du récepteur 5-HT _{2A}	62
e/ La kinase Casein Kinase 1 (CK1) et la protéine G _{i/o} : deux acteurs cellulaires participant à la potentialisation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³	62
f/ Implication de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ dans l'activité G _{i/o}	63
g/ La phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ est aussi induite par la stimulation du récepteur 5-HT _{2A}	65
h/ La potentialisation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ dépend de l'activité des deux récepteurs	67

II/ Résultats complémentaires..... 70

1/ Etude de la modulation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ dans un modèle préclinique murin reproduisant certains symptômes de la schizophrénie	70
2/ Effet d'un modulateur allostérique positif du récepteur mGlu ₂ sur la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³	72

Discussion et perspectives 74

I/ Lien fonctionnel fort entre les récepteur 5-HT_{2A} et mGlu₂ 74

II/ La phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ : un événement clé dans son cross-talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT_{2A} 75

III/ Perspectives : de la phosphorylation à la compréhension du mécanisme d'action des antipsychotiques sur le complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂..... 80

1/ Perspectives sur les profils de phosphorylation des récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂	80
2/ Perspectives sur l'utilisation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ dans la recherche sur la schizophrénie et la mise au point de nouveaux antipsychotiques	81
a/ Vers une régulation différentielle de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ dans un contexte pathologique	81

b/ Vers l'utilisation de l'anticorps spécifique de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ comme un marqueur d'activité des antipsychotiques	84
Méthodologie.....	85
I/ Analyse de la phosphorylation par spectrométrie de masse.....	85
II/ Mesure de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ par Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) : la sonde CAMYEL.....	90
III/ Mesure de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ par électrophysiologie des canaux calciques de type N	91
Bibliographie.....	92
Annexe	111

Table des illustrations

Figure 1 Exemples de gènes impliqués dans la physiopathologie de la schizophrénie	25
Figure 2 L'hypothèse génétique/épigénétique de la schizophrénie.....	27
Figure 3 L'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie	29
Figure 4 L'hypothèse neurochimique de la schizophrénie.....	33
Figure 5 Les antipsychotiques comme traitements symptomatiques de la schizophrénie	40
Figure 6 Autoradiographies par liaison du ³ H-LY354740 (agoniste des récepteurs mGlu _{2/3}) et du ³ H-DOI (agoniste des récepteurs 5-HT _{2A}) réalisées sur le cortex préfrontal de rat (adapté de Marek GJ. et al., The J. of Pharm., 2000)	43
Figure 7 Voie de signalisation biaisée du récepteur 5-HT _{2A}	46
Figure 8 Modèle de la balance d'activation des protéines G _{i/o} /G _q par les antipsychotiques ciblant le complexe 5-HT _{2A} /mGlu ₂ proposé par Fribourg M. <i>et al.</i> , <i>Cell</i> , 2011.....	48
Figure 9 Le rôle clé de la phosphorylation du RCPG dans le processus de désensibilisation	52
Figure 10 Localisation des sites de phosphorylation sur le récepteur hmGlu ₂	57
Figure 11 ELISA montrant la bonne spécificité de l'anticorps anti-phospho-Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ (Source : Eurogentec®).....	60
Figure 12 Effet dose de LY379268 sur la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ en présence ou non du récepteur 5-HT _{2A}	61
Figure 13 La potentialisation de l'activité G _{i/o} du récepteur mGlu ₂ en présence du récepteur 5-HT _{2A} est dépendante de la phosphorylation sur la Ser ⁸⁴³	64
Figure 14 Effet dose de 5-HT sur la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂	66
Figure 15 Modulation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur en fonction du mode d'activation des 2 récepteurs 5-HT _{2A} et mGlu ₂ et impact sur la signalisation G _{i/o}	69
Figure 16 Courbes de locomotion réalisées pendant 90 min chez des souris Wild-type traitées ou non avec le PCP (3 mg/kg). <i>Première tendance sur l'impact de l'injection de PCP sur la locomotion sur deux animaux d'où l'absence de barre d'erreurs, ces résultats ont besoin d'être confirmé</i>	71
Figure 17 Modulation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ , en présence ou non du LY379268, chez des souris traitées en ou non avec le PCP.....	72

Figure 18 Effet du LY487379 sur la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ en présence ou non du récepteur 5-HT _{2A}	73
Figure 19 Régulation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ et impact sur la signalisation G _{i/o}	79
Figure 20 Perspectives d'études de la régulation de la phosphorylation de la Ser ⁸⁴³ du récepteur mGlu ₂ en réponse à différents types d'antipsychotiques	83
Figure 21 La stratégie « bottom-up » suivie d'une quantification sans marquage « Label-free »	85
Figure 22 Fragmentation peptidique par CID (génération d'ions b et y) ou ETD (génération d'ions c et z). L'ETThCD permet la génération des 4 types d'ions.	87
Figure 23 Principe de l' « appel d'ion » ou « extracted ion chromatogram » (XIC)	89
Figure 24 Principe du BRET pour la mesure indirecte de la concentration d'AMPc suite à la stimulation d'un RCPG couplé à G _{i/o}	90
Figure 25 Principe électrophysiologique de l'inhibition du canal calcique de type N suite à la stimulation d'un RCPG couplé à G _{i/o}	91

Principales Abréviations

0-9

5-HT _{2A/1/3/6/}	Récepteur de la sérotonine de type 1/2A/3/6
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HIAA	Acide 5-hydroxyindolacétique
5-HT2A-/-	Souris n'exprimant pas le récepteur 5-HT _{2A}

A

AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
ADN	Acide désoxiribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ACT	Thérapie de l'acceptation et de l'engagement
ALA	Alanine
ASP	Aspartate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate

B

BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BINA	Biphenyl-indanone A

BRET Bioluminescence resonance energy transfer
BI Balance Index

C

COMT Catechol-O-methyltransferase
CK1 Casein kinase 1
CAMYEL cAMP sensor using YFP-Epac-RLuc
CID Collision induced dissociation

D

D4476 4-[4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-5-(2-pyridinyl)-
1*H*-imidazol-2-yl]benzamide
DAOA Gène activateur de la D-amino acid oxidase
DRD1/2/4 Gènes codant pour les récepteurs de la dopamine D1/2/4
DARPP32 Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (32kDa)
DISC1 Gène “Disrupted in Schizophrenia-1”
DTNBP1 Gène codant pour la Dysbindine
DNMTs DNA methyltransferases
DOI (±)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride
D1/2/3/4 Récepteurs de la dopamine de type 1/2/3/4
DAG Diacylglycérol

E

EGR-1/2 Gène Early Growth Factor 1/2
ERK Extracellular signal-regulated kinases

ETDElectron capture dissociation

ETHCD ETD + HCD

EDG1 Endothelial differentiation gene 1

Erb4 Erb- β 2 receptor tyrosine kinase 4

F

FRET Fluorescence resonance energy transfert

FT1/2 Flow through 1/2

G

GPSGrouped-based Prediction System

GDP Guanosine 5'-diphosphate

GABA Acide γ -aminobutyrique

GlyT1 Transporteur de la glycine de type 1

GRK G-protein receptor kinase

GIRK1/2/4 G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel 1/2/4

H

HEK-293Human embryonic kidney-293

HPLC High pressure liquid chromatography

HCD High collision induced dissociation

I

IRK3 Inward receiver K⁺ channel Kir2.3
IP3Inositol triphosphate

J

JNK c-Jun N-terminal kinases

K

KT5720 (9*R*,10*S*,12*S*)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1*H*-diindolo[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]pyrrolo[3,4-*i*][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid, hexyl ester

L

LY379268 (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4-Amino-2-oxabicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid
LY354740 (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-Aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid
LY2140023 Pomaglumetad methionil
LY395756 (1*S*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-rel-2-Amino-4-methylbicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid
LY341495 (2*S*)-2-Amino-2-[(1*S*,2*S*)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl)propanoic acid
LY487379 2,2,2-Trifluoro-*N*-[4-(2-methoxyphenoxy)phenyl]-*N*-(3-pyridinylmethyl)ethanesulfonamide

LSD	N,N-diéthyllysergamide
LCR	Liquide céphalo-rachidien

M

m/z (Th)	masse sur charge (Thompson)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M1/2	Récepteur muscarinique de type 1/2
MU	Récepteur opiacé mu
mGlu _{1/2/3/4/5/7/8}	Récepteurs métabotropiques du glutamate de type 1/2/3/4/5/7/8
MDL-100907	(R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperinemethanol

N

NPF2	Récepteur 2 du neuropeptide FF
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NRG	Neureguline

P

PPSE	Potentiel post-synaptique excitateur	
PKAProtein	kinase	A
PKC	Protein kinase C	
PTX	Pertussis toxin	
PLCB	Phospholipase C- β	

PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PPP1R1B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B
PCP	Phencyclidine

R

RSK2	Ribosomal S6 kinase de type 2
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS4	Regulator of G-protein signaling 4

S

SLC6A3	Gène pour le transporteur de la dopamine
SNC	Système nerveux central
SER	Sérine
S1P1	Récepteur sphingosine 1-phosphate
SDS	Sodium dodecyl sulfate

T

TYR	Tyrosine
THR	Thréonine
TEP	Tomographie à émission de positons

X

XICs	Extracted ion chromatogram
------	----------------------------

Introduction

I/ La schizophrénie

1/ Définition et symptomatologies

a/ Définition

La schizophrénie est une maladie mentale chronique qui se caractérise par un ensemble de symptômes cliniques pendant une période significative pouvant aller de 1 à 6 mois selon le symptôme (1). C'est une pathologie complexe, touchant 1% de la population mondiale (dont 600 000 personnes en France), très hétérogène dans sa manifestation (1–3).

Elle se déclenche en général avant 25 ans durant l'adolescence. Le pronostic est variable mais se caractérise essentiellement par un isolement social de la personne (chômage, problème d'intégration dans la société), de la violence et une augmentation du taux de suicide de l'ordre de 10 % (2, 4, 5).

b/ Symptomatologies

Il existe une phase dite prodromique de la schizophrénie correspondant à la phase où des signes avant-coureurs apparaissent (1, 6). Cette période prodromique est difficile à identifier et ne permet généralement pas de poser le diagnostic de schizophrénie. Ces signes apparaissent généralement avant 25 ans lors de l'adolescence et se manifestent par un retrait social progressif, une sensibilité émotionnelle accentuée, des problèmes d'intégration au sein d'un groupe social, une réduction des performances scolaires ou professionnelles et un comportement d'opposition envers l'autorité parentale. Il peut arriver que lors de cette phase prodromique, la personne commence à se rapprocher de la drogue et de l'alcool. La difficulté de détection de cette phase réside dans le fait que les signes restent dans les limites de l'adolescence normale et même si une suspicion de l'entourage, du personnel scolaire et d'éventuels autres acteurs est possible, il est souvent très difficile de poser un diagnostic définitif (6, 7). Cependant, la phase prodromique peut présenter par la suite des signes plus spécifiques tels que de graves difficultés scolaires, une attirance plus prononcée pour la drogue ou l'alcool, un manque de motivation et une difficulté pour la personne à éprouver du plaisir (1, 6). Durant cette phase prodromique plus avancée, l'état d'anxiété peut progresser de manière importante, une

dépersonnalisation psychique et somatique peut apparaître et conduire à la manifestation de la maladie (1, 6). Même si de nombreux efforts sont faits pour tenter de détecter au plus tôt la phase prodromique, bien souvent elle est définie rétrospectivement et après apparition des symptômes de la schizophrénie (1, 3, 6).

Ainsi, la phase prodromique est suivie de la phase dite active au cours de laquelle les symptômes de la maladie se manifestent. Les symptômes de la schizophrénie peuvent être divisés en deux grandes catégories, **i) les symptômes positifs** et **ii) les symptômes négatifs**, auxquels s'ajoutent **iii) des troubles cognitifs** (1–3, 8).

i) Les symptômes positifs incluent, en termes de manifestation clinique, des hallucinations, des idées délirantes, des troubles de la pensée et/ou du comportement (1–3).

Les hallucinations peuvent être définies comme des perceptions de choses qui, en réalité, n'existent pas. Elles peuvent être de nature auditive, visuelle, olfactive et tactile.

Les idées délirantes correspondent à des certitudes absolues pour le sujet mais qui sont en réalité totalement fausses. Ce symptôme peut envahir totalement l'individu et susciter chez l'entourage une incompréhension et un désarroi important. Les idées délirantes peuvent être de plusieurs types (délire de persécution, mystique, de grandeur, de contrôle - sentiment d'être sous l'emprise d'une force extérieure - somatique - sentiment de subir une transformation corporelle).

Les troubles de la pensée et du comportement correspondent respectivement à la formulation de phrases incohérentes par l'individu et à l'accomplissement d'actions étranges qui peut se manifester par une agressivité envers des objets ou les personnes.

ii) Les symptômes négatifs font référence à une diminution voire une perte des fonctions normales se manifestant cliniquement par un émoussement affectif, un manque de motivation, une pauvreté du discours et un retrait social. Ces symptômes sont très difficiles à évaluer, peu spécifiques et sont souvent la conséquence d'autres facteurs tels que la dépression, des effets secondaires médicamenteux ou des symptômes positifs. Ainsi, il est difficile de poser le diagnostic de schizophrénie par l'observation de ces seuls symptômes.

L'émoussement affectif constitue un symptôme négatif très courant dans la schizophrénie et se manifeste par une immobilité faciale du sujet qui reste impassible avec peu de contacts oculaires, une perte d'expression émotive dans l'intonation de la voix et une réduction forte du langage corporel. On peut parler d'anesthésie affective.

Le manque de motivation se manifeste par une incapacité de l'individu à assumer ses responsabilités familiales, professionnelles ou scolaires. Il présente une incapacité à débiter et persévérer dans des activités et se désintéresse de ses activités professionnelles ou sociales.

La pauvreté du discours (ou alogie) correspond à des réponses verbales vides, évasives et brèves. Le délai de réponse à une question peut être important et l'individu peut s'interrompre subitement au cours d'une conversation.

Le retrait social se caractérise par un isolement et un repli sur soi de l'individu. La manifestation de ce symptôme peut se caractériser par exemple par des disputes et altercations avec la famille, les amis et l'entourage.

iii) Les troubles cognitifs qui peuvent être associés au diagnostic de la schizophrénie correspondent à l'apparition de troubles de la mémoire, de l'attention et des fonctions exécutives (2, 3, 8). Ils se caractérisent par des difficultés du sujet à se concentrer sur une tâche donnée. La mémoire à court terme peut être altérée, entraînant des problèmes pour la vie quotidienne de l'individu (oubli de se laver, de prendre ses médicaments). La prise de décision peut être fortement perturbée même pour des choses banales.

Les personnes atteintes de schizophrénie ne présentent pas en même temps tous les symptômes décrits ci-dessus. Chaque patient aura une manifestation d'un ou plusieurs de ces symptômes, d'où l'importance d'une prise en charge personnalisée qui va devoir adapter les traitements pharmacologiques et non pharmacologiques selon le patient et l'évolution de sa maladie.

2/ Etiologie

L'étiologie de la schizophrénie est très complexe (2, 3). En effet, plusieurs hypothèses existent mais aucune d'entre elles ne peut l'expliquer dans son ensemble. Diagnostiquer un patient schizophrène reste un exercice médical difficile pour les psychiatres du fait de la complexité de la pathologie et prend généralement beaucoup de temps. La manière dont peut apparaître la maladie est très variable d'un patient à l'autre et souvent le diagnostic est posé lorsque la maladie est déjà à un stade avancé.

a/ L'hypothèse génétique

La schizophrénie ne peut pas être définie comme une maladie à transmission génétique simple du fait de son caractère plurifactoriel mais également polygénique. On parle plus de vulnérabilité.

Les progrès dans la connaissance de la physiopathologie de la schizophrénie ont permis d'identifier plusieurs gènes candidats dérégulés et impliqués entre autre dans la neurotransmission dopaminergique et glutamatergique ou encore le neurodéveloppement et la plasticité neuronale (9–17) (Figure 1).

Symbole du gène	Nom du gène
<i>Récepteurs/Canaux/Transporteurs</i>	
DAOA	Activateur de la D-acide aminé oxidase
COMT	Catechol-O-methyltransferase
DRD1, DRD2, DRD4	Récepteurs de la dopamine de type 1, 2 et 4
Erb4	Récepteur de la neuréguline 1
Gria1/2/3/4	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA1/2/3/4
Grik2	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2
Grin1/2a/2b	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA1/2a/2b
SLC6A3	Transporteur de la dopamine
<i>Adaptateurs/Régulateurs post-synaptiques</i>	
Dlg1/2/3/4	Disks large homolog 1/2/3/4 ou Synapse-associated protein 97/93/95
Dlgap1	Disks large-associated protein 1 ou SAP90/PSD-95-associated protein 1
<i>Kinase</i>	
CamkII2b	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta
<i>Phosphatase</i>	
PPP1R1B / DARPP32	Sous-unité β -1 de la protéine phosphatase 1 / Dopamine and adenosine regulated phosphoprotein-32
<i>Autres enzymes</i>	
Acot7	Acyl-CoA thioesterase 7
<i>Autres régulateurs</i>	
DISC1	Disrupted In Schizophrenia 1
DTNBP1	Protéine liant la dystrobrevine 1
BDNF	Brain Derivated Neurotrophic Factor
NRG	Neuréguline
RGS4	Regulator of G-protein signalling 4

Figure 1 Exemples de gènes impliqués dans la physiopathologie de la schizophrénie

Ainsi, grâce aux progrès de la génétique et la réalisation de plusieurs méta-analyses, des régions chromosomiques potentiellement impliquées dans la schizophrénie ont pu être localisées sur les chromosomes 1 (dans de multiples régions des bras long p et court q), 2q, 3q, 4q, 8p, 10q, 13q, 17q, 19q, 20q et 22q, et environ 6000 polymorphismes mono-nucléotidiques ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) ont pu être décrits (9, 11, 18–20). Bien que de gros efforts aient été réalisés pour tenter d'identifier les gènes impliqués dans la schizophrénie, aucun n'est à l'heure actuelle connu comme étant à lui seul responsable de la pathologie (9, 11, 18, 19, 21).

En parallèle de ces différents facteurs génétiques, de nombreuses d'études ont mis en évidence des facteurs épigénétiques potentiellement impliqués dans la schizophrénie. Les modifications épigénétiques correspondent à des modifications du génome provoquées par des facteurs environnementaux. Dans la schizophrénie, ces facteurs environnementaux peuvent être liés à une infection par des virus ou des toxines, au cannabis, à un stress ou à un traumatisme émotionnel (maltraitance infantile, accidents...) (22). Les modifications épigénétiques les plus étudiées dans la schizophrénie sont les méthylations par les DNA methyl transférases (DNMTs) des résidus cytosines des dinucléotides CpG regroupés souvent dans des régions d'ADN du même nom, et la modification des histones. Ces modifications épigénétiques affectent l'activité transcriptionnelle des gènes associés et influent fortement l'expression et les propriétés des protéines qui en sont issues (20, 23).

Ainsi, les avancées sur les origines génétiques et épigénétiques de la schizophrénie ont permis de démontrer que la maladie est polygénique et sous le contrôle étroit de facteurs environnementaux pouvant engendrer des modifications épigénétiques. L'ensemble de ces facteurs peuvent être responsables des différents symptômes observés dans la schizophrénie (Figure 2).

Hypothèse génétique/épigénétique

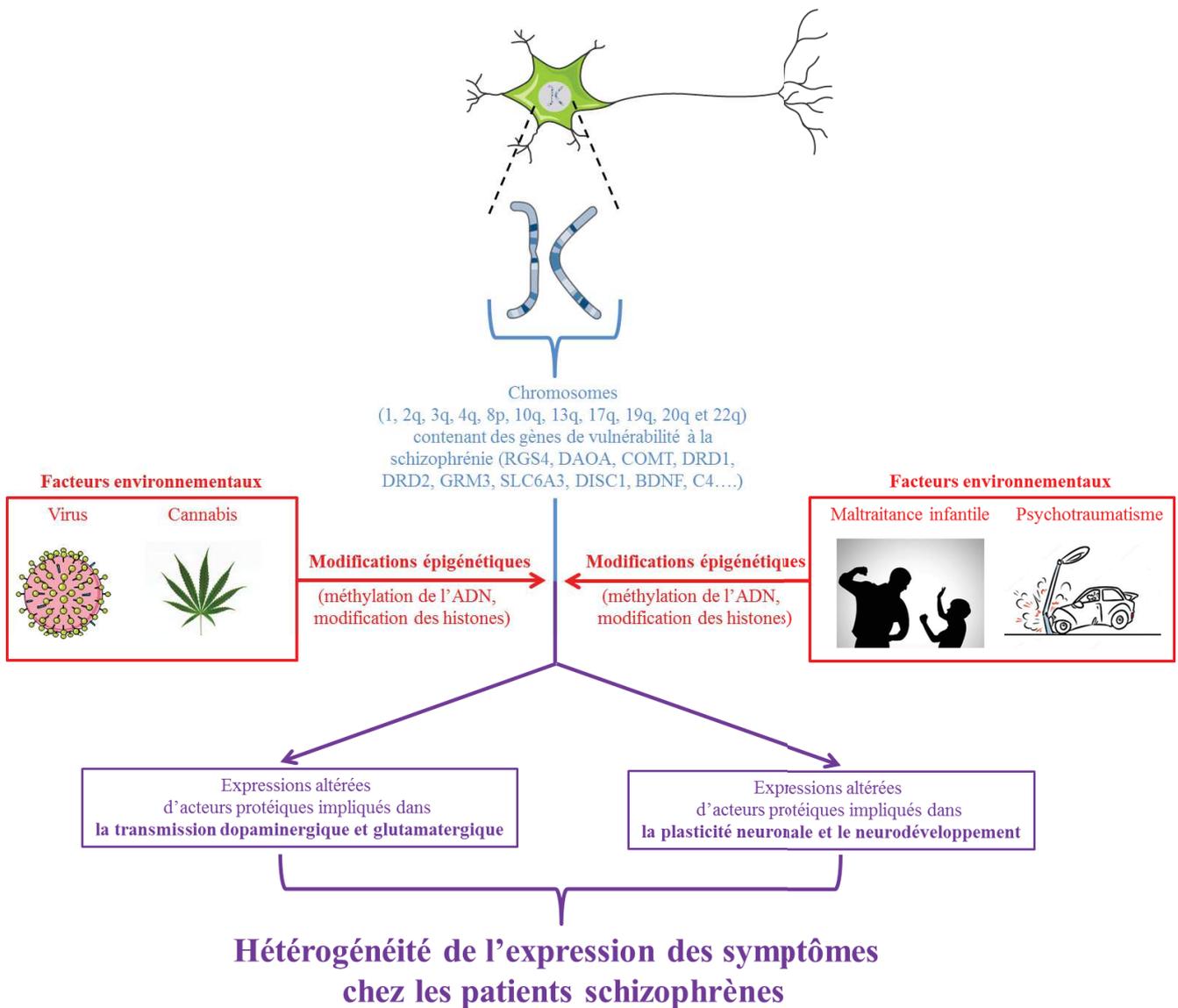


Figure 2 L'hypothèse génétique/épigénétique de la schizophrénie.

b/ L'hypothèse neurodéveloppementale

L'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie a été proposée pour la première fois par Weinberger, Murray et Lewis en 1985 qui soutiennent que la schizophrénie serait la conséquence

d'une anomalie du développement du système nerveux (24, 25). On peut décliner cette hypothèse neurodéveloppementale en 2 parties : l'hypothèse neurodéveloppementale *i)* précoce et *ii)* tardive.

i) *L'hypothèse neurodéveloppementale précoce* supposerait que la perturbation du développement cérébral se ferait durant la vie intra-utérine. Les causes de cette anomalie peuvent être multiples, et avoir des origines génétiques (9, 11, 18, 19) et/ou environnementales (infections virales *in-utéro*, complications durant la grossesse (20, 22, 23, 26)). Pour appuyer cette hypothèse neurodéveloppementale, des études précliniques ont été réalisées sur le jeune primate chez lequel des lésions du cortex préfrontal conduisent à une altération importante des fonctions cognitives à 15 mois (27). Chez le rat, l'administration d'antagonistes des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), comme la phéncyclidine (PCP), au cours de la période néonatale induit des altérations comportementales à l'âge adulte. Ces derniers reflètent certains symptômes positifs ou troubles cognitifs observés chez les patients, soutenant encore une fois l'hypothèse d'une origine neurodéveloppementale dans la schizophrénie (28).

ii) *L'hypothèse neurodéveloppementale tardive*, énoncée par Feinberg en 1983, propose que la schizophrénie pourrait être due à une altération de l'élimination des connexions synaptiques durant l'adolescence particulièrement au niveau du cortex préfrontal (29, 30).

L'élimination des connexions synaptiques reste un processus physiologique normal dans le développement cérébral de l'enfant qui commence dès l'âge de 2 ans d'abord dans les régions sensorielles puis plus tardivement dans les régions du cortex préfrontal. Ce processus d'élimination est sous le contrôle de facteurs biochimiques mais également environnementaux. Cependant, une perturbation de ce processus d'élimination synaptique peut être responsable de l'apparition de pathologies telle que la schizophrénie au cours de l'adolescence. En effet, cette hypothèse concernant une altération de la connectivité synaptique s'appuie sur les travaux de Glantz et Malmberger qui ont pu mesurer chez des sujets schizophrènes une diminution du nombre des épines dendritiques des cellules pyramidales du cortex préfrontal par rapport à des sujets contrôles (31, 32). Cette hypothèse neurodéveloppementale plus tardive peut aussi avoir pour origine des facteurs toxiques de l'environnement comme la consommation excessive de cannabis qui peut interagir avec des facteurs génétiques et conduire à la manifestation des symptômes de la schizophrénie (22).

Ainsi, l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie repose sur des dérégulations d'étapes clés dans le neurodéveloppement telles que la neurogénèse, la différenciation et la migration

neuronales, la myélinisation, la synaptogénèse et l'élimination synaptique ou élagage synaptique. Ces différentes étapes sont sous le contrôle de gènes, eux-mêmes dépendant de facteurs épigénétiques, tels que DISC1, ErbB4, NRG, RGS4, DAOA (11, 12, 15–17) (Figure 2, Figure 3).

Hypothèse neurodéveloppementale

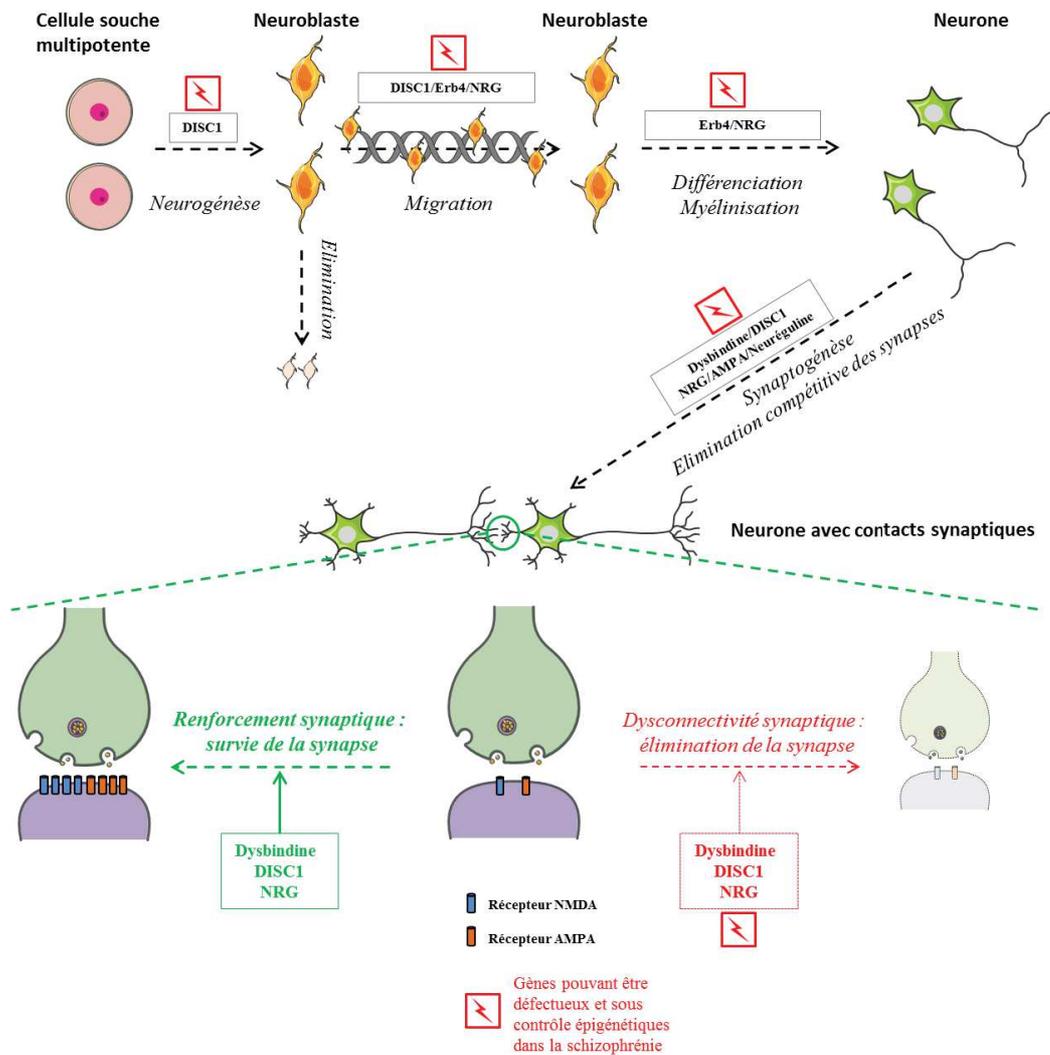


Figure 3 L'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie

c/ L'hypothèse neurochimique

L'hypothèse neurochimique met en avant le rôle central des systèmes de neurotransmission (dopaminergique, sérotoninergique et glutamatergique) dans l'apparition des symptômes de la schizophrénie et peut se décliner en 3 grandes parties.

i) L'hypothèse dopaminergique :

Cette hypothèse a émergé dans les années 1960 grâce à des observations indirectes du groupe de Carlsson (33, 34). En effet, les premiers neuroleptiques utilisés tels que la chlorpromazine ou l'halopéridol sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques et se sont révélés efficaces pour traiter les symptômes positifs de la schizophrénie. De plus, des études ont montré que la prise de drogues dopaminomimétiques (amphétamines) provoquait des symptômes psychotiques chez les sujets sains et les aggravait chez les sujets schizophrènes (35). Des expériences de liaison de radioligands ciblant les récepteurs D₂ de la dopamine, la tomographie à émission de positon (TEP) et l'utilisation [¹⁸F]-fluorodopa (précurseur de la dopamine témoin de l'activité dopaminergique présynaptique) ont démontré une hyperdopaminergie sous-corticale au niveau du réseau mésostriatal chez les patients schizophrènes (36, 37). Ces études ont permis de confirmer une augmentation de la libération de dopamine dans le striatum des patients schizophrènes comparés à des sujets sains.

Cependant, l'hypothèse dopaminergique selon laquelle les symptômes de la schizophrénie seraient uniquement dus à une hyperdopaminergie n'est pas suffisante pour expliquer l'entièreté des symptômes observés dans la pathologie (38, 39). En effet, des études d'imagerie ont montré que l'augmentation de libération de la dopamine dans le striatum de patients schizophrènes était corrélée avec l'intensité des symptômes positifs et non avec les symptômes négatifs (40). Ainsi, d'autres études précliniques et cliniques ont tenté de mieux décrypter cette hypothèse dopaminergique et ont montré qu'il pouvait coexister dans la schizophrénie une hypodopaminergie corticale, reflétant plus les symptômes négatifs et les troubles cognitifs, et une hyperdopaminergie striatale plus associée à l'émergence des symptômes positifs (41–43). Pour ne citer qu'un exemple, Meyer-Lindenberg A. *et al.* ont montré en 2002 que lors d'un test cognitif réalisé chez des patients schizophrènes sans traitement en cours, on pouvait observer à la fois une augmentation de l'activité dopaminergique associée à la voie mésostriatale et une hypoactivité du cortex frontal (43). Ainsi, les premières hypothèses de Carlsson dans les années 1980, selon lesquelles la schizophrénie serait due à une sensibilisation dopaminergique de la voie mésostriatale ont pu être complétées (34, 38). Ces différences peuvent

s'expliquer par une activité dopaminergique spécifique propre à chacune des 2 voies (mésostriatale et mésocorticale) mais également par une répartition inégale des récepteurs D₁ et D₂ post-synaptiques au niveau du striatum et du cortex (38, 43).

Enfin, on peut évoquer la dernière version de l'hypothèse dopaminergique proposée par Howes et Kapur en 2009 mettant en avant le rôle central de la présynapse au niveau du striatum (39). Cependant, tous les acteurs qui pourraient placer la présynapse des neurones du striatum au centre d'une perturbation de l'activité dopaminergique restent encore à déterminer (39, 44). Parmi les hypothèses formulées, on retrouve entre autre une dérégulation de l'expression des récepteurs D₂ présynaptiques (44).

ii) L'hypothèse sérotoninergique :

En parallèle des travaux sur l'implication du système dopaminergique dans la schizophrénie, d'autres se sont intéressés au rôle du système sérotoninergique. Dans les années 1960, les premières observations de Costa montrent une similarité de symptômes entre patients toxicomanes et schizophrènes, à savoir l'apparition d'hallucinations et de délires (45). En parallèle, les travaux de Woodley et Shaw ont aussi montré que le lysergic acid diethylamide (LSD, proche structurellement de la sérotonine et connu pour sa capacité à induire des hallucinations (45)) perturbe la transmission sérotoninergique (46). A la fin des années 1960, les mesures de métabolite de la sérotonine (5-HIAA : Acide 5-hydroxy-indole-acétique) combinées à des observations anatomiques d'atrophie corticale chez les patients schizophrènes ont fait également supposer un hypofonctionnement cortical du système sérotoninergique pour expliquer les symptômes négatifs (47). Cependant, ces dernières observations n'ont pas été relevées chez tous les patients schizophrènes où la mesure de 5-HIAA dans le CSF est normale chez les sujets ne présentant pas d'atrophie corticale (47). De plus, d'autres études ont déterminé si la densité des récepteurs de la sérotonine était modifiée chez les patients schizophrènes. Une revue intéressante de Soares et Innis a soulevé que parmi 11 études comparant la densité des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} dans des cerveaux post-mortem de patients schizophrènes et témoins, seulement 7 ont observé une diminution de la densité des récepteurs dans le cortex frontal des sujets schizophrènes (48). Par contre, une augmentation des récepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex préfrontal et temporal a été relevée chez les patients schizophrènes (48). Malheureusement, les analyses d'imagerie *in vivo* par TEP utilisant le ¹⁸F-setoperone n'ont pas montré de différence de densités des récepteurs 5-

HT_{2A/2C} entre patients schizophrènes et les témoins (48). Cependant, des critiques peuvent être apportées à ces études concernant la spécificité des ligands utilisés soulignant l'importance d'utiliser des ligands plus spécifiques pour les recherches futures.

Ainsi, le fait que les agonistes 5-HT_{2A/2C}, comme le LSD, induisent des hallucinations et, comme nous le détaillerons par la suite, que les antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} possèdent des propriétés antipsychotiques montrent l'implication du système sérotoninergique dans la schizophrénie.

iii) L'hypothèse glutamatergique :

L'implication du glutamate dans la schizophrénie a été proposée sur la base des observations des effets psychomimétiques de certains antagonistes du récepteur NMDA comme la phéncyclidine (PCP) (49–51). Olney et Farber mettent en avant le système glutamatergique dans la schizophrénie avec un hypofonctionnement des récepteurs NMDA au niveau du cortex préfrontal, plus précisément localisés au niveau des interneurons GABAergique du cortex préfrontal (52). Les interneurons GABAergiques corticaux ont pour rôle de moduler l'activité glutamatergique de la manière suivante : 1. le glutamate, libéré ici par un neurone pyramidal cortical, peut se fixer sur un récepteur NMDA d'un interneurone entraînant la libération de GABA ; 2. le GABA libéré peut se fixer sur les récepteurs GABA de l'axone d'un autre neurone pyramidal glutamatergique conduisant à son inhibition et réduisant la libération de glutamate en aval. L'ensemble de ce mécanisme permet une modulation fine de l'activité glutamatergique corticale. Ainsi, un hypofonctionnement des récepteurs NMDA dans la schizophrénie empêche le glutamate de jouer son rôle sur les neurones GABAergiques. Le GABA ne sera pas libéré empêchant l'inhibition de l'activité glutamatergique des neurones pyramidaux conduisant à un hyperfonctionnement du système glutamatergique. Comme énoncés dans la partie sur l'hypothèse neurodéveloppementale, ces anomalies de fonctionnement des récepteurs NMDA peuvent avoir des origines génétiques. Le modèle PCP néonatal constitue un modèle préclinique reconnu pour étudier la schizophrénie aux multiples avantages car en plus des symptômes positifs, des symptômes négatifs et des troubles cognitifs sont présents chez ces souris (49–51). L'ensemble des arguments précédents méritent d'intégrer cette hypothèse glutamatergique dans les voies de recherche et dans des modèles rassemblant les différents neurotransmetteurs (50–54).

Ainsi, la schizophrénie est une maladie plurifactorielle que l'on peut inclure dans un modèle « intégratif » (Figure 4).

Hypothèse neurochimique

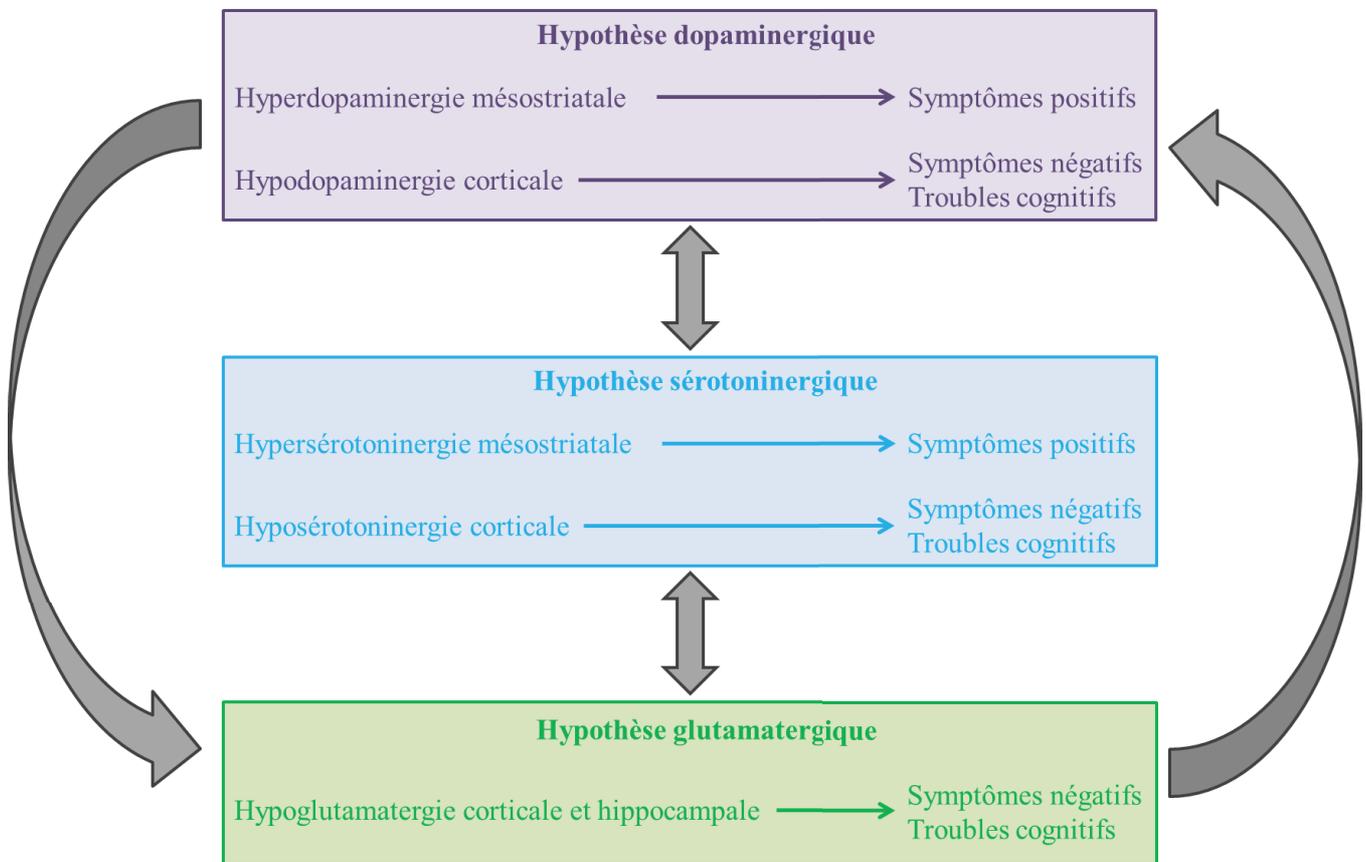


Figure 4 L'hypothèse neurochimique de la schizophrénie

3/ Les traitements symptomatiques

Les traitements pharmacologiques existants sont dits symptomatiques et regroupés sous le nom d'antipsychotiques. Il est important de noter que les traitements antipsychotiques doivent être associés à des traitements dits non pharmacologiques (psychothérapie telle que l'ACT pour thérapie de l'ACception et de l'engagement) visant à atténuer les déficiences psychologiques et sociales du patient (1, 55).

Ainsi, les traitements pharmacologiques restent indispensables pour traiter les symptômes de la schizophrénie et se déclinent en plusieurs types :

a/ Les antipsychotiques typiques ciblant le système dopaminergique

Les antipsychotiques typiques, appelés aussi classiques, conventionnels ou encore de première génération, ont émergé dans les années 1950. Ils ont pour but premier de diminuer l'activité dopaminergique via un blocage des récepteurs D₂ post-synaptiques (2). Cependant, la plupart des antipsychotiques classiques ne sont pas spécifiques du récepteur D₂ et agissent sur d'autres récepteurs contribuant à leurs effets pharmacologiques (thérapeutiques et indésirables). La chlorpromazine fut une des premières drogues antipsychotiques découverte dans les années 1950 qui a révolutionné le traitement symptomatique de la schizophrénie (56). Cependant, des études ont montré que le mode d'action de la chlorpromazine ne se limitait pas à l'antagonisme des récepteurs D₂ mais qu'elle cible aussi d'autres récepteurs adrénergique (α_1), sérotoninergique (« 5-HT₂ ») ainsi qu'un autre récepteur dopaminergique, le récepteur D₁ (57). La chlorpromazine fait partie des antipsychotiques de la famille des phénothiazines dans laquelle on retrouve par exemple la fluphénazine, la pipotiazine ou encore le prothipendyl. Plusieurs autres familles d'antipsychotiques ont vu le jour comme la famille des thioxanthènes (flupentixol), des butyrophénones (halopéridol, dropéridol), des diphenylpipéridines (penfluridol) et des benzamides (sulpiride, amisulpiride) (2, 58). Tous ont montré une efficacité plus ou moins marquée pour le traitement des symptômes positifs de la schizophrénie. Malheureusement, les études cliniques ont montré que pour un tiers des patients, les traitements n'étaient pas efficaces. En particulier, les antipsychotiques typiques ne sont pas efficaces pour le traitement des symptômes négatifs et des troubles cognitifs, et peuvent engendrer de lourds effets secondaires (syndromes extrapyramidaux avec des troubles moteurs, hyperprolactinémie) (59, 60).

b/ Les antipsychotiques atypiques ciblant le système sérotoninergique

Les antipsychotiques atypiques ou non conventionnels ou de seconde génération sont appelés ainsi car leur mode d'action est différent de celui des antipsychotiques typiques. En premier lieu, ces antipsychotiques ont été développés pour pouvoir agir à la fois comme antagonistes des récepteurs dopaminergiques (récepteur D₂) mais également comme antagonistes des récepteurs sérotoninergiques (récepteurs 5-HT_{2A} principalement) (2, 61). La résultante de ce blocage des deux sous-types de récepteur est une modulation fine de la transmission dopaminergique qui peut résulter de deux mécanismes : *i*) un blocage dopaminergique via l'action antagoniste sur les récepteurs D₂ post-synaptiques et *ii*) une augmentation indirecte de la libération de dopamine dans le striatum via un blocage des récepteurs 5-HT_{2A} présents dans les neurones pyramidaux glutamatergiques corticaux et

des interneurons GABAergiques du mésencéphale. En effet, les neurones pyramidaux corticaux projettent dans le mésencéphale où ils activent des neurones GABAergiques qui inhibent les neurones dopaminergiques projetant dans le striatum. Egalement, une activation des récepteurs 5-HT_{2A} des interneurons GABAergiques du mésencéphale peuvent bloquer la transmission dopaminergique mésostriatale. Ainsi, l'inhibition des récepteurs 5-HT_{2A} des neurones pyramidaux glutamatergiques corticaux et des interneurons GABAergiques du mésencéphale augmente la libération de dopamine striatal.

Le 1^{er} antagoniste atypique développé est la clozapine. Ce composé a ouvert la voie à une nouvelle génération d'antipsychotiques multi-cibles, car la clozapine est non seulement un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} et D₂ mais aussi de nombreux autres récepteurs, incluant des récepteurs sérotoninergiques (5-HT₁, 5-HT₃, 5-HT₆, 5-HT₇) et dopaminergiques (D₁, D₃, D₄) ou encore d'autres récepteurs muscariniques, adrénergiques et histaminergiques (62). Deux principales familles de composés ont été développées comme antipsychotiques atypiques : les dibenzoazépines (clozapine, loxapine, olanzapine et quétiapine) et les benzisoxasoles (rispéridone, serindole) (2, 61, 62). D'un point de vue général, il a été montré que les antipsychotiques atypiques présentent de nombreux avantages comparés aux antipsychotiques typiques. En effet, ils traitent de façon efficace les symptômes positifs tout en induisant très peu de syndromes extrapyramidaux (61, 62). De plus, certains antipsychotiques atypiques ont montré une efficacité sur des symptômes négatifs (amélioration de l'humeur) mais celle-ci reste souvent insuffisante. De la même façon, les antipsychotiques atypiques ont une efficacité très limitée sur les troubles cognitifs, même si de petites améliorations chez les personnes âgées ont pu être observées (63, 64). Même si on observe très peu de syndromes extrapyramidaux, de lourds effets secondaires ont été relevés incluant des troubles endocriniens, des crises d'épilepsies, des agranulocytoses (pour la clozapine), des troubles métaboliques (prise de poids, diabète, cholestérolémie perturbée) et une sédation (65, 66). De plus, le temps d'action des antipsychotiques atypiques est plus lent que celui des composés de 1^{ère} génération, ce qui nécessite bien souvent l'utilisation d'autres drogues avec un mode d'action plus rapide pour le traitement des épisodes aigus (65, 66). Outre ces antipsychotiques atypiques capables d'agir à la fois sur la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique, des antipsychotiques exerçant une activité agoniste partiel pour les récepteurs D₂ de la dopamine ont été décrits (67). Un agoniste partiel est un antagoniste vis-à-vis d'un agoniste total et un agoniste vis-à-vis d'un antagoniste total. Ainsi,

l'avantage de ce type d'agoniste est double. En effet, il peut diminuer la transmission dopaminergique dans le striatum via son action sur les récepteurs D₂ dopaminergique présynaptiques, formant des autorécepteurs pouvant empêcher la libération de dopamine présynaptique. L'autre avantage est qu'il active moins fortement les récepteurs dopaminergiques D₂ post-synaptiques sans les inhiber comme un antagoniste pur des récepteurs D₂ minimisant le risque d'apparition des syndromes extrapyramidaux (67). Parmi les drogues qui tendent à se rapprocher de cet équilibre parfait entre stimulation et inhibition dopaminergique, on trouve l'aripiprazole (67).

Malgré les grandes avancées dans le développement thérapeutique autour des antipsychotiques atypiques, de gros progrès restent encore à faire pour réduire les effets secondaires et le traitement des symptômes négatifs et des troubles cognitifs de la schizophrénie (2, 68).

c/ Vers des antipsychotiques de nouvelle génération ciblant le système glutamatergique

Malgré des efforts importants dans le développement des antipsychotiques, ces derniers restent insuffisants pour prendre en charge dans leur globalité les symptômes de la schizophrénie, notamment les symptômes négatifs et les troubles cognitifs (2, 68). C'est la raison pour laquelle de nouvelles cibles thérapeutiques, différentes des cibles dopaminergiques et sérotoninergiques, ont été prises en considération dans le développement d'antipsychotiques de nouvelle génération.

Parmi ces cibles, nous retrouvons le système glutamatergique dont un hypofonctionnement a été suggéré dans la schizophrénie, sur la base des effets des antagonistes des récepteurs NMDA tels que la phéncyclidine et la kétamine (49–51). Les effets de la phéncyclidine et de la kétamine chez les sujets sains rappellent certains symptômes observés chez des patients schizophrènes et ont contribué à l'émergence de l'hypothèse glutamatergique dans la schizophrénie. Ainsi, les différents composants du système glutamatergique (récepteurs ionotropiques AMPA, NMDA, et métabotropiques mGlu) ont été envisagés comme de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des symptômes de la maladie (69, 70).

On peut classer les drogues en cours de développement préclinique et clinique ciblant le système glutamatergique en 4 sous catégories : **i)** les AMPAkines qui modulent l'activité des récepteurs AMPA ; **ii)** les agonistes des récepteurs NMDA analogues de la glycine ; **iii)** les inhibiteurs des

transporteurs de la glycine GlyT1 localisés sur les cellules gliales et **iv**) les agonistes et les modulateurs allostériques des récepteurs métabotropiques du glutamate mGlu2.

i) Les AMPAkines sont des drogues capables de jouer le rôle de modulateur allostérique des récepteurs AMPA en augmentant notamment le temps d'ouverture du canal, permettant ainsi un renforcement de la transmission glutamatergique (71). Sur différents modèles précliniques, les AMPAkines, comme les composés de la famille CX (CX-516, CX-717) ont montré leur capacité à améliorer les troubles cognitifs (72, 73). Même si certaines études cliniques ont montré les effets bénéfiques des AMPAkines sur les troubles de la mémoire, leur utilisation en tant que monothérapie dans la schizophrénie n'est pas, à l'heure actuelle, convaincante comme l'illustrent les résultats obtenus avec la CX-516 (72, 73). D'autres AMPAkines plus puissantes sont en cours de développement (CX-546, CX-619...) pour lutter contre les troubles cognitifs sans pour autant favoriser les symptômes positifs et une neurotoxicité glutamatergique (73, 74).

ii) La glycine et ses analogues agissent comme co-agonistes (avec le glutamate) du récepteur NMDA (54, 75). Des études ont démontré l'efficacité d'acides aminés naturels tels que la glycine, la D-sérine et un de ses analogues, la D-cyclosérine, dans le traitement des symptômes négatifs et des troubles cognitifs de la schizophrénie (54, 75). D'autres agents plus puissants correspondant à des agonistes de synthèse sont encore en phase de développement. L'émergence de ces nouvelles thérapies semble être très prometteuse pour lutter non seulement contre les symptômes négatifs et les troubles cognitifs, mais également les symptômes positifs, si l'hypofonctionnement glutamatergique peut être totalement corrigé.

iii) D'autres travaux sont consacrés au développement d'inhibiteurs du transporteur de la glycine (GlyT) présent sur les cellules gliales pour le traitement des symptômes négatifs de la schizophrénie (76, 77). En effet, ces transporteurs sont capables de capter, dans la cellule gliale, la glycine présente de la fente synaptique. L'utilisation de bloqueurs de ces transporteurs aurait donc l'avantage d'augmenter la disponibilité de la glycine dans la synapse et de favoriser la transmission glutamatergique via l'activation des récepteurs NMDA (76, 77). Le blocage de ces transporteurs pourrait permettre de combler l'hypofonctionnement glutamatergique supposé dans la schizophrénie. Des études cliniques utilisant la N-méthyl-glycine, la sarcosine et la bitopertine (RG1678) pour bloquer ces transporteurs ont été effectuées et ont déjà montré leur efficacité dans la schizophrénie

(78–80). D'autres inhibiteurs pharmacologiques de GlyT1 sont encore en phase de développement préclinique.

iv) Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont capables de moduler finement l'activité glutamatergique. Ils constituent une cible thérapeutique d'intérêt pour combler l'hypofonctionnement des récepteurs NMDA dans la schizophrénie (70, 81, 82). Ces récepteurs sont regroupés en 3 grandes familles, les récepteurs métabotropiques du groupe I (couplés à la protéine G_q), et des groupes II et III (couplés à la protéine $G_{i/o}$) (83). Ainsi, depuis maintenant quelques décennies, ils constituent une piste thérapeutique d'intérêt car leur modulation de la transmission glutamatergique pourrait non seulement s'avérer efficace contre les symptômes positifs mais également contre les symptômes négatifs et les troubles cognitifs (70, 82). Parmi l'ensemble des récepteurs métabotropiques du glutamate, ceux du groupe I (mGlu₁ et mGlu₅) et du groupe II (mGlu₂ et mGlu₃) ont fait l'objet de développements précliniques et cliniques importants qui sont toujours en cours (70, 84, 85). Certains récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe III (mGlu₄, mGlu₇ et mGlu₈) ont aussi fait l'objet d'études précliniques et cliniques mais ils ont suscité un intérêt moindre en dépit des résultats précliniques prometteurs observés avec des agonistes orthostériques et des modulateurs allostériques positifs du récepteur mGlu₄ (70, 86, 87).

Pour le groupe I, des modulateurs allostériques positifs (VU0483605) et négatifs (FTIDC, CFMTI) du récepteur mGlu₁ et des modulateurs allostériques positifs du récepteur mGlu₅ (CDPPB, SPAM523, VU0409551) ont été testés (70, 85, 88, 89). Les modulateurs allostériques positifs des récepteurs mGlu₁ n'ont pas montré d'efficacité convaincante pour les traitements symptomatiques de la schizophrénie tandis que les résultats sur les modulateurs allostériques négatifs du récepteur mGlu₁ et les modulateurs allostériques positifs du récepteur mGlu₅ ont montré une efficacité sur des modèles précliniques pour traiter les symptômes positifs, négatifs et même les troubles cognitifs (70, 85, 88, 89).

Pour le groupe II, le récepteur mGlu₃ est une cible thérapeutique d'intérêt en raison de l'effet bénéfique des agonistes sur la cognition et les conséquences néfastes d'un antagoniste comme le montre l'exemple du LY395756 (90). Concernant le récepteur mGlu₂, des études précliniques ont été réalisées avec des agonistes orthostériques (LY354740, LY379268) et ont démontré leur efficacité pour traiter les symptômes positifs, négatifs et les troubles cognitifs (91–93). Ces résultats très convaincants ont même amené de premières investigations cliniques avec l'utilisation du LY2140023

ou pomaglumetad mais malheureusement la drogue a échoué en phase III en raison de son efficacité limitée aux patients non traités par des antipsychotiques atypiques (94). Les hypothèses pour expliquer ces échecs reposent entre autre sur le manque de sélectivité entre les récepteurs mGlu₂ et mGlu₃ mais également d'une possible dérégulation du niveau d'expression du récepteurs mGlu₂ par la prise d'antipsychotiques atypiques dans les traitements antérieurs des patients (94). A présent, même si l'AZD8529, modulateur allostérique positifs du récepteur mGlu₂, a malheureusement échoué en phase II des tests cliniques, de nouveaux espoirs se portent encore sur le développement d'autres modulateurs allostériques positifs plus sélectifs et efficaces du récepteur mGlu₂ (70, 84). De plus, une meilleure compréhension de la régulation de l'expression et du fonctionnement du récepteur mGlu₂ est encore nécessaire du fait de sa capacité à former des hétérocomplexes avec le récepteur 5-HT_{2A} laissant sous-entendre que le complexe pourrait être plus la cible des antipsychotiques (84, 95).

Antipsychotiques typiques

- **Objectif** : Modulation de l'activité dopaminergique via l'antagonisme des récepteurs D₂
- **Exemples** : Phénotiazines (chlorpromazine) / Thioxanthène (flupentixol) / Butyrophénone (halopéridol) / Diphénylpipéridines (penfluridol) / Butyrophénones (halopéridol) / Diphénylpipéridines (penfluridol) / Benzamides (sulpirides)
- **Avantages** : Effets bénéfiques sur les symptômes positifs / Mode d'action rapide
- **Inconvénients** : Manque d'efficacité sur les symptômes négatifs et les troubles cognitifs / effets secondaires (syndromes extrapyramidaux)

Antipsychotiques atypiques

- **Objectif** : Modulation fine de la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique via l'antagonisme des récepteurs D₂ et 5-HT_{2A}
- **Exemples** : Dibenzozépines (clozapine) / Benzisoxazole (rispéridone) / Aripiprazole
- **Avantages** : Effets bénéfiques sur les symptômes positifs et modérés sur les symptômes négatifs / Pas de syndromes extrapyramidaux
- **Inconvénients** : Manque d'efficacité sur les symptômes négatifs et les troubles cognitifs / Effets secondaires (hyperprolactinémie, troubles métaboliques, agranulocytose...) / Mode d'action plus lent

Antipsychotiques de nouvelles générations glutamatergiques

- **Objectif** : Corriger l'hypofonctionnement de la neurotransmission glutamatergique
- **Exemples** : AMPAkines (CX-546) / Agonistes de la glycine des récepteurs NMDA (D-cyclosérine) / Bloqueurs des transporteurs de la glycine GlyT1 (sarcosine) / Agonistes et modulateurs allostériques des récepteurs mGlu (LY379268, AZD8529, FTIDC)
- **Avantages** : Efficacité potentielle contre les symptômes positifs, négatifs et les troubles cognitifs
- **Inconvénients** : Premiers échecs cliniques en phase II/III / Développements précliniques et cliniques encore nécessaires

Figure 5 Les antipsychotiques comme traitements symptomatiques de la schizophrénie

II/ Les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ : deux cibles des antipsychotiques étroitement liées

Les récepteurs 5-HT_{2A} de la sérotonine et mGlu₂ du glutamate constituent deux cibles d'intérêt dans le traitement symptomatique de la schizophrénie. Comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, ils sont respectivement la cible des antipsychotiques atypiques et d'antipsychotiques de nouvelle génération (61, 70). Plusieurs études anatomiques, moléculaires et fonctionnelles identifient un hétérocomplexe constitué des deux récepteurs eux-mêmes ciblés par deux classes d'antipsychotiques (84, 95).

1/ Localisation des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

a/ Le récepteur 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} est un des 14 récepteurs de la sérotonine. Il est un des trois récepteurs de la sous-classe des récepteurs 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}), couplés canoniquement à la protéine G_q (96). Le récepteur 5-HT_{2A} est présent au niveau périphérique mais aussi au niveau central où il joue un rôle dans la régulation des fonctions cognitives.

Ce récepteur présente une expression large au niveau de certains organes périphériques tels que les reins et l'utérus, mais également dans les muscles squelettiques et lisses des vaisseaux, et les plaquettes (97–100).

Dans le système nerveux central (SNC), la localisation du récepteur a pu être établie grâce à un ensemble d'études combinant l'analyse des ARNm, l'autoradiographie et l'immunohistochimie (rendue possible par le développement d'anticorps polyclonaux de plus en plus spécifiques) (96, 101, 102). On retrouve une forte expression du récepteur au niveau du cortex cérébral en particulier dans les couches profondes (lamina IV-Va) mais également dans la partie enthorinale et dans le cortex piriforme. Une importante expression est aussi présente dans le claustrum, le noyau endopiriforme, le striatum et les tubercules olfactifs (chez les rongeurs). Dans le tronc cérébral, on retrouve un fort signal, obtenu par un marquage de l'ARNm, dans les noyaux hypoglosse, pontin, du nerf moteur trijumeau et facial. Des niveaux plus faibles du récepteur 5-HT_{2A} sont retrouvés dans le système limbique, les ganglions de la base et l'hippocampe (96, 102). La distribution régionale du récepteur 5-HT_{2A} au niveau du SNC est similaire chez l'Homme et les rongeurs notamment dans le cortex préfrontal à l'exception du striatum où l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} est absent chez l'Homme (96,

102). A l'échelle sub-cellulaire, des études immunohistochimiques et électrophysiologique ont mis en évidence une localisation prépondérante du récepteur 5-HT_{2A} dans les dendrites des neurones pyramidaux (localisation post-synaptique), mais également au niveau de la pré-synapse (terminaisons thalamo-corticales) (101, 103, 104).

b/ Le récepteur mGlu₂

Comme pour le récepteur 5-HT_{2A}, des études d'hybridation *in situ* combinées à des approches immunohistochimiques et autoradiographiques ont permis de dresser une cartographie de sa répartition au sein du système nerveux central. On retrouve le récepteur mGlu₂ exprimé de manière importante dans le cervelet, le cortex cérébral dans son ensemble, l'hippocampe et en plus faible quantité dans le striatum (83, 105). Par contre, contrairement au récepteur mGlu₃, le récepteur mGlu₂ n'a pas été retrouvé exprimé dans les cellules gliales. Enfin, si on se place à l'échelle de la synapse, le récepteur mGlu₂ a été majoritairement identifié en pré-synapse au niveau du cortex et de l'hippocampe notamment, même si certaines études ont aussi rapporté l'existence du récepteur mGlu₂ en post-synapse (105).

Ainsi, les localisations anatomiques centrales du récepteur 5-HT_{2A} (majoritairement présynaptiques) et du récepteur mGlu₂ (majoritairement postsynaptique) sont très distinctes. Cependant, une co-localisation des 2 récepteurs au niveau de la présynapse et de la postsynapse est envisageable et pourrait avoir des implications fonctionnelles importantes (101, 103–105).

c/ Lien entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

Les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ ont des localisations anatomiques communes. Au niveau du cortex cérébral, en particulier le cortex préfrontal (Figure 6), les 2 récepteurs participent à la régulation des fonctions cognitives au travers des systèmes sérotoninergique et glutamatergique (106, 107).

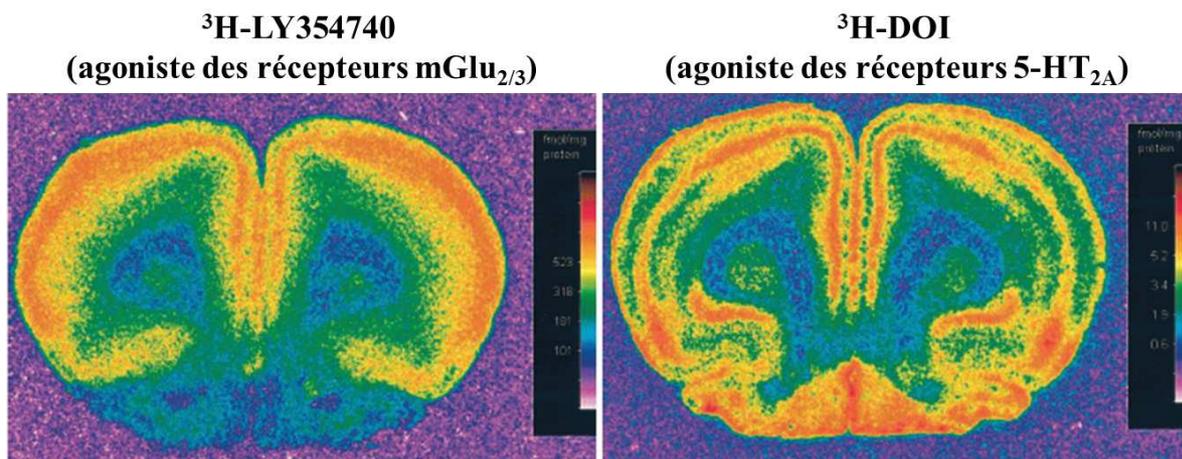


Figure 6 Autoradiographies par liaison du $^3\text{H-LY354740}$ (agoniste des récepteurs $\text{mGlu}_{2/3}$) et du $^3\text{H-DOI}$ (agoniste des récepteurs 5-HT_{2A}) réalisées sur le cortex préfrontal de rat (adapté de Marek GJ. et al., *The J. of Pharm.*, 2000)

Les premières investigations ayant révélé l'importance de la co-localisation anatomique des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu_2 sur la transmission sérotoninergique et glutamatergique ont été faites par des expériences d'électrophysiologie. En effet, les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) au niveau de la couche V des cellules pyramidales du néocortex via une activation des récepteurs 5-HT_{2A} sont bloqués par l'emploi d'un agoniste non sélectif des récepteurs mGlu des groupes II/III comme l'ACPD (1*S*,3*S*)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid) (108). Grâce à la génération de nouveaux agonistes orthostériques plus sélectifs des récepteurs mGlu du groupe II, $\text{mGlu}_{2/3}$ (LY354740, LY379268), Marek GJ. *et al.* ont démontré que les PPSE induits par l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} dans le cortex préfrontal sont bloqués par ces nouveaux agonistes (106). D'autres études électrophysiologiques ont été réalisées avec un modulateur allostérique positif spécifique du récepteur mGlu_2 (le BINA) et démontrent que ce mécanisme implique le récepteur mGlu_2 (107, 109, 110). Ainsi, ces études ont mis en lumière le couplage étroit entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu_2 au niveau du cortex préfrontal pour réguler la transmission post-synaptique (106–108, 110). Ces études ont également démontré l'importance de considérer ces deux récepteurs pour le développement de nouvelles thérapies pour le traitement des syndromes neuropsychiatriques tels que la schizophrénie (106–108, 110).

2/ Interaction physique des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

En 2008, González-Maeso J. *et al.* ont démontré par des expériences de BRET, FRET et de biochimie l'existence d'une interaction physique entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂. Cette équipe a pu mettre en évidence l'interaction dans des systèmes de surexpression cellulaire, mais également dans des cultures primaires de neurones corticaux, et *in vivo*, dans les cellules pyramidales du cortex préfrontal et des échantillons corticaux post-mortem de patients (111). Même si les études ne montrent pas une localisation majoritaire des récepteurs 5-HT_{2A} au niveau pré-synaptique et mGlu₂ au niveau post-synaptique, les résultats obtenus par González-Maeso J. *et al.* laissent sous-entendre l'existence d'un hétérocomplexe 5-HT_{2A}/mGlu₂ au niveau des neurones pré ou post-synaptiques (112). L'absence de co-localisation nette entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ peut s'expliquer par les niveaux d'expression différentielle des 2 récepteurs à la pré ou post-synapse et de la sensibilité des techniques de détection utilisées.

Stuart Sealfon et son équipe sont également parvenus à localiser le domaine précis responsable de la formation l'hétérocomplexe au niveau la partie N-terminal du 4^{ème} domaine transmembranaire (Tm4) du récepteur mGlu₂ (111, 113). Plus récemment, Moreno *et al.* ont démontré que le 4^{ème} domaine transmembranaire du récepteur 5-HT_{2A} était aussi responsable de la formation du complexe mGlu₂/5-HT_{2A} (113). Ainsi, l'ensemble de ces expériences apportent de forts arguments sur l'existence d'une interaction physique entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ (84, 111, 113).

3/ Cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

L'existence d'un cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ a fait l'objet d'un grand nombre d'études pharmacologiques. Pour cela, l'impact de la co-expression des deux récepteurs sur leurs voies de signalisation suite à l'activation par différents ligands (agonistes, agonistes inverses et antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂) a été étudié dans plusieurs modèles cellulaires et *in vivo* (111, 113–116).

a/ La signalisation biaisée du récepteur 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} peut activer plusieurs voies de signalisations. Le couplage du récepteur à la protéine G_q conduit à une activation de la phospholipase Cβ (PLCβ), hydrolysant le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycerol (DAG), (117). L'IP₃ produit est ensuite capable d'augmenter la concentration en Ca²⁺ intracellulaire

provenant du réticulum endoplasmique tandis que le DAG peut activer la protéine kinase C (PKC) (118). L'activation de cette voie canonique est à l'origine de l'induction de la transcription de *cFos* dans les neurones corticaux. L'activation de G_q peut également inhiber les canaux potassiques IRK3 (Inwardly Rectifying Potassium channels 3) (119) et activer la voie des MAPKinases/Erk1,2 par un mécanisme dépendant de Ras (120) (Figure 7). A noter que le récepteur 5-HT_{2A} est aussi capable d'activer d'autres voies de signalisation indépendantes des protéines G comme celle dépendante des β -arrestines impliquée dans les processus de désensibilisation qui sera détaillée dans la partie III. Cependant, plusieurs études ont montré que la signalisation du récepteur 5-HT_{2A} était plus complexe et que les voies de signalisation activées dépendaient du type d'agoniste (121–124). Au début des années 2000, Stuart C. Sealfon et Javier González-Maeso ont démontré que le récepteur 5-HT_{2A} active des mécanismes de signalisation distincts lorsqu'il est stimulé par des agonistes hallucinogènes (LSD, DOI, Psilocybine) ou des agonistes dépourvus d'effets psychotropes (Ergotamine, Lisuride) (123). Si les 2 types de ligands sont capables d'activer la voie de signalisation de la protéine G_q , les ligands hallucinogènes activent en plus une voie de signalisation dépendante de la protéine $G_{i/o}$, conduisant à une activation de la protéine kinase Src et la transcription des gènes précoces *egr-1* et *egr-2* dans les neurones corticaux (122, 123). Cette voie de signalisation, $G_{i/o}$ -dépendante et activée spécifiquement par les ligands hallucinogènes, est responsable d'une réponse comportementale considérée comme un bon index des effets hallucinogènes chez les rongeurs via la mesure du balancement saccadé de la tête (« head twitch response ») (123). Les travaux de Laura Bohn ont également montré un mécanisme d'activation différent de la voie des MAPkinases/Erk1,2 par la 5-HT et le DOI, un agoniste hallucinogène synthétique du récepteur : l'activation de la voie Erk1,2 par la 5-HT nécessite la β -arrestine 2 alors que son activation par le DOI est indépendante des β -arrestines (121) (Figure 7).

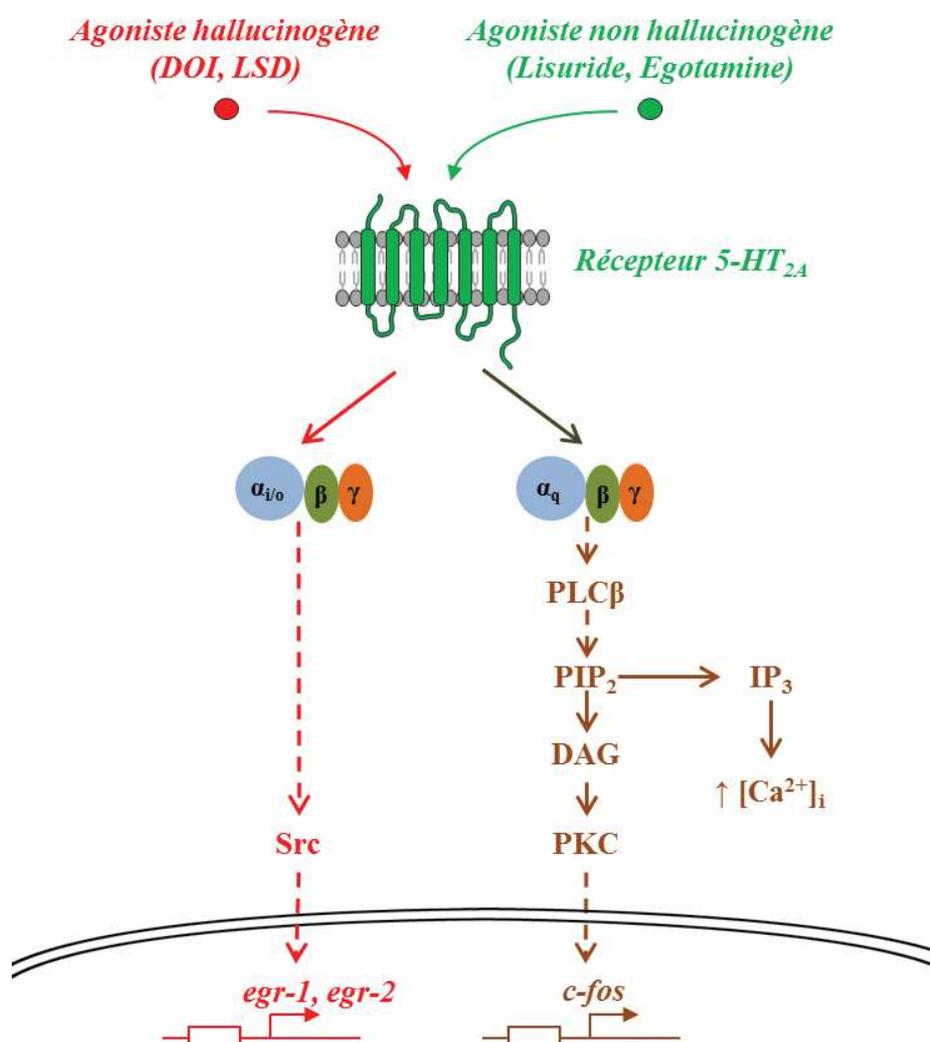


Figure 7 Voie de signalisation biaisée du récepteur 5-HT_{2A}

b/ Lien fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

L'ensemble de ces données fonctionnelles sur le récepteur 5-HT_{2A} démontrent que les ligands hallucinogènes activent spécifiquement une voie de signalisation dépendante de la protéine G_{i/o} elle-même sous le contrôle du récepteur mGlu₂. Le récepteur mGlu₂ est un RCPG couplé canoniquement à la protéine G_{i/o} composé par les sous-unités $\alpha_{i/o}$ et β/γ . La sous-unité $\alpha_{i/o}$ est capable d'inhiber l'adénylate cyclase et de diminuer indirectement les concentrations d'AMPc cellulaire (125) tandis que la sous-unité β/γ peut activer les canaux potassiques GIRK (GIRK₁/GIRK_{2/4}) (119) et inhiber des canaux calciques de type N voltage-dépendent (126–128). De plus, comme pour la voie de

signalisation associée à la protéine G_q , la voie dépendante des protéines $G_{i/o}$ peut aussi activer les récepteurs la cascade Erk1,2 (95, 129).

Lors de la première description du complexe formé par les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂, González-Maeso J. *et al.* ont également montré une potentialisation de l'activité $G_{i/o}$ par le DOI lorsque le récepteur mGlu₂ est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A} (111). A la suite de cette observation, de nouvelles études pharmacologiques ont été réalisées afin de mieux caractériser le lien fonctionnel entre les deux récepteurs. Fribourg M. *et al.* ont disséqué les signalisations dépendant des protéines G_q et $G_{i/o}$ des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ en réalisant des expériences d'électrophysiologie sur des œufs de Xénope pour mesurer l'impact sur différents canaux potassiques (IRK3, rendant compte de la signalisation G_q , et GIRK4, rendant compte de la signalisation $G_{i/o}$) (115). Ces études ont démontré, dans un premier temps, que la co-expression des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ diminue la signalisation de la protéine G_q et augmente la signalisation $G_{i/o}$, révélant ainsi l'existence d'une balance d'activation des deux voies de signalisation dépendant de l'expression relative des deux récepteurs. Pour modéliser ce phénomène, les auteurs ont défini un index ($BI = \Delta G_{i/o} - \Delta G_q$) rendant compte de l'importance de l'activation d'une voie de signalisation par rapport à l'autre reflétant, selon leur théorie, le potentiel pro ou antipsychotique de la drogue ciblant les récepteurs 5-HT_{2A} ou mGlu₂ (115). L'activation du récepteur 5-HT_{2A} par un agoniste hallucinogène, appelé aussi « strong agonist », comme le DOI est associée à un BI bas reflétant le potentiel pro-psychotique de la drogue alors qu'une activation du récepteur mGlu₂ par le LY379268, agoniste orthostérique, est associée à un BI haut qui rend compte du potentiel antipsychotique (115). Pour ne citer que quelques exemples supplémentaires de l'étude, le LY341495, antagoniste du récepteur mGlu₂, a un BI bas rendant compte du potentiel non antipsychotique de la drogue tandis qu'au contraire la clozapine ou la rispéridone (antagonistes/agonistes inverses du récepteur 5-HT_{2A}) sont associées à un BI haut rendant compte du potentiel antipsychotique des drogues. De plus, du fait d'une dérégulation des deux récepteurs dans la schizophrénie, une altération de la balance définie par le BI dans la schizophrénie est également proposée par les auteurs qui placent le complexe au centre des stratégies futures pour le traitement de la schizophrénie dans le but de rétablir l'équilibre entre activation $G_{i/o}$ et G_q (84, 115) (Figure 8).

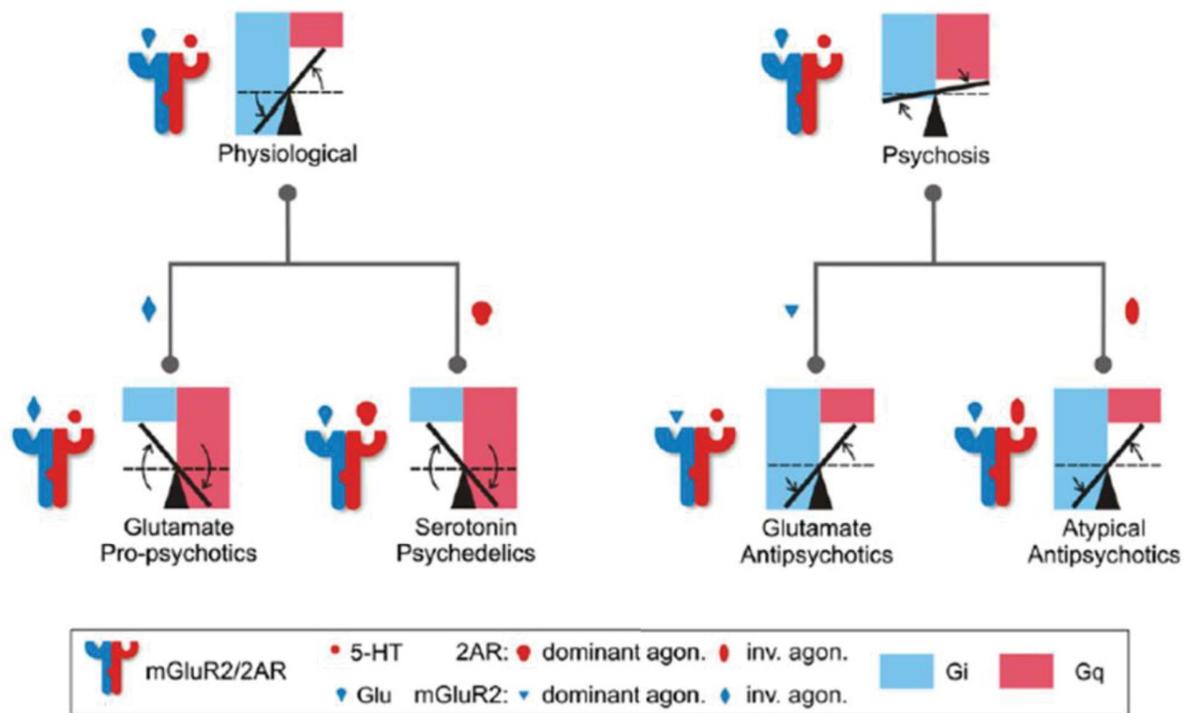


Figure 8 Modèle de la balance d'activation des protéines $G_{i/o}/G_q$ par les antipsychotiques ciblant le complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂ proposé par Fribourg M. *et al.*, *Cell*, 2011

Cependant, malgré l'élégance et les preuves pharmacologiques de cette théorie, cette dernière reste controversée, comme l'indiquent notamment les travaux de Gérard Marek. En effet, Delille H.K. *et al.* n'ont pas réussi à reproduire sur un autre modèle cellulaire hétérologue (cellules HEK-293) les évidences fonctionnelles de l'existence d'un tel complexe (114). Ces auteurs n'ont pas retrouvé de différences de production d'AMPC (reflet de l'activité $G_{i/o}$) et des dérivés phosphorylés de l'inositol (index de l'activité G_q) suite à la co-expression des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ (114). De plus, comme cela a été souligné par les auteurs, la théorie ne reflète pas totalement la réalité car si le LY341495, antagoniste du récepteur mGlu₂, est associé, comme le DOI, à un BI faible, ce composé devrait être défini comme pro-psychotique. Or aucune étude n'a jamais rapporté un tel effet du LY341495 (95). De plus, l'efficacité antipsychotique prédite par l'utilisation du BI ne correspond pas aux preuves cliniques déjà établies pour la ritansérine, la clozapine ou encore la rispéridone. Cependant, ces observations ne remettent pas totalement en cause l'existence d'un complexe fonctionnel comprenant les récepteurs mGlu₂ et 5-HT_{2A} du fait des différentes expériences réalisées tant au niveau cellulaire qu'*in vivo* (95, 112, 115, 116, 130). Ainsi, le modèle proposé par Fribourg M. *et al.* ne suffit pas pour prédire totalement le comportement d'une drogue agissant sur l'un des deux

récepteurs et nécessite des améliorations pour expliquer le potentiel cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ (95, 107, 111, 114–116, 130).

La caractérisation d'un point de vue anatomique, physique et fonctionnel des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ et l'existence d'un hétérocomplexe nécessitent donc d'être étayées par des études basées sur de nouvelles approches expérimentales (84, 95, 107, 115).

III/ Phosphorylation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines dans laquelle une enzyme appelée kinase transfère le gamma phosphate d'une molécule d'ATP sur l'hydroxyle –OH d'une sérine, d'une thréonine ou d'une tyrosine, les trois acides aminés phosphorylables chez les mammifères. C'est un mécanisme réversible par l'action d'autres enzymes appelées phosphatases, responsables de la déphosphorylation.

Depuis plusieurs années, un nombre croissant d'exemples souligne le rôle central de la phosphorylation des RCPGs dans la régulation de leur activité et la réponse comportementale aux drogues qui les modulent (131–134). Suivant la localisation des sites de phosphorylation et le GPCR concerné, la phosphorylation peut avoir différentes conséquences sur l'activité du récepteur.

1/ Désensibilisation

La désensibilisation d'un RCPG est un des mécanismes conduisant à un état du récepteur non activable par une nouvelle exposition à son agoniste (135). Elle permet un retour à l'état de base de la stimulation de la cellule avant une nouvelle réponse. Pour enclencher ce mécanisme, le RCPG doit être phosphorylé sur un ou plusieurs sites spécifiques (133, 135) par deux grandes classes de protéines kinases : les protéines GRK (G-protein receptor kinases) appartenant à la famille des sérine/thréonine kinases et des protéines kinases activées par des seconds messagers cellulaires comme l'AMPC (activateur de la « Protein Kinase A ») ou le diacylglycérol (activateur de la « Protein Kinase C ») (132, 133, 135). Ainsi, il existe deux grands types de désensibilisation des RCPGs : - homologue impliquant les GRKs en réponse à la stimulation du RCPG lui-même et - hétérologue résultant de l'activation de protéines kinases par des seconds messagers produits en réponse à d'autres stimuli.

i) Désensibilisation homologue par les GRKs (Figure 9)

Les GRKs phosphorylent les RCPGs pour initier la désensibilisation du récepteur après liaison spécifique de l'agoniste au récepteur, on parle de désensibilisation homologue ou ligand-dépendante. À ce jour, 6 membres de la famille des GRKs ont été identifiés (GRK1 à GRK6) (136). Ces récepteurs sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme à l'exception des GRK1 et GRK4 que l'on retrouve respectivement dans la rétine et les testicules (136–138). Les GRKs phosphorylent les

sérine/thréonine des RCPGs présentes dans le domaine C-terminal (e.g. récepteurs β_2 adrénergique (139, 140)), la 1^{ère} boucle intracellulaire (récepteurs de la follitropine (141)), la 2^{ème} boucle intracellulaire (récepteurs dopaminergiques D_2/D_3 (142)) et la 3^{ème} boucle intracellulaire (récepteurs muscarinique M_2 , β_2 adrénergique (143, 144)) (132, 145). Même si aucune séquence consensus de phosphorylation par les GRKs n'a été identifiée, GRK1 et GRK2 phosphoryleraient préférentiellement un site entouré de résidus acides alors que GRK5 et GRK6 phosphoryleraient préférentiellement un site entouré de résidus basiques (136).

La phosphorylation du RCPG favorise le recrutement de protéines nommées arrestines car elles arrêtent son activité par découplage de la protéine G du récepteur et par internalisation du récepteur. La famille des arrestines comporte 4 membres (Arrestine-1, Arrestine-2, Arrestine-3 et Arrestine-4) dont les plus connus sont les β -arrestine-1 et β -arrestine-2 correspondant aux Arrestine-2 et Arrestine-3, respectivement. Si l'expression des arrestines 1 se limite à la rétine et celle de l'arrestine 4 aux cônes, l'expression des β arrestine-1 et β arrestine-2 est ubiquitaire (146). Pour illustrer la spécificité d'activation des β arrestines selon le type de RCPG, on peut citer celui de la β arrestine-1 qui induit la désensibilisation du récepteur β_2 -adrénergique après sa phosphorylation par GRK2 (147). Différentes observations ont montré également que la phosphorylation du récepteur β_2 -adrénergique par la PKA n'augmente pas l'activité inhibitrice de la β arrestine-1 illustrant le rôle central des arrestines uniquement dans la désensibilisation homologue (148).

ii) Désensibilisation hétérologue (Figure 9)

La désensibilisation hétérologue implique des protéines kinases comme la PKA ou la PKC. Contrairement à la désensibilisation homologue, elle est indépendante de la présence de l'agoniste du RCPG à désensibiliser. Les kinases phosphorylant le plus couramment les GPCRs sont les Ser/Thr kinases (STK) PKA et PKC, et les tyrosines kinases comme les récepteurs de l'insuline (Insuline Growth Factor, IGF-I et IGF-II). Un exemple illustrant ce type de désensibilisation hétérologue est celui de la PKA phosphorylant le récepteur β_2 -adrénergique principalement sur la Ser²⁶² (149, 150). Contrairement aux phosphorylations induites par les GRKs, la séquence consensus phosphorylable par la PKA, RRXS, a été clairement identifiée (151). La cinétique de phosphorylation du RCPG semble plus lente que celle de la phosphorylation déclenchée par les GRKs (152). Le mécanisme de désensibilisation du récepteur β_2 -adrénergique suite à la phosphorylation du récepteur par la PKA

implique le découplage de la protéine G avec un switch de couplage du récepteur de la protéine G_s vers la protéine G_i (153). La phosphorylation des récepteurs muscarinique de type I, de l'angiotensine II, de la vasopressine et des récepteurs β_2 -adrénergiques par la PKC constitue d'autres exemples bien connus de désensibilisation hétérologue (154–156).

Ainsi, les mécanismes de désensibilisation des RCPGs peuvent être multiples. Il est encore difficile d'évaluer la contribution de la désensibilisation homologue par rapport à la désensibilisation hétérologue. Il est probable que cela soit dépendant du RCPG, des sites phosphorylés, du type d'agoniste et de l'environnement cellulaire et tissulaire dans lequel se trouve le récepteur (157). Ainsi, le profil de phosphorylation adopté par le RCPG constitue une réelle signature guidant sa désensibilisation suivie très souvent par l'internalisation du récepteur par un mécanisme dépendant des arrestines (132, 135).

Il est important de souligner que la désensibilisation et l'internalisation d'un RCPG sont deux mécanismes liés mais distincts qui peuvent nécessiter la phosphorylation de résidus spécifiques comme le montre l'exemple du récepteur β_2 -adrénergique dont la phosphorylation de la Thr¹³² et de la Tyr¹⁴¹ est nécessaire à l'internalisation alors que la désensibilisation implique plutôt la phosphorylation des Ser³⁵⁵, Ser³⁵⁶ et Ser³⁶⁴ entre autre (150, 158). Cette internalisation peut être suivie d'une dégradation du RCPG dans les lysosomes ou d'un recyclage à la membrane (Figure 9).

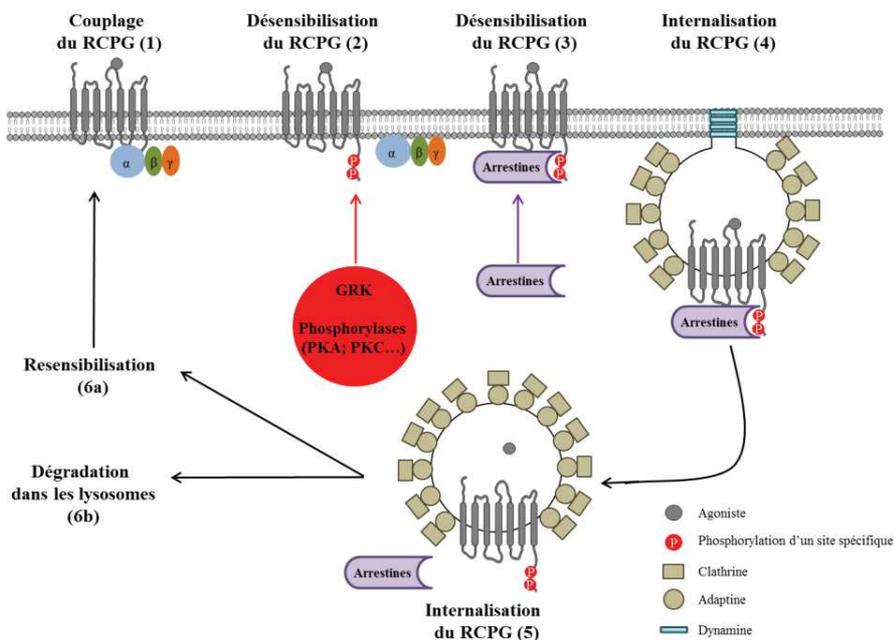


Figure 9 Le rôle clé de la phosphorylation du RCPG dans le processus de désensibilisation

iii) Désensibilisation des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

La désensibilisation du récepteur 5-HT_{2A} implique classiquement les kinases GRK2/3, la PKC et le recrutement des arrestines (159) mais aussi d'autres kinases comme la RSK2 (ribosomal S6 kinase 2) en réponse à la stimulation des récepteurs de facteurs de croissance et la CaM Kinase II (Protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante) (160, 161). Même si des expériences de mutagenèse dirigée ciblant les résidus Ser¹⁸⁸ et Ser⁴²¹ ont montré le rôle central de leur phosphorylation dans les processus de désensibilisation du récepteur, les kinases responsables de leur phosphorylation restent inconnues. Pour le récepteur mGlu₂, peu d'études se sont intéressées au mécanisme de désensibilisation du récepteur. Cependant, 2 études ont montré que le récepteur serait résistant à la désensibilisation homologue contrairement au récepteur mGlu₃ (162, 163).

2/ Signalisation et phosphorylation

Le profil de phosphorylation adopté par les RCPGs peut aussi être à l'origine du déclenchement de voies de signalisation spécifiques. Parmi les exemples décrits dans la littérature, on peut citer celui du récepteur muscarinique M₃ qui peut être phosphorylé à la fois par la caséine kinase 1 α et la caséine kinase 2 sur des sites différents activant des voies de signalisation distinctes (respectivement la voie Erk1/2 et JNK, (160, 161)). Un autre exemple d'activation de voies de signalisation suite à la phosphorylation d'un RCPG est celui du récepteur sphingosine-1-phosphate (S1P1 ou EDG-1) qui peut activer la voie Rac après phosphorylation de la Thr²³⁶ localisée au niveau de la boucle i₃ du récepteur par la PKB (ou Akt) (165). Comme cela a été mentionné précédemment, la phosphorylation spécifique de résidus sérine/thréonine du récepteur β_2 -adrénergique par la protéine kinase A (PKA) conduit à un changement de couplage du récepteur β_2 de la protéine G_s vers la protéine G_i et à l'inhibition de la production d'AMPc (166).

3/ Sélectivité fonctionnelle et phosphorylation

La notion de sélectivité fonctionnelle ou d'agonisme biaisé a été proposée pour définir la capacité de ligands spécifiques d'un même RCPG à le stabiliser dans des conformations actives partiellement différentes permettant l'activation différentielle de voies de signalisation (167). Le profil de phosphorylation adopté par les RCPGs joue un grand rôle dans les processus de sélectivité

fonctionnelle (168 + Annexe). Par exemple, le récepteur Mu des opioïdes adopte un profil de phosphorylation différentiel selon qu'il est stimulé par la morphine ou le DAMGO (168). La conséquence de cette différence de profil de phosphorylation adopté par le RCPG est à l'origine d'une endocytose du récepteur en réponse à une stimulation du récepteur par le DAMGO mais pas en réponse à la morphine (168). Un autre exemple est la réponse du récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine aux agonistes hallucinogènes *vs.* non hallucinogènes. Comme décrit dans la partie II, le récepteur 5-HT_{2A} est capable d'activer des voies de signalisation distinctes en réponse à une stimulation par des agonistes hallucinogènes ou non hallucinogènes (122, 123). Notre équipe a été la première à démontrer que cette capacité différentielle du récepteur 5-HT_{2A} à déclencher des mécanismes de signalisation différents en réponse à ces deux types d'agonistes serait due à la phosphorylation d'un résidu sérine (la Ser²⁸⁰) localisée dans la boucle i3 du récepteur (Annexe). Cette étude a démontré que la Ser²⁸⁰ est spécifiquement phosphorylée en réponse aux agonistes hallucinogènes (LSD, DOI) et que cette phosphorylation est à l'origine de la capacité moindre des hallucinogènes à désensibiliser et à internaliser le récepteur (Annexe).

4/ Hétérocomplexe et phosphorylation

Enfin, des études récentes suggèrent que le profil de phosphorylation des RCPGs dépend également de leur capacité à former des hétéromères avec d'autres RCPGs. Ce nouveau concept est illustré par la phosphorylation des récepteurs Mu des opioïdes en réponse à l'activation du récepteur NPFF2 par le neuropeptide FF (NPFF) au sein d'un hétéromère Mu/NPFF₂. Cette phosphorylation est responsable de la perte de fonction du récepteur Mu, un processus qui contribue à la tolérance à la morphine induite par une stimulation au NPFF (169).

Ainsi, le profil de phosphorylation des RCPGs constitue une étape centrale responsable de leurs fonctions spécifiques et dépend de l'environnement tissulaire, cellulaire, protéique et moléculaire (132, 145).

Objectifs

Plusieurs études démontrent l'existence d'un cross-talk fonctionnel et d'un hétérocomplexe entre les deux récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ (112, 115). Cependant, de nombreuses questions subsistent quant aux conséquences de ce complexe sur le mode d'action des antipsychotiques atypiques et de nouvelle génération ciblant ces récepteurs (95, 115). En particulier, le profil de phosphorylation adopté par le récepteur mGlu₂ n'est pas connu lorsqu'il se trouve en présence ou non du récepteur 5-HT_{2A}. Ainsi, la problématique générale de la thèse a été de déterminer l'impact de l'activation de chaque récepteur sur la phosphorylation du récepteur mGlu₂ au sein du complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂.

Cette thèse a donc poursuivi les objectifs suivants :

- 1) Etablir la carte de phosphorylation du récepteur mGlu₂ en modèle cellulaire HEK-293
- 2) Caractériser les potentiels sites de phosphorylation du récepteur mGlu₂ régulés en fonction de la présence ou non du récepteur 5-HT_{2A}
- 3) Développer un ou plusieurs anticorps spécifiques pour étendre l'étude *in vivo* sur souris Wild-type mais également un modèle de schizophrénie (PCP)
- 4) Expliquer leur rôle fonctionnel par mutagenèse dirigée

Résultats

I/ La phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂, dépendante du récepteur 5-HT_{2A}, peut moduler son activité G_{i/o}

1/ Article

Research Article

5-HT_{2A} receptor-dependent phosphorylation of mGlu₂ receptor at Serine 843 promotes mGlu₂ receptor-operated G_{i/o} signaling

Samy Murat⁽¹⁻³⁾, Mathilde Bigot⁽¹⁻³⁾, Jonathan Chapron⁽¹⁻³⁾, Gabriele M König⁽⁴⁾, Evi Kostenis⁽⁴⁾, Giuseppe Battaglia⁽⁵⁾, Ferdinando Nicoletti^(5,6), Emmanuel Bourinet⁽¹⁻³⁾, Joël Bockaert⁽¹⁻³⁾, Philippe Marin^(1-3*), Franck Vandermoere^(1-3*)

(1) CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France; (2) INSERM, U1191, F-34094 Montpellier, France; (3) Université de Montpellier, F-34094 Montpellier, France; (4) Molecular, Cellular and Pharmacobiology Section, Institute of Pharmaceutical Biology, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany; (5) I.R.C.C.S. Neuromed, 86077 Pozzilli, Italy; (6) Department of Physiology and Pharmacology, University Sapienza, 00185 Rome, Italy

(*) These authors equally contributed to the study

Research Article

5-HT_{2A} receptor-dependent phosphorylation of mGlu₂ receptor at Serine 843 promotes mGlu₂ receptor-operated G_{i/o} signaling

Samy Murat⁽¹⁻³⁾, Mathilde Bigot⁽¹⁻³⁾, Jonathan Chapron⁽¹⁻³⁾, Gabriele M König⁽⁴⁾, Evi Kostenis⁽⁴⁾, Giuseppe Battaglia⁽⁵⁾, Ferdinando Nicoletti^(5,6), Emmanuel Bourinet⁽¹⁻³⁾, Joël Bockaert⁽¹⁻³⁾, Philippe Marin^(1-3*), Franck Vandermoere^(1-3*)

(1) CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France; (2) INSERM, U1191, F-34094 Montpellier, France; (3) Université de Montpellier, F-34094 Montpellier, France; (4) Molecular, Cellular and Pharmacobiology Section, Institute of Pharmaceutical Biology, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany; (5) I.R.C.C.S. Neuromed, 86077 Pozzilli, Italy; (6) Department of Physiology and Pharmacology, University Sapienza, 00185 Rome, Italy

(*) These authors equally contributed to the study

Corresponding authors: Dr Philippe Marin, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier Cedex 5, France; Tel +33 434 35 92 13; Fax + 33 467 54 24 32; email: philippe.marin@igf.cnrs.fr; Dr Franck Vandermoere, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier Cedex 5, France; Tel +33 434 35 92 13; Fax + 33 467 54 24 32; email: franck.vandermoere@igf.cnrs.fr

Running title: mGlu₂ phosphorylation in 5-HT_{2A}/mGlu₂ crosstalk

Abstract

The serotonin 5-HT_{2A} and glutamate mGlu₂ receptors continue to attract particular attention given their implication in psychosis associated with schizophrenia and the mechanism of action of atypical antipsychotics and a new class of antipsychotics, respectively. A large body of evidence indicates a functional crosstalk between both receptors in the brain, but the underlying mechanisms are not entirely elucidated. Here, we have explored the influence of 5-HT_{2A} receptor upon the phosphorylation pattern of mGlu₂ receptor in light of the importance of specific phosphorylation events in regulating G protein-coupled receptor signaling and physiological outcomes. Among the five mGlu₂ receptor phosphorylated residues identified in HEK-293 cells, the phosphorylation of Ser⁸⁴³ was enhanced upon mGlu₂ receptor stimulation by the orthosteric agonist LY379268 only in cells co-expressing the 5-HT_{2A} receptor. Likewise, administration of LY379268 increased mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ in prefrontal cortex of wild type mice but not 5-HT_{2A}^{-/-} mice. Exposure of HEK-293 cells co-expressing mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors to 5-HT also increased Ser⁸⁴³ phosphorylation state to a magnitude similar to that measured in LY379268-treated cells. In both HEK-293 cells and prefrontal cortex, Ser⁸⁴³ phosphorylation elicited by 5-HT_{2A} receptor stimulation was prevented by the mGlu₂ receptor antagonist LY341495, while the LY379268-induced effect was abolished by the 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907. Mutation of Ser⁸⁴³ into alanine strongly reduced G_{i/o} signaling elicited by mGlu₂ or 5-HT_{2A} receptor stimulation in cells co-expressing both receptors. Collectively, these findings identify mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ as a key molecular event that underlies the functional crosstalk between both receptors.

Introduction

Amongst the 14 5-hydroxytryptamine (serotonin, 5-HT) receptor subtypes, the 5-HT_{2A} receptor still raises special interest given its role in the psychotropic effects of psychedelic hallucinogens, which are often used to probe the psychosis associated with schizophrenia, and in the therapeutic effects of atypical antipsychotics like clozapine, olanzapine and risperidone, which act as antagonists or inverse agonists of the receptor (1,2). Atypical antipsychotics are efficient against positive symptoms of schizophrenia (hallucinations, delusions and disorder of thought), but they poorly control negative symptoms (social isolation, anhedonia and inactivity) and are often not efficient against cognitive symptoms (poor "executive functioning", lack of attention, impaired working memory) (3). During the 90ies, a new class of antipsychotics acting as orthosteric agonists (LY354740, LY379268, LY404039) or positive allosteric modulators (PAMs, LY487379, BINA) of group II metabotropic glutamate receptors (mGlu_{2/3}) has been developed. Subsequent preclinical studies indicated that mGlu₂ receptor activation accounts for their antipsychotic activity (4–6) and showed overall superiority over 5-HT_{2A} receptor antagonists in alleviating negative symptoms. Furthermore, an integrated study combining five placebo-controlled trials of pomaglumetad, the oral prodrug of LY404039, demonstrated clinical efficacy of glutamate-based pharmacotherapy in schizophrenia in specific patient subgroups, such as patients at early disease stage and, interestingly, patients who had never been treated with 5-HT_{2A} receptor antagonists (7).

5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors are canonically coupled to G_q and G_{i/o} proteins, respectively, and thus induce different signaling cascades, but they do not function as independent targets of antipsychotics. Electrophysiological and behavioral studies have demonstrated a functional antagonism between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors: pharmacological activation of mGlu₂ receptor inhibits glutamate release and excitatory postsynaptic currents (EPSCs) elicited by 5-HT_{2A} receptor stimulation in the prefrontal cortex, and attenuates behavioral effects of hallucinogens, while mGlu₂ receptor antagonists further enhance the frequency and amplitude of 5-HT_{2A} receptor-induced EPSCs (7, 8). It has recently been proposed that

the functional crosstalk between both receptors does not solely occur at the level of neuronal networks or intracellular signaling cascades, but that it involves the formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers, which integrate inputs from ligands of each protomer to trigger unique signaling and behavioral outcomes (9). *In vitro* and *in vivo* data identified the 5-HT_{2A}-mGlu₂ heterocomplex as a possible target of hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists that mediates engagement of G_{i/o} signaling and the associated psychotropic effects (9). Conversely, 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers are necessary for the stimulation of G_q signaling by mGlu₂ receptor agonists, which is altered in patients with schizophrenia (10). This particular signaling also depends on the ability of mGlu₂ receptor to couple to and activate G_{i/o} proteins (10). Finally, studies showed that 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers serve as an integration point that determines the balance between G_{i/o} and G_q-dependent signaling, and pro-psychotic (increase in G_q vs. G_{i/o} signaling) vs. antipsychotic (increase in G_{i/o} vs. G_q signaling) outcome (11). These findings pinpoint the role of 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers in the homeostatic equilibrium between G_{i/o} and in G_q signaling that ensures a normal non-psychotic state. However, the existence of 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers and their physiological relevance still remain controversial in absence of unequivocal demonstration of the co-localization of both receptors in neurons (12). There is even predominant evidence for a presynaptic localization of mGlu₂ receptors while 5-HT_{2A} receptors are mainly localized at the post-synapse (12).

Given the importance of specific phosphorylation events in determining the signaling and physiological outcomes of G protein-coupled receptors (GPCRs) (13), phosphorylation of 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors is another mechanism that might contribute to the functional crosstalk between both receptors, irrespective of heteromer formation. In a previous study, we extensively characterized 5-HT_{2A} receptor phosphorylated sites and identified a serine residue in the third receptor intracellular loop (Ser²⁸⁰) phosphorylated in response to receptor activation by hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists, such as lysergic acid diethylamide (LSD) or 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI), but not by non-hallucinogenic agonists, such as lisuride or ergotamine (14). This study also showed that the phosphorylation of Ser²⁸⁰ underlies the lower propensity of hallucinogens to induce receptor

desensitization and internalization, compared with non-hallucinogenic agonists (14). These data suggest that biased phosphorylation of 5-HT_{2A} receptor by hallucinogenic vs. non-hallucinogenic agonists might account for their distinct behavioural outcomes upon long-term treatment. Using an *in vitro* phosphorylation assay, another study also identified several residues phosphorylated in the mGlu₂ receptor C-terminal domain and showed that the phosphorylation of one of them (Ser⁸⁴³) by protein kinase A (PKA) affects receptor coupling to G proteins (15). However, the reciprocal influence of 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors on their phosphorylation state and the role of their phosphorylation in the functional crosstalk between both receptors remain unexplored.

Here, we characterized phosphorylated residues of mGlu₂ receptor expressed in HEK-293 cells and investigated the influence of 5-HT_{2A} receptor expression/stimulation upon their phosphorylation state using high-resolution mass spectrometry. Among the identified residues, we show that Ser⁸⁴³ phosphorylation elicited by agonist stimulation of mGlu₂ receptor depends on 5-HT_{2A} receptor co-expression and demonstrate a reciprocal interplay between the activation of both receptors to promote Ser⁸⁴³ phosphorylation. Characterization of the signaling outcome of Ser⁸⁴³ phosphorylation revealed its key role in G_{i/o} signaling elicited by 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors agonists in cells co-expressing both receptors.

Materials and Methods

Materials

Human Embryonic Kidney-293 (HEK-293) N type cells (RRID:CVCL_0045) were from the American Type Culture Collection (Anassas, VI, ATCC, CRL-1573). All experiments of the study were performed using a previously characterized batch of cells (Isolate #3) (16). Their negative mycoplasma status was analyzed every month using the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Switzerland). Culture media were from Invitrogen. M100907 maleate was a generous gift from Dr Jean-Michel Rivet (Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine, France). LY379268 (mGlu₂ receptor orthosteric agonist), LY341495 (mGlu₂ receptor antagonist), KT5720 (PKA inhibitor) and D4476 (casein kinase 1 inhibitor) were from Tocris, lisuride maleate from Santa Cruz Biotechnologies, 5-HT and DOI from Sigma Aldrich. Pertussis Toxin (PTX) was from Calbiochem® and FR900359 was produced as previously described (17).

The rat anti-Hemagglutinin (HA) antibody (11867423001) was from Roche, the rabbit anti-Flag antibody (F7425) and the mouse anti-Flag M2 antibody conjugated to magnetic beads (M8823) were from Sigma Aldrich. The rabbit anti-CK1 ϵ (#12448) was from Cell Signaling and the mouse anti-Actin (#MA5-11869) was from ThermoScientific. The anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody was generated by immunizing rabbits with the synthetic CAAPRASANLGQG peptide coupled to KLH (Eurogentec®). Antibodies were purified by two consecutive affinity chromatographies. A first chromatography against the immobilized phosphorylated CAAPRASANLGQG peptide as bait bound antibodies recognizing both phosphorylated and unphosphorylated forms of the peptide. The retained fraction was then eluted and used for a second chromatography against the immobilized non-phosphorylated CAAPRASANLGQG peptide. We considered that the non-retained fraction of the second chromatography step contains antibodies recognizing mGlu₂ receptor phosphorylated at Ser⁸⁴³.

The PRK5 plasmid encoding the HA-tagged 5-HT_{2A} receptor was described elsewhere (18). The cDNA encoding HA-tagged 5-HT_{2A}(D¹²⁰N) was generated by site-directed mutagenesis from this plasmid. The pcDNA3 plasmids encoding the Flag-tagged human and rat mGlu₂

receptors were generously provided by Dr. Philippe Rondard (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France). The cDNAs encoding human and rat S⁸⁴³A mGlu₂ receptors and human S⁸⁴³D and S⁸⁴⁴A mGlu₂ receptor were obtained by gene synthesis (Eurogentec[®]) and subcloned in pcDNA3. The pcDNA3 plasmid encoding human CaV2.2 calcium channel isoform and the single dual promotor plasmid (pDuo) encoding rat Cav α_2 - δ_{1-b} and Cav β_{1b} ancillary subunits cloned in a single dual promotor plasmid (pDuo) were described elsewhere (19). The peGFPC1 plasmid was from Clontech.

Cell cultures and transfection

HEK-293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMAX (Life Technologies) supplemented with 10% dialyzed, heat-inactivated fetal calf serum (BioWhittaker) and antibiotics in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. They were transfected at 40-50% confluence using polyethylenimine (PEI, Sigma-Aldrich), as previously described (20), and used 48 h after transfection. CKI ϵ siRNA (FlexiTube siRNA CKI ϵ ; Cat.N° SI00287735 / SI00287728 / SI04434843 / SI04434836) and control siRNA (AllStars Negative Control siRNA; Cat.N° 107280) were purchased from QIAGEN. siRNA transfection in HEK-293 cells (at 40-50% confluence) was performed with Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol using a final siRNA concentration of 10 nM. Cells were used 48 h after transfection.

Quantitative mass spectrometry analysis of mGlu₂ receptor phosphorylation

Transfected cells were starved of serum for 4 h, challenged with either vehicle or LY379268 (1 μ M) for 15 min and lysed in Triton X-100 (2%), sodium chloride (150 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), EDTA (2 mM), EGTA (2 mM), SDS (0.2%), sodium orthovanadate (1 mM), sodium fluoride (50 mM), sodium β -glycerophosphate (25 mM), sodium pyrophosphate (5 mM) and a protease inhibitor cocktail (Roche). The samples were incubated under rotation for 1 h at 4°C and centrifuged for 15 min at 16,000 x g to eliminate insoluble material. Flag-tagged mGlu₂ receptor was immunoprecipitated from 10 mg protein extracts using the anti-Flag M2 antibody immobilized on magnetic beads. After reduction with dithiothreitol (10 mM,

10 min at 37°C) and alkylation with iodoacetamide (50 mM, 45 min at 25°C), immunoprecipitated mGlu₂ receptors were resolved by SDS-PAGE and digested *in-gel* with trypsin (10 ng/mL, Gold, Promega) or with chymotrypsin (10 ng/mL, Gold, Promega) overnight at 25°C. Peptides were analyzed by nano-flow liquid chromatography coupled to Fourier transform tandem mass spectrometry (nanoLC-FT-MS/MS) using a LTQ Velos Pro Orbitrap Elite mass spectrometer coupled to an Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentration of samples were performed on-line on a Pepmap precolumn (0.3 mm 10 mm, Dionex) in buffer A (2% acetonitrile, 0.1% formic acid). A gradient consisting of 2–40% buffer B (B = 99.9% acetonitrile with 0.1% formic acid) (3–33 min), 40–80% B (33–34 min), 80–0% B (49–50 min), and equilibrated for 20 min in 0% B (50–70 min) was used to elute peptides at 300 nL/min from a Pepmap capillary reversed-phase column (0.075 mm x 150 mm, Thermo Fisher Scientific). Mass spectra were acquired using a top-10 collision-induced dissociation (CID) data-dependent acquisition (DDA) method. The LTQ-Orbitrap was programmed to perform a FT full scan (60,000 resolution) on 400–1,400 Th mass range with the top ten ions from each scan selected for LTQ-MS/MS with multistage activation on the neutral loss of 24.49, 32.66 and 48.99 Th. FT spectra were internally calibrated using a single lock mass (445.1200 Th). Target ion numbers were 500,000 for FT full scan on the Orbitrap and 10,000 MS_n on the LTQ. Precursor mass and top 6 per 30 Da windows peak lists were extracted from MS₂ using MSconvert 3.0 and searched with Mascot 2.6 against the human or rat Complete Proteome Set database (<http://www.uniprot.org>), cysteine carbamidomethylation as a fixed modification and phosphorylation of Ser, Thr and Tyr as variable modifications, 7 ppm precursor mass tolerance, 0.5 Da fragment mass tolerance and trypsin/P or chymotrypsin digestion. MS₂ spectra matching phosphorylated peptides with ion score over 15 were manually inspected for unique transitions that pinpoint the position of phosphorylation sites. Ion signals corresponding to phosphorylated peptides were quantified from the maximal intensities measured in their ion chromatograms manually extracted using Qual browser v2.1 (Thermo Fisher Scientific) with a tolerance of 5 ppm for mass deviation, and normalized to signals of their non-phosphorylated counterparts. For

each identified phosphorylated residue, a phosphorylation index [phosphorylated peptide ion signal intensity / (phosphorylated peptide ion signal intensity + non-phosphorylated peptide ion signal intensity)], was calculated.

Western Blotting

Proteins, resolved onto 10% polyacrylamide gels, were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Biorad). Membranes were immunoblotted with primary antibodies (anti phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor, 1:2,000; anti-Flag, 1:1,000; Anti-HA, 1:1,000) and then with either anti-rat (Jackson ImmunoResearch 112-035-003) or anti-rabbit (Sigma Aldrich GENA934V) or anti-mouse (Sigma Aldrich GENA931V) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:5,000). Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence method (Western lightning® Plus-ECL, Perkin Elmer) on a ChemiDoc™ Touch Imaging System (Biorad). Immunoreactive bands were quantified by densitometry using the ImageJ software (v.1.50). In protein phosphorylation analyses, the amount of each phosphoprotein was normalized to the amount of the corresponding total protein detected in the sample.

Analysis of Ser⁸⁴³ phosphorylation in the mouse prefrontal cortex

Experiments on mice (C57/Bl6J, eight weeks old, male) conformed to European ethics standards (86/609-EEC) and to decrees of the French National Ethics Committee (N°87/848) for the care and use of laboratory animals. Protocols were approved by regional ethic committee for animal use (CEEA LR 34, #7251). A minimum of four animals was used for each group. Animals were randomly allocated into the different groups by an observer who was blind to the experimental conditions. Prior to immunochemistry, brains were randomly numbered in order to perform immunochemistry and image acquisition in a blind way and reassign the samples to their group afterwards. Mice (about 20 g) were injected i.p. with either vehicle (5% DMSO/5% Tween-80) or LY379268 (10 mg/kg) or DOI (10 mg/kg) or lisuride (10 mg/kg). M100907 (5 mg/kg) or LY341495 (3 mg/kg) were injected 15 min prior to vehicle or agonists. LY379268 was also administered to 5-HT_{2A}^{-/-} (21) and mGlu₂^{-/-} (22) mice

(originally provided by Prof. Shigetada Nakanishi at Kyoto University, Japan), and DOI to mGlu₂^{-/-} mice. Thirty min after agonist injection, mice were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg i.p., Ceva SA) and perfused transcardiacally with fixative solution containing 4% w/v paraformaldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5), sodium fluoride (10 mM) and sodium orthovanadate (2 mM). Brains were post-fixed for 48 h in the same solution and stored at 4°C. Thirty µm-thick sections were cut with a vibratome (Leica). Sections were incubated with a solution containing 0.2% Triton X-100, 3% bovine serum albumin (BSA) and 2% goat serum in Tris buffer saline (TBS) for 30 min. They were then incubated for 24 h at 4°C with the anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody (1:500) in TBS containing 3% BSA. After four washes, they were incubated for 1 h with an Alexa Fluor® 488-conjugated anti-rabbit antibody (1:2,000, Invitrogen) in TBS containing 2.5% BSA and 0.08% Triton X-100. Immunofluorescent staining was observed with a Zeiss Axioimager Z1 microscope equipped with apotome (Carl Zeiss). Images were acquired using the Zen2 (blue edition) software driving an AxioCam MRm CCD camera (Carl Zeiss). Image analysis was performed with the Image J software (v1.50) and results were expressed in percentage of anti-phospho-Ser⁸⁴³-positive cells relative to DAPI-stained cells.

ELISA

Quantification of cell surface expression of HA-tagged 5-HT_{2A} receptors and Flag-tagged wild-type, S⁸⁴³A and S⁸⁴³D mGlu₂ receptors was performed by ELISA under non-permeabilized conditions, as previously described (23). Dilutions for primary antibodies were 1:400 (Anti-HA) and 1:1,000 (anti-Flag). Secondary antibodies (donkey anti-mouse or anti-rabbit conjugated to HRP, GE Healthcare) were used at 1:5,000 dilution. Immunoreactive signal was detected with a M200 Infinite plate reader (Tecan), using the SuperSignal ELISA Femto chromogenic substrate (Thermo Scientific). Control experiments were performed using cells transfected with empty vectors.

Electrophysiology

HEK-293 cells were co-transfected with plasmids encoding Flag-tagged wild-type or S⁸⁴³A or S⁸⁴³D mGlu₂ receptor, HA-tagged 5-HT_{2A} receptor, Cav2.2, Cavβ_{1b} and Cavα₂-δ_{1-b} ancillary subunits and GFP (to detection of transfected cells). Twenty-four hours after transfection, cells were dissociated with Versene (Invitrogen), and plated at low density in poly-ornithine-coated 35-mm Petri dishes for 24 h. Cells were incubated with extracellular solution containing 125 mM NaCl, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 5mM BaCl₂, 1 mM MgCl₂ and pH was adjusted to 7.3 with TEAOH. Borosilicate glass pipettes (2–4 MΩ, Sutter instrument) were filled with internal solution containing 130 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 4 mM MgATP, 0.3 mM Tris-GTP (pH adjusted to 7.3 with NaOH). Currents were elicited from a holding potential of -80 mV to 0 mV during 10 msec repeated each 1 sec. Data were plotted as means ± SEM. Statistical difference (p < 0.05) was determined using one-way analysis of variance.

Statistics

Statistical analyses were performed using Prism (v. 7.0, GraphPad Software Inc.). Histograms show means ± SEMs. One-way ANOVA followed by Tukey's and Dunnett's tests were performed for multiple comparisons to multiple groups or to a single group, respectively. For each statistical test, F value was calculated in order to determine how the variance between the mean values obtained in different populations is significantly different. F value, number of independent biological replicates and sample size (or number of animals per condition) are indicated in the corresponding figure legends. MS peptide identification probabilities were calculated using the Mascot algorithm. Mascot score represents - 10*LOG₁₀(p-value), where p-value is the absolute probability of peptide wrong assignment.

Results

Agonist-stimulated mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ requires co-expression of 5-HT_{2A} receptor in HEK-293 cells

To identify novel molecular substrates of the functional crosstalk between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors, we first examined the phosphorylation pattern of Flag-tagged human mGlu₂ receptor co-expressed with HA-tagged 5-HT_{2A} receptor in HEK-293 cells following exposure to vehicle or a maximally-effective concentration of the mGlu₂ receptor orthosteric agonist LY379268 (1 μM) (24). mGlu₂ receptors were purified by immunoprecipitation followed by SDS-PAGE. They were then digested *in-gel* with trypsin. Analysis of peptides from vehicle or LY379268-treated cells by nano-flow liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) yielded 57 % coverage of the entire receptor sequence and 75% coverage of intracellular domains, with a p-value threshold of 0.05 for peptide identification (Supplementary Figure1). LC-MS/MS analysis identified one phosphorylated residue located in the third extracellular domain of the receptor (Thr⁷¹⁸) and four residues in the C-terminal domain (Ser⁸³³, Ser⁸³⁷, Ser^{843/844} and Ser⁸⁷¹, Table 1, Figure 1A, Supplementary Figures 2-5). Note that MS/MS fragmentation did not discriminate between a phosphorylation at Ser⁸⁴³ or Ser⁸⁴⁴, due to the absence of site-specific fragment ions in MS/MS spectra (Supplementary Figure 4). In an effort to distinguish Ser⁸⁴³ from Ser⁸⁴⁴ phosphorylation, purified mGlu₂ receptor was digested with chymotrypsin to generate a proteolytic peptide with the two serine residues located in the central part of the sequence, which should be enriched in discriminant fragment ions. Unfortunately, chymotrypsin digestion yielded only 31 % receptor sequence coverage (Supplementary Figure 6A) and the two theoretically discriminant ions were not detected in the corresponding fragmentation spectra (Supplementary Figure 6B).

Alignment of human, mouse and rat mGlu₂ receptor sequences revealed that the region encompassing Ser⁸⁴³ and Ser⁸⁴⁴ is highly conserved in the three species (Figure 1B). Specifically, Ser⁸⁴³ of the human receptor is conserved in rat and mouse orthologs, whereas Ser⁸⁴⁴ is replaced by an alanine (Figure 1B). We thus renewed the experiments in cells

expressing the rat mGlu₂ receptor and clearly identified a peptide phosphorylated at Ser⁸⁴³ (Supplementary Figure 7). Consistent with these findings, a peptide comprising phosphorylated Ser⁸⁴³ was likewise identified in cells expressing the S⁸⁴⁴A mutant of the human mGlu₂ receptor (Supplementary Figure 8), while no peptide phosphorylated at Ser⁸⁴⁴ was detected in cells expressing the S⁸⁴³A mutant. Collectively, these results unambiguously identify Ser⁸⁴³ as the phosphorylated residue in the human and murine receptors.

To explore the impact of agonist stimulation of mGlu₂ receptor and 5-HT_{2A} receptor expression upon mGlu₂ receptor phosphorylation, we next compared the phosphorylation index of each identified phosphorylated residue in cells exposed or not to LY379268, in the presence or absence of 5-HT_{2A} receptor. The phosphorylation index of Thr⁷¹⁸, Ser⁸³³, Ser⁸³⁷ and Ser⁸⁷¹ did not display any significant variation upon exposure of cells to LY379268 or co-expression of 5-HT_{2A} receptor (Table 1 and Supplementary Figures 2B, 3B, 5B). In contrast, LY379268 induced a marked increase in Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells co-expressing human mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors while it did not significantly affect its phosphorylation state in cells expressing mGlu₂ receptor alone (Figure 1C). Likewise, LY379268 exposure of cells expressing the rat mGlu₂ receptor increased Ser⁸⁴³ phosphorylation only when the 5-HT_{2A} receptor was co-expressed (Figure 1C and Supplementary Figure 7). Collectively, these findings demonstrate that agonist stimulation of mGlu₂ receptor induces the phosphorylation of a conserved serine residue in human and murine receptors in HEK-293 cells, an effect dependent of the presence of 5-HT_{2A} receptor.

Agonist-stimulated mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ in the mouse prefrontal cortex requires co-expression of 5-HT_{2A} receptor

A polyclonal antibody against the mGlu₂ receptor phosphorylated at Ser⁸⁴³ was obtained by immunizing a rabbit with the synthetic CAAPRA_sANLGQG peptide encompassing a phosphorylated serine residue corresponding to Ser⁸⁴³ in the entire murine receptor. We checked the specificity of the antibody for the phosphorylated site by immunoblotting on HEK-293 cell protein extracts. No immunoreactive signal was observed in blots from cells

transfected with empty vector, but a clear signal was detected at the expected molecular weight in blots obtained from cells expressing the rat mGlu₂ receptor (Supplementary Figure 9). Furthermore, LY379268 treatment strongly enhanced this immunoreactive signal only in cells co-expressing the 5-HT_{2A} receptor, consistent with the results of MS analysis (Figure 1C and Supplementary Figure 9). Mutation of Ser⁸⁴³ into alanine abolished this immunoreactive signal, confirming the specificity of the antibody for phosphorylated Ser⁸⁴³ (Supplementary Figure 9). The maximal signal intensity was reached at LY379268 concentration as low as 1 nM (Supplementary Figure 10A). Notably, expression of 5-HT_{2A} receptor at various densities (in absence of LY379268) did not enhance phosphorylation of Ser⁸⁴³ of mGlu₂ receptor (Supplementary Figure 11). As expected, the increase in Ser⁸⁴³ phosphorylation induced by LY379268 was prevented by the co-application of the mGlu₂ receptor antagonist LY341495 (10 μM, Supplementary Figure 12). An increase in the anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody immunoreactivity was also observed in Western blots from cells expressing the human mGlu₂ receptor, though the intensity of the immunoreactive signal was much lower than that measured in cells expressing the rat receptor (Supplementary Figure 13), suggesting a higher affinity of our anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody for the murine phosphorylated receptor.

We next took advantage of this antibody to investigate the phosphorylation of native mGlu₂ receptor in the mouse prefrontal cortex, a brain region where mGlu₂/5-HT_{2A} heteromers have been identified (9). We injected mice with either vehicle or LY379268 (10 mg/kg, 30 min) and assessed mGlu₂ phosphorylation by immunohistochemistry. Reminiscent of the data obtained in HEK-293 cells, LY379268 administration strongly increased immunostaining with the anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody (Figure 1D). The most intense signal was observed in middle layers of prefrontal cortex, which express the highest density of 5-HT_{2A} receptor (25). As observed in HEK-293 cells, Ser⁸⁴³ phosphorylation elicited in mouse prefrontal cortex by injecting LY379268 was also prevented by the administration of LY341495, which alone did not affect Ser⁸⁴³ phosphorylation (Figure 1D). Confirming the specificity of our antibody for phosphorylated mGlu₂, no signal was detected in prefrontal cortex of mGlu₂ receptor

knockout (mGlu₂^{-/-}) mice treated with either vehicle or LY379268 (Figure 1D). Moreover, administration of LY379268 to 5-HT_{2A} receptor knockout (5-HT_{2A}^{-/-}) mice did not increase the phospho-Ser⁸⁴³ immunoreactive signal in prefrontal cortex (Figure 1D), indicating that 5-HT_{2A} receptor expression is also necessary for LY379268-induced phosphorylation of native mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³.

Ser⁸⁴³ phosphorylation is mediated by casein kinase 1 (CK1)

In order to identify protein kinase(s) involved in Ser⁸⁴³ phosphorylation, mGlu₂ receptor sequence surrounding Ser⁸⁴³ was uploaded into Group-based Prediction System (GPS[®], v3.0), a software for kinase consensus search that ranks protein kinases into a hierarchical tree with four levels and builds its algorithm against the PhosphoELM database, in order to calculate false discovery rates for each of them (26). GPS search revealed that Ser⁸⁴³ is a good consensus for phosphorylation by casein kinase 1 (CK1, GPS[®] score 9.3), and cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA, GPS[®] score 4.1), consistent with previous findings (15). Pretreatment of HEK-293 cells co-expressing mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptor with the CK1 inhibitor D4476 (10 μM, 60 min) (27) abolished LY379268-induced phosphorylation of Ser⁸⁴³, whereas the PKA pharmacological inhibitor KT5720 (1 μM, 60 min) (28) did not affect the level of Ser⁸⁴³ phosphorylation (Figure 2A), suggesting that CK1 rather than PKA promotes Ser⁸⁴³ phosphorylation in living cells. Treatment of cells with D4476 did not affect the low Ser⁸⁴³ phosphorylation level measured in cells expressing mGlu₂ receptor alone and challenged with LY379268 (Supplementary Figure 14).

Among the CK1 isoforms, GPS search pointed CK1δ and CK1ε as the best candidates able to phosphorylate Ser⁸⁴³. Given the high CK1ε expression level and the very low expression of CK1δ in prefrontal cortex (<http://mouse.brain-map.org/>), we targeted specifically the ε isoform using RNA interference. Silencing CK1ε expression abolished LY379268-induced Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells co-expressing 5-HT_{2A} receptor (Figure 2B and Supplementary Figure 15), reminiscent of the effect of cell exposure to D4476 (Figure 2A).

G_{i/o} and G_q proteins are involved in Ser⁸⁴³ phosphorylation elicited by mGlu₂ receptor stimulation in cells co-expressing 5-HT_{2A} receptor

In line with the canonical coupling of mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors to G_{i/o} and G_q proteins, respectively, we next explored their influence on LY379268-induced Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells co-expressing both receptors. LY379268 exposure did not increase Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells pretreated with the G_{i/o} inhibitor Pertussis toxin (PTX, 100 ng/mL, 18 h) or the pharmacological G_{q/11} inhibitor FR900359 (1 μM, 2 h) (17), indicating that the activation of both G_{i/o} and G_{q/11} is necessary to LY379268-induced Ser⁸⁴³ phosphorylation (Supplementary Figure 16A). Further supporting the role of G_{q/11} activation by unliganded 5-HT_{2A} receptor, LY379268 exposure did not promote Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells expressing the signaling-dead 5-HT_{2A}(D¹²⁰N) receptor (Supplementary Figure 17A) (29).

Agonist-elicited phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ promotes receptor-operated G_{i/o} signaling

To determine the role of Ser⁸⁴³ phosphorylation in mGlu₂ receptor-mediated signal transduction, we measured mGlu₂ receptor-operated inhibition of N-type voltage-gated calcium channels, a read-out commonly used to study engagement of G_{i/o} signaling by GPCRs (30,31) (Figure 3A).

As expected, LY379268 inhibited N-type calcium channel-mediated current in a concentration-dependent manner (pEC₅₀ = 8.81 ± 0.16, n = 10 cells) in HEK-293 cells transiently expressing mGlu₂ receptor (Figure 3B). No effect of LY379268 was seen in cells transfected with an empty vector or transiently expressing the 5-HT_{2A} receptor alone, but co-expression of 5-HT_{2A} receptor with mGlu₂ receptor increased the amplitude of LY379268-induced inhibition of N-type calcium channels without affecting its apparent affinity (pEC₅₀ = 8.66 ± 0.07, n = 10 cells, Figure 3B). In contrast, co-expression of 5-HT_{2A} receptor with S⁸⁴³A mGlu₂ receptor mutant did not enhance the LY379268-induced inhibition of N-type calcium channels, while mutation of Ser⁸⁴³ into aspartate, to mimic permanent phosphorylation of this residue, had no consequence on the level of inhibition of the N-type calcium channels by LY379268 (Figure 3C). Furthermore, pre-treatment of cells with the CK1 inhibitor D4476 (10

μM), which prevented Ser⁸⁴³ phosphorylation, also abolished the potentiation of the LY379268 response elicited by 5-HT_{2A} receptor expression in cells co-expressing wild type mGlu₂ receptor but not in cells co-expressing S⁸⁴³D mGlu₂ receptors (Figure 3C). D4476 exposure did not affect the amplitude of LY379268-induced inhibition of N-type calcium channels in cells expressing mGlu₂ receptor alone (Figure 3C). Collectively, these results suggest that Ser⁸⁴³ phosphorylation is a necessary step of the potentiation of mGlu₂ receptor-operated G_{i/o} signaling induced by 5-HT_{2A} receptor expression. This potentiation was not due to an enhanced expression of mGlu₂ receptor at the plasma membrane, as ELISA experiments showed that co-expression of 5-HT_{2A} receptors did not change the cell surface expression of mGlu₂ receptor (Supplementary Figure 18). Further supporting the absence of influence of Ser⁸⁴³ phosphorylation on mGlu₂ receptor plasma membrane localization, wild type, S⁸⁴³A and S⁸⁴³D mGlu₂ receptors exhibited similar cell surface expression (Supplementary Figure 18).

5-HT_{2A} receptor stimulation promotes phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³

Exposure of HEK-293 cells co-expressing mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors to 5-HT increased Ser⁸⁴³ phosphorylation state in a concentration-dependent manner and to a magnitude similar to that measured in LY379268-treated cells (Figures 1C and 4A, Supplementary Figure 10B), an effect prevented by the 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 (100 nM, Figure 4A). Reminiscent of the LY379268-induced response, the 5-HT-induced Ser⁸⁴³ phosphorylation was strongly reduced in cells expressing the G_q-dead 5-HT_{2A}(D¹²⁰N) receptor (Supplementary Figure 17B). Likewise, the 5-HT-elicited Ser⁸⁴³ phosphorylation was abolished in cells pretreated with FR900359 but it persisted in cells pretreated with PTX (Supplementary Figure 16B). The hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonist DOI (10 μM) and the non-hallucinogenic agonist lisuride (10 μM) induced increases in Ser⁸⁴³ phosphorylation comparable to that measured in cells challenged with 5-HT (Figure 4B). Furthermore, no additional increase in Ser⁸⁴³ phosphorylation state was measured in cells exposed to both LY379268 and 5-HT_{2A} receptor agonists (5-HT, DOI or lisuride, Figure 4B).

Corroborating results obtained in transfected HEK-293 cells, administration of DOI (10 mg/kg, 30 min) or lisuride (10 mg/kg, 30 min) to mice induced elevations of Ser⁸⁴³ phosphorylation in prefrontal cortex similar to those measured in mice injected with LY379268 (Figure 4C). As expected, Ser⁸⁴³ phosphorylation elicited by DOI injection was prevented by the administration of M100907, which alone did not affect Ser⁸⁴³ phosphorylation (Figure 4C). Collectively, these results indicate that Ser⁸⁴³ phosphorylation can be triggered with similar efficiencies by agonist stimulation of either 5-HT_{2A} or mGlu₂ receptors in cells co-expressing both receptor subtypes.

Interestingly, treatment of HEK-293 cells co-expressing 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors with LY341495, which alone did not affect Ser⁸⁴³ phosphorylation, inhibited the 5-HT-induced effect (Figure 5A). Conversely, M100907 prevented the LY379268-induced increase in Ser⁸⁴³ phosphorylation, while it slightly but not significantly decreased basal Ser⁸⁴³ phosphorylation (Figure 5B). mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptor ligands induced similar regulations of Ser⁸⁴³ phosphorylation in mouse prefrontal cortex: Ser⁸⁴³ phosphorylation elicited by injecting LY379268 was prevented by the administration of M100907 and, reciprocally, the DOI-induced effect was prevented by the administration of LY341495 (Figure 5C). Collectively, these observations indicate that phosphorylation of Ser⁸⁴³ elicited by the stimulation of 5-HT_{2A} receptor depends on the co-expression of mGlu₂ receptor at active conformation and *vice versa*.

Impact of 5-HT_{2A} receptor activation on G_{i/o}-dependent signaling under the control of mGlu₂ receptor

Given the role of Ser⁸⁴³ phosphorylation in mGlu₂ receptor-operated activation of G_{i/o} signaling and the critical influence of the 5-HT_{2A} receptor upon this phosphorylation, we also investigated the effect of 5-HT_{2A} receptor stimulation on G_{i/o} signaling by measuring the activity of N-type calcium channels. In cells expressing 5-HT_{2A} receptor alone, 5-HT (1 μM) already induced a weak inhibition of N-type calcium channels (Figure 5D). This inhibition was more pronounced in cells co-expressing wild type or S⁸⁴³D mGlu₂ receptors, but not in cells co-expressing S⁸⁴³A mGlu₂ receptor (Figure 5D). Reminiscent of their influence upon

Ser⁸⁴³ phosphorylation, both LY341495 and M100907 prevented LY379268- and 5-HT-induced inhibition of N-type calcium channels (Figure 5E). Collectively, these data suggest a reciprocal interplay between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors in engagement of G_{i/o} signaling, which depends on Ser⁸⁴³ phosphorylation.

Discussion

Phosphorylation of GPCRs is classically considered as a mechanism initiating receptor desensitization and β -arrestin-dependent receptor internalization following sustained agonist exposure (32). More recently, subtle modifications of GPCR phosphorylation at specific sites have emerged as key molecular substrates that determine the nature of GPCR-operated signaling, depending on the ligand (functional selectivity) or the cell type, that can be tailored to meet a specific physiological function (33–38). It has also been suggested that GPCR heteromerization can influence the phosphorylation status of the different heteromer constituents, which in turn modulates signaling and physiological outcome of the heteromer. For instance, a recent study has shown that the RF-amide peptide NPFF, by acting at NPFF₂ receptors, induces a transphosphorylation of Mu-opioid receptor within Mu/NPFF₂ heteromers, a process responsible for a loss of function of Mu receptors and contributing to the tolerance to morphine analgesia induced by NPFF (39). These observations highlight the functional and physiological impact of GPCR phosphorylation within heterocomplexes and underscore the potential of deciphering the phosphorylation events on each subunit of GPCR heteromers to elucidate the mechanism of action of psychotropic drugs. They provided the impetus for the present phosphoproteomics screen aimed at characterizing the influence of 5-HT_{2A} receptor expression and stimulation upon mGlu₂ receptor phosphorylation pattern.

We identified three (Ser⁸³³, Ser⁸⁴³ and Ser⁸⁷¹) out of the 12 putative phosphorylated residues (Ser¹⁰⁹, Ser¹¹¹, Ser²⁴⁶, Thr⁴⁵⁷, Ser⁵⁰¹, Tyr⁷³⁴, Tyr⁷⁴⁵, Tyr⁷⁴⁹, Thr⁸³², Ser⁸³³, Ser⁸⁴³ and Ser⁸⁷¹) referenced in the PhosphoSitePlus database (<http://www.phosphosite.org>) and two previously not described phosphorylated sites (Ser⁷¹⁸ and Ser⁸³⁷) in human mGlu₂ receptor co-expressed with 5-HT_{2A} receptor in HEK-293 cells challenged with a mGlu₂ receptor agonist. The absence of manual inspection of MS/MS spectra pinpointing the phosphorylated sites referenced in the PhosphoSitePlus database suggests that the majority of the previously described sites are actually not fully validated, though one cannot rule out

that the difference between our results and the previously reported ones might reflect the distinct biological samples and experimental conditions used.

Among the five sites identified in the present study, only the phosphorylation of a serine residue (Ser⁸⁴³) located in the receptor C-terminal domain and conserved in the human and rat sequences was up-regulated upon agonist receptor stimulation. Moreover, Ser⁸⁴³ phosphorylation depended on the co-expression of 5-HT_{2A} receptor. Likewise, phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ elicited in mice prefrontal cortex by peripheral administration of the mGlu₂ receptor agonist LY379268 (assessed by immunohistochemistry using a newly-generated phospho-Ser⁸⁴³ antibody) was not seen in 5-HT_{2A}^{-/-} mice. This result indicates that the joint influence of 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors upon Ser⁸⁴³ phosphorylation can be observed on both recombinant receptors and native receptors expressed in prefrontal cortex, a brain structure co-expressing both receptors and important for the behavioral responses to 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptor ligands (9,40). Intriguingly, 5-HT_{2A} receptor stimulation by 5-HT promoted Ser⁸⁴³ phosphorylation as efficiently as that induced by mGlu₂ receptor stimulation, reminiscent of the transphosphorylation of Mu-opioid receptor elicited by NPF receptor activation (39). Moreover, Ser⁸⁴³ phosphorylation induced by 5-HT (or the synthetic 5-HT_{2A} receptor agonist DOI) was impaired by the mGlu₂ receptor antagonist LY341495, while the LY379268-induced effect was prevented by the 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907, thus demonstrating a positive reciprocal influence of both receptor activities upon mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ in HEK-293 cells and mice prefrontal cortex. Notably, the LY379268-induced Ser⁸⁴³ phosphorylation depends on both G_{i/o} and G_q activation, whereas the 5-HT-induced response is only G_q-dependent. Collectively, these findings suggest that Ser⁸⁴³ phosphorylation can result from two types of allosteric modulation exerted by different active conformations of the 5-HT_{2A} receptor within heteromers: i) an allosteric modulation by unliganded (constitutively active) 5-HT_{2A} receptor of agonist-stimulated mGlu₂ receptor (bound to activated G_{i/o} protein) and ii) an allosteric modulation by 5-HT-stimulated 5-HT_{2A} receptor that is independent of mGlu₂ receptor

stimulation by its own agonist and of $G_{i/o}$ protein activation. However, one cannot rule out that 5-HT_{2A} receptor-dependent Ser⁸⁴³ phosphorylation can also be induced indirectly, *via* a 5-HT_{2A} receptor-operated $G_{q/11}$ signaling pathway. Irrespective of the mechanism underlying Ser⁸⁴³ phosphorylation, our results identify a novel functional crosstalk mechanism between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors at the receptor level. The demonstration of this crosstalk in mouse prefrontal cortex strongly supports the co-localization of at least a fraction of both receptors expressed in this brain area and, possibly, the formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers *in vivo*.

The difference in signal transduction elicited by hallucinogenic and non-hallucinogenic agonists of the 5-HT_{2A} receptor represents one of the best characterized examples of functional selectivity translated into distinct behaviors (21,41). Furthermore, we previously showed that the two categories of 5-HT_{2A} receptor agonists differ in their capacities to promote 5-HT_{2A} receptor phosphorylation at Ser²⁸⁰ (14). Such a biased phosphorylation was not retrieved for Ser⁸⁴³: treatment of cells with the hallucinogenic agonist DOI and the non-hallucinogenic agonist lisuride induced comparable increases in Ser⁸⁴³ phosphorylation to that elicited by 5-HT. It is thus unlikely that Ser⁸⁴³ phosphorylation underlies the distinct behavioral responses induced by both ligand categories.

Among the two kinases possibly involved in Ser⁸⁴³ phosphorylation suggested by the GPS algorithm, namely CK1 and PKA, our data based on pharmacological inhibitors and CK1 expression silencing suggest that this phosphorylation is mediated by CK1. This contrasts with previous findings, which demonstrated that Ser⁸⁴³ can be phosphorylated *in vitro* by PKA or following a treatment of cells expressing recombinant mGlu₂ receptor with the adenylyl cyclase activator forskolin or cell-permeable cAMP analogs. Hence, CK1 rather than PKA seems to be involved in the more physiological context of agonist mGlu₂ receptor stimulation in cells co-expressing 5-HT_{2A} receptors, consistent with the canonical coupling of mGlu₂ receptors to $G_{i/o}$ proteins and their ability to inhibit rather than stimulate cAMP production (42). CK1 activity generally depends on its expression level or the expression of

regulators, which are likely not affected by acute extracellular stimuli (43,44). In light of the well-established formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ heteromers, at least in recombinant cells (9, 34), we hypothesize that Ser⁸⁴³ might be accessible for CK1 only in a mGlu₂ receptor conformation stabilized by its association with 5-HT_{2A} receptor and agonist stimulation of either mGlu₂ or 5-HT_{2A} receptor within the heterocomplex.

Consistent with the localization of Ser⁸⁴³ in mGlu₂ receptor C-terminal domain, a region important for coupling to G proteins, several lines of evidence suggest that its phosphorylation is an essential step in engagement of G_{i/o} signaling not only upon mGlu₂ receptor activation but also following 5-HT_{2A} receptor activation in cells co-expressing both receptors: *i*) corroborating previous findings indicating that heteromeric assembly of mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors enhances glutamate-elicited G_{i/o} signaling (11), co-expression of 5-HT_{2A} receptor with mGlu₂ receptor enhanced LY379268-induced inhibition of N-type channels (used as readout of activation of G_{i/o}-dependent signaling) (30,31), an effect suppressed by mutating Ser⁸⁴³ into alanine; *ii*) reminiscent of their influence upon Ser⁸⁴³ phosphorylation, the 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 prevented enhancement of LY379268-induced inhibition of N-type channels induced by the co-expression of 5-HT_{2A} receptor, while the mGlu₂ receptor antagonist LY341495 blocked the 5-HT-evoked response. These findings thus identify Ser⁸⁴³ phosphorylation as a novel molecular substrate underlying the functional crosstalk between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors, which determines the level of G_{i/o} signaling under the control of both receptors. It has been proposed that the balance between G_{i/o} and G_q-dependent signaling determines pro-psychotic vs. antipsychotic activity of 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors ligands (11). Given the critical influence of Ser⁸⁴³ phosphorylation level on mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptor-dependent G_{i/o} signaling, its fine-tuning might be an essential mechanism contributing to the homeostatic balance that ensures a normal non-psychotic state.

In conclusion, the present study identifies Ser⁸⁴³ phosphorylation as an early molecular substrate of the functional crosstalk between 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors that determines

the level of $G_{i/o}$ signaling under the control of both receptors, which itself might be predictive of antipsychotic or pro-psychotic effects of drugs targeting each receptor. Accordingly, the anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody developed in this study might be a relevant tool for the screening of potential antipsychotic drugs in preclinical models of schizophrenia. Several studies also reported changes in 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors densities in patients with schizophrenia, which might contribute to the pathogenicity of the disease (9,12,46). Though the data show some discrepancies and must be considered cautiously due to the potential impact of antipsychotic drug treatment on 5-HT_{2A} receptor expression, the majority of post-mortem studies demonstrate a decrease in cortical 5-HT_{2A} receptor density in patients. In line with these findings and the strong influence of 5-HT_{2A} receptor expression/stimulation on Ser⁸⁴³ phosphorylation, analysis of its phosphorylation status in post-mortem brain of patients with schizophrenia might be of great interest.

Acknowledgements

Funding: This work was supported by grants from la Fondation pour la Recherche Médicale, ANR (Contract n° ANR-08-MNPS-0011), CNRS, INSERM and University of Montpellier to PM and FV. EB is supported by the LABEX Ion Channel Science and Therapeutics (ICST). Mass spectrometry experiments were carried out using facilities of the Functional Proteomic Platform of Montpellier Languedoc-Roussillon. SM was a recipient of a fellowship from the French Ministry for Research.

Author Contributions: SM performed biochemical and electrophysiology experiments, some LC-MS/MS analyses and participated in manuscript writing. MB and JC performed some biochemical experiments and LC-MS/MS analyses. PM conceived the study, supervised experiments and wrote the manuscript. FV conceived the study, performed LC-MS/MS analyses and some biochemical experiments, supervised experiments and wrote the manuscript. JB conceived the study and participated in manuscript writing. EB supervised electrophysiology experiments. GK and EK extracted and purified FR900359 from *Ardisia crenata* plant. GB and FN participated in experiments on mGlu₂^{-/-} mice.

Competing interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Supplementary information is available at MP's website.

References

1. Gray JA, Roth BL. Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2007 Sep;33(5):1100–19.
2. Meltzer HY, Massey BW, Horiguchi M. Serotonin receptors as targets for drugs useful to treat psychosis and cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jun;13(8):1572–86.
3. Keefe RSE, Bilder RM, Davis SM, Harvey PD, Palmer BW, Gold JM, et al. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry.* 2007 Jun;64(6):633–47.
4. Ellaithy A, Younkin J, González-Maeso J, Logothetis DE. Positive allosteric modulators of metabotropic glutamate 2 receptors in schizophrenia treatment. *Trends Neurosci.* 2015 Aug;38(8):506–16.
5. Gibert-Rahola J, Villena-Rodriguez A. Glutamatergic drugs for schizophrenia treatment. *Actas Esp Psiquiatr.* 2014 Oct;42(5):234–41.
6. Fell MJ, McKinzie DL, Monn JA, Svensson KA. Group II metabotropic glutamate receptor agonists and positive allosteric modulators as novel treatments for schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2012 Mar;62(3):1473–83.
7. Kinon BJ, Millen BA, Zhang L, McKinzie DL. Exploratory analysis for a targeted patient population responsive to the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist pomaglumetad methionil in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2015 Dec 1;78(11):754–62.
8. Marek GJ, Wright RA, Schoepp DD, Monn JA, Aghajanian GK. Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine(2A) and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jan;292(1):76–87.

9. González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, et al. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*. 2008 Mar 6;452(7183):93–7.
10. Moreno JL, Miranda-Azpiazu P, García-Bea A, Younkin J, Cui M, Kozlenkov A, et al. Allosteric signaling through an mGlu2 and 5-HT_{2A} heteromeric receptor complex and its potential contribution to schizophrenia. *Sci Signal*. 2016 Jan 12;9(410):ra5.
11. Fribourg M, Moreno JL, Holloway T, Provasi D, Baki L, Mahajan R, et al. Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):1011–23.
12. Delille HK, Mezler M, Marek GJ. The two faces of the pharmacological interaction of mGlu2 and 5-HT_{2A} - relevance of receptor heterocomplexes and interaction through functional brain pathways. *Neuropharmacology*. 2013 Jul;70:296–305.
13. Butcher AJ, Kong KC, Prihandoko R, Tobin AB. Physiological role of G-protein coupled receptor phosphorylation. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(208):79–94.
14. Karaki S, Becamel C, Murat S, Mannoury la Cour C, Millan MJ, Prézeau L, et al. Quantitative phosphoproteomics unravels biased phosphorylation of serotonin 2A receptor at Ser280 by hallucinogenic versus nonhallucinogenic agonists. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2014 May;13(5):1273–85.
15. Schaffhauser H, Cai Z, Hubalek F, Macek TA, Pohl J, Murphy TJ, et al. cAMP-dependent protein kinase inhibits mGluR2 coupling to G-proteins by direct receptor phosphorylation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2000 Aug 1;20(15):5663–70.
16. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol*. 2002 Nov;62(5):971–4.

17. Schrage R, Schmitz A-L, Gaffal E, Annala S, Kehraus S, Wenzel D, et al. The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat Commun.* 2015 Dec 14;6:10156.
18. Bécamel C, Gavarini S, Chanrion B, Alonso G, Galéotti N, Dumuis A, et al. The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):20257–66.
19. Gaillard S, Lo Re L, Mantilleri A, Hepp R, Urien L, Malapert P, et al. GINIP, a Gai-interacting protein, functions as a key modulator of peripheral GABAB receptor-mediated analgesia. *Neuron.* 2014 Oct 1;84(1):123–36.
20. Dubois F, Vandermoere F, Gernez A, Murphy J, Toth R, Chen S, et al. Differential 14-3-3 affinity capture reveals new downstream targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2009 Nov;8(11):2487–99.
21. González-Maeso J, Yuen T, Ebersole BJ, Wurmbach E, Lira A, Zhou M, et al. Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2003 Oct 1;23(26):8836–43.
22. Yokoi M, Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T, Sakaguchi I, Katsuura G, et al. Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science.* 1996 Aug 2;273(5275):645–7.
23. Chanrion B, Mannoury la Cour C, Gavarini S, Seimandi M, Vincent L, Pujol J-F, et al. Inverse agonist and neutral antagonist actions of antidepressants at recombinant and native 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors: differential modulation of cell surface expression and signal transduction. *Mol Pharmacol.* 2008 Mar;73(3):748–57.

24. Delille HK, Becker JM, Burkhardt S, Bleher B, Terstappen GC, Schmidt M, et al. Heterocomplex formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ and its relevance for cellular signaling cascades. *Neuropharmacology*. 2012 Jun;62(7):2184–91.
25. Miner L a. H, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Sesack SR. Ultrastructural localization of serotonin_{2A} receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2003;116(1):107–17.
26. Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2008 Sep;7(9):1598–608.
27. Rena G, Bain J, Elliott M, Cohen P. D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep*. 2004 Jan;5(1):60–5.
28. Russo LC, Castro LM, Gozzo FC, Ferro ES. Inhibition of thimet oligopeptidase by siRNA alters specific intracellular peptides and potentiates isoproterenol signal transduction. *FEBS Lett*. 2012 Sep 21;586(19):3287–92.
29. Sealfon SC, Chi L, Ebersole BJ, Rodic V, Zhang D, Ballesteros JA, et al. Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol Chem*. 1995 Jul 14;270(28):16683–8.
30. Chen W-P, Kirchgessner AL. Activation of group II mGlu receptors inhibits voltage-gated Ca²⁺ currents in myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Dec;283(6):G1282-1289.
31. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha₁ subunit. *Nature*. 1997 Jan 30;385(6615):442–6.

32. Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:511–34.
33. Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ. Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:179–97.
34. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, et al. Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci Signal.* 2011 Aug 9;4(185):ra51.
35. Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, et al. Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem.* 2011 Apr 1;286(13):11506–18.
36. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10):7805–17.
37. Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, et al. A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 16;104(42):16657–62.
38. Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Aug;29(8):413–20.
39. Moulédous L, Froment C, Dauvillier S, Burlet-Schiltz O, Zajac J-M, Mollereau C. GRK2 protein-mediated transphosphorylation contributes to loss of function of μ -opioid receptors induced by neuropeptide FF (NPFF2) receptors. *J Biol Chem.* 2012 Apr 13;287(16):12736–49.

40. Moreno JL, Holloway T, Albizu L, Sealfon SC, González-Maeso J. Metabotropic glutamate mGlu2 receptor is necessary for the pharmacological and behavioral effects induced by hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists. *Neurosci Lett*. 2011 Apr 15;493(3):76–9.
41. González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, et al. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron*. 2007 Feb 1;53(3):439–52.
42. Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, et al. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*. 2011 Jun;60(7–8):1017–41.
43. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*. 2005 Jun 1;17(6):675–89.
44. Yang Y, Xu T, Zhang Y, Qin X. Molecular basis for the regulation of the circadian clock kinases CK1 δ and CK1 ϵ . *Cell Signal*. 2017 Feb 1;31:58–65.
45. El Moustaine D, Granier S, Doumazane E, Scholler P, Rahmeh R, Bron P, et al. Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16342–7.
46. Dean B. The cortical serotonin_{2A} receptor and the pathology of schizophrenia: a likely accomplice. *J Neurochem*. 2003 Apr;85(1):1–13.

Figure legends

Figure 1. Agonist-stimulated mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ requires co-expression of 5-HT_{2A} receptor in HEK-293 cells and mouse prefrontal cortex. **A**, Schematic overview of the position of phosphorylated residues identified by MS/MS in human mGlu₂ receptor. **B**, Sequence alignment of the receptor region containing Ser⁸⁴³ in human, mouse and rat mGlu₂ orthologs. Note that Ser⁸⁴³ is conserved in the three orthologs, while Ser⁸⁴⁴ in the human receptor is replaced by an alanine in murine orthologs. The sequences in bold correspond to peptides identified by MS/MS. **C**, HEK-293 cells transiently expressing human or rat mGlu₂ receptor in the absence or presence of 5-HT_{2A} receptor were exposed to vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM) for 15 min. The histograms represent the means ± SEM of ion signal intensities (expressed in % of signal intensity measured in cells co-expressing mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors and treated with LY379268) measured in three replicates. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3,12)=14.91, p=0.0002 and F(3,8)=5.558, p=0.0234, in cells expressing human and rat mGlu₂, respectively. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. **D**, Wild type, 5-HT_{2A}^{-/-} and mGlu₂^{-/-} mice were injected with either vehicle or LY379268 (10 mg/kg, i.p) for 30 min. LY341495 (3 mg/kg i.p.) was injected 15 min before vehicle/LY379268 administration. Representative images showing phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ immunofluorescent staining in prefrontal cortex are illustrated. The histogram shows the mean ± SEM of values (expressed in % of anti-phospho-Ser⁸⁴³-positive cells relative to DAPI-stained cells) obtained in four animals per group. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(5,18)=8.967, p=0.0002. *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001. Scale bar: 100 μm. ns: not significant.

Figure 2. 5-HT_{2A} receptor-dependent phosphorylation of Ser⁸⁴³ elicited by LY379268 is mediated by casein kinase 1. **A**, HEK-293 cells co-expressing rat Flag-tagged mGlu₂ and HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were pre-incubated with either vehicle or the CK1 inhibitor (D4476, 10 μM) or the PKA inhibitor (KT5720, 1 μM) for 60 min and then challenged with vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM) for 15 min. **B**, HEK-293 cells co-expressing Flag-tagged

rat mGlu₂ and HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were transfected with either control or CK1ε siRNA and challenged for 15 min with vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM). Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by sequential immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means ± SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.) obtained in the three experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): A, F(5,12)=10.23, p=0.0005. B, F(3,8)=8.114, p=0.0082. *p<0.05, **p<0.01 vs. corresponding vehicles. ns: not significant.

Figure 3. Potentiation of mGlu₂ receptor-operated G_{i/o} signaling elicited by 5-HT_{2A} receptor expression depends on Ser⁸⁴³ phosphorylation. **A**, Schematic overview of N-type calcium channel inhibition elicited upon activation of G_{i/o}-coupled receptors. **B**, Left panel: representative current traces obtained in response to vehicle (open circles) or 1 μM LY379268 (filled circles) in HEK-293 cells expressing Flag-tagged wild type mGlu₂ receptor alone or in combination with HA-tagged 5-HT_{2A} receptor. Right panel: HEK-293 cells, transiently expressing Flag-tagged wild type mGlu₂ receptor alone or in combination with HA-tagged 5-HT_{2A} receptor, were exposed to increasing concentrations of LY379268. Each point represents the means ± SEM of percentage of N-type calcium channel current inhibition measured in 10 cells from three different sets of cultured cells. **C**, Left panel: cells, expressing Flag-tagged mGlu₂ receptor alone or co-expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptor and either wild type or S⁸⁴³A or S⁸⁴³D Flag-tagged mGlu₂ receptor, were exposed to 1 μM LY379268. Right panel: HEK-293 cells, expressing Flag-tagged mGlu₂ receptor alone or co-expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptor and either wild type or S⁸⁴³D mGlu₂ receptor, were treated with vehicle or D4476 (10 μM, delivered *via* the patch pipette 5 min before the LY379268 challenge). Representative traces of N-type calcium channel currents in conditions not depicted in B are illustrated. Histograms represent the means ± SEM of N-

type calcium channel current inhibition induced by LY379268 in 10 cells from three independent cultures. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): $F(3,36)=16.94$, $p<0.0001$; $F(5,54)=17.15$, $p<0.0001$ in left and right panels, respectively. *** $p<0.001$.

Figure 4. 5-HT_{2A} receptor stimulation promotes phosphorylation of mGlu₂ at Ser⁸⁴³ in HEK-293 cells and mouse prefrontal cortex. **A**, HEK-293 cells co-expressing Flag-tagged mGlu₂ receptor and HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were exposed to vehicle or 5-HT (1 μ M, 15 min) in the absence or presence of M100907 (100 nM). **B**, Cells were exposed to either vehicle or 5-HT (1 μ M), or DOI (10 μ M) or lisuride (10 μ M) in the absence or presence of LY379268 (1 μ M) for 15 min. Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by sequential immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and the anti-Flag antibody. In A and B, representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means \pm SEM of anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units) obtained in the three experiments. A, One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): $F(2,6)=16.63$, $p<0.0036$. B, One-way ANOVA (Post-hoc: Dunnett's range test): $F(6,14)=7.779$, $p<0.0008$. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0,001$ vs. Vehicle. § $p<0.05$ vs. 5-HT. **C**, Wild type mice were injected with either vehicle or DOI (10 mg/kg, i.p) or lisuride (10 mg/kg, i.p). mGlu₂^{-/-} mice were injected with DOI (10 mg/kg, i.p). M100907 (5 mg/kg, i.p.) was injected 15 min before vehicle/DOI administration. Representative images showing phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ immunofluorescent staining in prefrontal cortex are illustrated. The histogram shows the mean \pm SEM of values (expressed in % of anti-phospho-Ser⁸⁴³-positive cells relative to DAPI-stained cells) obtained in four animals per group. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): $F(4,15)=33.62$, $p<0.0001$. *** $p<0.001$. Scale bar: 100 μ m.

Figure 5. Reciprocal influence of mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptor stimulation upon G_{io} signaling depends on Ser⁸⁴³ phosphorylation. **A**, HEK-293 cells co-expressing Flag-tagged mGlu₂ receptor and HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were exposed to vehicle or 5-HT (1 μM), alone or in combination with LY341495 (10 μM), or to LY341495 alone (10 μM) for 15 min. **B**, HEK-293 cells co-expressing Flag-tagged mGlu₂ receptor and HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were exposed for 15 min to vehicle or LY379268 (10 nM), in the absence or presence of M100907 (100 nM). In A and B, mGlu₂ receptor phosphorylation was analyzed by sequential immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody and the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means ± SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.) obtained in the three experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3,8)=22.49, p=0.0003 and F(3,8)=28.97, p=0.0001 in A and B, respectively. **p<0.01, ***p<0.001. **C**, Mice were injected with either DOI (10 mg/kg, i.p), LY379268 (10 mg/kg, i.p), M100907 (5 mg/kg, i.p.) and LY341495 (3 mg/kg, i.p.) were injected 15 min before vehicle/LY379268/DOI administration. Representative images showing phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ immunofluorescent staining in prefrontal cortex are illustrated. The histogram shows the mean ± SEM of values (expressed in % of anti-phospho-Ser⁸⁴³-positive cells relative to DAPI-stained cells) obtained in four animals per group. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(5,18)=24.57, p<0.0001. ***p<0.001. Scale bar: 100 μm. **D**, HEK-293 cells, transiently expressing 5-HT_{2A} receptor alone or in combination with either wild type or S⁸⁴³A or S⁸⁴³D mGlu₂ receptor, were exposed to 1 μM 5-HT. Representative traces of N-type calcium channel currents obtained after exposure to vehicle or 5-HT are shown. The histograms represent the means ± SEM of N-type calcium channel current inhibition measured for each treatment in 10 cells originating from three independent cultures. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3,36)=13.45, p<0.0001. ***p<0.001. **E**, Left panels: HEK-293 cells co-expressing 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors were sequentially challenged with LY379268 (10 nM), LY341495 (10 μM) and LY379268 + LY341495 or with 5-HT (1 μM), M100907 (100 nM) and 5-HT +

M100907. Right panels: cells were sequentially challenged with LY3792968, M100907 and LY3792968 + M100907 or with 5-HT, LY341495 and 5-HT + LY341495. Representative traces of N-type calcium channel currents obtained after 5-HT or LY3792968 challenges (in absence or presence of M100907 or LY341495) are illustrated. The histograms represent the means \pm SEM of N-type calcium channel current inhibition measured for each condition in 10 cells originating from three independent cultures. Note that M100907 or LY341495 alone did not alter the N-type calcium channel current. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): $F(3,36)=89.9$, $p<0.0001$; $F(3,36)=78.18$, $p<0.0001$ in left and right panels, respectively. *** $p<0.001$.

Modified sequence	Species	Start-end	Experimental m/z (Th)	Theoretical mass (Da)	Δ mass (ppm)	Mascot score	Phosphorylation site occupancy index			
							mGlu ₂		mGlu ₂ + 5-HT _{2A}	
							Vehicle	LY37	Vehicle	LY37
REVVt ⁷¹⁸ LR + Phospho (ST)	Human	714-720	477,2515	951,4903	-5,40	23	0,059 ± 0.03	0,057 ± 0.03	0,028 ± 0.02	0,042 ± 0.02
APTs ⁸³³ RFGs ⁸³⁷ AAAR + 2 Phospho (ST)	Human	830-841	676,2813	1350,5482	-0,18	31	0,222 ± 0.10	0,237 ± 0.12	0,228 ± 0.10	0,276 ± 0.10
AS ⁸⁴³ S ⁸⁴⁴ SLGQGSGSQFVPTVCNGR + Phospho (ST)	Human	842-862	1088,476	2174,9416	-1,93	136	0,004 ± 0.001	0,010 ± 0.001	0,006 ± 0.0007	0,025 ± 0.004***
EVVDSTTs ⁸⁷¹ L + Phospho (ST)	Human	863-872	559,2383	1116,4588	2,9	53	0,052 ± 0.02	0,041 ± 0.01	0,052 ± 0.01	0,047 ± 0.003
As ⁸⁴³ ANLGQSGSQFVPTVCNGR + Phospho (ST)	Rat	842-862	1093,9878	2185,9576	1,57	60	0,040 ± 0.01	0,041 ± 0.01	0,032 ± 0.01	0,112 ± 0.02*

Table 1. List of phosphorylated peptides identified from purified mGlu₂ receptors by nano-LC-MS/MS. HEK-293 cells transiently expressing human or rat Flag-tagged mGlu₂ receptor, with or without HA-tagged 5-HT_{2A} receptor, were exposed to either Vehicle or LY379268 (1 μ M, 15 min). Solubilized receptors were immunoprecipitated with the anti-Flag M2 antibody, resolved by SDS-PAGE and digested in-gel with trypsin. Peptides were analyzed by nano-LC-MS/MS using multistage activation on the neutral loss of phosphoric acid. MS/MS spectra were manually interpreted. For each peptide, the position of modified residue(s), the position in the protein sequence, experimental mass/charge, theoretical mass, mass deviation, Mascot score, and relative abundance compared with the non-phosphorylated peptide (site occupancy index: maximal intensity observed in the phosphorylated peptide extracted ion chromatogram/sum of the maximal intensities observed in the phosphorylated and the non-phosphorylated peptide extracted ion chromatograms) are indicated. The data are the means of values calculated from three independent experiments performed on different sets of cultured cells. *p<0.05, *** p<0.001 vs. corresponding vehicles.

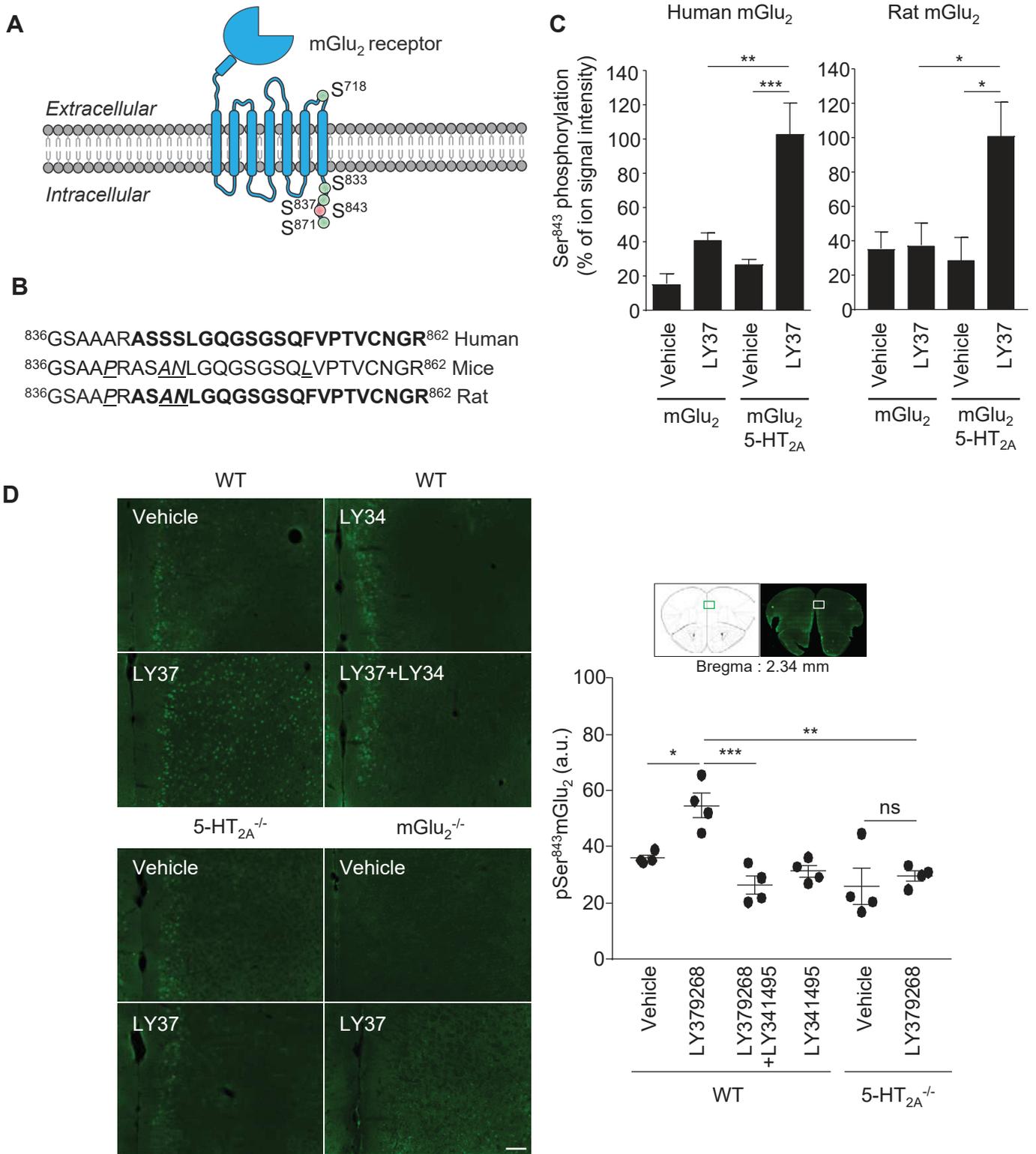


Figure 1

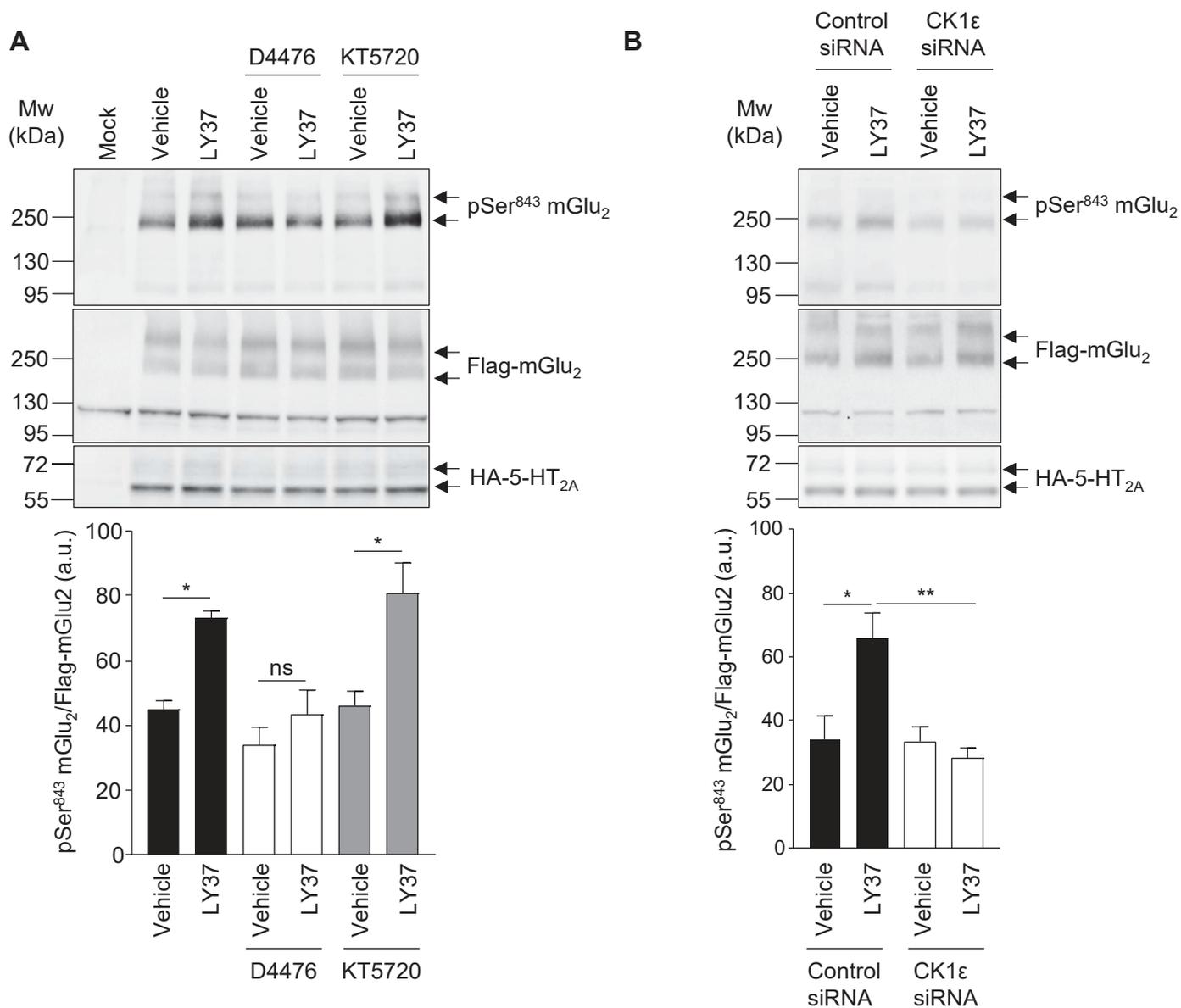


Figure 2

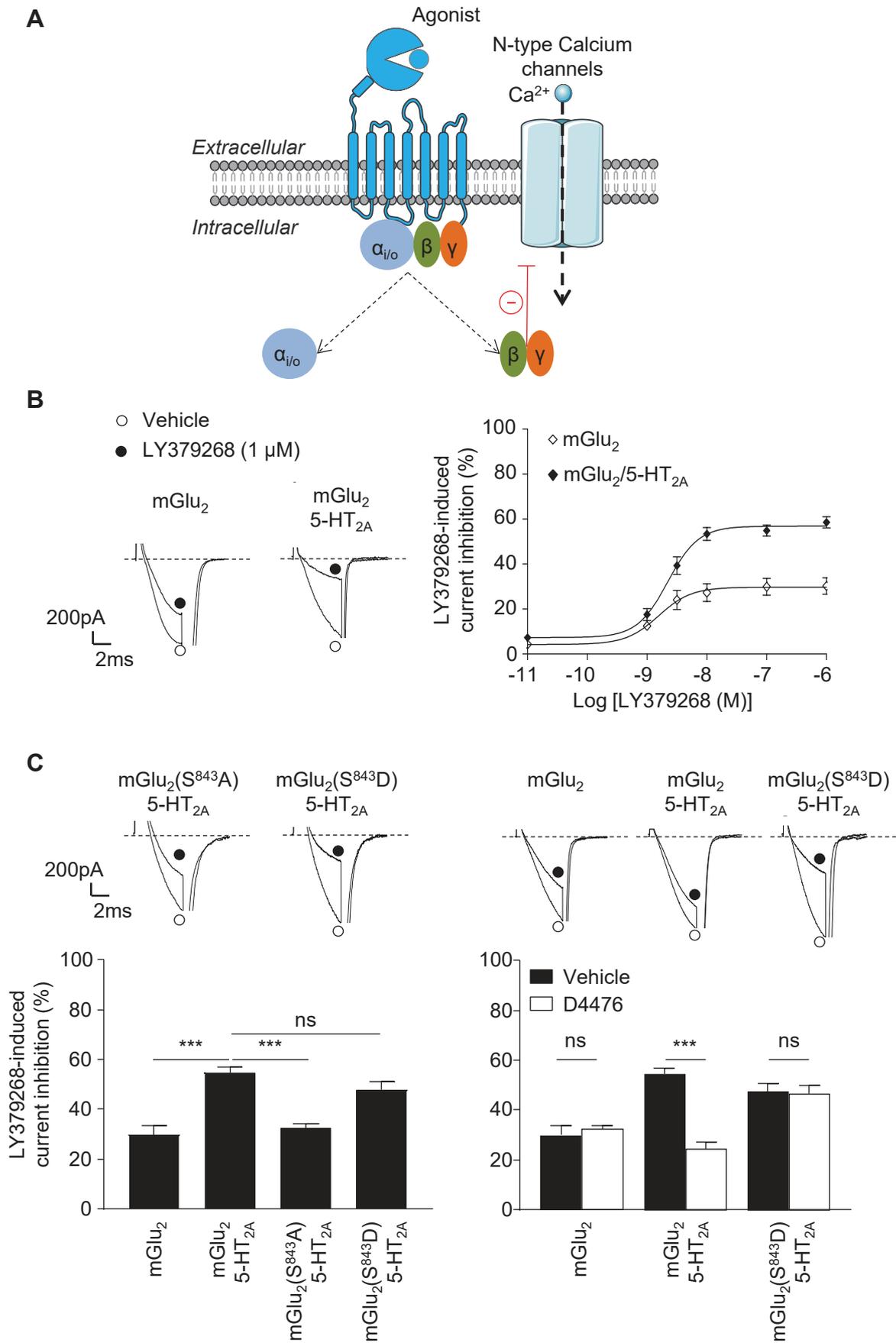


Figure 3

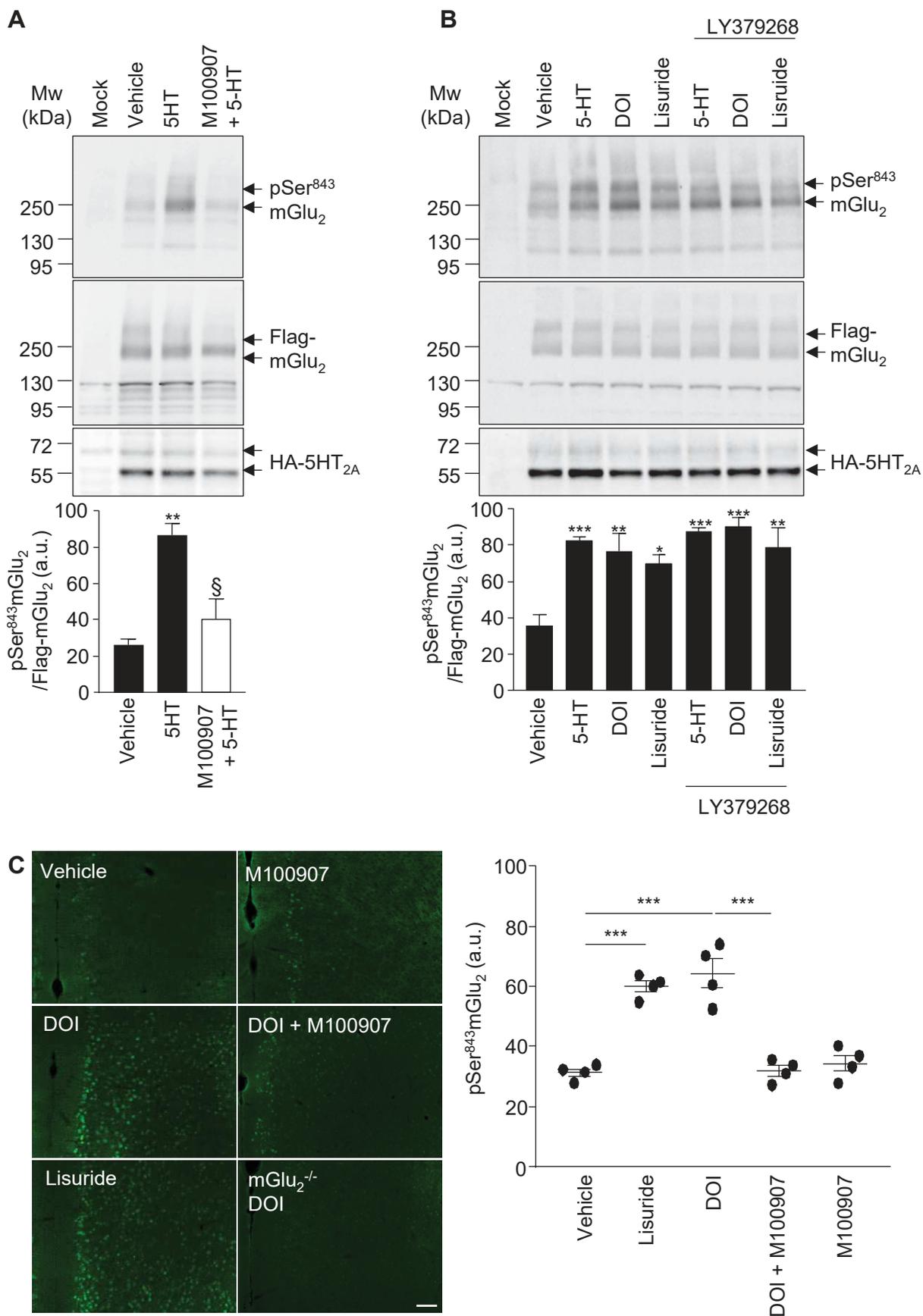


Figure 4

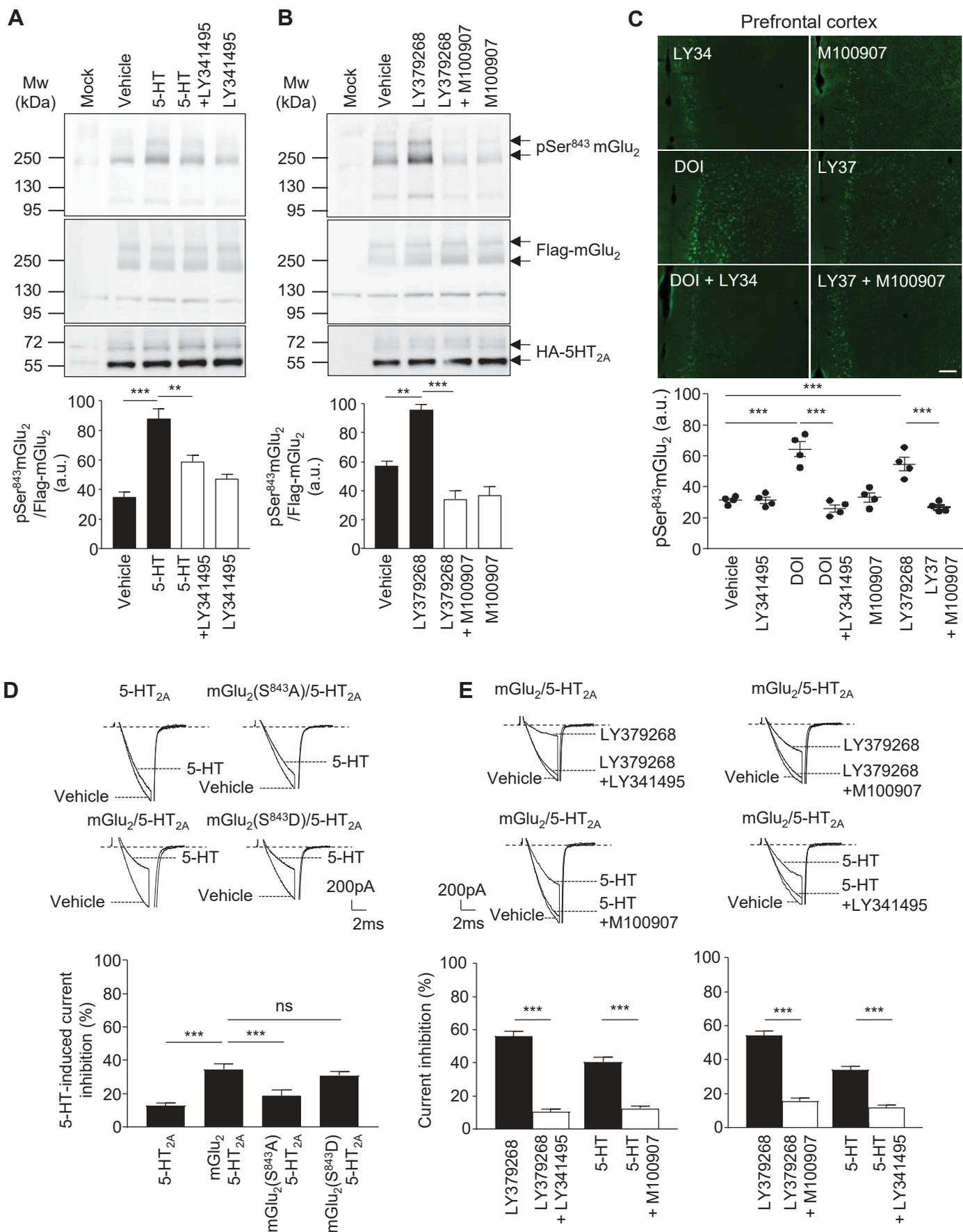


Figure 5

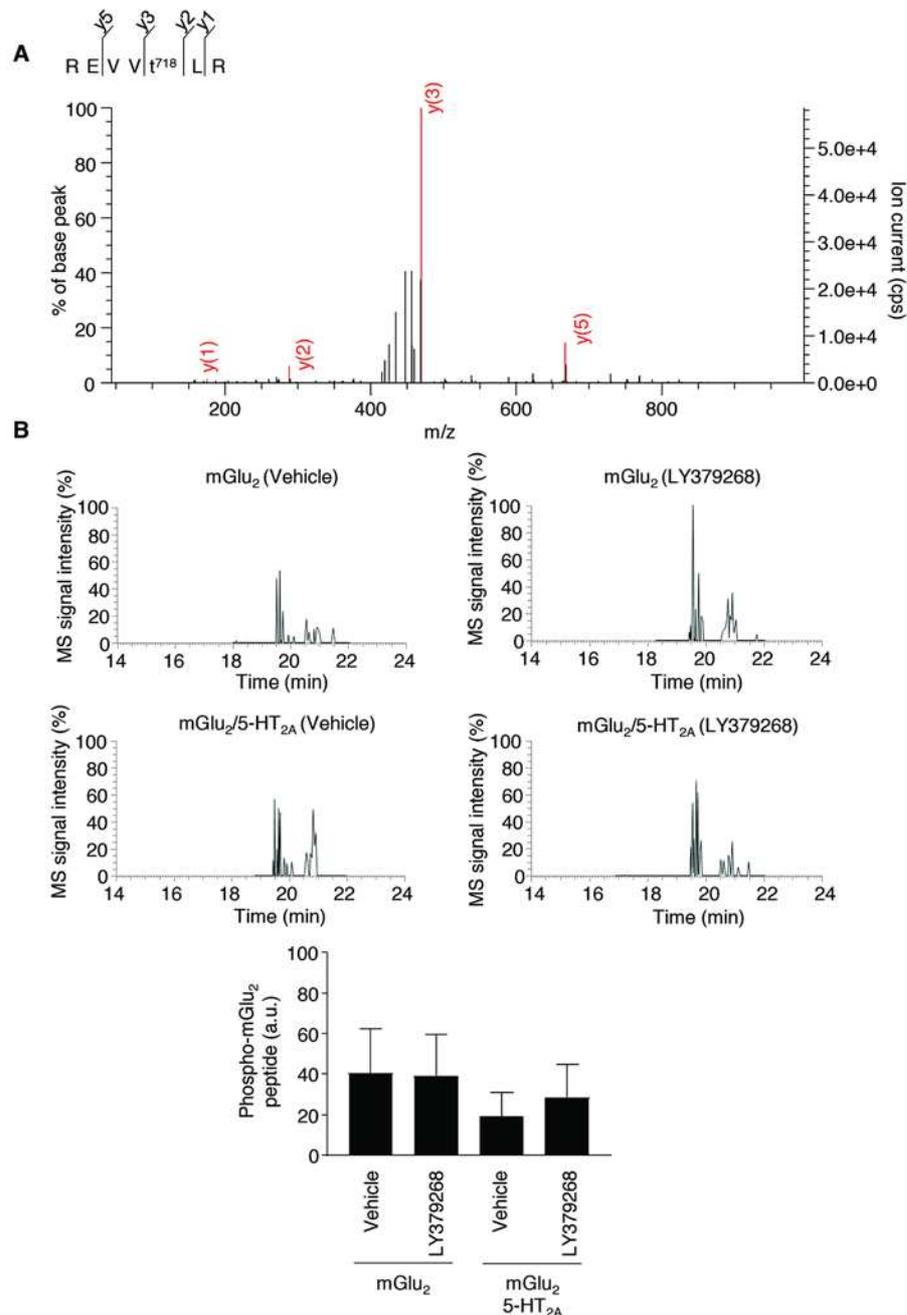
mGlu₂ receptor coverage (Human) : 57% (exp pvalue cut off <0.05)

1	MGSLALLAL	LLLWGAVAEG	PAKKVLTLEG	DLVLGGLFPV	HQKGGPAEDC
51	GPVNEHRGIQ	RLEAMLFALD	RINRDPHLLP	GVRLGAHILD	SCSKDTHALE
101	QALDFVRASL	SRGADGSRHI	CPDGSYATHG	DAPTAITGVI	GGSYSDVSIQ
151	VANLLRLFQI	PQISYASTSA	KLSDKSRDYD	FARTVPPDF	QAKAMAEILR
201	FFNWTYVSTV	ASEGDYGETG	IEAFELEARA	RNICVATSEK	VGRAMSRAAF
251	EGVVRALLQK	PSARVAVLFT	RSEDARELLA	ASQRLNASFT	WVASDGGWAL
301	ESVVGSEGA	AEGAITIELA	SYPISEFASY	FQSLDPWNNS	RNPWFREFWE
351	QRFRCFSFRQR	DCAAHSLRAV	PFEQESKIMF	VVNAVYAMAH	ALHNMHRALC
401	PNTRRLCDAM	RPVNGRRLYK	DFVLNVKFDA	PFRPADTHNE	VRFDKDFDGI
451	GRYNIFTYLR	AGSGRYRYQK	VGWAEGLTL	DTSLIPWASP	SAGPLPASRC
501	SEPCLQNEVK	SVQPGEVCCW	LCIPCQPYEY	RLDEFTCADC	GLGYWPNASL
551	TGCFELPQEY	IRWGDAAVAVG	PVTIACLGAL	ATLFVLGVFV	RHNATPVVKA
601	SGRELCYILL	GGVFLCYCMT	FIFIAKPSTA	VCTLRRLGLG	TAFSVCYSAL
651	LTKTNRIARI	FGGAREGAQR	PRFISPASQV	AICLALISGQ	LLIVVAWLTV
701	EAPGTGKETA	PERREVV ⁷¹⁸ LR	CNHRDASMLG	SLAYNVLLIA	LCTLYAFKTR
751	KCPENFNEAK	FIGFTMYTTC	IWLAFPIF	YVTSSDYRVQ	TTTMCVSVSL
801	SGSVVLGCLF	APKLHILFQ	PQKNVVSRA	PT ^{S833} RFG ^{S837} AAA	RA ^{S843} S ^{S844} SLGQGS
851	GSQFVPTVCN	GREVDSTTS	S ⁸⁷¹ L		

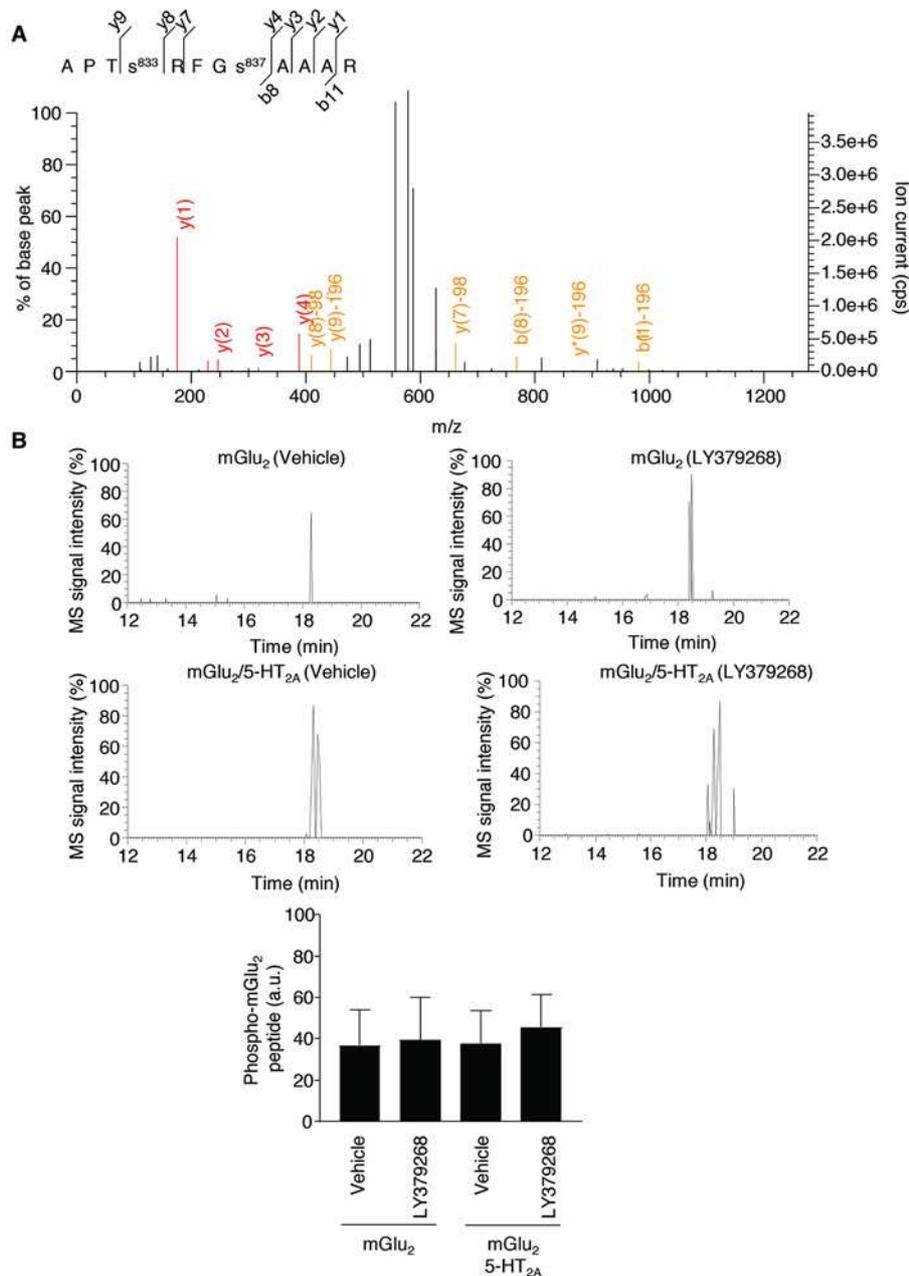
mGlu₂ receptor coverage (Rat) : 40% (exp pvalue cut off <0.05)

1	MESLLGFLAL	LLLWGAVAEG	PAKKVLTLEG	DLVLGGLFPV	HQKGGPAEEC
51	GPVNEHRGIQ	RLEAMLFALD	RINRDPHLLP	GVRLGAHILD	SCSKDTHALE
101	QALDFVRASL	SRGADGSRHI	CPDGSYATHS	DAPTAITGVI	GGSYSDVSIQ
151	VANLLRLFQI	PQISYASTSA	KLSDKSRDYD	FARTVPPDF	QAKAMAEILR
201	FFNWTYVSTV	ASEGDYGETG	IEAFELEARA	RNICVATSEK	VGRAMSRAAF
251	EGVVRALLQK	PSARVAVLFT	RSEDARELLA	ATQRLNASFT	WVASDGGWAL
301	ESVVGSEGA	AEGAITIELA	SYPISEFASY	FQSLDPWNNS	RNPWFREFWE
351	ERFHCSFRQR	DCAAHSLRAV	PFEQESKIMF	VVNAVYAMAH	ALHNMHRALC
401	PNTRRLCDAM	RPVNGRRLYK	DFVLNVKFDA	PFRPADTDE	VRFDKDFDGI
451	GRYNIFTYLR	AGSGRYRYQK	VGWAEGLTL	DTSFIPWASP	SAGPLPASRC
501	SEPCLQNEVK	SVQPGEVCCW	LCIPCQPYEY	RLDEFTCADC	GLGYWPNASL
551	TGCFELPQEY	IRWGDAAVAVG	PVTIACLGAL	ATLFVLGVFV	RHNATPVVKA
601	SGRELCYILL	GGVFLCYCMT	FVFIKPSTA	VCTLRRLGLG	TAFSVCYSAL
651	LTKTNRIARI	FGGAREGAQR	PRFISPASQV	AICLALISGQ	LLIVVAWLTV
701	EAPGTGKETA	PERREVVTLR	CNHRDASMLG	SLAYNVLLIA	LCTLYAFKTR
751	KCPENFNEAK	FIGFTMYTTC	IWLAFPIF	YVTSSDYRVQ	TTTMCVSVSL
801	SGSVVLGCLF	APKLHILFQ	PQKNVVSRA	PTSRFGSAAP	RA ^{S843} ANLGGGS
851	GSQFVPTVCN	GREVDSTTS	S ⁸⁷¹ L		

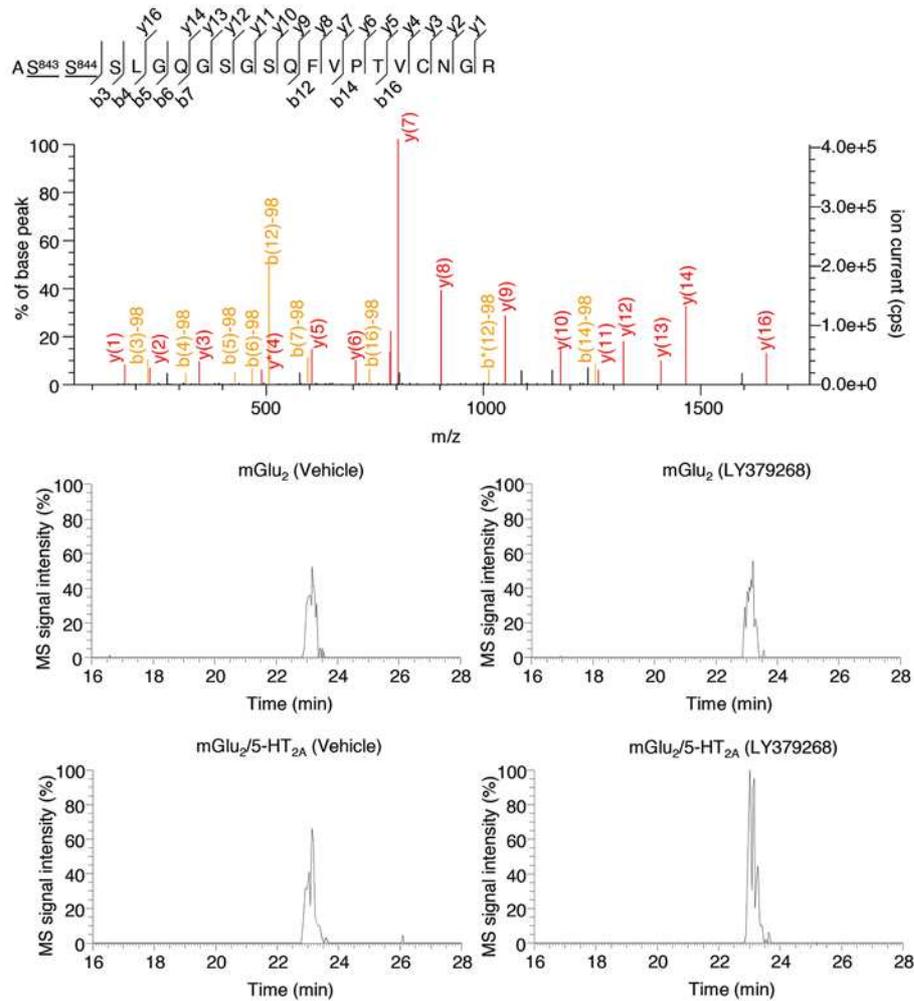
Supplementary Figure 1. Sequence coverage of human and rat mGlu₂ receptors obtained by LC-MS/MS. The sequence covered by LC-MS/MS analysis is highlighted in red. Identified phosphorylated residues in human mGlu₂ receptor (Thr⁷¹⁸, Ser⁸³³, Ser⁸³⁷, Ser^{843/844}, Ser⁸⁷¹) and rat mGlu₂ receptor (Ser⁸⁴³, Ser⁸⁷¹) and their positions are highlighted in blue.



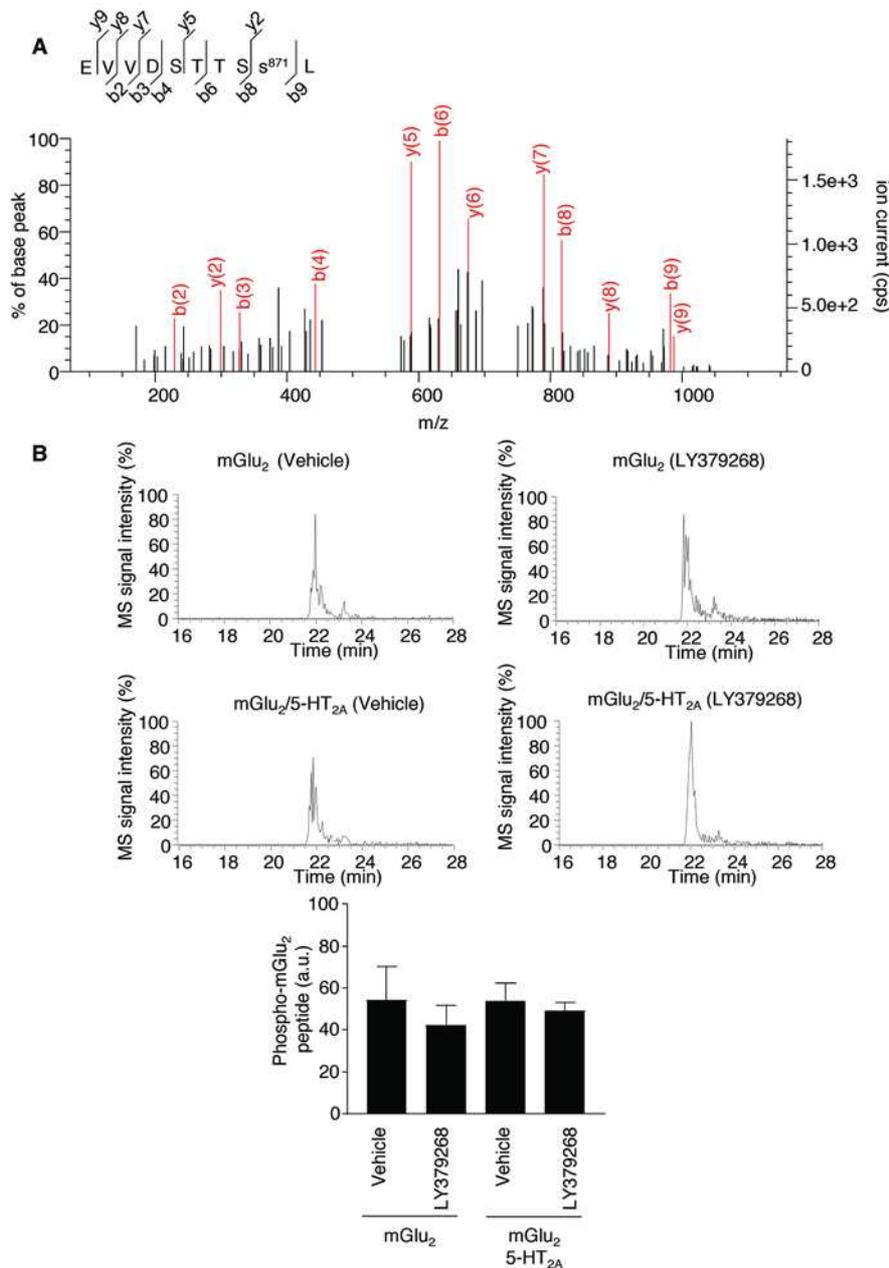
Supplementary Figure 2. Identification and quantification of the REVVt⁷¹⁸LR phosphorylated peptide by LC-MS. **A**, The MS/MS spectrum that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the phosphorylated residue in the full-length human mGlu₂ receptor are illustrated. **B**, Representative extracted ion chromatograms of this peptide in cells expressing mGlu₂ receptor alone or in combination with 5-HT_{2A} receptor, and exposed to either vehicle or LY379268 (1 μM) for 15 min. The histogram represents the means ± SEM of ion signal intensities of REVVt⁷¹⁸LR phosphorylated peptide obtained in three independent experiments performed on independent cultures. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3,12)=0.3072, p=0.8197.



Supplementary Figure 3. Identification and quantification of the APTs⁸³³RFGs⁸³⁷AAAR phosphorylated peptide by LC-MS. **A**, The MS/MS spectrum that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the phosphorylated residue in the full-length human mGlu₂ receptor are illustrated. **B**, Representative extracted ion chromatograms of this peptide in cells expressing mGlu₂ receptor alone or in combination with 5-HT_{2A} receptor, and exposed to either vehicle or LY379268 (1 μM) for 15 min. The histogram represents the means ± SEM of ion signal intensities of APTs⁸³³RFGs⁸³⁷AAAR phosphorylated peptide obtained in three independent experiments performed on independent cultures. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3,12)=0.05346, p=0.9829.



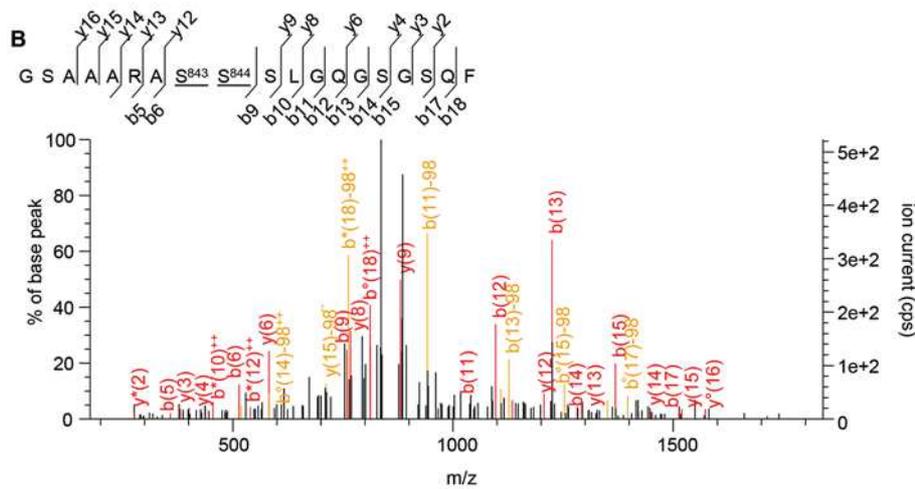
Supplementary Figure 4. Identification and quantification of the AS⁸⁴³S⁸⁴⁴SLGQGSGSQFVPTVCNGR phosphorylated peptide by LC-MS. The MS/MS spectrum that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the phosphorylated residue in the full-length human mGlu₂ receptor are illustrated (top panel). The bottom panels show representative extracted ion chromatograms of the peptide in cells expressing mGlu₂ receptor alone or in combination with 5-HT_{2A} receptor, and exposed to either vehicle or LY379268 (1 μM) for 15 min.



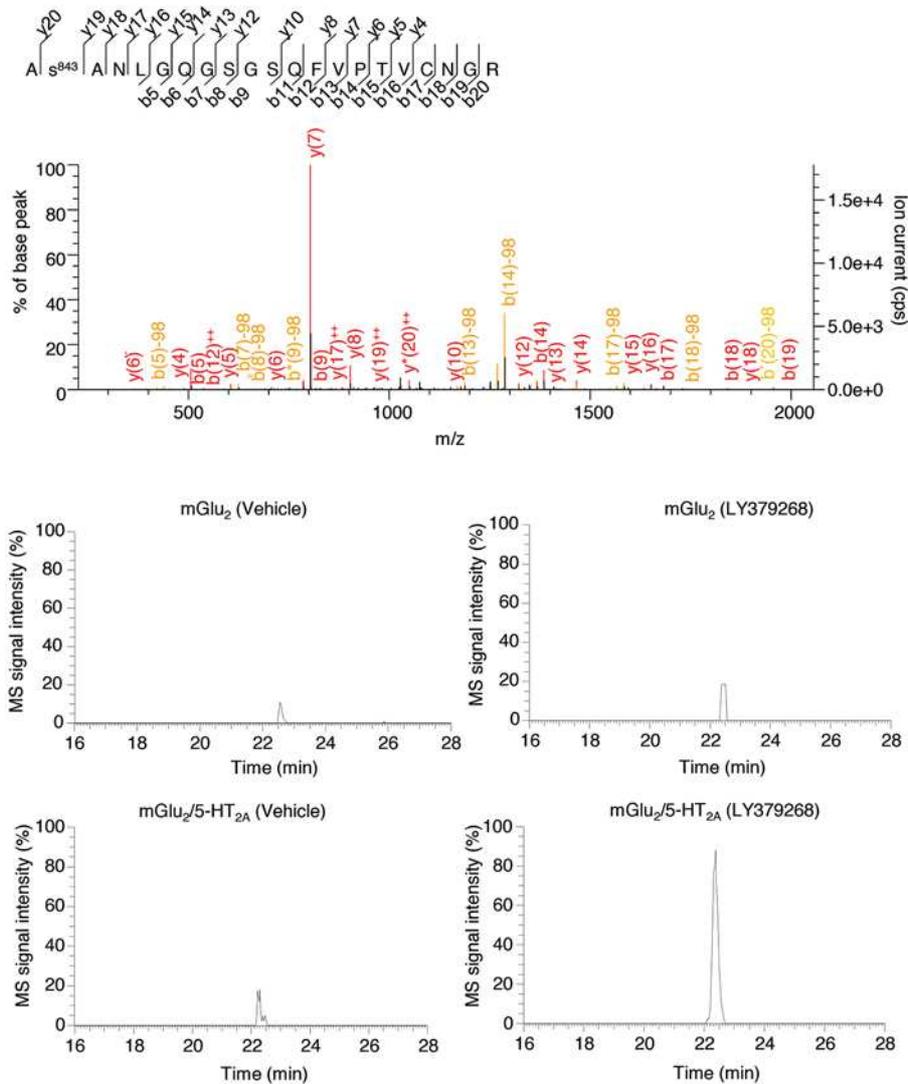
Supplementary Figure 5. Identification and quantification of the EVVDSTTS⁸⁷¹L phosphorylated peptide by LC-MS. A, The MS/MS spectrum that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the phosphorylated residue in the full-length human mGlu₂ receptor are illustrated. **B,** Representative extracted ion chromatograms of this peptide in cells expressing mGlu₂ receptor alone or in combination with 5-HT_{2A} receptor, and exposed to either vehicle or LY379268 (1 μM) for 15 min. The histogram represents the means ± SEM of ion signal intensities of EVVDSTTS⁸⁷¹L phosphorylated peptide obtained in three independent experiments performed on independent cultures. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3,12)=0.2874, p=0.8337.

A mGlu₂ receptor coverage (Human) : 31% (exp pvalue cut off <0.05)

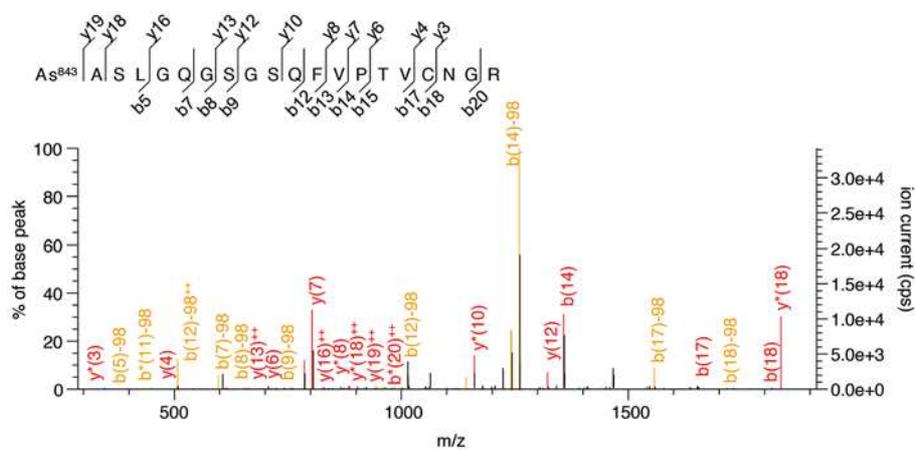
1	MGSLALLAL	LLWGAVAEG	PAKKVLTLEG	DLVLGGLFPV	HQKGGPAEDC
51	GPVNEHRGIQ	RLEAMLFALD	RINRDPHLLP	GVRLGAHILD	SCSKDTHALE
101	QALDFVRASL	SRGADGSRHI	CPDGSYATHG	DAPTAITGVI	GGSYSDVSIQ
151	VANLLRLFQI	PQISYASTSA	KLSDKSRYDY	FARTVPPDFD	QAKAMAEILR
201	FFNWTVYSTV	ASEGDYGETG	IEAFELEARA	RNICVATSEK	VGRAMSRAAF
251	EGVVRALLQK	PSARVAVLFT	RSEDARELLA	ASQRLNASFT	WVASDGGWAL
301	ESVVAGSEGA	AEGAITIELA	SYPIDFASY	FQSLDPWNNS	RNPWFREFWE
351	QRFRCSFRQR	DCAAHSLRAV	PFEQESKIMF	VVNAVYAMAH	ALHNMHRALC
401	PNTTRLCDAM	RPVNGRRLYK	DFVLNVKFDA	PFRPADTHNE	VRFRDFGDI
451	GRYNIFTYLR	AGSGRYRYQK	VGYWAEGLTL	DTSLIPWASP	SAGPLPASRC
501	SEPCLQNEVK	SVQPGEVCCW	LCIPCQPYEY	RLDEFTCADC	GLGYWPNASL
551	TGCFELPQEY	IRWGDAAWVG	PVTIACLGAL	ATLFLVGVFV	RHNATPVVKA
601	SGRELCYILL	GGVFLCYCMT	FIFIAPKSTA	VCTLRRLGLG	TAFSVCYSAL
651	LTKTNRIARI	FGGAREGAQR	PRFISPASQV	AICLALISGQ	LLIVVAWLTV
701	EAPGTGKETA	PERREVVTLR	CNHRDASMLG	SLAYNVLLIA	LCTLYAFKTR
751	KCPENFNEAK	FIGFTMYTTC	IIWLAFLPIF	YVTSSDYRVQ	TTTMCVSVSL
801	SGSVVLGCLF	APKLHILFQ	PQKNVSHRA	PTSRFGSAAA	RA^{S843}S^{S844}S^{S845}LGQGS
851	GSQFVPTVCN	GREVDSSTTS	S^{S871}L		



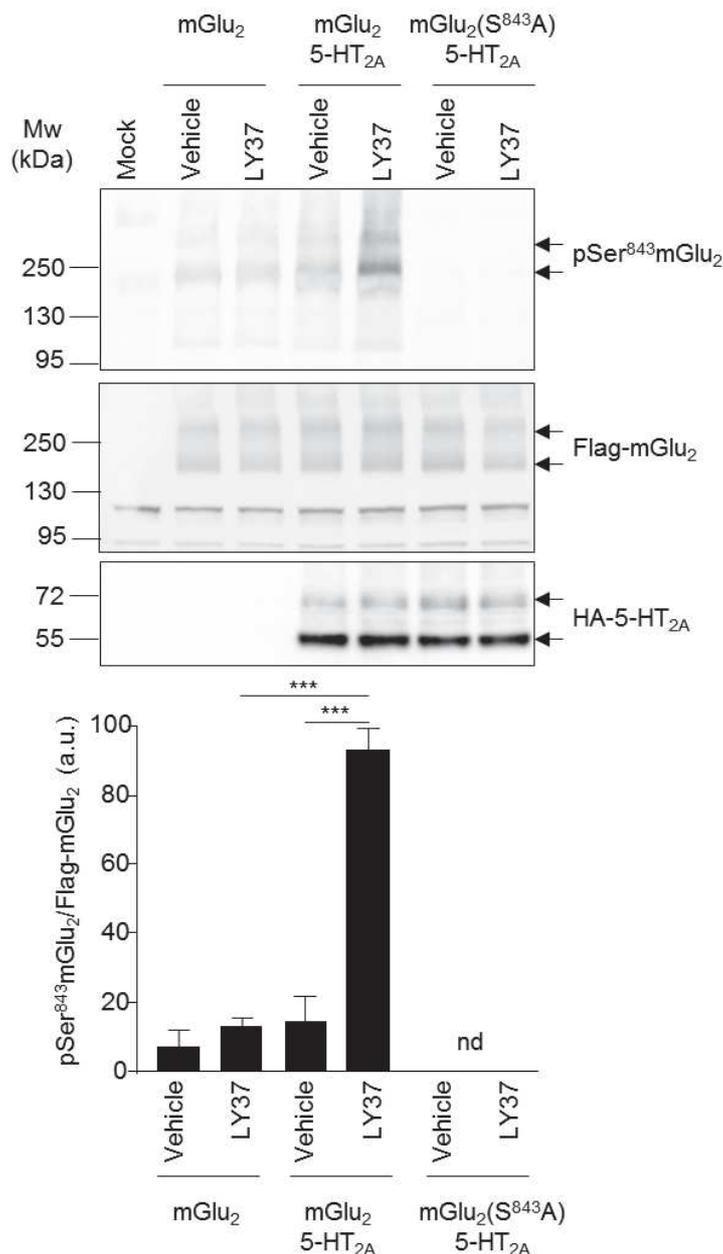
Supplementary Figure 6. LC-MS analysis of human mGlu₂ receptor digested with chymotrypsin. A, The sequence covered by LC-MS/MS analysis after *in-gel* digestion of human mGlu₂ receptor with chymotrypsin is highlighted in red. Identified phosphorylated residues and their positions in the protein sequence are highlighted in blue. **B,** The MS/MS spectrum of the GSAAARAS^{S843}S^{S844}SLGQGSQSQF phosphorylated peptide that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the possible phosphorylated residues in the full-length receptor are underlined.



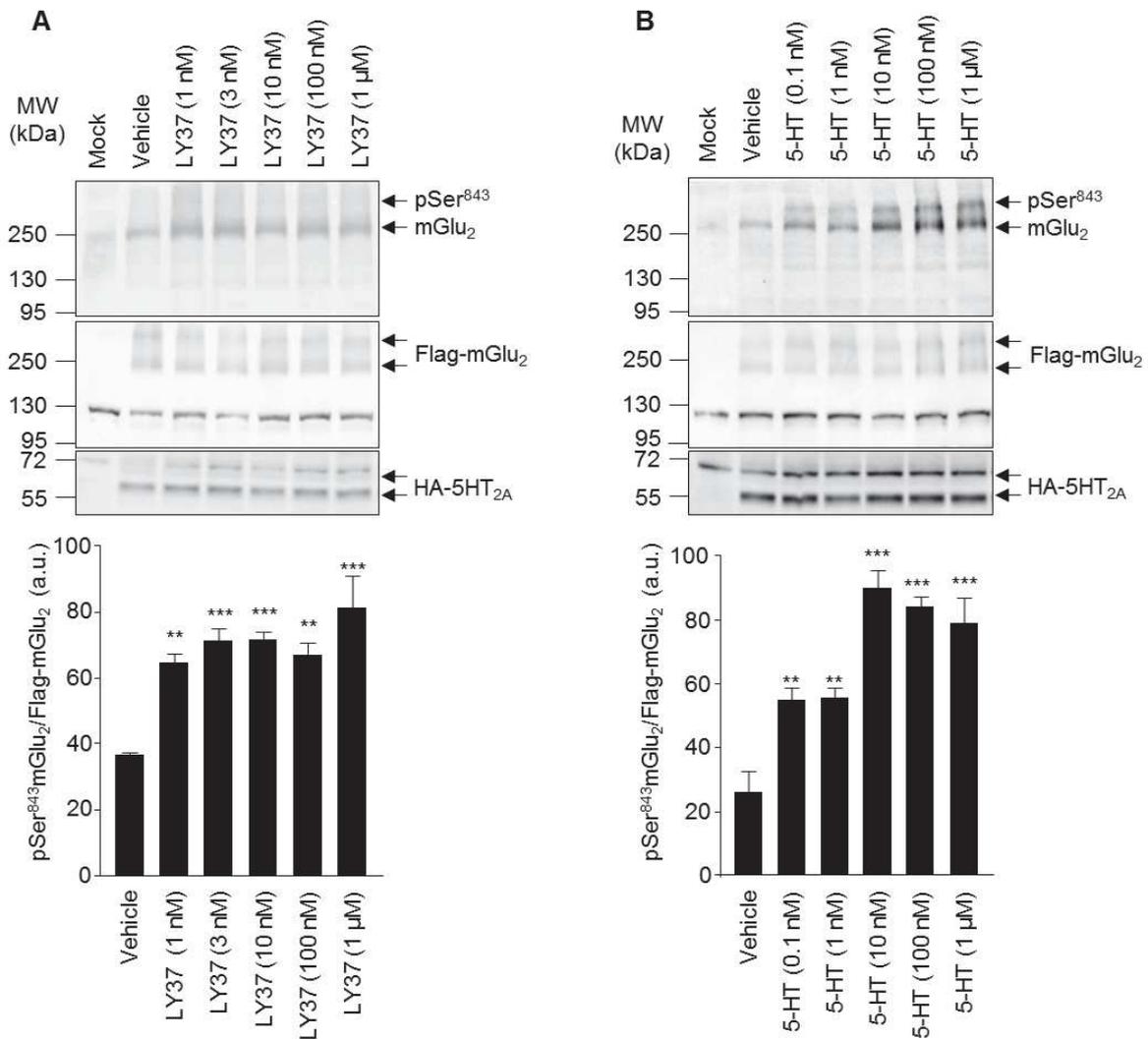
Supplementary Figure 7. Identification and quantification of the As⁸⁴³ANLGQSGSQFVPTVCNGR phosphorylated peptide by LC-MS. The MS/MS spectrum that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the phosphorylated residue in the full-length rat mGlu₂ receptor are illustrated (top panel). The bottom panels show representative extracted ion chromatograms of the As⁸⁴³ANLGQSGSQFVPTVCNGR peptide in cells expressing mGlu₂ receptor alone or in combination with 5-HT_{2A} receptor and treated with either vehicle or LY379268 (1 μM) for 15 min.



Supplementary Figure 8. Identification of the As⁸⁴³ASLGQSGSQFVPTVCNGR phosphorylated peptide in S⁸⁴⁴A mGlu₂ receptor. The MS/MS spectrum that yielded the highest Mascot score, matched b and y ions, peptide sequence and position of the phosphorylated residue in the full-length human S⁸⁴⁴A mGlu₂ receptor are illustrated.



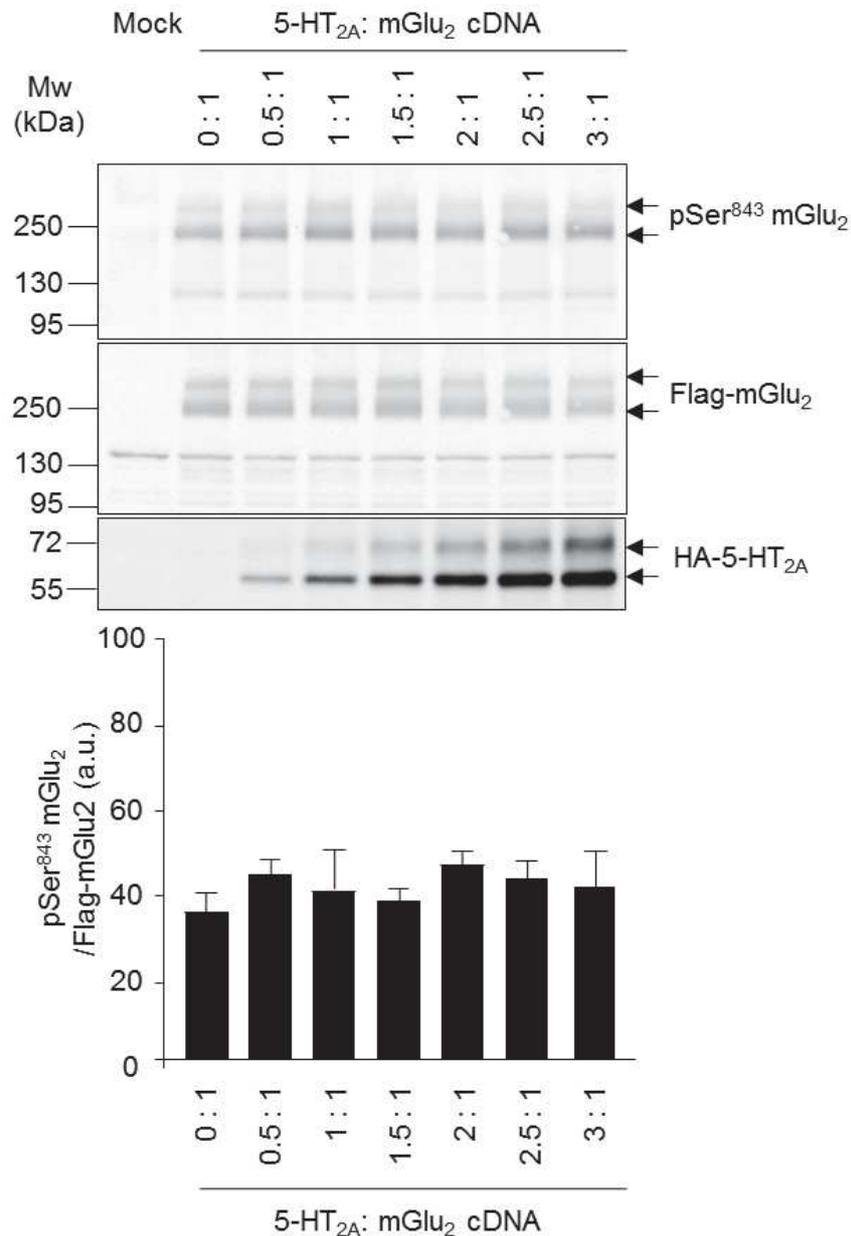
Supplementary Figure 9. Validation of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor antibody by Western blotting. HEK-293 cells transiently expressing rat Flag-tagged mGlu₂ receptor alone or in combination with HA-tagged 5-HT_{2A} receptor or co-expressing rat Flag-tagged S⁸⁴³A mGlu₂ receptor and HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were exposed to vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM) for 15 min. mGlu₂ receptor phosphorylation was analyzed by sequential immunoblotting with the antibody raised against the CAAPRASANLGQG peptide and the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The generated antibody provided an immunoreactive signal in Western blots from cells expressing Flag-tagged mGlu₂ receptors at a molecular weight corresponding to the signal obtained with the anti-Flag antibody. The histograms show the means ± SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.) obtained in the three experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(5,12)=58.02, p<0.0001. ***p<0.001. nd: non-detectable.



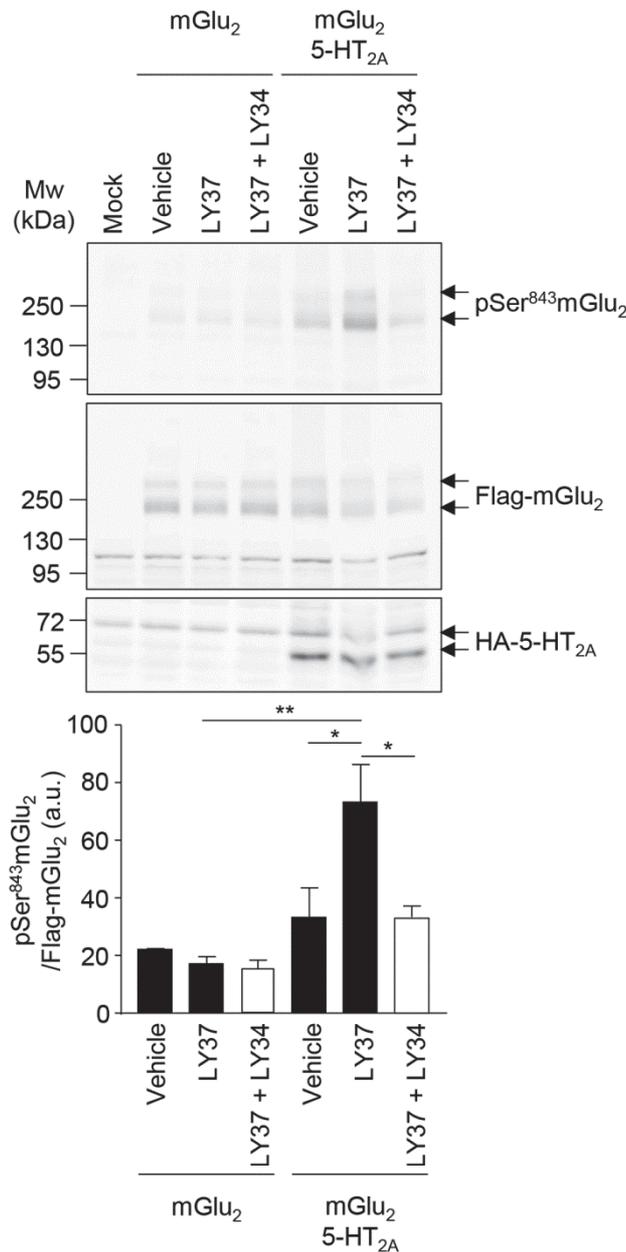
Supplementary Figure 10. Effects of increasing concentrations of LY379268 and 5-HT on Ser⁸⁴³ phosphorylation.

A, HEK-293 cells co-expressing Flag-tagged mGlu₂ receptor and HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were exposed to vehicle or increasing concentrations of LY379268 (LY37, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M) for 15 min. **B**, Cells were exposed to vehicle or increasing concentrations of 5-HT (0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M) for 15 min. Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and mGlu₂ receptor expression by immunoblotting with the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means \pm SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.). One-way ANOVA (Post-hoc: Dunnett's range test): A, F(5,12)=9.884, p=0.0005. B, F(5,12)=20.46, p<0.0001.

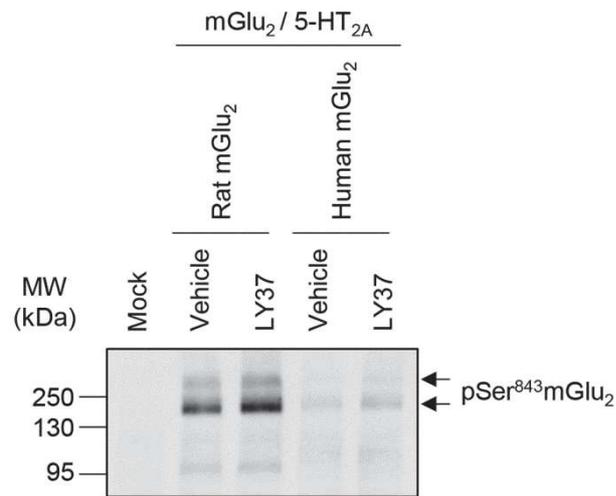
*p<0.05 vs. corresponding vehicle conditions.



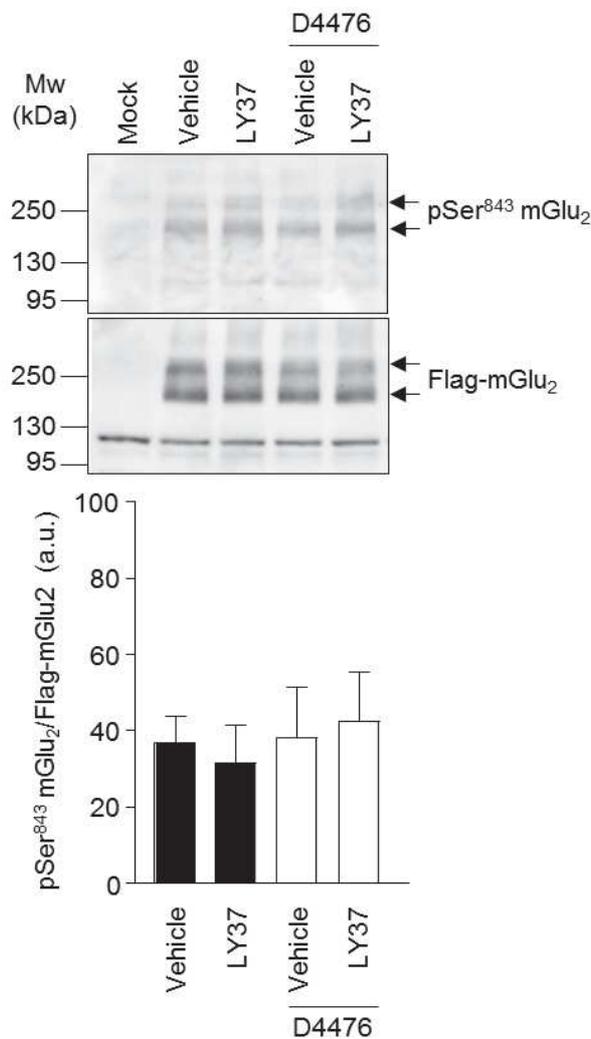
Supplementary Figure 11. Basal mGlu₂ receptor Ser⁸⁴³ phosphorylation level does not depend on 5-HT_{2A} receptor expression level. HEK-293 cells co-expressing rat Flag-tagged mGlu₂ receptor and increasing amounts of HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were challenged with vehicle or LY379268 for 15 min. Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by sequential immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and with the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means \pm SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.). One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): $F(6,14)=0.4493$, $p=0.8338$.



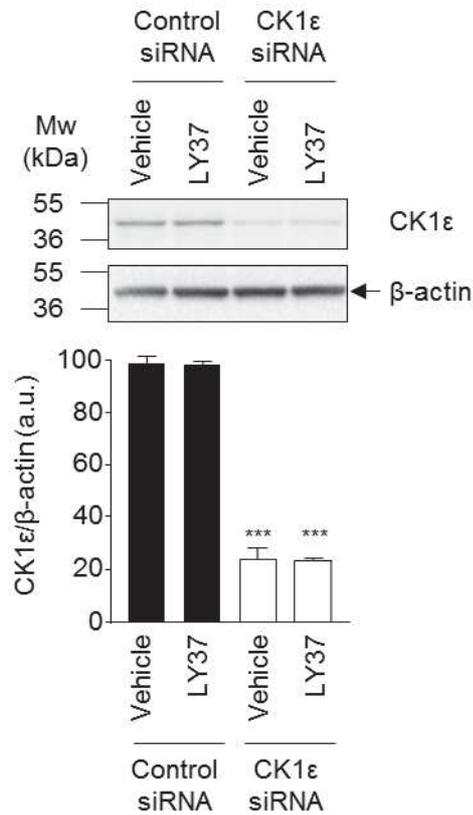
Supplementary Figure 12. LY379268-elicited mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³ in cells co-expressing 5-HT_{2A} receptor is prevented by the mGlu₂ receptor antagonist LY341495. HEK-293 cells transiently expressing rat Flag-tagged mGlu₂ receptor alone or in combination with HA-tagged 5-HT_{2A} receptor were exposed to vehicle or LY379268 (LY37, 10 nM), in absence or presence of LY341495 (LY34, 10 μM) for 15 min. mGlu₂ receptor phosphorylation was analyzed by sequential immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³ antibody and the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means ± SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.) obtained in the three experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(5,12)=8.407, p=0.0013. *p<0.05; **p<0.01.



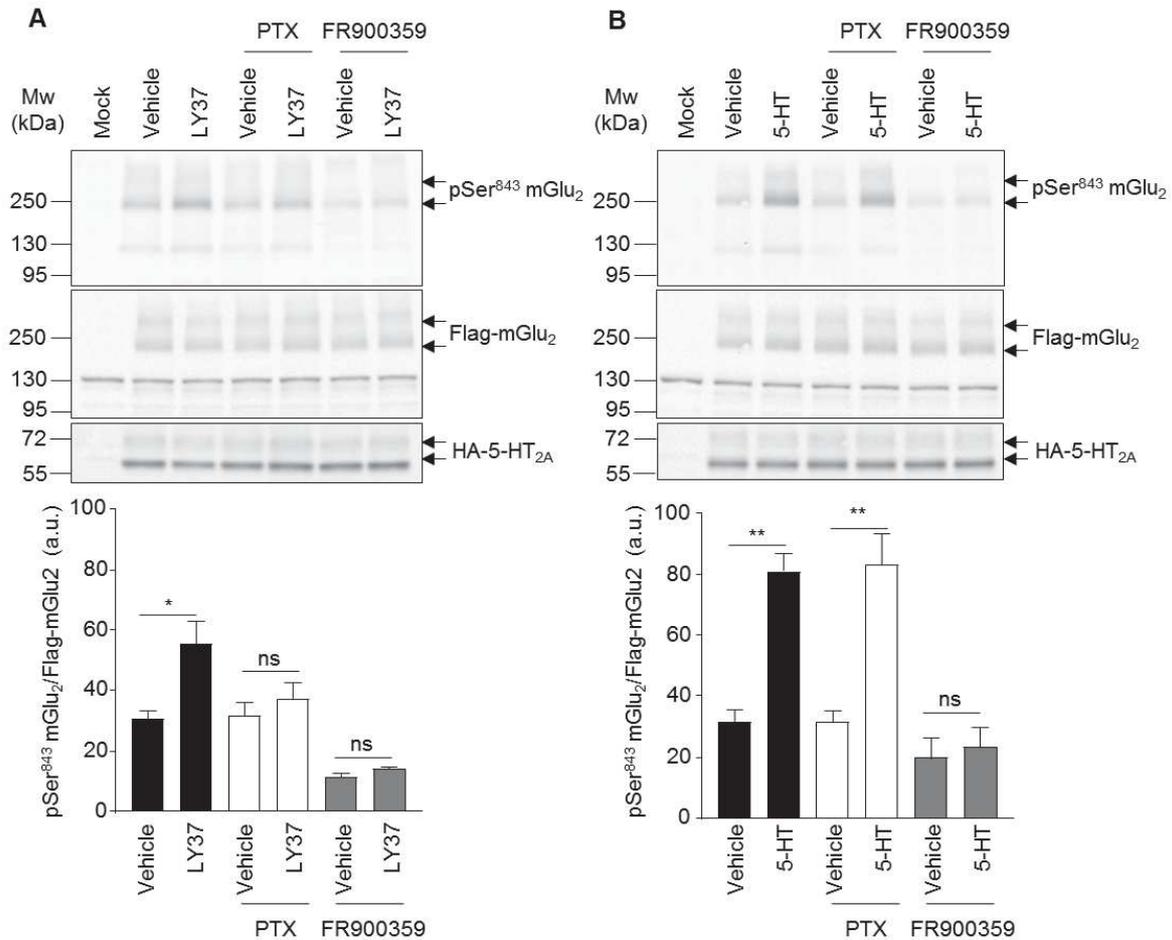
Supplementary Figure 13. Western blot analysis of rat and human mGlu₂ receptor phosphorylation at Ser⁸⁴³. HEK-293 cells co-expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptor and either rat or human Flag-tagged mGlu₂ receptor were exposed to vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM) for 15 min. The phosphorylation of rat and human mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was analyzed by Western blotting using the newly generated anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor antibody. Note that LY379268 treatment increased the immunoreactive signal of both rat and human orthologs, but the signal intensity was much higher for the rat receptor.



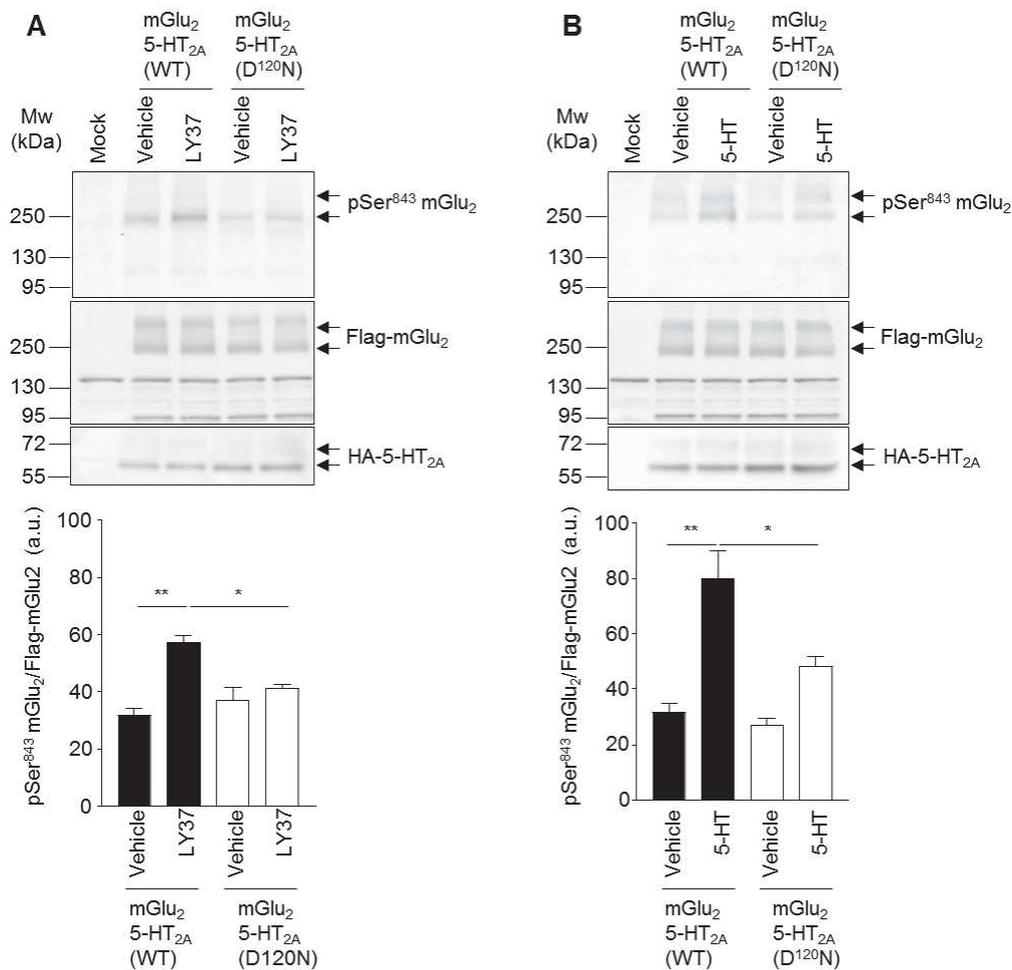
Supplementary Figure 14. LY379268-induced Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells expressing mGlu₂ receptor alone is not mediated by casein kinase 1. HEK-293 cells expressing rat Flag-tagged mGlu₂ alone were pre-incubated with either vehicle or the CK1 inhibitor (D4476, 10 μ M) for 60 min and then challenged with vehicle or LY379268 (LY37, 1 μ M) for 15 min. Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by sequential immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means \pm SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.) obtained in the three experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): $F(3,8)=0.1738$, $p=0.9112$



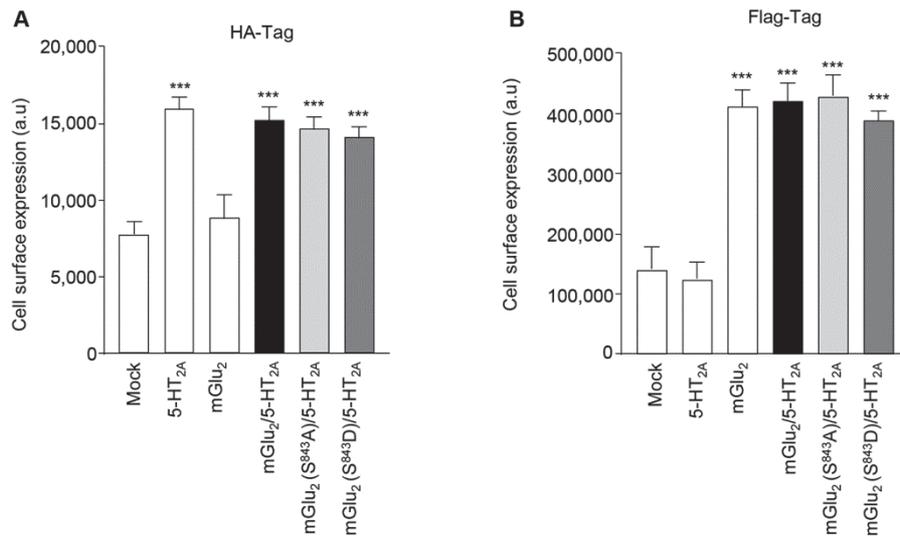
Supplementary Figure 15. Silencing casein kinase 1ε (CK1ε) expression in HEK-293 cells by RNA interference. HEK-293 cells co-expressing rat Flag-tagged mGlu₂ and HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were transfected with either control or CK1ε siRNA and challenged with vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM) for 15 min. CK1ε protein expression was assessed by sequential immunoblotting with the anti-CK1ε antibody and the anti-β-actin antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means ± SEM (expressed in arbitrary units, a.u.) of the anti-CK1ε immunoreactive signal relative to β-actin immunoreactive signal obtained in the three experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): F(3, 8)=230, p<0.0001. *** p<0.001 vs. corresponding condition in presence of control siRNA.



Supplementary Figure 16. Role of $G_{i/o}$ and G_q proteins in the phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³. **A**, HEK-293 cells co-expressing rat Flag-tagged mGlu₂ and HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were pre-incubated with either vehicle or Pertussis toxin (PTX, 0.1 μ g/mL, 18 h) or FR900359 (1 μ M, 2 h) and challenged with either vehicle or LY379268 (LY37, 1 μ M, 15 min). **B**, HEK-293 cells were challenged with either vehicle or 5-HT (1 μ M, 15 min). Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and mGlu₂ receptor expression by immunoblotting with the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means \pm SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.). One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): A, $F(5,12)=14.82$, $p<0.0001$. B, $F(5,12)=17.37$, $p<0.0001$. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ vs. corresponding vehicles.



Supplementary Figure 17. Neither LY379268 nor 5-HT promote Ser⁸⁴³ phosphorylation in cells expressing G_q signaling-dead D^{120N} 5-HT_{2A} receptor. A, HEK-293 cells co-expressing rat Flag-tagged mGlu₂ in combination with HA-tagged wild type or D^{120N} 5-HT_{2A} receptor were treated with either vehicle or LY379268 (LY37, 1 μM) for 15 min. **B**, HEK-293 cells were treated with either vehicle or 5-HT (1 μM) for 15 min. Phosphorylation of mGlu₂ receptor at Ser⁸⁴³ was assessed by immunoblotting with the anti-phospho-Ser⁸⁴³-mGlu₂ receptor antibody and mGlu₂ receptor expression by immunoblotting with the anti-Flag antibody. Representative blots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. The histograms show the means ± SEM of the anti-phospho-Ser⁸⁴³ mGlu₂ receptor immunoreactive signal relative to Flag immunoreactive signal (expressed in arbitrary units, a.u.). One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): A, F(3,8)=14.92, p=0.0012. B, F(3,8)=17.79, p=0.0007. *p<0.05; **p<0.01 vs. corresponding vehicles.



Supplementary Figure 18. Ser⁸⁴³ phosphorylation does not affect cell surface expression of mGlu₂ and 5-HT_{2A} receptors. Quantification of cell surface expression of HA-tagged 5-HT_{2A} receptors (A) and Flag-tagged mGlu₂ receptors (B) was performed by ELISA in non-permeabilizing conditions using anti-HA and anti-Flag antibodies, respectively, in cells expressing 5-HT_{2A} or wild type mGlu₂ receptor alone or 5-HT_{2A} receptor in combination with either wild type or S⁸⁴³A or S⁸⁴³D mGlu₂ receptor. Data are the means ± SEM of values obtained in three independent experiments. One-way ANOVA (Post-hoc: Tukey's range test): A, F(5.48)=12.97, p<0.0001; B, F(5.48)=23.64, p<0.0001. ***p<0.001 vs. cells transfected with empty vectors (Mock).

2/ Résumé des principaux résultats

a/ Caractérisation du profil de phosphorylation du récepteur mGlu₂ par spectrométrie de masse

Le profil de phosphorylation de l'orthologue humain du récepteur mGlu₂ (hmGlu₂) a été caractérisé en comparant différentes conditions de transfection et de stimulation de cellules HEK-293. Le récepteur étiqueté Flag sur son extrémité N-terminale (Flag-hmGlu₂) a été exprimé seul ou en présence du récepteur HA-5-HT_{2A} et les cellules ont été exposées à l'agoniste orthostérique LY379268 du récepteur mGlu₂ (1 μM pendant 15 min) ou au véhicule correspondant. Le récepteur immunopurifié a été digéré en gel par la trypsine et les peptides de digestion analysés par LC-MSMS. Pour chaque phosphopeptide identifié, la localisation des sites de phosphorylation a été déterminée et un index de phosphorylation reflétant la stœchiométrie de phosphorylation du peptide a été calculé. De cette étude, nous avons trouvé 5 sites de phosphorylation sur 4 phosphopeptides (Figure 10 + Article Supplementary Figure 1 à 5).

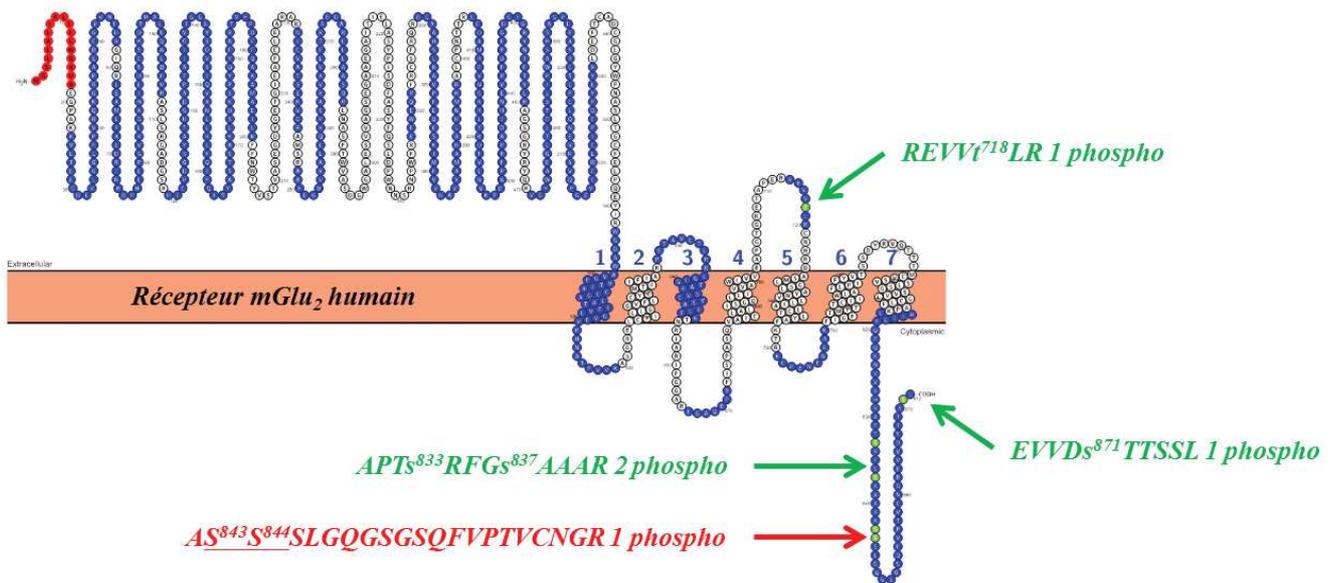


Figure 10 Localisation des sites de phosphorylation sur le récepteur hmGlu₂.

Les résidus en bleu représentent les acides aminés identifiés par spectrométrie de masse après analyse des spectres MS/MS. Les résidus en vert correspondent aux résidus phosphorylés (ambiguïté de localisation pour les Ser⁸⁴³ et Ser⁸⁴⁴).

Un site (Thr⁷¹⁸) a été localisé au niveau du 3^{ème} domaine extracellulaire du récepteur. Quatre sites (Ser⁸³³, Ser⁸³⁷, Ser^{843/844}, Ser⁸⁷¹) ont été localisés dans le domaine C-terminal du récepteur. Le calcul des index de phosphorylation n'a pas révélé de différences significatives dans nos conditions de transfection et de stimulation au LY379268 pour les 2 monophosphopeptides REVVt⁷¹⁸LR, EVVDSTTS⁸⁷¹L et le diphosphopeptide APTs⁸³³RFGs⁸³⁷AAAR (voir Article Supplementary Figures 2, 3 et 5 et Table 1).

Par contre, le monophosphopeptide AS⁸⁴³S⁸⁴⁴SLGQGSGSQFVPTVCNGR s'est montré régulé de manière intéressante car, si son niveau de phosphorylation n'augmente pas de façon significative en réponse au LY379268 lorsque le récepteur mGlu₂ est exprimé seul, une forte potentialisation de cette phosphorylation en réponse au LY379268 apparaît lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé (Article Figure 1C). Faute d'ions discriminants en MS/MS, nous ne sommes pas parvenus à déterminer la position précise de la phosphorylation sur le peptide monophosphorylé AS⁸⁴³S⁸⁴⁴SLGQGSGSQFVPTVCNGR laissant comme possibilités les Ser⁸⁴³ ou Ser⁸⁴⁴ (voir Article Supplementary Figure 4). Pour pallier à cela, le récepteur a été digéré par une autre enzyme, la chymotrypsine, afin de disposer d'un phosphopeptide où les Ser⁸⁴³ et Ser⁸⁴⁴ sont localisés au centre du peptide et non en N-terminal (GSAAARAS⁸⁴³S⁸⁴⁴SLGQGSGSQF) et ainsi augmenter la probabilité de détection d'autres ions discriminants. Cependant, la discrimination de la position de la phosphorylation entre les Ser⁸⁴³ et Ser⁸⁴⁴ n'a toujours pas pu être établie (voir Article Supplementary Figure 6). Deux mutants hmGlu₂ mutés en Alanine pour la Ser⁸⁴³ ou la Ser⁸⁴⁴ ont été générés afin d'empêcher l'évènement de phosphorylation de se produire sur l'un ou l'autre des deux résidus. Après l'analyse des spectres MS/MS, nous n'avons pas identifié de phosphopeptide AAs⁸⁴⁴SLGQGSGSQFVPTVCNGR suite à l'expression du récepteur hmGlu₂ (Ser⁸⁴³Ala) alors qu'un phosphopeptide As⁸⁴³ASLGQGSGSQFVPTVCNGR a été clairement identifié suite à l'analyse des spectres MS/MS en utilisant le mutant hmGlu₂ (Ser⁸⁴⁴Ala) (voir Article Supplementary Figure 8). De plus, l'alignement des séquences des orthologues humain, rat et souris montre une forte conservation entre espèces de la séquence du phosphopeptide, une parfaite conservation de la Ser⁸⁴³, mais une non-conservation de la position 844 qui correspond à une alanine chez le rat ou la souris. D'ailleurs, des analyses MS similaires réalisées sur l'orthologue de rat du récepteur mGlu₂ (rmGlu₂) ont clairement identifié un peptide As⁸⁴³ANLGQGSGSQFVPTVCNGR phosphorylé en position 843 et ont indiqué

les mêmes variations entre conditions de cultures et de transfection que l'orthologue humain du récepteur (voir Article 1C).

Ainsi, grâce à l'ensemble de ces analyses, nous avons établi que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ des récepteurs mGlu₂ humain, rat et souris en réponse à son agoniste orthostérique LY379268 est fortement potentialisée par la co-expression du récepteur 5-HT_{2A}. C'est pourquoi un nouvel anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ rat et souris a été généré.

b/ Génération et validation d'un nouvel anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂

La production de l'anticorps a été confiée à la société Eurogentec. Pour l'immunisation des lapins, le peptide de synthèse CAAPRAS⁸⁴³ANLGQG a été choisi pour une parfaite conservation de l'épitope entre rat et souris et une différence de seulement deux résidus 844 et 845 avec l'orthologue humain. L'anticorps a été purifié en deux étapes : une première purification contre le peptide phosphorylé puis une contre-purification contre le peptide non-phosphorylé. Afin de contrôler la bonne spécificité de l'anticorps, la société Eurogentec a réalisé des ELISA avec les formes phosphorylées et non phosphorylées du peptide sur les fractions Peak2 (élution de contre-purification) et FT2 (flow-through de la contre-purification). Les résultats montrent une bonne reconnaissance par la fraction Peak2 des formes phosphorylée et non-phosphorylée du peptide alors que la fraction FT2 ne reconnaît que la forme phosphorylée de notre peptide et pas du tout la forme non-phosphorylée (Figure 11). Nous disposons donc de deux anticorps polyclonaux : un anticorps Peak2 reconnaissant le récepteur mGlu₂ murin total (phosphorylé ou non sur la Ser⁸⁴³) et un anticorps FT2 spécifique de la forme phosphorylée de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ murin que nous appellerons l'anticorps pSer⁸⁴³.

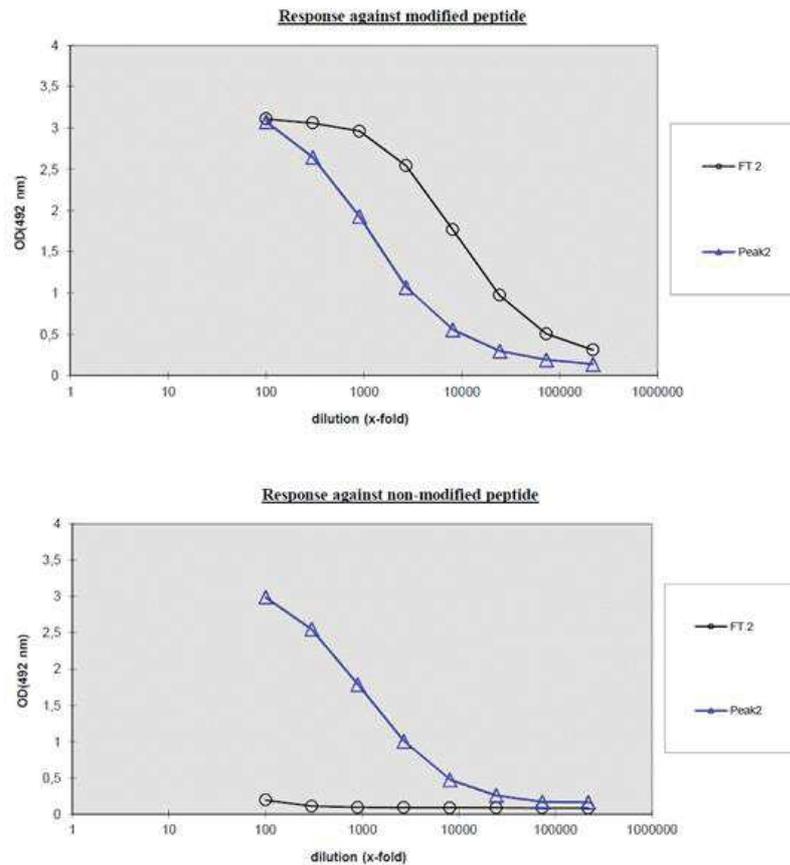


Figure 11 ELISA montrant la bonne spécificité de l'anticorps anti-phospho-Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ (Source : Eurogentec[©])

Le Western blot avec l'anticorps pSer⁸⁴³ (voir Article Supplementary Figure 12) montre un signal aux poids moléculaires attendus pour le récepteur mGlu₂ avec une augmentation suite à une stimulation par l'agoniste orthostérique LY379268 du récepteur mGlu₂ (uniquement lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé). L'anticorps montrant très peu de bruit de fonds, l'immunoprécipitation du récepteur n'est pas nécessaire à la bonne détection de notre récepteur mGlu₂ phosphorylé. A noter que l'orthologue rat est mieux reconnu que l'orthologue humain ce qui justifie son emploi pour la suite des expériences. Aucun signal n'est détecté lorsque le récepteur mGlu₂ muté (Ser⁸⁴³Ala) est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A} confirmant la spécificité de notre anticorps pour reconnaître la forme phosphorylée de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ (voir Article Supplementary Figure 9).

c/ Validation orthogonale des résultats de spectrométrie de masse

L'analyse par Western Blot avec l'anticorps pSer⁸⁴³ a permis de confirmer les résultats de protéomique à savoir une potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ suite à une stimulation par le LY379268 uniquement lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé. De manière surprenante, une dose réponse de l'agoniste orthostérique, LY379268 a montré que le niveau de la phosphorylation atteint déjà un plateau à partir de faibles concentrations en LY379268 (1 nM, Figure 12 et voir Article Supplementary Figure 10A).

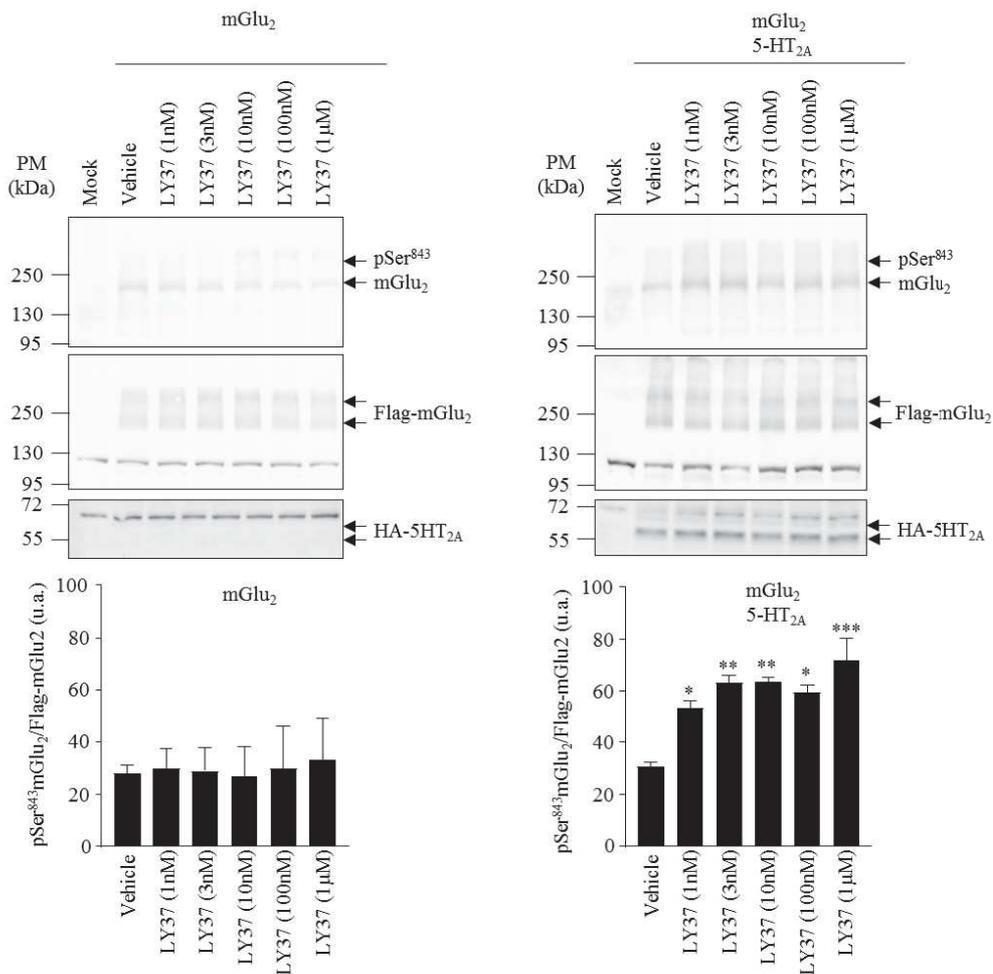


Figure 12 Effet dose de LY379268 sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ en présence ou non du récepteur 5-HT_{2A}

Un co-traitement des cellules LY379268 + LY341495 (antagoniste du récepteur mGlu_{2/3}) empêche la potentialisation de la phosphorylation sur la Ser⁸⁴³ (voir Article Supplementary Figure 12).

d/ Validation *in vivo* de la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ par la co-expression du récepteur 5-HT_{2A}

L'anticorps pSer⁸⁴³ a également permis de réaliser des expériences d'immunofluorescence sur cerveaux de souris fixés au formaldéhyde par perfusion intracardiaque pour suivre cet événement de phosphorylation *in vivo* dans un contexte plus physiologique. Nous avons réalisé des traitements aigus avec le LY379268 (10 mg/kg, 30min) sur des souris Wild-type *vs.* des souris Knock-Out 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}^{-/-}). La zone privilégiée est le cortex pré-frontal, zone où le complexe mGlu₂/5-HT_{2A} a été initialement décrit (111) (voir article « Material and Methods »). Les analyses ont permis de confirmer le mécanisme de régulation avec une augmentation de la détection des cellules positives pour la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ chez les souris Wild-type traitées avec le LY379268 alors que cette augmentation n'est pas retrouvée chez les souris 5-HT_{2A}^{-/-}. Si les couches superficielles du cortex pré-frontal chez les souris Wild-type (et 5-HT_{2A}^{-/-}) montrent un faible marquage insensible à l'injection de LY379268, les couches intermédiaires montrent une augmentation de signal en réponse au LY379268 (voir Article Figure 1D). Une forte expression du récepteur 5-HT_{2A} au niveau des neurones pyramidaux a déjà été caractérisé dans ces couches corticales (95, 111, 170). La spécificité de détection de notre anticorps pour le récepteur mGlu₂ est démontrée par l'absence totale de signal dans les cerveaux de souris mGlu₂^{-/-} traitées au LY379268 (voir Article Figure 1D et Figure 4C).

Ainsi, les résultats de cette partie nous ont permis de :

- i) Confirmer les résultats de spectrométrie de masse** précédemment décrits à savoir une forte potentialisation de la phosphorylation sur la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ après stimulation au LY379268 uniquement lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé.
- ii) Démontrer que ce mécanisme de régulation est conservé dans le cortex pré-frontal de souris** où l'augmentation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³, essentiellement dans les couches intermédiaires, nécessite la présence du récepteur 5-HT_{2A}.

e/ La kinase Casein Kinase 1 (CK1) et la protéine G_{i/o} : deux acteurs cellulaires participant à la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³

Afin de sélectionner les kinases pouvant potentiellement phosphoryler la Ser⁸⁴³, la séquence du récepteur mGlu₂ entourant le résidu Ser⁸⁴³ a été chargée dans le logiciel Grouped-based Prediction

System (GPS[®], v3.0) qui recherche automatiquement les consensus de phosphorylation par les kinases grâce à des algorithmes entraînés sur de larges volumes de données (171). Ainsi, nous avons sélectionné deux kinases candidates : la Casein Kinase 1 (CK1) et la Protein Kinase A (PKA). L'analyse Western blot a révélé que le prétraitement par le D4476 (inhibiteur de la CK1, 10 μ M 1 h) empêche la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ suite à une stimulation avec le LY379268 et la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} (voir Article Figure 2A). Par contre, le prétraitement avec le KT5720 (inhibiteur de la PKA, 1 μ M 1 h) ne modifie en rien la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ (voir Article Figure 2A).

Ce mécanisme semble dépendant de la protéine G_{i/o}, protéine canoniquement couplée au récepteur mGlu₂ (125), puisque le prétraitement des cellules par la toxine pertussique (PTX) qui bloque sous leur forme GDP les sous-unités G_{ai/o} (172), empêche également la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ (voir Article Supplementary Figure 16A).

De ce fait, l'ensemble de ces investigations pharmacologiques suggère que la kinase CK1 et la protéine G_{i/o} sont directement impliquées dans cet évènement de phosphorylation.

f/ Implication de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans l'activité G_{i/o}

L'impact fonctionnel de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ a été évalué en mutant le récepteur mGlu₂ en Alanine (Ser843A) ou en Aspartate (Ser843D) pour, respectivement, inhiber ou mimer cet évènement de phosphorylation. Ainsi, nous avons pu mesurer l'activité G_{i/o} résultante grâce à son action sur :

i) la production d'AMPC en utilisant la sonde CAMYEL, sonde permettant via des expériences de BRET de mesurer indirectement l'impact sur l'activité G_{i/o} (173).

ii) le blocage du canal calcique de type N, read-out électrophysiologique utilisé pour étudier l'activité G_{i/o} (126, 128), en réalisant des expériences d'électrophysiologie.

Les expériences de BRET ont montré une inhibition de la réponse à la forskoline après stimulation du récepteur mGlu₂ avec le LY379268. De manière intéressante, nous avons remarqué une potentialisation de l'inhibition de la réponse à la forskoline, et donc de l'activité G_{i/o}, lorsque le récepteur mGlu₂ est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A}. Cette potentialisation est perdue si la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ est mutée en alanine (Ser⁸⁴³A) laissant supposer un rôle de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ sur la potentialisation de l'activité G_{i/o}. La mutation en aspartate de la Ser⁸⁴³, mGlu₂(Ser⁸⁴³D), amène la réponse à la forskoline à un niveau intermédiaire entre les formes Wild-Type des récepteurs

mGlu₂ exprimé seul et mGlu₂ co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A}, rendant difficile l'interprétation des résultats pour ce mutant (Figure 13).

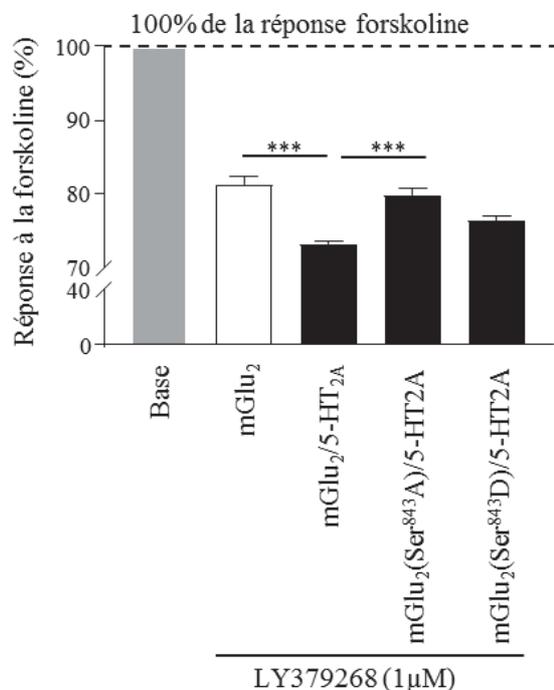


Figure 13 La potentialisation de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ en présence du récepteur 5-HT_{2A} est dépendante de la phosphorylation sur la Ser⁸⁴³

Malgré les preuves statistiques de ces différences entre les conditions de transfection et une première preuve de la possible implication de la phosphorylation sur la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ sur son activité G_{i/o}, les variations de l'inhibition de la réponse à la forskoline restent faibles. En effet, la fenêtre de variation de l'activité G_{i/o} en utilisant cette technique dans nos conditions de transfections est limitée rendant notamment difficile l'interprétation des résultats pour le mutant mGlu₂ (Ser⁸⁴³D). C'est la raison pour laquelle nous avons recherché un autre read-out présentant une meilleure gamme dynamique pour renforcer nos conclusions.

L'électrophysiologie a permis de mesurer l'impact d'une dose-réponse de LY379268 sur l'inhibition des courants calciques de type N entre des cellules exprimant le récepteur mGlu₂ seul ou avec le récepteur 5-HT_{2A}. Comme pour les résultats obtenus avec la sonde CAMYEL, nous avons observé une potentialisation de l'activité G_{i/o} (inhibition plus forte du courant) lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-

exprimé avec le récepteur mGlu₂. A remarquer que l'affinité du récepteur pour le LY379268 n'est pas modifiée de manière significative lorsqu'il est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A} (voir Article Figure 3B).

Le mutant mGlu₂(Ser⁸⁴³A) ne présente pas de potentialisation de l'inhibition du courant liée à la co-expression du récepteur 5-HT_{2A}. Les résultats obtenus avec le mutant mGlu₂(Ser⁸⁴³D) co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A} révèlent un niveau d'inhibition des courants calciques similaires à celui observé lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé avec le récepteur mGlu₂ non muté (voir Article Figure 3C – left panel). Ainsi, ces résultats renforcent les conclusions obtenus avec la technique BRET pour le mutant mGlu₂(Ser⁸⁴³A) et éclairent nos conclusions pour le mGlu₂(Ser⁸⁴³D). L'ensemble de ces analyses démontre que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ participe directement à la potentialisation l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ en présence du récepteur 5-HT_{2A}.

Ayant montré précédemment que la kinase CK1 est responsable de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ (voir Partie I/3/e), nous avons évalué l'effet de son inhibiteur pharmacologique D4476 (10 μM, directement dans la pipette de patch et le milieu intracellulaire) sur l'inhibition du courant calcique de type N. Le D4476 inhibe également la potentialisation liée à la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} la ramenant à un niveau comparable à la condition où le récepteur mGlu₂ est exprimé seul. A remarquer que l'application du D4476 n'a pas d'effet lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé avec le récepteur mGlu₂ (Ser⁸⁴³D) muté ou lorsque le récepteur mGlu₂ est exprimé seul (voir Article Figure 3C – right panel).

L'ensemble de ces résultats établit clairement le rôle de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ par CK1 sur la potentialisation de l'activité G_{i/o} liée à la co-expression du récepteur 5-HT_{2A}.

g/ La phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ est aussi induite par la stimulation du récepteur 5-HT_{2A}

La phosphorylation de la Ser⁸⁴³ étant dépendante de la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} nous avons évalué l'impact des ligands du récepteur 5-HT_{2A} sur :

i) le niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans un modèle de surexpression sur HEK-293 mais aussi directement *in vivo*.

ii) l'activité G_{i/o} du complexe mGlu₂/5-HT_{2A}.

Des cellules, co-transfectées avec les deux récepteurs, ont été exposées à la sérotonine (5-HT), ligand naturel du récepteur 5-HT_{2A} (1 μM, 15 min voir article « Materials and Methods »). L'analyse Western

blot révèle une augmentation du niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ en réponse à la sérotonine, augmentation inhibée par la co-application d'un antagoniste du récepteur 5-HT_{2A} (MDL-100907, 0.1 μM, 15 min, voir Article Figure 4A). Un effet dose de 5-HT montre que l'augmentation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ se fait en 2 étapes : un premier niveau d'activation de 0.1 nM à 1 nM et un deuxième niveau, plateau, à partir de 10 nM (Figure 14 et voir Article Supplementary Figure 10B).

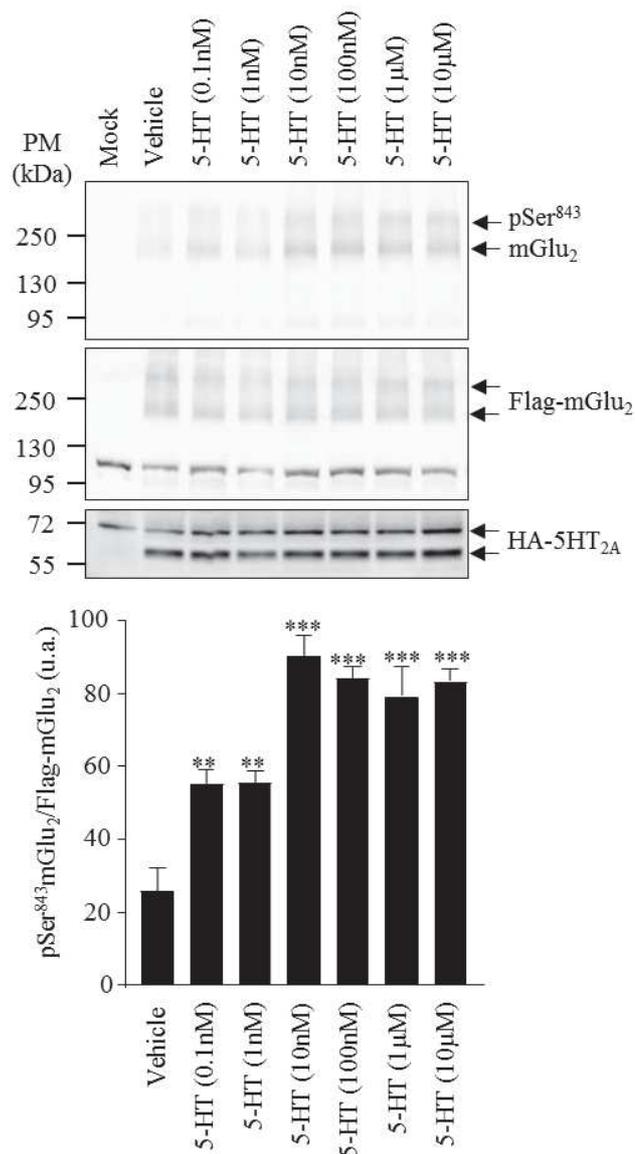


Figure 14 Effet dose de 5-HT sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂

Les ligands hallucinogènes vs. non-hallucinogènes du récepteur 5-HT_{2A} étant un bel exemple de sélectivité fonctionnelle servant de modèle préclinique pour les symptômes positifs de la schizophrénie (123, 174), l'impact d'une stimulation avec le DOI (10 µM), agoniste hallucinogène, et le lisuride (10 µM), agoniste non hallucinogène, sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ a été évalué par Western blot. Une augmentation du niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ de même amplitude est observée que ce soit suite à une stimulation au DOI, au lisuride ou à la 5-HT en combinaison ou non avec une stimulation du récepteur mGlu₂ au LY379268 (voir Article Figure 4B).

Dans des expériences d'immunohistochimie, une augmentation similaire du nombre de cellules positives pour la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ en réponse à l'injection d'agonistes du récepteur 5-HT_{2A} (DOI ou lisuride (30 min, 10 mg/kg)) est observée dans le cortex pré-frontal de souris Wild-type (voir Article Figure 4C).

Les expériences d'électrophysiologie mesurant l'impact d'une stimulation à la 5-HT (1 µM) sur le blocage du canal calcique de type N ne montrent pas d'inhibition du courant dans des cellules n'exprimant que le récepteur 5-HT_{2A} seul. En revanche, un blocage net apparaît lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé avec le récepteur mGlu₂ témoignant de l'apparition d'une activité G_{i/o} liée à la présence du récepteur mGlu₂. Cet effet sur le blocage du courant calcique est perdu lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé avec le récepteur mGlu₂ (Ser⁸⁴³A) et conservé lorsque ce dernier se retrouve co-exprimé avec le récepteur mGlu₂ (Ser⁸⁴³D) (voir Article Figure 5D).

Ainsi, ces différentes expériences ont permis de mettre en avant l'existence d'une transactivation du récepteur mGlu₂ par le récepteurs 5-HT_{2A} via la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ car : **i**) la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ peut être déclenchée par des agonistes du récepteur 5-HT_{2A} en absence d'agoniste du récepteur mGlu₂, **ii**) l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ peut être activée par la stimulation du récepteur 5-HT_{2A} seulement si la Ser⁸⁴³ est phosphorylable et **iii**) le récepteur 5-HT_{2A} exprimé seul ne peut pas induire d'activité G_{i/o} en réponse à ses agonistes.

h/ La potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ dépend de l'activité des deux récepteurs

Cette phosphorylation étant au centre d'un dialogue fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂, nous avons évalué l'effet de l'inhibition d'un récepteur par un antagoniste sur la stimulation de l'autre récepteur et mesuré la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ et l'activité G_{i/o}.

Les analyses par Western blot révèlent que l'effet de la 5-HT sur la potentialisation de la Ser⁸⁴³ est perdue par un co-traitement avec l'antagoniste LY341495 du récepteur mGlu₂ (voir Article Figure 5A). De la même manière, l'effet du LY379268 sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ est aboli par un co-traitement avec l'antagoniste MDL-100907 du récepteur 5-HT_{2A} (voir Article Figure 5B).

La mesure des courants calciques indique que l'inhibition du courant de type N induite par une stimulation du récepteur du mGlu₂ est abolie suite à l'exposition à l'antagoniste MDL-100907 du récepteur 5-HT_{2A}. De la même manière, l'inhibition du courant calcique induite par une stimulation du récepteur 5-HT_{2A} en présence du récepteur mGlu₂ est abolie suite à l'exposition à l'antagoniste LY341495 du récepteur mGlu₂ (voir Article Figure 5E). Ainsi, l'ensemble de ces expériences complémentaires ont permis de mettre en avant que la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ et sa modulation de l'activité G_{i/o} du complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂ nécessite deux récepteurs non-antagonisés (Figure 15).

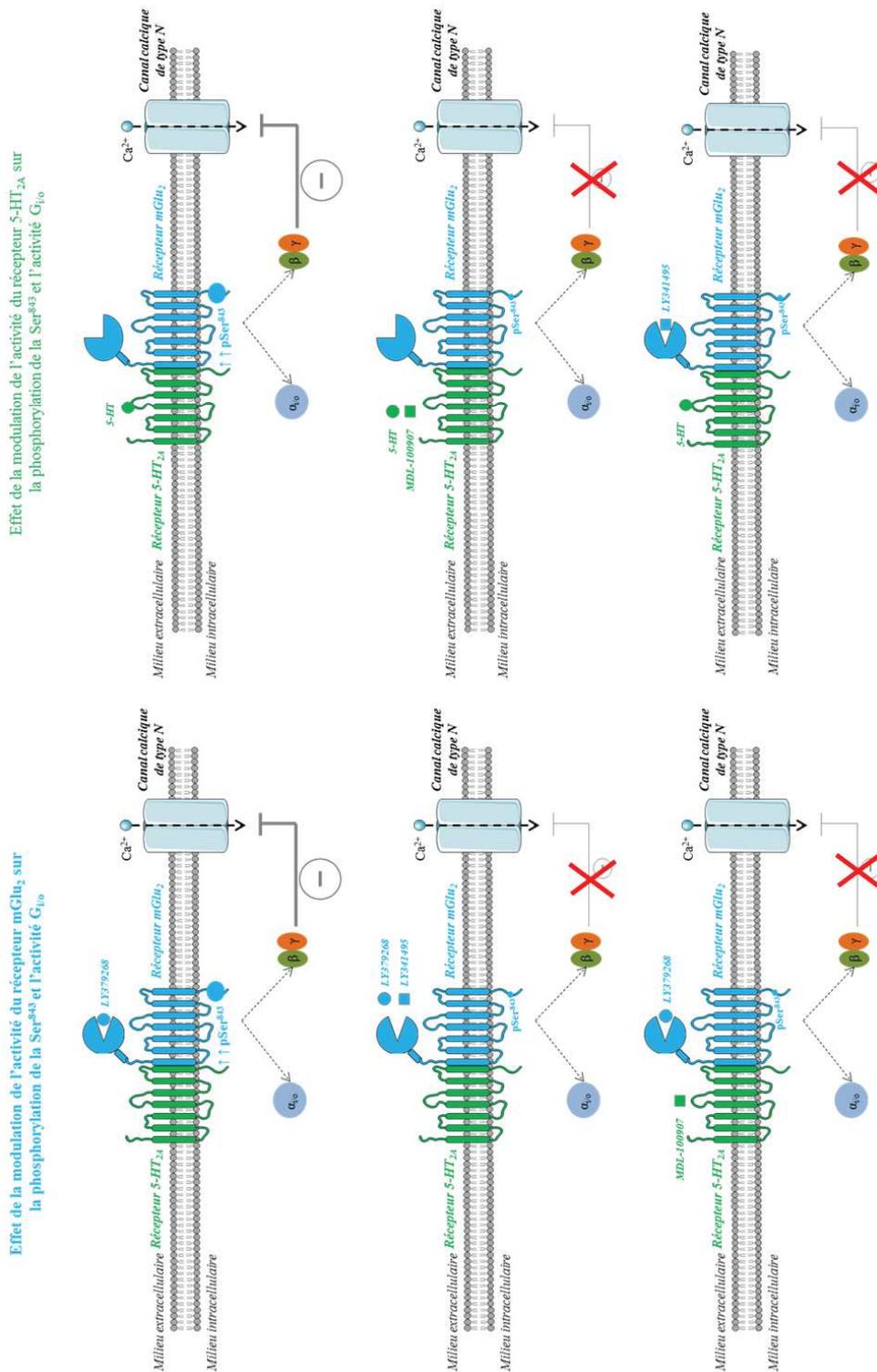


Figure 15 Modulation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur en fonction du mode d'activation des 2 récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ et impact sur la signalisation G_{i/o}

II/ Résultats complémentaires

1/ Etude de la modulation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans un modèle préclinique murin reproduisant certains symptômes de la schizophrénie

Les résultats décrits précédemment suggèrent que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ constitue un substrat moléculaire du cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ (Figure 19, Figure 15). Cette phosphorylation représente un marqueur de l'activité G_{i/o} de l'hétérocomplexe 5-HT_{2A}/mGlu₂ dont le contrôle peut être exercé par les deux récepteurs. Cette activité est elle-même prédictive du potentiel pro ou antipsychotiques des drogues ciblant chacun des 2 récepteurs (115). Or, même si des débats existent encore à ce sujet, plusieurs études (95, 111, 170) démontrent que la densité des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ est modifiée chez les patients schizophrènes, ce qui pourrait contribuer au développement de la maladie. Afin de déterminer si la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ peut être affectée dans un contexte pathologique, nous avons évalué le niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans un modèle préclinique reproduisant certains symptômes de la schizophrénie, des souris ayant reçu un traitement subchronique à la phencyclidine (PCP, antagoniste non compétitif des récepteurs au glutamate de type N-méthyl-D-Aspartate). Ce modèle présente l'avantage, par rapport à une administration aiguë de PCP, d'avoir des réponses comportementales et des résistances aux antipsychotiques plus proches de la pathologie humaine (175). Nous avons également étudié les effets de l'administration aiguë de différents antipsychotiques (atypiques ou de dernière génération) sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ chez les animaux traités à la PCP.

Les études comportementales réalisées au premier jour de la série de dix injections journalières de PCP sur un nombre limité de souris mettent en évidence une hyper-locomotion prononcée (Figure 16) et une stéréotypie caractérisée par des mouvements rotatifs répétés autour de la queue.

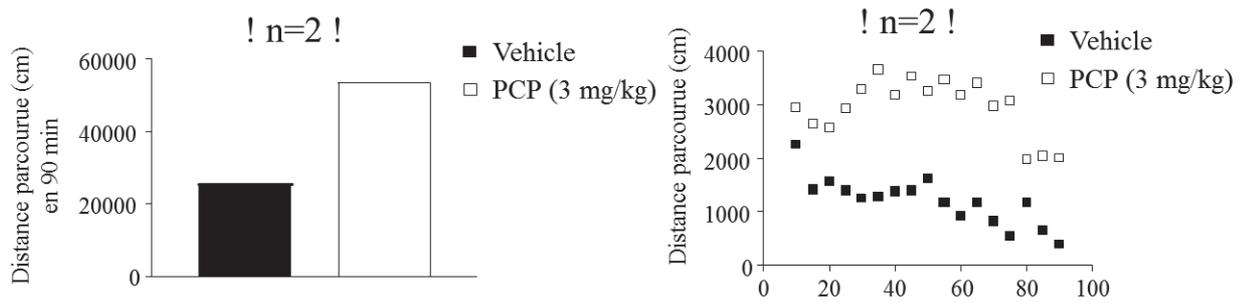


Figure 16 Courbes de locomotion réalisées pendant 90 min chez des souris Wild-type traitées ou non avec le PCP (3 mg/kg). Première tendance sur l'impact de l'injection de PCP sur la locomotion sur deux animaux d'où l'absence de barre d'erreurs, ces résultats ont besoin d'être confirmé

A la dixième injection journalière de PCP, les souris ont été également injectées avec l'agoniste LY379268 du récepteur mGlu₂ (IP, 3 mg/kg, 30 min), antipsychotique de nouvelle génération. Les expériences préliminaires d'immunohistochimie réalisées dans le cortex préfrontal ont révélé que :

i) Les souris traitées au PCP ont un niveau de base de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ fortement diminué par rapport aux souris traitées uniquement avec la solution saline.

ii) L'injection de LY379268 provoque un niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ similaire à ce que l'on observe chez les souris non traitées à la PCP.

Ainsi, ces résultats préliminaires, qui nécessitent d'être répliqués, indiquent un niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ fortement diminué chez les souris traitées à la PCP mais une réponse au LY379268 potentialisé.

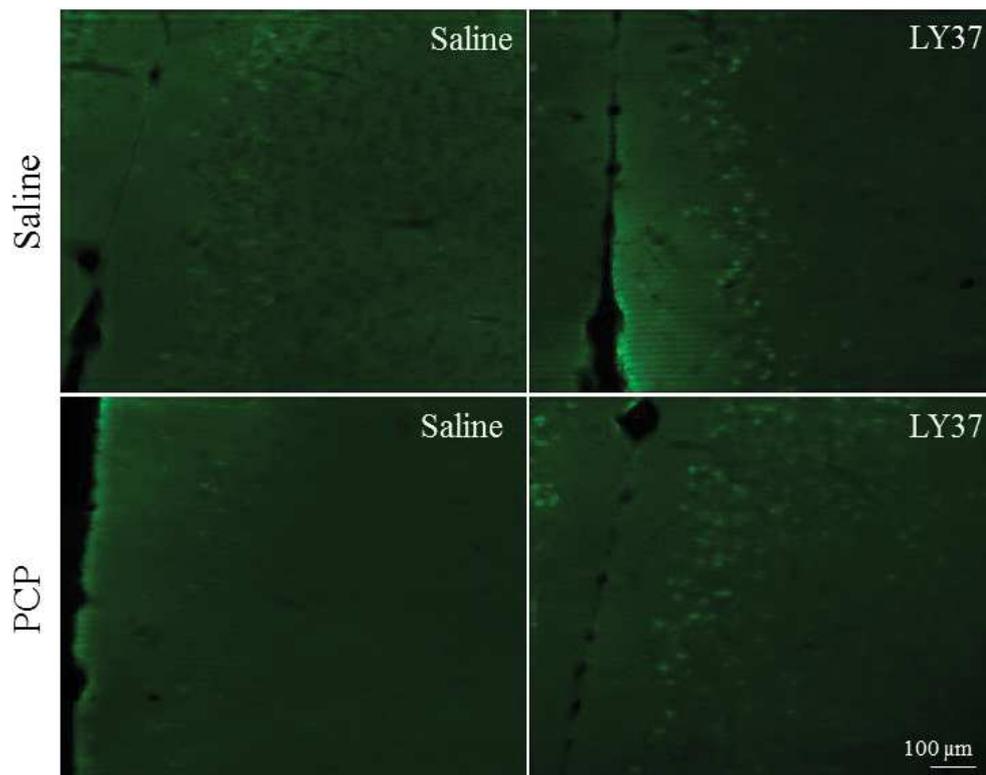


Figure 17 Modulation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂, en présence ou non du LY379268, chez des souris traitées en ou non avec le PCP

2/ Effet d'un modulateur allostérique positif du récepteur mGlu₂ sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³

Le LY487379, modulateur allostérique positif (PAM) du récepteur mGlu₂ est un antipsychotique de dernière génération toujours en développement clinique (176). Ce composé active le récepteur mGlu₂ par des mécanismes différents de ceux des agonistes orthostériques.

Les analyses par Western blot démontrent que, contrairement à l'agoniste orthostérique LY379268, le modulateur allostérique positif LY487379 (en présence d'une faible concentration de LY379268 n'induisant pas d'effets propres) stimule la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans les cellules HEK-293 n'exprimant pas le récepteur 5-HT_{2A} (Figure 18). Ainsi, le LY487379 pourrait activer la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans tous les neurones qui expriment le récepteur mGlu₂ et pas seulement les neurones co-exprimant les récepteurs mGlu₂ et 5-HT_{2A}.

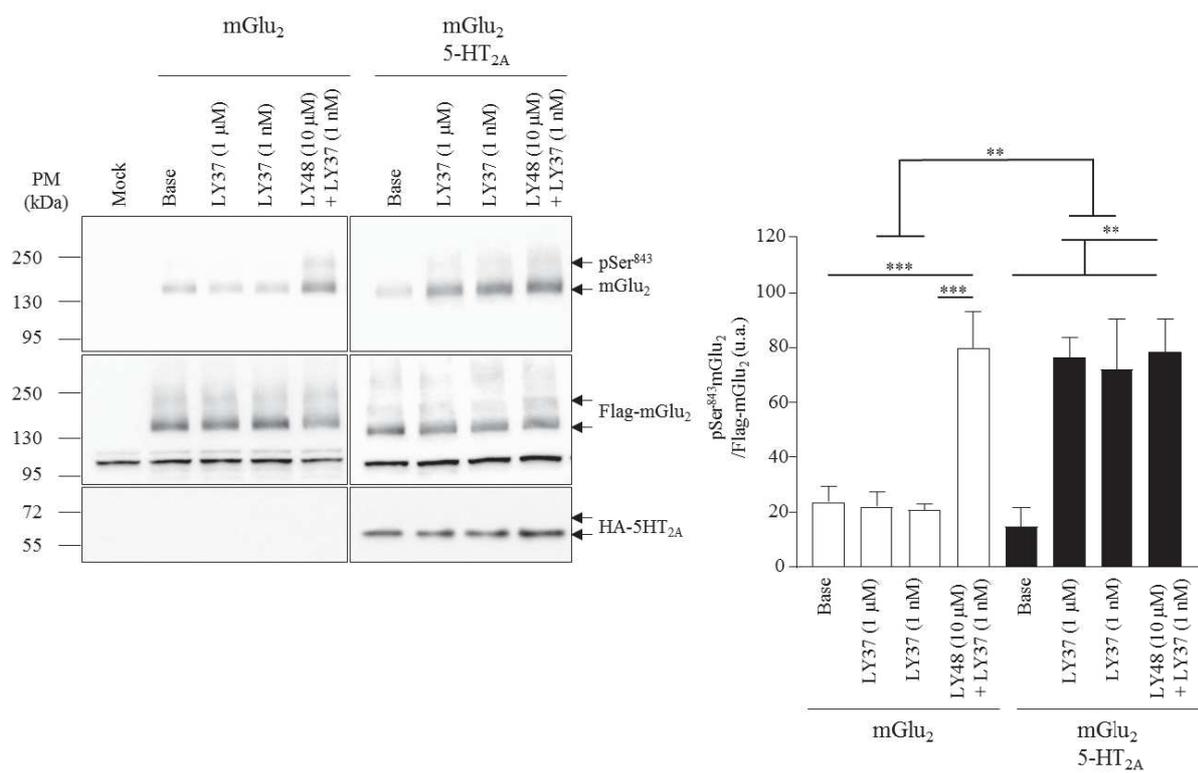


Figure 18 Effet du LY487379 sur la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ en présence ou non du récepteur 5-HT_{2A}

Discussion et perspectives

Même si les antipsychotiques typiques et atypiques ont permis d'apporter des solutions efficaces pour le traitement des symptômes positifs de la schizophrénie, ils restent encore insuffisants pour le traitement des symptômes négatifs et des troubles cognitifs et présentent d'importants effets secondaires (68). Les antipsychotiques de dernière génération ciblant les récepteurs métabotropiques du glutamate n'ont montré une efficacité que pour les patients n'ayant pas été préalablement traités par des antipsychotiques atypiques. Des patients résistants aux antipsychotiques atypiques auront malheureusement de fortes chances d'être aussi résistants aux antipsychotiques ciblant le récepteur mGlu₂ (70, 94). Ceci sous-entend un lien étroit entre le récepteur de la sérotonine 5-HT_{2A} et le récepteur métabotropique du glutamate mGlu₂ (70, 94). Afin de développer des drogues antipsychotiques, il est donc nécessaire de mieux comprendre comment ces récepteurs fonctionnent et interagissent entre eux (95, 114, 115).

I/ Lien fonctionnel fort entre le récepteur 5-HT_{2A} et mGlu₂

Depuis une dizaine d'année, plusieurs études ont démontré un lien étroit entre le système sérotoninergique et le système glutamatergique *via* une régulation de l'activité des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu_{2/3} (106, 108, 177). En effet, les premières études électrophysiologiques ont montré un blocage des PPSE induit par une stimulation du récepteur 5-HT_{2A} suite à l'activation du récepteur mGlu₂ (108). Plus récemment, l'identification d'un hétérocomplexe 5-HT_{2A}/mGlu₂ a ravivé l'intérêt d'étudier les interactions fonctionnelles entre ces deux récepteurs impliqués dans la réponse aux antipsychotiques (112). Le groupe de Gonzalez-Maeso a montré l'existence d'un hétérodimère 5-HT_{2A}/mGlu₂ et caractérisé les domaines d'interaction : TM4 pour le récepteur mGlu₂ (113) et TM4 pour le récepteur 5-HT_{2A} (116).

D'un point de vue fonctionnel, mes résultats en électrophysiologie et en BRET ont confirmé l'existence d'un cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ avec une potentialisation de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ en réponse à ses agonistes lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé dans les mêmes cellules. Nous avons aussi démontré que l'activité G_{i/o} du complexe est stimulée de façon croisée en réponse à l'activation du récepteur 5-HT_{2A} avec un blocage prononcé du

canal calcique de type N. En effet, cette inhibition du courant induite par la sérotonine n'est pas visible lorsque le récepteur mGlu₂ n'est pas co-exprimé. De plus, le blocage du canal calcique est empêché lorsque les récepteurs mGlu₂ ou 5-HT_{2A} sont bloqués par un antagoniste (respectivement le LY341495 et le MDL-100907). Ces résultats confortent l'idée d'un cross-talk fonctionnel par l'utilisation d'un nouveau read-out électrophysiologique pour l'étude du complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂, complétant ainsi les travaux précédents mesurant l'ouverture des canaux potassiques GIRK (115, 119). Ces résultats sont en accord avec les travaux du groupe de Javier Gonzalez-Maeso mais différent de ceux du groupe de Gerard Marek qui n'ont pas montré d'effet de la formation du complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂ sur l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ (114). Ces différences peuvent être inhérentes aux différentes techniques utilisées qui n'ont pas la même gamme dynamique pour détecter les variations de l'activité G_{i/o} (mesure de la production d'AMPC intracellulaire grâce à un senseur BRET *vs.* mesure des courants potassiques et calcique en électrophysiologie). En effet, même si les deux techniques utilisées pour mesurer l'activité G_{i/o} m'ont permis d'arriver aux mêmes conclusions, nous avons remarqué un effet moins prononcé sur la potentialisation de l'activité G_{i/o} en présence du récepteur 5-HT_{2A} en utilisant le BRET comparé à l'électrophysiologie. Le groupe de Gérard J Marek utilise également une technique HTRF qui mesure la quantité d'AMPC produite pour rendre compte de l'inhibition de l'adénylate cyclase par la sous-unité $\alpha_{i/o}$ de la protéine G (114). Les techniques électrophysiologiques rendent, quant à elles, compte de l'impact de la sous-unité $\beta\gamma$ sur l'activation des canaux potassiques GIRK (119) et sur l'inhibition du canal calcique de type N (126). On pourrait émettre l'hypothèse que l'engagement de la protéine G_{i/o} par l'hétérocomplexe mGlu₂/5-HT_{2A} va préférentiellement avoir des effets sur les canaux potassiques et calciques et non sur la production d'AMPC via l'inhibition de l'adénylate cyclase. Quoiqu'il en soit, mes résultats ont confirmé un cross-talk fonctionnel entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ menant principalement à une potentialisation de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂.

II/ La phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ : un événement clé dans son cross-talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT_{2A}

Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, le profil de phosphorylation d'un RCPG permet de moduler finement les voies de signalisation qu'il engage (132). L'exemple du récepteur mu des opioïdes démontre que la formation d'hétérocomplexes entre RCPGs peut également avoir des conséquences

sur leurs profils de phosphorylation (169). L'existence d'un complexe fonctionnel entre les récepteurs mGlu₂/5-HT_{2A} nous a logiquement amené à nous intéresser au profil de phosphorylation des deux récepteurs, qui n'avait jusqu'alors jamais été pris en considération en tant que mécanisme potentiel du cross-talk.

La cartographie des sites de phosphorylation du récepteur mGlu₂ a permis d'identifier plusieurs sites de phosphorylation sur les résidus Ser⁷¹⁸, Ser⁸³³, Ser⁸³⁷, Ser⁸⁴³ et Ser⁸⁷¹. Parmi les 12 sites de phosphorylations référencés sur le site « PhosphositePlus database » (<http://www.phosphosite.org>) (Ser¹⁰⁹, Ser¹¹¹, Ser²⁴⁶, Thr⁴⁵⁷, Ser⁵⁰¹, Tyr⁷³⁴, Tyr⁷⁴⁵, Tyr⁷⁴⁹, Thr⁸³², Ser⁸³³, Ser⁸⁴³ and Ser⁸⁷¹), nous en avons retrouvé 3 (Ser⁸³³, Ser^{843/844}, Ser⁸⁷¹) localisés dans le domaine C-terminal du récepteur. Les Ser⁷¹⁸ et Ser⁸³⁷ ont été identifiées pour la première fois dans notre étude et sont localisées respectivement dans la troisième boucle extracellulaire, rendant peut-être compte d'une phosphorylation durant l'adressage du récepteur à la membrane, et dans le domaine C-terminal, bien connu pour son rôle dans le couplage de la protéine G (125). Un contexte cellulaire différent, une validation automatique de la localisation de certains sites de phosphorylation dans les données à grande échelle publiées précédemment et des différences dans la préparation et l'analyse des échantillons pourraient expliquer pourquoi nous n'avons pas retrouvé dans nos expériences l'ensemble des sites déjà décrits. L'analyse des index de phosphorylation pour chacun des sites identifiés a montré une régulation par la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} uniquement pour le résidu Ser⁸⁴³. En effet, sa phosphorylation est potentialisée en réponse à une stimulation du récepteur mGlu₂ par le LY379268 uniquement lorsque le récepteur 5-HT_{2A} est co-exprimé. Aucune régulation particulière n'a été relevée dans nos conditions expérimentales pour les autres sites phosphorylés caractérisés (Ser⁷¹⁸, Ser⁸³³ et Ser⁸⁷¹). Ces sites régulent peut être certaines activités du récepteur mGlu₂ mais comme ils ne sont pas modifiés dans les conditions expérimentales testées, nous avons choisi de ne pas les muter en alanine pour évaluer leur importance fonctionnelle.

Nos données de MS/MS ne nous ont pas permis de trancher entre la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ et la Ser⁸⁴⁴ dans le récepteur mGlu₂ humain. Par la suite, des données indirectes nous ont cependant permis de favoriser la position Ser⁸⁴³. D'une part, la mutation de la Ser⁸⁴⁴ en alanine permet toujours de détecter un signal pour un peptide porteur d'une phosphorylation alors que la mutation de la Ser⁸⁴³ en alanine éteint complètement le signal MS correspondant. D'autre part, seule la Ser⁸⁴³ est conservée dans les récepteurs mGlu₂ de rat et de souris. Or, la même potentialisation de la phosphorylation de la

Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ de rat est induite par la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} que celle qui est mesurée dans les cellules exprimant le récepteur mGlu₂ humain.

La localisation précise de ce site phosphorylé et la modulation de sa phosphorylation par la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} nous a conduits à produire un nouvel anticorps spécifique de ce résidu phosphorylé des récepteurs mGlu₂ de rat et de souris. Pour cela, nous avons choisi d'immuniser des lapins avec un phosphopeptide de synthèse comprenant la Ser⁸⁴³ phosphorylée et la séquence murine environnante qui présente une parfaite conservation entre rat et souris. Cet outil a été déterminant pour le projet car il a permis **i)** de confirmer les résultats obtenus en spectrométrie de masse quantitative, **ii)** de mieux caractériser la phosphorylation en culture cellulaire en multipliant le nombre de conditions comparées et surtout **iii)** de caractériser cette phosphorylation *in vivo* dans le cerveau de souris par immunohistochimie.

Ces dernières expériences m'ont permis de montrer que le récepteur mGlu₂ phosphorylé sur la Ser⁸⁴³ en réponse à un agoniste orthostérique était localisé, pour l'essentiel, dans les couches intermédiaires du cortex préfrontal des souris sauvages. Il s'agit justement de la zone correspondant aux neurones exprimant la densité la plus importante de récepteur 5-HT_{2A} (111). Il est important de remarquer que ce signal est absent chez la souris 5-HT_{2A}^{-/-}, ce qui confirme *in vivo* l'importance de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans le dialogue fonctionnel entre les récepteurs mGlu₂ et 5-HT_{2A}.

Les expériences de Western blot réalisées sur les cultures cellulaires et d'immunohistochimie dans le cerveau de souris ont montré que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ est aussi potentialisée par l'activation du récepteur 5-HT_{2A} indépendamment de la propriété hallucinogène ou non de l'agoniste. Ce résultat indique que la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ ne constitue pas un évènement capable à lui seul de distinguer la signalisation spécifique des hallucinogènes et des non-hallucinogènes, contrairement à la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ du récepteur 5-HT_{2A} décrite dans une étude précédente du laboratoire (Annexe). Les agonistes hallucinogènes du récepteur 5-HT_{2A} servant de modèle pour l'étude des symptômes positifs de la schizophrénie, la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ pourrait plutôt représenter un index de l'activation des voies de signalisation responsable des symptômes négatifs ou encore des troubles cognitifs. La caractérisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans un modèle préclinique de la schizophrénie comme des souris traitées à la phéncyclidine en réponse à différents antipsychotiques, notamment ceux de nouvelle génération, plus efficaces pour

traiter les symptômes négatifs et les troubles cognitifs pourraient permettre d'apporter des éléments de réponse à cette question.

De plus, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs mGlu₂ et 5-HT_{2A} a montré que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ en réponse à des agonistes mGlu₂ ou 5-HT_{2A} nécessite que les deux récepteurs soient dans un état actif. Ceci démontre que la conformation adoptée par les deux récepteurs est au centre du mécanisme de potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂.

A la suite de cette caractérisation, nous avons déterminé la kinase responsable de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³. En utilisant le logiciel Grouped-based Prediction System (GPS[®], v3.0) (171), nous avons sélectionné deux candidats : la Protéine Kinase A (PKA) et la Caséine Kinase 1 (CK1). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ces deux kinases m'a permis de démontrer que la CK1, plutôt que la PKA, est responsable de la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ au sein du complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂. Des expériences *in vitro* réalisées précédemment par l'équipe de Jeffrey-Conn avaient démontré une phosphorylation de la Ser⁸⁴³ en réponse à une activation directe de la PKA par la forskoline (178) mais dans nos conditions expérimentales, il semble bien que ce soit seulement la CK1 qui est responsable de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans les cellules HEK-293. Ainsi, nous pouvons supposer que lorsque l'hétéromère 5-HT_{2A}/mGlu₂ est formé, le récepteur mGlu₂ adopte une conformation stabilisée par sa stimulation et son association avec le récepteur 5-HT_{2A}, qui favorise l'accessibilité de la CK1 à son substrat (la Ser⁸⁴³). Cependant, même si l'existence de l'hétéromère 5-HT_{2A}/mGlu₂ est bien établie, nous ne pouvons pas exclure une possible modulation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ par un mécanisme indépendant de l'hétérodimérisation, impliquant l'activation d'une voie de signalisation associée au récepteur 5-HT_{2A}. De plus, les expériences d'inhibition de la protéine G_{i/o} avec la toxine pertussique (PTX) ont montré que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dépendait aussi de la protéine G_{i/o} laissant supposer un rôle de cette dernière pour amplifier le processus de phosphorylation.

Afin de déterminer l'impact fonctionnel de la phosphorylation sur la signalisation G_{i/o}, nous avons généré 2 mutants du récepteur mGlu₂ : le mutant mGlu₂(Ser⁸⁴³Ala) pour empêcher la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ et le mutant mGlu₂(Ser⁸⁴³Asp) pour mimer de façon constitutive cette phosphorylation. Les résultats de BRET et d'électrophysiologie ont démontré l'importance de celle-ci dans la potentialisation de l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ en présence du récepteur 5-HT_{2A}. En effet, lorsque le mutant mGlu₂ (Ser⁸⁴³Ala) est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A}, la potentialisation de

l'activité $G_{i/o}$ est perdue. De la même façon, l'inhibition de la kinase CK1 empêche la potentialisation de l'activité $G_{i/o}$ du récepteur mGlu₂ lorsqu'il est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A} sans pour autant affecter une activité $G_{i/o}$ de base.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences nous a permis de conclure que le cross-talk fonctionnel observé entre les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ nécessite une potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ sous le contrôle de la Caséine Kinase 1 mais également de la protéine $G_{i/o}$ (Figure 19).

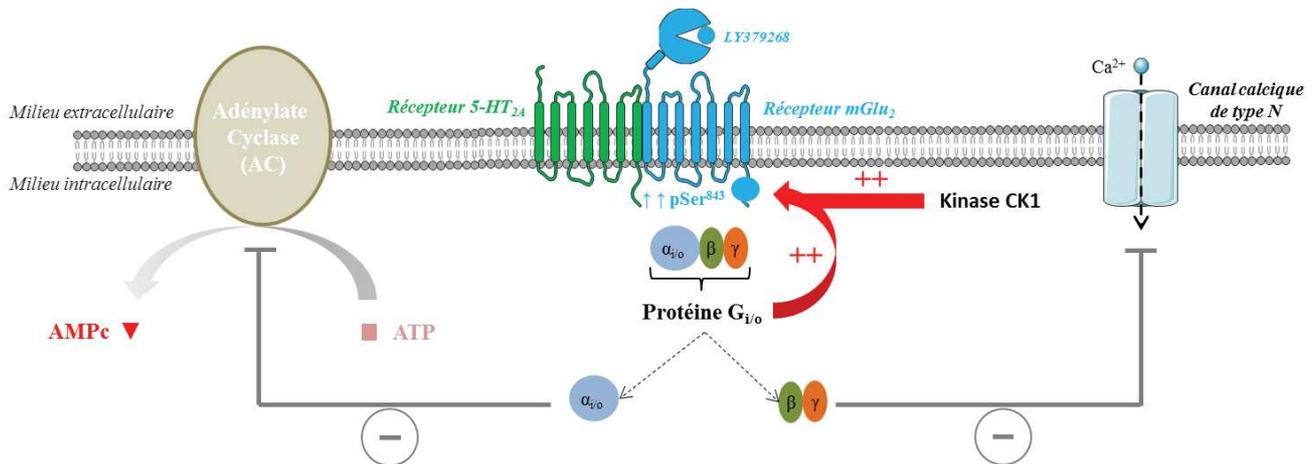


Figure 19 Régulation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ et impact sur la signalisation $G_{i/o}$

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ pour que le cross-talk fonctionnel avec le récepteur 5-HT_{2A} se produise. Nous pouvons supposer que le récepteur mGlu₂ subit une modulation de type allostérique lorsqu'il est co-exprimé avec le récepteur 5-HT_{2A} permettant une potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ et une amplification de l'activité $G_{i/o}$, témoin de l'existence d'un cross-talk fonctionnel entre les deux récepteurs.

En accord avec cette hypothèse, des résultats préliminaires ont montré que la potentialisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ est indépendante du récepteur 5-HT_{2A} lorsque le récepteur mGlu₂ est stimulé par un modulateur allostérique positif, le LY487379 (179). Ceci supporte l'hypothèse selon laquelle la modulation allostérique du récepteur mGlu₂ par le récepteur 5-HT_{2A} serait proche de celle du LY487379.

Ainsi, l'ensemble de ce travail de thèse a permis d'identifier et de caractériser la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ comme un substrat moléculaire important du cross-talk fonctionnel entre les

récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂. Cette phosphorylation constitue un indicateur de la signalisation G_{i/o}, contrôlée par l'activité des 2 récepteurs, elle-même prédictive du potentiel pro ou antipsychotique des drogues ciblant chacun des récepteurs (115). L'ensemble de ces conclusions soulève de nouvelles questions et perspectives en plaçant ce site de phosphorylation comme un substrat moléculaire clé dans le mode d'action de composés antipsychotiques actuels ou futurs.

III/ Perspectives : de la phosphorylation à la compréhension du mécanisme d'action des antipsychotiques sur le complexe 5-HT_{2A}/mGlu₂

1/ Perspectives sur les profils de phosphorylation des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂

Le profil de phosphorylation adopté par le récepteur mGlu₂ est dépendant de la présence du récepteur 5-HT_{2A} en réponse à la stimulation de l'un ou l'autre des 2 récepteurs. Même si au cours de cette thèse, l'accent a été porté sur la caractérisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³, il pourrait être intéressant d'étudier l'impact des autres sites de phosphorylation identifiés dans le domaine C-terminal (Ser⁸³³, Ser⁸³⁷, Ser⁸⁷¹), connu pour son rôle dans le couplage des RCPGs aux protéines G (125), par des expériences basées sur les mutants Alanine et Aspartate de chacun de ces résidus. Concernant la phosphorylation identifiée au niveau de la 3^{ème} boucle extracellulaire, on peut formuler l'hypothèse que celle-ci a lieu durant l'adressage du récepteur à la membrane. Il serait certainement intéressant d'étudier le rôle de la phosphorylation de ce résidu dans l'adressage du récepteur à la membrane par exemple en présence ou non du récepteur 5-HT_{2A}. Ces études permettraient de déterminer si d'autres sites phosphorylés dans la séquence du récepteur mGlu₂ affectent son activité.

Il serait également intéressant d'étudier l'impact de la formation du complexe mGlu₂/5-HT_{2A} sur le profil de phosphorylation du récepteur 5-HT_{2A} et notamment si l'expression et/ou l'activation du récepteur mGlu₂ affecte le niveau de phosphorylation de la Ser²⁸⁰ du récepteur 5-HT_{2A} en réponse aux ligands hallucinogènes (Annexe). En effet, les outils disponibles dans l'équipe nous permettraient d'étudier si la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ est modifiée dans la souris mGlu₂^{-/-} en réponse au DOI ou au LSD. Sachant que la réponse comportementale induite par le DOI est inhibée chez les souris mGlu₂^{-/-} (130), la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ pourrait être réduite chez ces souris. Etant donné l'importance de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ sur l'activité G_{i/o} du récepteur mGlu₂ et du rôle de la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ du récepteur 5-HT_{2A} dans sa réponse spécifique aux ligands

hallucinogènes, on pourrait également rechercher si la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ impacte la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ en réalisant une série d'expériences utilisant les mutants Alanine et Aspartate de la Ser²⁸⁰. Des expériences d'électrophysiologie mesurant l'impact de la co-expression du récepteur 5-HT_{2A} muté en Alanine sur la Ser²⁸⁰ avec le récepteur mGlu₂ sur le courant calcique de type N en réponse au DOI permettraient de déterminer si la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ est nécessaire au cross-talk fonctionnel. Ainsi, l'ensemble de ces études démontreraient s'il existe un lien entre la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ du récepteur 5-HT_{2A} et la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂. Enfin, ces expériences pourraient permettre de déterminer si la phosphorylation de la Ser²⁸⁰ du récepteur 5-HT_{2A} induite spécifiquement par les agonistes hallucinogènes du récepteur dépend également d'un cross talk fonctionnel avec le récepteur mGlu₂.

2/ Perspectives sur l'utilisation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans la recherche sur la schizophrénie et la mise au point de nouveaux antipsychotiques

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse offre de nouvelles perspectives en plaçant la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ comme un substrat moléculaire clé du mode d'action des composés antipsychotiques existants et futurs.

a/ Vers une régulation différentielle de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans un contexte pathologique

Des résultats préliminaires montrent que la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ ne nécessite pas la présence du récepteur 5-HT_{2A} lorsque le récepteur mGlu₂ est stimulé par un modulateur allostérique, le LY487379 (efficace vis-à-vis des troubles cognitifs dans des modèles précliniques de la schizophrénie (179)). Il serait intéressant de vérifier si ce résultat peut être reproduit *in vivo* en déterminant si l'administration de LY487379 à des souris 5-HT_{2A}^{-/-} induit la phosphorylation de ce résidu dans le cortex préfrontal.

De plus, on pourrait poursuivre l'étude de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ chez des souris ayant reçu un traitement subchronique à la phéncyclidine. Nos résultats préliminaires révèlent une baisse de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ dans le cortex préfrontal de souris traitées au PCP, comparé aux animaux traités par un véhicule. Ce niveau de phosphorylation est restauré à un niveau comparable à celui

mesuré chez les souris sauvages après un traitement au LY379268, un agoniste orthostérique du récepteur mGlu₂.

Ces derniers résultats pourraient refléter l'hypoglutamatergie corticale présent dans la souris traitée au PCP et comme cela a été décrit chez les patients schizophrènes (180). Cette étude préliminaire sera poursuivie par l'analyse dans le modèle PCP des effets ***i*) des antipsychotiques atypiques** (clozapine et rispéridone), ***ii*) de dernière génération ciblant le récepteur mGlu₂** (LY379268, LY487379) (92, 179) et ***iii*) de la pimavansérine** (antipsychotique atypique et agoniste inverse puissant du récepteur 5-HT_{2A}) validée récemment pour le traitement des états psychotiques dans la maladie de Parkinson et en phase III pour le traitement symptomatique de la schizophrénie (181–184) (Figure 20).

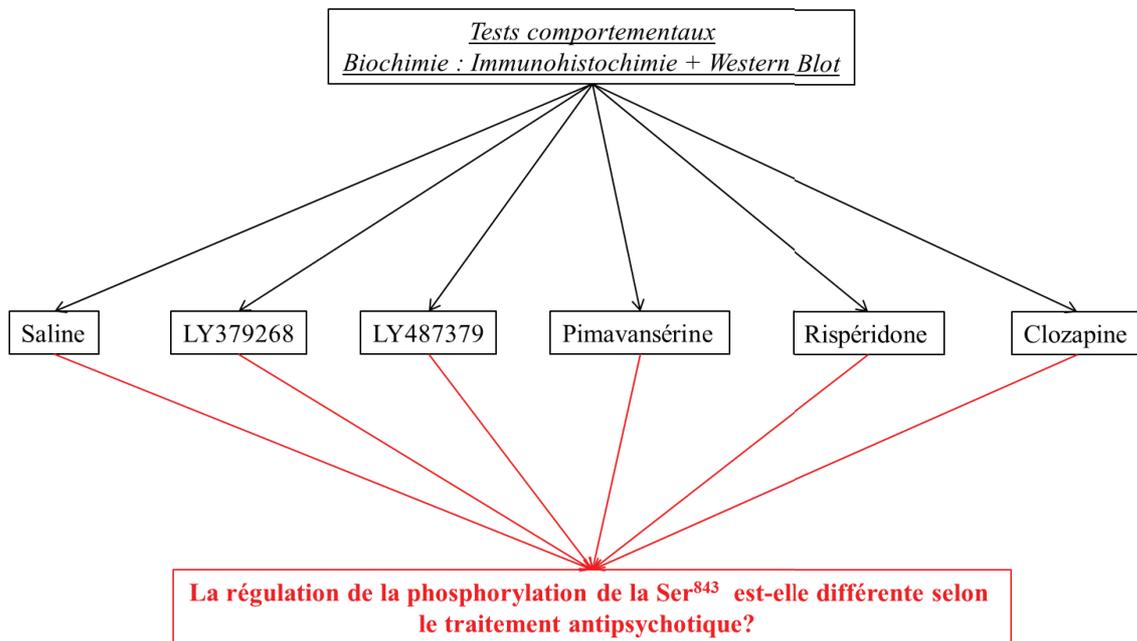
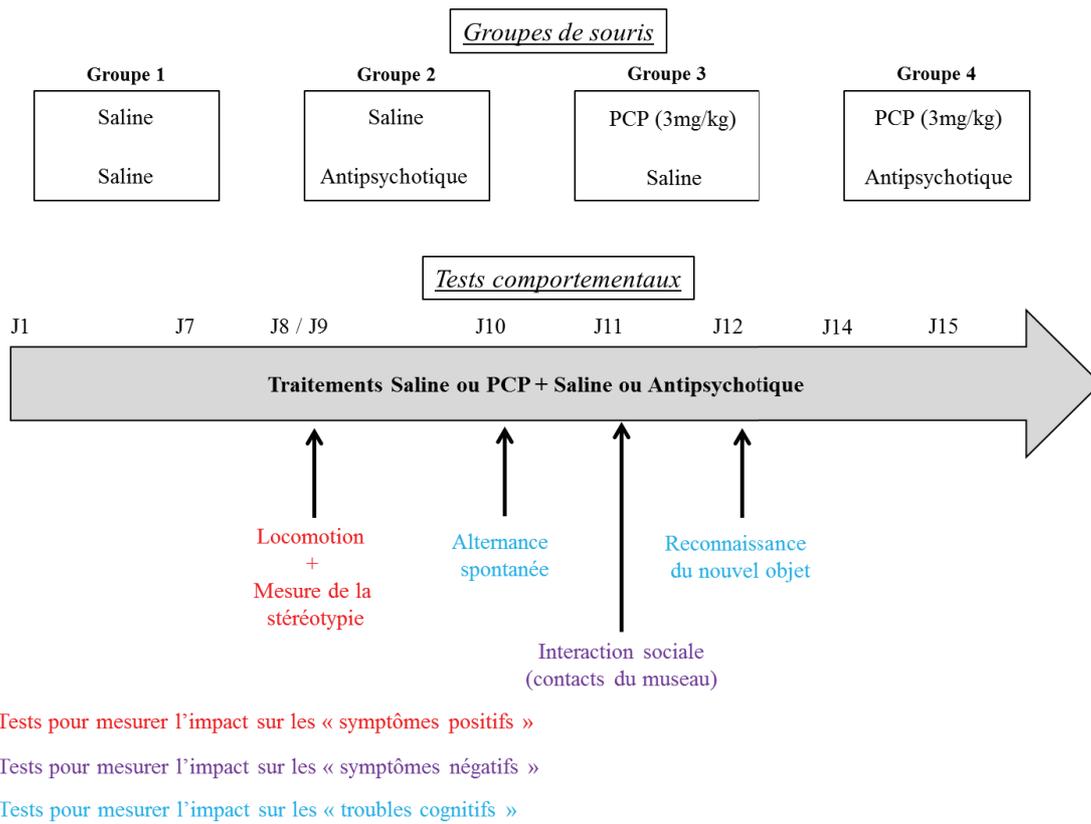


Figure 20 Perspectives d'études de la régulation de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ en réponse à différents types d'antipsychotiques

b/ Vers l'utilisation de l'anticorps spécifique de la phosphorylation de la Ser⁸⁴³ comme un marqueur d'activité des antipsychotiques

Les différentes expériences réalisées durant la thèse suggèrent que cet anticorps peut être utilisé comme un biomarqueur de l'activité et de la signalisation du complexe mGlu₂/5-HT_{2A} en réponse à de nouveaux composés ciblant le récepteur mGlu₂, le récepteur 5-HT_{2A} ou ciblant à la fois les récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂. Le niveau de phosphorylation de la Ser⁸⁴³ pourrait ainsi refléter l'efficacité thérapeutique des composés testés.

Des études post-mortem démontrent une différence de densité des récepteurs 5-HT_{2A} et mGlu₂ chez des patients diagnostiqués schizophrènes (95, 112, 170). Même si des résultats contradictoires ont été publiés dus à la prise ou non d'antipsychotiques par les patients inclus dans les études, la plupart d'entre elles rapportent une diminution de l'expression du récepteur 5-HT_{2A} dans les cerveaux des patients atteints de schizophrénie (95, 170). Pour l'instant, la cause de cette dérégulation reste inconnue. L'altération de la balance d'expression des récepteurs mGlu₂ et 5-HT_{2A} pourrait être due à la pathologie elle-même. Cependant, elle pourrait être aussi la conséquence de la prise d'antipsychotiques atypiques par les patients comme le montre l'exemple du pomaglumetad, antipsychotique inefficace chez les patients préalablement traités avec des antipsychotiques atypiques (94). Au-delà de l'expression relative des deux récepteurs, un immunomarquage avec l'anticorps anti-phosphoSer⁸⁴³ du récepteur mGlu₂ dans des biopsies post-mortem de patients schizophrènes pourrait ainsi rendre compte de l'activité fonctionnelle de l'hétérocomplexe dans la schizophrénie et d'évaluer l'effet des différents traitements sur cette activité.

Méthodologie

Dans cette partie, nous nous proposons d'apporter des précisions sur quelques points méthodologiques clés employés durant la thèse pour réaliser la carte de phosphorylation du récepteur mGlu₂ et mesurer son activité $G_{i/o}$.

I/ Analyse de la phosphorylation par spectrométrie de masse

Parmi les nombreuses possibilités offertes par la protéomique, l'étude des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation constitue une application majeure. Les progrès de la spectrométrie de masse pour l'analyse des modifications post traductionnelles des protéines a révolutionné ces analyses en permettant une identification sans à priori des sites phosphorylés et une quantification relative de leur taux de phosphorylation (185). Ces techniques d'analyse ont déjà permis de détecter avec précision les phosphorylations présentes sur plusieurs RCPGs ouvrant la voie à l'étude de leur profil de phosphorylation (132, 133). Pour cette partie, je décrirai uniquement les stratégies de protéomique utilisées durant la thèse pour identifier et quantifier les sites phosphorylés du récepteur mGlu₂ : la stratégie « bottom-up » et la quantification par une approche sans marquage (« Label-free ») (Figure 21).

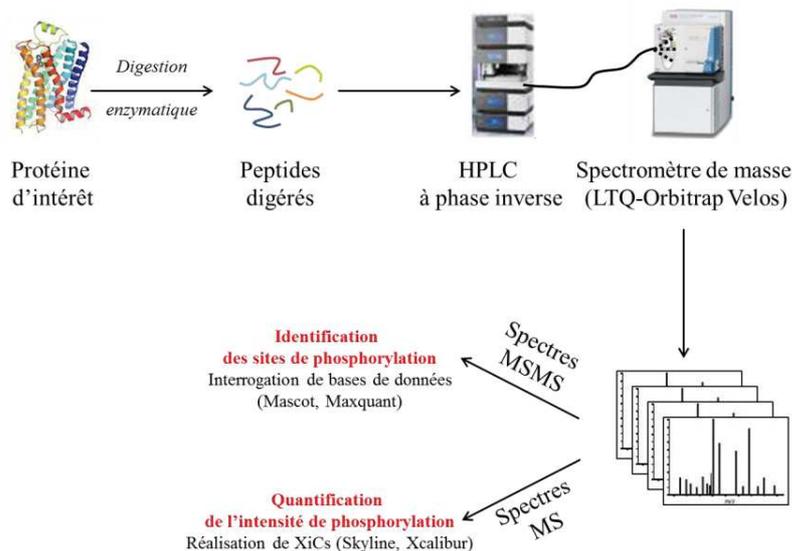


Figure 21 La stratégie « bottom-up » suivie d'une quantification sans marquage « Label-free »

i) La digestion enzymatique de la protéine d'intérêt:

Dans la stratégie « bottom-up » que nous avons employée, les protéines ne sont pas directement analysées en spectrométrie de masse mais, au préalable, digérées par une endoprotéase. Ce sont donc les peptides de digestion qui sont analysés. Il faudra ensuite les réassembler informatiquement en protéines après leur identification. Par opposition, dans la stratégie « top down », les protéines entières sont introduites dans le spectromètre de masse. Différentes enzymes de digestion peuvent être sélectionnées afin de maximiser la couverture de séquence de la protéine lors de l'analyse par spectrométrie de masse grâce à la génération de peptides de taille analysables (idéalement entre 6 et 20 acides aminés et porteurs de charges positives). Parmi les enzymes de digestion les plus couramment utilisées en protéomique, on peut citer la trypsine qui coupe en C-terminal des résidus lysine et arginine non suivis d'une proline ; la chymotrypsine qui coupe en C-terminal après les résidus phénylalanine, tyrosine et tryptophane non suivis d'une proline ; les Lys C et Lys N coupant respectivement en C-terminal et N-terminal d'une lysine ; et l'endopeptidase AspN coupant en N-terminal d'un résidu aspartate.

ii) La séparation chromatographique HPLC des peptides

Pour analyser de mélanges complexes de peptides, le spectromètre de masse est souvent couplé à la chromatographie liquide haute pression (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography) en phase inverse afin de séparer les peptides en fonction de leur hydrophobicité et les amener progressivement au spectromètre de masse pour lui laisser le temps de caractériser un maximum de peptides différents. La phase stationnaire la plus utilisée en protéomique est le C18 (matrice de silice greffée de chaînes aliphatiques longues de 18 carbones).

Du fait de la faible représentation des peptides phosphorylés parmi les peptides résultant de la digestion d'une protéine, les peptides phosphorylés peuvent être enrichis par des méthodes biochimiques :

- la purification IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) est une technique de chromatographie d'affinité entre le peptide phosphorylé chargé négativement et un ion métal chargé positivement (Gallium, Fer) chargé sur une matrice NTA (NiTriloacetic Acid) (186)

- la purification TiO_2 (dioxyde de titane) est aussi une technique de chromatographie d'affinité où la résine TiO_2 est capable de retenir le groupement phosphate, chargé négativement, des peptides phosphorylés (187).

iii) Analyse des peptides par spectrométrie de masse:

L'analyse MS des peptides permet d'obtenir plusieurs types d'informations. La MS1 procure la masse sur charge (m/z) du peptide d'intérêt. La MSMS ou MS2 permet d'obtenir la masse sur charge des fragments obtenus par dissociation du peptide dans une chambre de fragmentation. Suivant le mode de fragmentation employé, les peptides fragmentent à des endroits bien particuliers ce qui permet de reconstituer des informations de séquence en acides aminés et de localiser les modifications post traductionnelles. La dissociation induite par collision (contre un gaz inerte comme l'azote ou l'hélium, CID) fragmente le peptide au niveau de la liaison peptidique et génère des ions de type b (si la charge reste coté N-terminal du peptide) et y (si la charge reste coté C-terminal du peptide) (Figure 22). Une variante de cette méthode de fragmentation est l'HCD (High Collision Dissociation) (188) qui génère également des fragments b et y mais permet également l'observation de fragments m/z de plus basse masse. La dissociation par transfert d'électron (ETD) consiste en une capture en phase gazeuse d'un électron par un ion multi-chargé. Elle fragmente les peptides après la liaison peptidique et génère des ions fragments de type c (si la charge reste coté N-terminal du peptide) et z (si la charge reste coté C-terminal du peptide, Figure 22). Développé plus récemment, l'ETHCD combine 2 modes de fragmentation (HCD et ETD) et permet la génération de 4 types de fragments b, y, c et z (Figure 22).

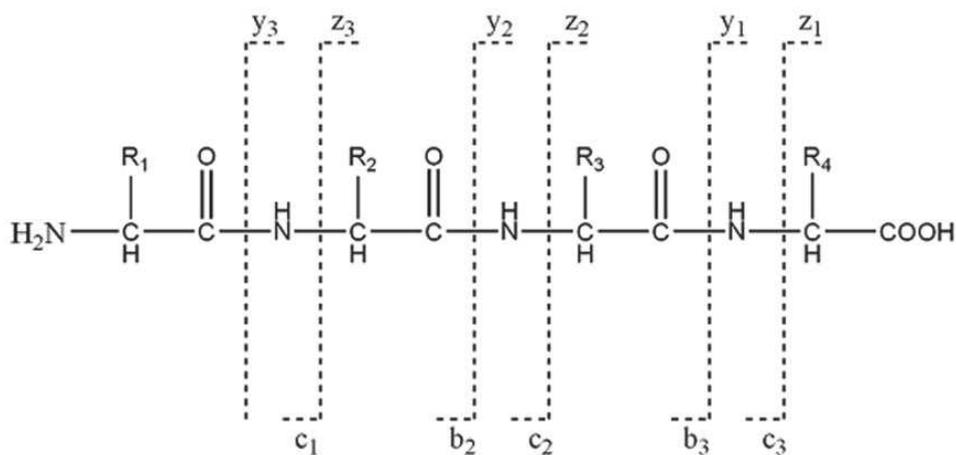


Figure 22 Fragmentation peptidique par CID (génération d'ions b et y) ou ETD (génération d'ions c et z). L'ETHCD permet la génération des 4 types d'ions.

Les peptides ne fragmentant pas aléatoirement, il est possible de calculer les spectres de fragmentation théoriques des peptides de digestion des protéines dont les séquences sont contenues dans les bases de données et de les confronter aux spectres de fragmentation MSMS expérimentaux pour les identifier grâce à des logiciels comme Mascot® ou encore Maxquant® (189). A noter que la présence d'une phosphorylation sur un peptide induit un incrément de masse de 80 Da sur le précurseur en MS1. Cependant en MS2 mode CID, elle induit entre deux ions fragments d'une série (b ou y) un incrément de masse de 243 Da si une tyrosine est phosphorylée (Tyr 163 Da + Phospho 80 Da = 243 Da), un incrément de masse de 69 Da si une sérine est phosphorylée (Ser 87 Da + Phospho 80 Da – perte de neutre H₃PO₄ 98 Da) ou un incrément de masse de 83 Da si une thréonine est phosphorylée, (Thr 101 Da + Phospho 80 Da – perte de neutre H₃PO₄ 98 Da). Le décalage de masse dans la série b ou y des fragments apporté par la modification permet donc de localiser le résidu phosphorylé.

La méthode d'analyse que nous avons employée pour caractériser sans a priori les peptides de digestion est le top 20 DDA CID sur un LTQ orbitrap Elite Pro. Dans cette méthode d'acquisition, un spectre MS1 est acquis dans la partie orbitrap (FT) de la machine afin de mesurer avec une résolution de 60.000, les m/z des peptides présents à un temps t du gradient. Puis le logiciel pilotant le spectromètre de masse analyse le spectre MS1 obtenu et déclenche l'acquisition d'un spectre MS2 en mode CID (collision induced dissociation) pour les 20 ions les plus intenses. La succession 1 spectre MS1 + 20 spectres MS2 constitue un cycle d'analyse qui est reproduit jusqu'à la fin de l'acquisition. La liste de 20 précurseurs à fragmenter évolue au fur et à mesure que les peptides arrivent de l'HPLC et apparaissent sur les spectres MS1 d'où le terme DDA (data dependent acquisition).

Le cycle d'analyse commençant toujours par un spectre MS1, on peut reproduire le profil d'élution des peptides en extrayant le signal MS1 correspondant à leur m/z dans la succession de spectres MS1 (le numéro de scan MS1 correspond à un temps d'élution de l'HPLC). C'est ce que l'on nomme un « appel d'ion » ou « extracted ion chromatogram » (XIC). La surface sous la courbe reflétant l'abondance du peptide dans l'échantillon, elle peut être comparée pour une m/z donnée entre plusieurs injections (Figure 23).

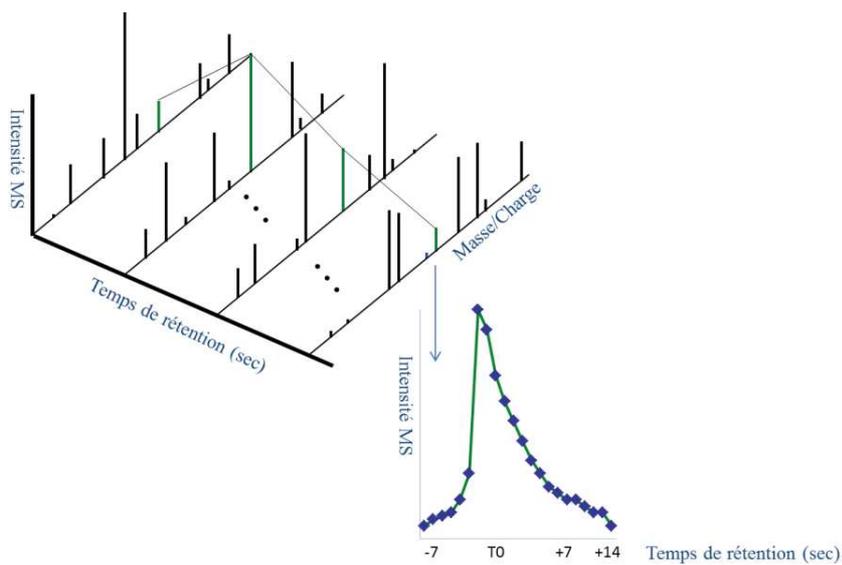


Figure 23 Principe de l' « appel d'ion » ou « extracted ion chromatogram » (XIC)

Dans le cas particulier des peptides phosphorylés, la stœchiométrie de phosphorylation peut être estimée pour chaque condition biologique en calculant l'index de phosphorylation MS :

index de phosphorylation = intensité MS du peptide précurseur phosphorylé / (intensité MS du peptide précurseur phosphorylé + intensité MS du peptide précurseur non phosphorylé).

II/ Mesure de l'activité $G_{i/o}$ du récepteur mGlu₂ par Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) : la sonde CAMYEL

La sonde CAMYEL (cAMP sensor using YFP-Epac-RLuc) est un outil pharmacologique développé par le laboratoire de Paul Sternweis pour faciliter l'étude la régulation de l'AMPc (173). Le but est d'exprimer la sonde constituée par 2 parties où un transfert d'énergie et l'émission d'un signal de BRET se fait lorsque les 2 sont proches. Lorsqu'une augmentation de la production d'AMPc cellulaire se produit, comme lors d'une activation de l'adénylate cycle par la sous-unité α_s de la protéine G_s , l'AMPc se place entre les 2 parties de la sonde empêchant le signal de BRET : plus le signal de BRET diminue, plus la production d'AMPc est importante.

Ainsi, pour mesurer l'activité $G_{i/o}$ de nos RCPGs d'intérêt couplé à la protéine $G_{i/o}$, une stimulation directe de l'adénylate cyclase par un traitement des cellules à la forskoline (pour stimuler l'adénylate cyclase) est nécessaire afin de mesurer au final une inhibition de la production d'AMPc, reflet de l'activité des protéines $G_{i/o}$.

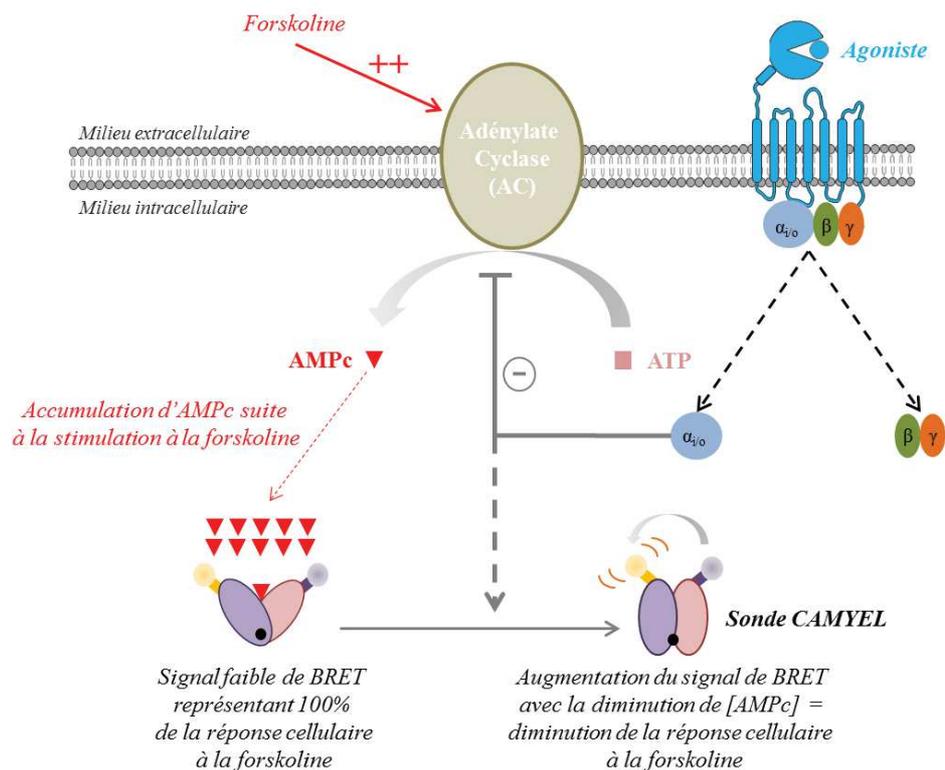


Figure 24 Principe du BRET pour la mesure indirecte de la concentration d'AMPc suite à la stimulation d'un RCPG couplé à $G_{i/o}$

III/ Mesure de l'activité $G_{i/o}$ du récepteur mGlu₂ par électrophysiologie des canaux calciques de type N

Le principe de la technique consiste à mesurer le blocage des canaux calciques de type N en réponse à une stimulation d'un RCPG couplé à la protéine $G_{i/o}$. En effet, plusieurs études pharmacologiques, dont une sur le récepteur mu des opioïdes (126, 128, 190), ont rapporté la capacité de la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine $G_{i/o}$ d'interagir avec les canaux calciques de type N pour bloquer le courant entrant de calcium.

Pour mesurer l'impact sur le canal calcique de type N, nous avons utilisé des cellules HEK-293 co-transfectées avec les RCPGs d'intérêt, le canal calcique de type N et de la GFP membranaire. Ainsi, la drogue est appliquée directement sur les cellules transfectées (GFP positives) et les courants en réponse à une dépolarisation de -80 mV à 0 mV durant 10 msec répétée toutes les secondes sont mesurés. Ainsi, l'inhibition du courant calcique reflète l'activité $G_{i/o}$ du récepteur mGlu₂ (Figure 25).

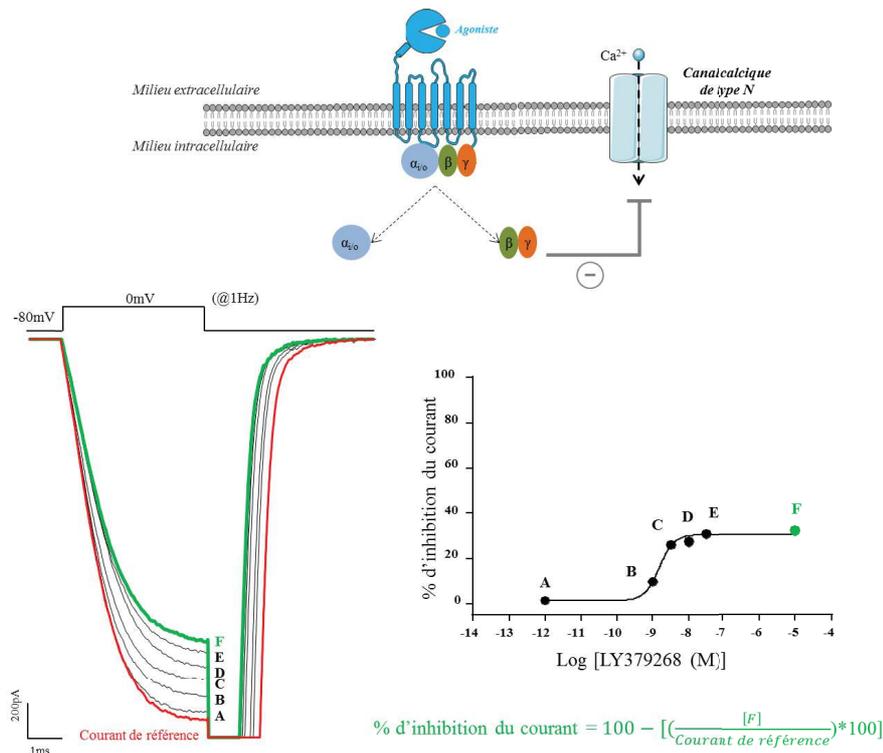


Figure 25 Principe électrophysiologique de l'inhibition du canal calcique de type N suite à la stimulation d'un RCPG couplé à $G_{i/o}$.

Bibliographie

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders-fifth edition : DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013
2. Freedman, R. (2003) Schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1738–1749
3. Owen, M. J., Sawa, A., and Mortensen, P. B. (2016) Schizophrenia. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 86–97
4. Pompili, M., Amador, X. F., Girardi, P., Harkavy-Friedman, J., Harrow, M., Kaplan, K., Krausz, M., Lester, D., Meltzer, H. Y., Modestin, J., Montross, L. P., Mortensen, P. B., Munk-Jørgensen, P., Nielsen, J., Nordentoft, M., Saarinen, P. I., Zisook, S., Wilson, S. T., and Tatarelli, R. (2007) Suicide risk in schizophrenia: learning from the past to change the future. *Ann. Gen. Psychiatry.* **6**, 10
5. Tamminga, C. A., and Holcomb, H. H. (2005) Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol. Psychiatry.* **10**, 27–39
6. 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
7. 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
8. Green, M. F. (1996) What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *Am. J. Psychiatry.* **153**, 321–330
9. Badner, J. A., and Gershon, E. S. (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* **7**, 405–411
10. Schwab, S. G., and Wildenauer, D. B. (2009) Update on key previously proposed candidate genes for schizophrenia. *Curr. Opin. Psychiatry.* **22**, 147–153
11. van de Leemput, J., Hess, J. L., Glatt, S. J., and Tsuang, M. T. (2016) Genetics of Schizophrenia: Historical Insights and Prevailing Evidence. *Adv. Genet.* **96**, 99–141
12. Devor, A., Andreassen, O. A., Wang, Y., Mäki-Marttunen, T., Smeland, O. B., Fan, C.-C., Schork, A. J., Holland, D., Thompson, W. K., Witoelar, A., Chen, C.-H., Desikan, R. S.,

- McEvoy, L. K., Djurovic, S., Greengard, P., Svenningsson, P., Einevoll, G. T., and Dale, A. M. (2017) Genetic evidence for role of integration of fast and slow neurotransmission in schizophrenia. *Mol. Psychiatry*. **22**, 792–801
13. Levitt, P., Ebert, P., Mirnics, K., Nimgaonkar, V. L., and Lewis, D. A. (2006) Making the case for a candidate vulnerability gene in schizophrenia: Convergent evidence for regulator of G-protein signaling 4 (RGS4). *Biol. Psychiatry*. **60**, 534–537
 14. Cantrup, R., Sathanantham, K., Rushlow, W. J., and Rajakumar, N. (2012) Chronic hyperdopaminergic activity of schizophrenia is associated with increased Δ FosB levels and cdk-5 signaling in the nucleus accumbens. *Neuroscience*. **222**, 124–135
 15. Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y., Liu, X., Yang, C.-H., Jordan, J. D., Ma, D. K., Liu, C. Y., Ganesan, S., Cheng, H.-J., Ming, G., Lu, B., and Song, H. (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 Regulates Integration of Newly Generated Neurons in the Adult Brain. *Cell*. **130**, 1146–1158
 16. Roberts, R. C. (2007) Schizophrenia in translation: disrupted in schizophrenia (DISC1): integrating clinical and basic findings. *Schizophr. Bull.* **33**, 11–15
 17. Fernández, E., Collins, M. O., Uren, R. T., Kopanitsa, M. V., Komiyama, N. H., Croning, M. D. R., Zografos, L., Armstrong, J. D., Choudhary, J. S., and Grant, S. G. N. (2009) Targeted tandem affinity purification of PSD-95 recovers core postsynaptic complexes and schizophrenia susceptibility proteins. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 269
 18. Holmans, P. A., Riley, B., Pulver, A. E., Owen, M. J., Wildenauer, D. B., Gejman, P. V., Mowry, B. J., Laurent, C., Kendler, K. S., Nestadt, G., Williams, N. M., Schwab, S. G., Sanders, A. R., Nertney, D., Mallet, J., Wormley, B., Lasseter, V. K., O'Donovan, M. C., Duan, J., Albus, M., Alexander, M., Godard, S., Ribble, R., Liang, K. Y., Norton, N., Maier, W., Papadimitriou, G., Walsh, D., Jay, M., O'Neill, A., Lerer, F. B., Dikeos, D., Crowe, R. R., Silverman, J. M., and Levinson, D. F. (2009) Genomewide linkage scan of schizophrenia in a large multicenter pedigree sample using single nucleotide polymorphisms. *Mol. Psychiatry*. **14**, 786–795
 19. Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Anttila, V., Gusev, A., Day, F. R., Consortium, R., Consortium, P. G., Consortium 3, A. N. G. C. W. T., Duncan, L., Perry, J. R. B., Patterson, N., Robinson, E., Daly, M. J., Price, A. L., and Neale, B. M. (2015) An Atlas of Genetic Correlations across Human Diseases and Traits. *bioRxiv*. 10.1101/014498

20. Cariaga-Martinez, A., Saiz-Ruiz, J., and Alelú-Paz, R. (2016) From Linkage Studies to Epigenetics: What We Know and What We Need to Know in the Neurobiology of Schizophrenia. *Front. Neurosci.* **10**, 202
21. Sekar, A., Bialas, A. R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T. R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., Genovese, G., Rose, S. A., Handsaker, R. E., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Daly, M. J., Carroll, M. C., Stevens, B., and McCarroll, S. A. (2016) Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature.* **530**, 177–183
22. Murray, R. M., Bhavsar, V., Tripoli, G., and Howes, O. (2017) 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophr. Bull.* 10.1093/schbul/sbx121
23. Shorter, K. R., and Miller, B. H. (2015) Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **118**, 1–7
24. The pathogenesis of schizophrenia: a neurodevelopmental theory. In *The Neurology of Schizophrenia* (eds RA Nasrallah & DR Weinberger): 387–405. Elsevier, 1986.
25. Murray, R. M., and Lewis, S. W. (1987) Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* **295**, 681–682
26. Brown, A. S., and Derkits, E. J. (2010) Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am. J. Psychiatry.* **167**, 261–280
27. Goldman, P. S. (1974) Functional recovery after lesions of the nervous systems. 3. Developmental processes in neural plasticity. Recovery of function after CNS lesions in infant monkeys. *Neurosci. Res. Program Bull.* **12**, 217–222
28. Harris, L. W., Sharp, T., Gartlon, J., Jones, D. N. C., and Harrison, P. J. (2003) Long-term behavioural, molecular and morphological effects of neonatal NMDA receptor antagonism. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1706–1710
29. Feinberg, I. (1982) Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J. Psychiatr. Res.* **17**, 319–334
30. Granger, B. (1996) [Synaptogenesis and synaptic pruning: role in triggering schizophrenia]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983. **25**, 1595–1598

31. Glantz, L. A., and Lewis, D. A. (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* **57**, 65–73
32. Malmberg, A., Lewis, G., David, A., and Allebeck, P. (1998) Premorbid adjustment and personality in people with schizophrenia. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **172**, 308-313; discussion 314-315
33. Carlsson, A., and Lindqvist, M. (1963) EFFECT OF CHLORPROMAZINE OR HALOPERIDOL ON FORMATION OF 3-METHOXYTYRAMINE AND NORMETANEPHRINE IN MOUSE BRAIN. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*. **20**, 140–144
34. Carlsson, A. (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **1**, 179–186
35. Lieberman, J. A., Kane, J. M., and Alvir, J. (1987) Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)*. **91**, 415–433
36. Reith, J., Benkelfat, C., Sherwin, A., Yasuhara, Y., Kuwabara, H., Andermann, F., Bachneff, S., Cumming, P., Diksic, M., Dyve, S. E., Etienne, P., Evans, A. C., Lal, S., Shevell, M., Savard, G., Wong, D. F., Chouinard, G., and Gjedde, A. (1994) Elevated dopa decarboxylase activity in living brain of patients with psychosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11651–11654
37. Laruelle, M. (2000) The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: implications from recent brain imaging studies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **31**, 371–384
38. Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., and Davidson, M. (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am. J. Psychiatry.* **148**, 1474–1486
39. Howes, O. D., and Kapur, S. (2009) The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophr. Bull.* **35**, 549–562
40. Hietala, J., Syvälahti, E., Vilkmann, H., Vuorio, K., Rökköläinen, V., Bergman, J., Haaparanta, M., Solin, O., Kuoppamäki, M., Eronen, E., Ruotsalainen, U., and Salokangas, R. K. (1999) Depressive symptoms and presynaptic dopamine function in neuroleptic-naive schizophrenia. *Schizophr. Res.* **35**, 41–50
41. Weinberger, D. R. (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* **44**, 660–669

42. Lieberman, J. A., and Koreen, A. R. (1993) Neurochemistry and neuroendocrinology of schizophrenia: a selective review. *Schizophr. Bull.* **19**, 371–429
43. Meyer-Lindenberg, A., Miletich, R. S., Kohn, P. D., Esposito, G., Carson, R. E., Quarantelli, M., Weinberger, D. R., and Berman, K. F. (2002) Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat. Neurosci.* **5**, 267–271
44. Qi, Z., Miller, G. W., and Voit, E. O. (2010) Computational modeling of synaptic neurotransmission as a tool for assessing dopamine hypotheses of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry.* **43 Suppl 1**, S50-60
45. COSTA, E. (1960) The role of serotonin in neurobiology. *Int. Rev. Neurobiol.* **2**, 175–227
46. Wooley DW. (1962) The biochemical basis of psychosis
47. Breier, A. (1995) Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action. *Schizophr. Res.* **14**, 187–202
48. Soares, J. C., and Innis, R. B. (1999) Neurochemical brain imaging investigations of schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* **46**, 600–615
49. Javitt, D. C. (1987) Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J. Clin. Psychiatry.* **9**, 12–35
50. Javitt, D. C., and Zukin, S. R. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* **148**, 1301–1308
51. Hu, W., MacDonald, M. L., Elswick, D. E., and Sweet, R. A. (2015) The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1338**, 38–57
52. Olney, J. W., and Farber, N. B. (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* **52**, 998–1007
53. Carlsson, M., and Carlsson, A. (1990) Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr. Bull.* **16**, 425–432
54. Javitt, D. C., Zylberman, I., Zukin, S. R., Heresco-Levy, U., and Lindenmayer, J. P. (1994) Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am. J. Psychiatry.* **151**, 1234–1236
55. Tonarelli, S. B., Pasillas, R., Alvarado, L., Dwivedi, A., and Cancellare, A. (2016) Acceptance and Commitment Therapy Compared to Treatment as Usual in Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Psychiatry.* 10.4172/2378-5756.1000366

56. Andermann, K., and Lindsay, J. S. (1955) Chlorpromazine. *Med. J. Aust.* **42**, 80–82
57. Thornley, B., Rathbone, J., Adams, C. E., and Awad, G. (2003) Chlorpromazine versus placebo for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 10.1002/14651858.CD000284
58. Creese, I., Burt, D. R., and Snyder, S. H. (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science.* **192**, 481–483
59. Bressan, R. A., Costa, D. C., Jones, H. M., Ell, P. J., and Pilowsky, L. S. (2002) Typical antipsychotic drugs -- D(2) receptor occupancy and depressive symptoms in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **56**, 31–36
60. Haddad, P. M., and Wieck, A. (2004) Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs.* **64**, 2291–2314
61. Vasan, S., and Abdijadid, S. (2017) Atypical Antipsychotic Agents. in *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
62. Nucifora, F. C., Mihaljevic, M., Lee, B. J., and Sawa, A. (2017) Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **14**, 750–761
63. Bilder, R. M., Goldman, R. S., Volavka, J., Czobor, P., Hoptman, M., Sheitman, B., Lindenmayer, J.-P., Citrome, L., McEvoy, J., Kunz, M., Chakos, M., Cooper, T. B., Horowitz, T. L., and Lieberman, J. A. (2002) Neurocognitive effects of clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry.* **159**, 1018–1028
64. Keefe, R. S. E., Bilder, R. M., Davis, S. M., Harvey, P. D., Palmer, B. W., Gold, J. M., Meltzer, H. Y., Green, M. F., Capuano, G., Stroup, T. S., McEvoy, J. P., Swartz, M. S., Rosenheck, R. A., Perkins, D. O., Davis, C. E., Hsiao, J. K., Lieberman, J. A., CATIE Investigators, and Neurocognitive Working Group (2007) Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch. Gen. Psychiatry.* **64**, 633–647
65. Volavka, J., Czobor, P., Sheitman, B., Lindenmayer, J.-P., Citrome, L., McEvoy, J. P., Cooper, T. B., Chakos, M., and Lieberman, J. A. (2002) Clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in the treatment of patients with chronic schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry.* **159**, 255–262
66. Citrome, L., and Volavka, J. (2002) Atypical antipsychotics: revolutionary or incremental advance? *Expert Rev. Neurother.* **2**, 69–88

67. Tuplin, E. W., and Holahan, M. R. (2017) Aripiprazole, a Drug that Displays Partial Agonism and Functional Selectivity. *Curr. Neuropharmacol.* 10.2174/1570159X15666170413115754
68. Stone, J. M., Raffin, M., Morrison, P., and McGuire, P. K. (2010) Review: The biological basis of antipsychotic response in schizophrenia. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* **24**, 953–964
69. Zink, M., and Correll, C. U. (2015) Glutamatergic agents for schizophrenia: current evidence and perspectives. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **8**, 335–352
70. Maksymetz, J., Moran, S. P., and Conn, P. J. (2017) Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Mol. Brain.* **10**, 15
71. de Bartolomeis, A., Sarappa, C., Magara, S., and Iasevoli, F. (2012) Targeting glutamate system for novel antipsychotic approaches: relevance for residual psychotic symptoms and treatment resistant schizophrenia. *Eur. J. Pharmacol.* **682**, 1–11
72. Danysz, W. (2002) CX-516 Cortex pharmaceuticals. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000. **3**, 1081–1088
73. Danysz, W. (2002) Positive modulators of AMPA receptors as a potential treatment for schizophrenia. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000. **3**, 1062–1066
74. O'Neill, M. J., Bleakman, D., Zimmerman, D. M., and Nisenbaum, E. S. (2004) AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **3**, 181–194
75. Goff, D. (2016) The Therapeutic Role of d-Cycloserine in Schizophrenia. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif.* **76**, 39–66
76. Atkinson, B. N., Bell, S. C., De Vivo, M., Kowalski, L. R., Lechner, S. M., Ognyanov, V. I., Tham, C. S., Tsai, C., Jia, J., Ashton, D., and Klitenick, M. A. (2001) ALX 5407: a potent, selective inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter. *Mol. Pharmacol.* **60**, 1414–1420
77. Mezler, M., Hornberger, W., Mueller, R., Schmidt, M., Amberg, M. S. W., Amberg, W., Amberg, M. S. W., Braje, W., Ochse, M., Schoemaker, H., and Behl, B. (2008) Inhibitors of GlyT1 affect glycine transport via discrete binding sites. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1705–1715
78. Harsing, L. G., Timar, J., Szabo, G., Udvari, S., Nagy, K. M., Marko, B., Zsilla, G., Czompa, A., Tapolcsanyi, P., Kocsis, A., and Matyus, P. (2015) Sarcosine-Based Glycine Transporter Type-1 (GlyT-1) Inhibitors Containing Pyridazine Moiety: A Further Search for Drugs with Potential to Influence Schizophrenia Negative Symptoms. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 2291–2303

79. Kumar, V., Ahmad, M. A., Najmi, A. K., and Akhtar, M. (2016) Effect of Sarcosine (a Glycine Transport 1 Inhibitor) and Risperidone (an Atypical antipsychotic Drug) on MK-801 Induced Learning and Memory Deficits in Rats. *Drug Res.* **66**, 11–17
80. Kantrowitz, J. T., Nolan, K. A., Epstein, M. L., Lehrfeld, N., Shope, C., Petkova, E., and Javitt, D. C. (2017) Neurophysiological Effects of Bitopertin in Schizophrenia. *J. Clin. Psychopharmacol.* **37**, 447–451
81. Fell, M. J., McKinzie, D. L., Monn, J. A., and Svensson, K. A. (2012) Group II metabotropic glutamate receptor agonists and positive allosteric modulators as novel treatments for schizophrenia. *Neuropharmacology.* **62**, 1473–1483
82. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904507/> (Accessed August 24, 2017)
83. Ferraguti, F., and Shigemoto, R. (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* **326**, 483–504
84. Ellaithy, A., Younkin, J., González-Maeso, J., and Logothetis, D. E. (2015) Positive allosteric modulators of metabotropic glutamate 2 receptors in schizophrenia treatment. *Trends Neurosci.* **38**, 506–516
85. Cho, H. P., Garcia-Barrantes, P. M., Brogan, J. T., Hopkins, C. R., Niswender, C. M., Rodriguez, A. L., Venable, D. F., Morrison, R. D., Bubser, M., Daniels, J. S., Jones, C. K., Conn, P. J., and Lindsley, C. W. (2014) Chemical modulation of mutant mGlu1 receptors derived from deleterious GRM1 mutations found in schizophrenics. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2334–2346
86. Pałucha-Poniewiera, A., Kłodzińska, A., Stachowicz, K., Tokarski, K., Hess, G., Schann, S., Frauli, M., Neuville, P., and Pilc, A. (2008) Peripheral administration of group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts potential antipsychotic effects in rodents. *Neuropharmacology.* **55**, 517–524
87. Wierońska, J. M., Zorn, S. H., Doller, D., and Pilc, A. (2016) Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: Historical perspective and critical comparative assessment. *Pharmacol. Ther.* **157**, 10–27
88. Satow, A., Suzuki, G., Maehara, S., Hikichi, H., Murai, T., Murai, T., Kawagoe-Takaki, H., Hata, M., Ito, S., Ozaki, S., Kawamoto, H., and Ohta, H. (2009) Unique antipsychotic activities of the selective metabotropic glutamate receptor 1 allosteric antagonist 2-cyclopropyl-5-[1-(2-fluoro-3-

- pyridinyl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 179–190
89. Rook, J. M., Xiang, Z., Lv, X., Ghoshal, A., Dickerson, J. W., Bridges, T. M., Johnson, K. A., Foster, D. J., Gregory, K. J., Vinson, P. N., Thompson, A. D., Byun, N., Collier, R. L., Bubser, M., Nedelcovych, M. T., Gould, R. W., Stauffer, S. R., Daniels, J. S., Niswender, C. M., Lavreysen, H., Mackie, C., Conde-Ceide, S., Alcazar, J., Bartolomé-Nebreda, J. M., Macdonald, G. J., Talpos, J. C., Steckler, T., Jones, C. K., Lindsley, C. W., and Conn, P. J. (2015) Biased mGlu5-Positive Allosteric Modulators Provide In Vivo Efficacy without Potentiating mGlu5 Modulation of NMDAR Currents. *Neuron*. **86**, 1029–1040
90. Li, M.-L., Yang, S.-S., Xing, B., Ferguson, B. R., Gulchina, Y., Li, Y.-C., Li, F., Hu, X.-Q., and Gao, W.-J. (2015) LY395756, an mGluR2 agonist and mGluR3 antagonist, enhances NMDA receptor expression and function in the normal adult rat prefrontal cortex, but fails to improve working memory and reverse MK801-induced working memory impairment. *Exp. Neurol.* **273**, 190–201
91. Cartmell, J., Monn, J. A., and Schoepp, D. D. (1999) The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonists LY354740 and LY379268 selectively attenuate phencyclidine versus d-amphetamine motor behaviors in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 161–170
92. Jones, C. A., Brown, A. M., Auer, D. P., and Fone, K. C. F. (2011) The mGluR2/3 agonist LY379268 reverses post-weaning social isolation-induced recognition memory deficits in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)*. **214**, 269–283
93. Higgins, G. A., Ballard, T. M., Kew, J. N. C., Richards, J. G., Kemp, J. A., Adam, G., Woltering, T., Nakanishi, S., and Mutel, V. (2004) Pharmacological manipulation of mGlu2 receptors influences cognitive performance in the rodent. *Neuropharmacology*. **46**, 907–917
94. Kinon, B. J., Millen, B. A., Zhang, L., and McKinzie, D. L. (2015) Exploratory analysis for a targeted patient population responsive to the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist pomaglumetad methionil in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. **78**, 754–762
95. Delille, H. K., Mezler, M., and Marek, G. J. (2013) The two faces of the pharmacological interaction of mGlu2 and 5-HT_{2A} - relevance of receptor heterocomplexes and interaction through functional brain pathways. *Neuropharmacology*. **70**, 296–305

96. Hannon, J., and Hoyer, D. (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* **195**, 198–213
97. de Chaffoy de Courcelles, D., Leysen, J. E., De Clerck, F., Van Belle, H., and Janssen, P. A. (1985) Evidence that phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-S2 receptor sites. *J. Biol. Chem.* **260**, 7603–7608
98. Garnovskaya, M. N., Nebigil, C. G., Arthur, J. M., Spurney, R. F., and Raymond, J. R. (1995) 5-Hydroxytryptamine2A receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. *Mol. Pharmacol.* **48**, 230–237
99. Wilcox, B. D., Rydelek-Fitzgerald, L., and Jeffrey, J. J. (1992) Regulation of collagenase gene expression by serotonin and progesterone in rat uterine smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 20752–20757
100. Guillet-Deniau, I., Burnol, A. F., and Girard, J. (1997) Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT2A receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 14825–14829
101. Xia, Z., Hufeisen, S. J., Gray, J. A., and Roth, B. L. (2003) The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT2A serotonin receptors in cortical pyramidal neurons in vitro. *Neuroscience.* **122**, 907–920
102. Beliveau, V., Ganz, M., Feng, L., Ozenne, B., Højgaard, L., Fisher, P. M., Svarer, C., Greve, D. N., and Knudsen, G. M. (2017) A High-Resolution In Vivo Atlas of the Human Brain's Serotonin System. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 120–128
103. 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**, E1382-1391
104. 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
105. Ohishi, H., Neki, A., and Mizuno, N. (1998) Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Res.* **30**, 65–82

106. Marek, G. J., Wright, R. A., Schoepp, D. D., Monn, J. A., and Aghajanian, G. K. (2000) Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine(2A) and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 76–87
107. Marek, G. J. (2017) Interactions of Hallucinogens with the Glutamatergic System: Permissive Network Effects Mediated Through Cortical Layer V Pyramidal Neurons. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 10.1007/7854_2017_480
108. Aghajanian, G. K., and Marek, G. J. (1997) Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology.* **36**, 589–599
109. Bonnefous, C., Vernier, J.-M., Hutchinson, J. H., Gardner, M. F., Cramer, M., James, J. K., Rowe, B. A., Daggett, L. P., Schaffhauser, H., and Kamenecka, T. M. (2005) Biphenylindanones: allosteric potentiators of the metabotropic glutamate subtype 2 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4354–4358
110. Benneyworth, M. A., Xiang, Z., Smith, R. L., Garcia, E. E., Conn, P. J., and Sanders-Bush, E. (2007) A selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 2 blocks a hallucinogenic drug model of psychosis. *Mol. Pharmacol.* **72**, 477–484
111. González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., and Sealfon, S. C. (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* **452**, 93–97
112. González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., and Sealfon, S. C. (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* **452**, 93–97
113. Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuéllar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L. F., Neve, R. L., Milligan, G., Sealfon, S. C., López-Giménez, J. F., Meana, J. J., Benson, D. L., and González-Maeso, J. (2012) Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT_{2A}·mGlu₂) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J. Biol. Chem.* **287**, 44301–44319

114. Delille, H. K., Becker, J. M., Burkhardt, S., Bleher, B., Terstappen, G. C., Schmidt, M., Meyer, A. H., Unger, L., Marek, G. J., and Mezler, M. (2012) Heterocomplex formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ and its relevance for cellular signaling cascades. *Neuropharmacology*. **62**, 2184–2191
115. Fribourg, M., Moreno, J. L., Holloway, T., Provasi, D., Baki, L., Mahajan, R., Park, G., Adney, S. K., Hatcher, C., Eltit, J. M., Ruta, J. D., Albizu, L., Li, Z., Umali, A., Shim, J., Fabiato, A., MacKerell, A. D., Brezina, V., Sealfon, S. C., Filizola, M., González-Maeso, J., and Logothetis, D. E. (2011) Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell*. **147**, 1011–1023
116. Moreno, J. L., Miranda-Azpiazu, P., García-Bea, A., Younkin, J., Cui, M., Kozlenkov, A., Ben-Ezra, A., Voloudakis, G., Fakira, A. K., Baki, L., Ge, Y., Georgakopoulos, A., Morón, J. A., Milligan, G., López-Giménez, J. F., Robakis, N. K., Logothetis, D. E., Meana, J. J., and González-Maeso, J. (2016) Allosteric signaling through an mGlu₂ and 5-HT_{2A} heteromeric receptor complex and its potential contribution to schizophrenia. *Sci. Signal*. **9**, ra5
117. Berridge, M. J., Dawson, R. M., Downes, C. P., Heslop, J. P., and Irvine, R. F. (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J*. **212**, 473–482
118. Azzi, A., Boscoboinik, D., and Hensey, C. (1992) The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem*. **208**, 547–557
119. Hatcher-Solis, C., Fribourg, M., Spyridaki, K., Younkin, J., Ellaithy, A., Xiang, G., Liapakis, G., Gonzalez-Maeso, J., Zhang, H., Cui, M., and Logothetis, D. E. (2014) G protein-coupled receptor signaling to Kir channels in *Xenopus* oocytes. *Curr. Pharm. Biotechnol*. **15**, 987–995
120. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé, D., and Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*. **364**, 249–252
121. Schmid, C. L., Raehal, K. M., and Bohn, L. M. (2008) Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on beta-arrestin-2 interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **105**, 1079–1084
122. González-Maeso, J., Yuen, T., Ebersole, B. J., Wurmbach, E., Lira, A., Zhou, M., Weisstaub, N., Hen, R., Gingrich, J. A., and Sealfon, S. C. (2003) Transcriptome fingerprints distinguish

- hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 8836–8843
123. González-Maeso, J., Weisstaub, N. V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Lira, A., Bradley-Moore, M., Ge, Y., Zhou, Q., Sealfon, S. C., and Gingrich, J. A. (2007) Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron*. **53**, 439–452
124. González-Maeso, J., and Sealfon, S. C. (2009) Agonist-trafficking and hallucinogens. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1017–1027
125. Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G. L., Conn, P. J., Ferraguti, F., Schoepp, D. D., Wroblewski, J. T., and Pin, J. P. (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*. **60**, 1017–1041
126. Zamponi, G. W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J., and Snutch, T. P. (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Nature*. **385**, 442–446
127. Perroy, J., Gutierrez, G. J., Coulon, V., Bockaert, J., Pin, J. P., and Fagni, L. (2001) The C terminus of the metabotropic glutamate receptor subtypes 2 and 7 specifies the receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 45800–45805
128. Chen, W.-P., and Kirchgessner, A. L. (2002) Activation of group II mGlu receptors inhibits voltage-gated Ca^{2+} currents in myenteric neurons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, G1282-1289
129. Lee, H., Zhu, X., Casadesus, G., Pallàs, M., Camins, A., O'Neill, M. J., Nakanishi, S., Perry, G., and Smith, M. A. (2009) The effect of mGluR2 activation on signal transduction pathways and neuronal cell survival. *Brain Res.* **1249**, 244–250
130. Moreno, J. L., Holloway, T., Albizu, L., Sealfon, S. C., and González-Maeso, J. (2011) Metabotropic glutamate mGlu2 receptor is necessary for the pharmacological and behavioral effects induced by hallucinogenic 5-HT2A receptor agonists. *Neurosci. Lett.* **493**, 76–79
131. Lefkowitz, R. J. (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 413–422

132. Tobin, A. B., Butcher, A. J., and Kong, K. C. (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 413–420
133. Butcher, A. J., Kong, K. C., Prihandoko, R., and Tobin, A. B. (2012) Physiological role of G-protein coupled receptor phosphorylation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 10.1007/978-3-642-23274-9_5
134. Liggett, S. B. (2011) Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. *Sci. Signal.* **4**, pe36
135. Rajagopal, S., and Shenoy, S. K. (2018) GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell. Signal.* **41**, 9–16
136. Pitcher, J. A., Freedman, N. J., and Lefkowitz, R. J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 653–692
137. Lorenz, W., Inglese, J., Palczewski, K., Onorato, J. J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1991) The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8715–8719
138. Premont, R. T., Macrae, A. D., Stoffel, R. H., Chung, N., Pitcher, J. A., Ambrose, C., Inglese, J., MacDonald, M. E., and Lefkowitz, R. J. (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J. Biol. Chem.* **271**, 6403–6410
139. Fredericks, Z. L., Pitcher, J. A., and Lefkowitz, R. J. (1996) Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 13796–13803
140. Seibold, A., January, B. G., Friedman, J., Hipkin, R. W., and Clark, R. B. (1998) Desensitization of beta2-adrenergic receptors with mutations of the proposed G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* **273**, 7637–7642
141. Nakamura, K., Hipkin, R. W., and Ascoli, M. (1998) The agonist-induced phosphorylation of the rat follitropin receptor maps to the first and third intracellular loops. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* **12**, 580–591
142. Kim, K. M., Valenzano, K. J., Robinson, S. R., Yao, W. D., Barak, L. S., and Caron, M. G. (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* **276**, 37409–37414

143. Budd, D. C., Willars, G. B., McDonald, J. E., and Tobin, A. B. (2001) Phosphorylation of the Gq/11-coupled m3-muscarinic receptor is involved in receptor activation of the ERK-1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 4581–4587
144. Trester-Zedlitz, M., Burlingame, A., Kobilka, B., and von Zastrow, M. (2005) Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry (Mosc.)*. **44**, 6133–6143
145. Tobin, A. B. (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* **153 Suppl 1**, S167-176
146. Reiter, E., and Lefkowitz, R. J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* **17**, 159–165
147. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265**, 3202–3211
148. Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* **267**, 8558–8564
149. Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **264**, 12657–12665
150. Seibold, A., Williams, B., Huang, Z. F., Friedman, J., Moore, R. H., Knoll, B. J., and Clark, R. B. (2000) Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1162–1173
151. Walsh, D. A., and Van Patten, S. M. (1994) Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **8**, 1227–1236
152. Roth, N. S., Campbell, P. T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Lohse, M. J. (1991) Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6201–6204

153. Baillie, G. S., Sood, A., McPhee, I., Gall, I., Perry, S. J., Lefkowitz, R. J., and Houslay, M. D. (2003) beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from G_s to G_i. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 940–945
154. Zhang, M., Turnbaugh, D., Cofie, D., Dogan, S., Koshida, H., Fugate, R., and Kem, D. C. (1996) Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertens. Dallas Tex* 1979. **27**, 269–275
155. Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K., and Uchiyama, H. (1996) Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 2776–2782
156. Oppermann, M., Freedman, N. J., Alexander, R. W., and Lefkowitz, R. J. (1996) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 13266–13272
157. Shih, M., and Malbon, C. C. (1994) Oligodeoxynucleotides antisense to mRNA encoding protein kinase A, protein kinase C, and beta-adrenergic receptor kinase reveal distinctive cell-type-specific roles in agonist-induced desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12193–12197
158. Karoor, V., Wang, L., Wang, H. Y., and Malbon, C. C. (1998) Insulin stimulates sequestration of beta-adrenergic receptors and enhanced association of beta-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *J. Biol. Chem.* **273**, 33035–33041
159. Gray, J. A., Bhatnagar, A., Gurevich, V. V., and Roth, B. L. (2003) The interaction of a constitutively active arrestin with the arrestin-insensitive 5-HT(2A) receptor induces agonist-independent internalization. *Mol. Pharmacol.* **63**, 961–972
160. Sheffler, D. J., Kroeze, W. K., Garcia, B. G., Deutch, A. Y., Hufeisen, S. J., Leahy, P., Brüning, J. C., and Roth, B. L. (2006) p90 ribosomal S6 kinase 2 exerts a tonic brake on G protein-coupled receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4717–4722
161. Kagaya, A., Mikuni, M., Muraoka, S., Saitoh, K., Ogawa, T., Shinno, H., Yamawaki, S., and Takahashi, K. (1993) Homologous desensitization of serotonin 5-HT₂ receptor-stimulated intracellular calcium mobilization in C6BU-1 glioma cells via a mechanism involving a calmodulin pathway. *J. Neurochem.* **61**, 1050–1056
162. Lennon, S. M., Rivero, G., Matharu, A., Howson, P. A., Jane, D. E., Roberts, P. J., and Kelly, E. (2010) Metabotropic glutamate receptor mGlu2 is resistant to homologous agonist-induced

- desensitization but undergoes protein kinase C-mediated heterologous desensitization. *Eur. J. Pharmacol.* **649**, 29–37
163. Iacovelli, L., Molinaro, G., Battaglia, G., Motolese, M., Di Menna, L., Alfiero, M., Blahos, J., Matrisciano, F., Corsi, M., Corti, C., Bruno, V., De Blasi, A., and Nicoletti, F. (2009) Regulation of group II metabotropic glutamate receptors by G protein-coupled receptor kinases: mGlu2 receptors are resistant to homologous desensitization. *Mol. Pharmacol.* **75**, 991–1003
164. Torrecilla, I., Spragg, E. J., Poulin, B., McWilliams, P. J., Mistry, S. C., Blaukat, A., and Tobin, A. B. (2007) Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *J. Cell Biol.* **177**, 127–137
165. Lee, M. J., Thangada, S., Paik, J. H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S. S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., Alessi, D. R., and Hla, T. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell.* **8**, 693–704
166. Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* **390**, 88–91
167. Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M., and Mailman, R. B. (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 1–13
168. Lau, E. K., Trester-Zedlitz, M., Trinidad, J. C., Kotowski, S. J., Krutchinsky, A. N., Burlingame, A. L., and von Zastrow, M. (2011) Quantitative encoding of the effect of a partial agonist on individual opioid receptors by multisite phosphorylation and threshold detection. *Sci. Signal.* **4**, ra52
169. Moulédous, L., Froment, C., Dauvillier, S., Burlet-Schiltz, O., Zajac, J.-M., and Mollereau, C. (2012) GRK2 protein-mediated transphosphorylation contributes to loss of function of μ -opioid receptors induced by neuropeptide FF (NPFF2) receptors. *J. Biol. Chem.* **287**, 12736–12749
170. Dean, B. (2003) The cortical serotonin_{2A} receptor and the pathology of schizophrenia: a likely accomplice. *J. Neurochem.* **85**, 1–13
171. Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics MCP.* **7**, 1598–1608

172. Katada, T. (2012) The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 2103–2111
173. Jiang, L. I., Collins, J., Davis, R., Lin, K.-M., DeCamp, D., Roach, T., Hsueh, R., Rebres, R. A., Ross, E. M., Taussig, R., Fraser, I., and Sternweis, P. C. (2007) Use of a cAMP BRET Sensor to Characterize a Novel Regulation of cAMP by the Sphingosine 1-Phosphate/G13 Pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 10576–10584
174. Karaki, S., Becamel, C., Murat, S., Mannoury la Cour, C., Millan, M. J., Prézeau, L., Bockaert, J., Marin, P., and Vandermoere, F. (2014) Quantitative phosphoproteomics unravels biased phosphorylation of serotonin 2A receptor at Ser280 by hallucinogenic versus nonhallucinogenic agonists. *Mol. Cell. Proteomics MCP.* **13**, 1273–1285
175. Castañé, A., Santana, N., and Artigas, F. (2015) PCP-based mice models of schizophrenia: differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic treatments. *Psychopharmacology (Berl.)*. **232**, 4085–4097
176. Schaffhauser, H., Rowe, B. A., Morales, S., Chavez-Noriega, L. E., Yin, R., Jachec, C., Rao, S. P., Bain, G., Pinkerton, A. B., Vernier, J.-M., Bristow, L. J., Varney, M. A., and Daggett, L. P. (2003) Pharmacological characterization and identification of amino acids involved in the positive modulation of metabotropic glutamate receptor subtype 2. *Mol. Pharmacol.* **64**, 798–810
177. Marek, G. J., Wright, R. A., and Schoepp, D. D. (2006) 5-Hydroxytryptamine_{2A} (5-HT_{2A}) receptor regulation in rat prefrontal cortex: interaction of a phenethylamine hallucinogen and the metabotropic glutamate_{2/3} receptor agonist LY354740. *Neurosci. Lett.* **403**, 256–260
178. Schaffhauser, H., Cai, Z., Hubalek, F., Macek, T. A., Pohl, J., Murphy, T. J., and Conn, P. J. (2000) cAMP-dependent protein kinase inhibits mGluR₂ coupling to G-proteins by direct receptor phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 5663–5670
179. Nikiforuk, A., Popik, P., Drescher, K. U., van Gaalen, M., Relo, A.-L., Mezler, M., Marek, G., Schoemaker, H., Gross, G., and Bernalov, A. (2010) Effects of a positive allosteric modulator of group II metabotropic glutamate receptors, LY487379, on cognitive flexibility and impulsive-like responding in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **335**, 665–673
180. Honey, G. D., Sharma, T., Suckling, J., Giampietro, V., Soni, W., Williams, S. C. R., and Bullmore, E. T. (2003) The functional neuroanatomy of schizophrenic subsyndromes. *Psychol. Med.* **33**, 1007–1018

181. Hunter, N. S., Anderson, K. C., and Cox, A. (2015) Pimavanserin. *Drugs Today Barc. Spain* 1998. **51**, 645–652
182. Majláth, Z., Obál, I., and Vécsei, L. (2016) Treatment possibilities for psychosis in Parkinson's disease with an emphasis on the newly approved drug: Pimavanserin. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*
183. Sarva, H., and Henchcliffe, C. (2016) Evidence for the use of pimavanserin in the treatment of Parkinson's disease psychosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **9**, 462–473
184. Cummings, J., Isaacson, S., Mills, R., Williams, H., Chi-Burris, K., Corbett, A., Dhall, R., and Ballard, C. (2014) Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet.* **383**, 533–540
185. Dephoure, N., Gould, K. L., Gygi, S. P., and Kellogg, D. R. (2013) Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 535–542
186. Stensballe, A., Andersen, S., and Jensen, O. N. (2001) Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics.* **1**, 207–222
187. Thingholm, T. E., Jørgensen, T. J. D., Jensen, O. N., and Larsen, M. R. (2006) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat. Protoc.* **1**, 1929–1935
188. Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., and Mann, M. (2007) Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods.* **4**, 709–712
189. Nesvizhskii, A. I., Vitek, O., and Aebersold, R. (2007) Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nat. Methods.* **4**, 787–797
190. Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., Hamid, J., Nargeot, J., Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat. Neurosci.* **7**, 118–125

Annexe

Résumé

Le récepteur 5-HT_{2A} de la sérotonine est la cible première des hallucinogènes comme le diéthylamine de l'acide lysergique (LSD), la mescaline ou la psilocibine qui reproduisent les symptômes positifs de la schizophrénie. Un paradoxe encore partiellement non résolu est que seulement certains agonistes du récepteur 5-HT_{2A} manifeste une activité hallucinogène alors que d'autres agonistes proches structuralement avec des affinités comparables pour le récepteur ne présente pas d'activité hallucinogènes. Nous avons comparé le phosphoprotéome de cellules HEK-293 exprimant par transfection transitoire le récepteur 5-HT_{2A}, exposées soit à un contrôle, soit à un agoniste hallucinogène, le 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2- aminopropane (DOI) ou soit à un agoniste non hallucinogène, le lisuride. Parmi les résidus phosphorylés, la Ser²⁸⁰ localisée dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur 5-HT_{2A}, une région importante pour sa désensibilisation, est spécifiquement phosphorylée en réponse au ligand hallucinogène. La phosphorylation spécifique de la Ser²⁸⁰ par les hallucinogènes a été validée par une analyse en spectrométrie de masse quantitative sur récepteur digéré et purifié, et en Western blotting et immunohistochimie sur cellule HEK-293 et *in vivo* grâce à un anticorps spécifique dirigé contre le site de phosphorylation. De plus, des expériences de mutagenèse du site en alanine a démontré qu'il est nécessaire à la désensibilisation moins prononcée du récepteur en réponse aux ligands hallucinogènes par rapport aux ligands non-hallucinogènes. En conclusion, cette étude révèle une phosphorylation biaisée du récepteur 5-HT_{2A} en réponse aux agonistes hallucinogènes vs. non hallucinogène à la base de leurs capacités différentielles à désensibiliser le récepteur.

Abstract

The serotonin 5-HT_{2A} receptor is a primary target of psychedelic hallucinogens such as lysergic acid diethylamine (LSD), mescaline or psilocybin, which reproduce positive symptoms of schizophrenia. A paradox for this receptor is that only some 5-HT_{2A} receptor agonists exhibit hallucinogenic activity, whereas structurally related agonists with comparable affinity and activity lack such a psychoactive activity. Using a phosphoproteomic strategy, we compared the phosphoproteome in HEK-293 cells transiently expressing the 5-HT_{2A} receptor and exposed to either vehicle or the synthetic hallucinogen 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane (DOI) or the nonhallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonist, lisuride. We found that Ser²⁸⁰ of the 5-HT_{2A} receptor located in the third intracellular loop, a region important for its desensitization, is phosphorylated specifically in response to hallucinogen DOI. This was further validated by quantitative mass spectrometry analysis of immunopurified receptor digests and by using a phosphosite specific antibody in Western blotting on HEK-293 cells and in immunocytochemistry on mouse prefrontal cortex. Moreover, site mutagenesis into alanine revealed that this phosphorylation event is required for the weaker desensitization effect of hallucinogenic versus non-hallucinogenic agonists of 5-HT_{2A} receptor. Altogether, this study reveals a biased phosphorylation of the 5-HT_{2A} receptor in response to hallucinogenic *versus* nonhallucinogenic agonists, which underlies their distinct capacity to desensitize the receptor.

Quantitative Phosphoproteomics Unravels Biased Phosphorylation of Serotonin 2A Receptor at Ser²⁸⁰ by Hallucinogenic versus Nonhallucinogenic Agonists^{*§}

Samah Karaki^{‡¶}, Carine Becamel^{‡¶}, Samy Murat^{‡¶}, Clotilde Mannoury la Cour^{**}, Mark J. Millan^{**}, Laurent Prézeau^{‡¶}, Joël Bockaert^{‡¶}, Philippe Marin^{‡¶§§}, and Franck Vandermoere^{‡¶§§}

The serotonin 5-HT_{2A} receptor is a primary target of psychedelic hallucinogens such as lysergic acid diethylamine, mescaline, and psilocybin, which reproduce some of the core symptoms of schizophrenia. An incompletely resolved paradox is that only some 5-HT_{2A} receptor agonists exhibit hallucinogenic activity, whereas structurally related agonists with comparable affinity and activity lack such a psychoactive activity. Using a strategy combining stable isotope labeling by amino acids in cell culture with enrichment in phosphorylated peptides by means of hydrophilic interaction liquid chromatography followed by immobilized metal affinity chromatography, we compared the phosphoproteome in HEK-293 cells transiently expressing the 5-HT_{2A} receptor and exposed to either vehicle or the synthetic hallucinogen 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane (DOI) or the nonhallucinogenic 5-HT_{2A} agonist lisuride. Among the 5995 identified phosphorylated peptides, 16 sites were differentially phosphorylated upon exposure of cells to DOI versus lisuride. These include a serine (Ser²⁸⁰) located in the third intracellular loop of the 5-HT_{2A} receptor, a region important for its desensitization. The specific phosphorylation of Ser²⁸⁰ by hallucinogens was further validated by quantitative mass spectrometry analysis of immunopurified receptor digests and by Western blotting using a phosphosite specific antibody. The administration of DOI, but not of lisuride, to mice, enhanced the phosphorylation of 5-HT_{2A} receptors at Ser²⁸⁰ in the prefrontal cortex. Moreover, hallucinogens

induced a less pronounced desensitization of receptor-operated signaling in HEK-293 cells and neurons than did nonhallucinogenic agonists. The mutation of Ser²⁸⁰ to aspartic acid (to mimic phosphorylation) reduced receptor desensitization by nonhallucinogenic agonists, whereas its mutation to alanine increased the ability of hallucinogens to desensitize the receptor. This study reveals a biased phosphorylation of the 5-HT_{2A} receptor in response to hallucinogenic versus nonhallucinogenic agonists, which underlies their distinct capacity to desensitize the receptor. *Molecular & Cellular Proteomics* 13: 10.1074/mcp.M113.036558, 1273–1285, 2014.

Among the G Protein-Coupled Receptors (GPCRs)¹ activated by serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), the 5-HT_{2A} receptor continues to attract particular attention in view of its broad physiological role and implication in the actions of numerous psychotropic agents (1, 2). It is a primary target of widely used atypical antipsychotics such as clozapine, risperidone, and olanzapine, which act as antagonists or inverse agonists (1, 3). The activation of 5-HT_{2A} receptors expressed in the prefrontal cortex has also been implicated in the psycho-mimetic effects of psychedelic hallucinogens, such as lysergic acid diethylamide (LSD), mescaline, and psilocybin, which are often used to model positive symptoms of schizophrenia (4–8). However, these psychoactive effects are not reproduced by structurally-related agonists, such as ergotamine and the anti-Parkinson agent lisuride, despite the fact that they exhibit comparable affinities and efficacies at 5-HT_{2A} receptors (7, 9). This paradox was partially resolved by the demonstration that hallucinogens induce a specific transcrip-

From the ‡CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France; §INSERM, U661, F-34094 Montpellier, France; ¶Université Montpellier 1, F-34094 Montpellier, France; ||Université Montpellier 2, F-34094 Montpellier, France; **Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine, France

✂ Author's Choice—Final version full access.

Received November 27, 2013, and in revised form, February 19, 2014

Published, MCP Papers in Press, March 17, 2014, DOI 10.1074/mcp.M113.036558

Author contributions: C.M., M.J.M., J.B., P.M., and F.V. designed research; S.K., S.M., P.M., and F.V. performed research; C.B. and L.P. contributed new reagents or analytic tools; S.K. and F.V. analyzed data; M.J.M., J.B., P.M., and F.V. wrote the paper.

¹ The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; 5-HT, 5-hydroxytryptamine, serotonin; DOI, 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; LSD, lysergic acid diethylamide; PKB, Protein Kinase B; PKC, Protein Kinase C; PLC, phospholipase C; PTX, Pertussis toxin; RSK, Ribosomal S6 kinase; SILAC, stable isotope labeling by amino acids in cell culture.

tomic signature because of the specific engagement of a Pertussis toxin-sensitive G_{i/o}/Src signaling pathway which is not activated by nonhallucinogenic agonists (7, 8). These findings suggest that hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists induce different conformational states of the 5-HT_{2A} receptor, and represent a striking example of functional selectivity that translates into contrasting pattern of mice behavior: induction of head-twitches by hallucinogenic but not by nonhallucinogenic agonists (9).

The differential influence of hallucinogenic *versus* nonhallucinogenic agonists on signaling pathways suggests that they trigger contrasting patterns of protein phosphorylation. To address this issue, we employed a quantitative phosphoproteomics strategy to directly compare the phosphoproteomes generated in HEK-293 cells by the synthetic hallucinogen 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane (DOI) and the nonhallucinogenic 5-HT_{2A} agonist lisuride. We found that DOI, but not lisuride, induced the phosphorylation of a serine residue (Ser²⁸⁰) located in the third intracellular loop of the receptor itself. The hallucinogen-specific phosphorylation of this residue was further validated *in vitro* and *in vivo* by using a phosphosite-specific antibody. These findings were followed by a series of experiments to determine the impact of Ser²⁸⁰ phosphorylation upon receptor desensitization and internalization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Human Embryonic Kidney-293 (HEK-293) cells were from the European Collection of Cell Cultures, culture media from Invitrogen (Carlsbad, CA). Lisuride maleate was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). All other chemicals were from Sigma Aldrich. Isotope-labeled amino acids for SILAC experiments were from Eurisotop (Saint Aubin, France).

The rabbit anti-phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-Erk1,2, and anti-total Erk1,2 antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), the rabbit anti-Hemagglutinin (HA) antibody from Zymed Laboratories Inc. (South San Francisco, CA), the rabbit anti-GFP antibody from Roche Diagnostics, the rabbit anti-5-HT_{2A} receptor antibody from Immunostar (Hudson, MI) and the mouse anti-HA antibody conjugated to agarose beads from Sigma Aldrich. The anti-phosphoSer²⁸⁰-5-HT_{2A} receptor antibody was generated by immunizing rabbits with the synthetic GTRAKLApSFSFL+C peptide coupled to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, Eurogentec, Liege, Belgium).

The construct encoding the HA-tagged 5-HT_{2A} receptor was described elsewhere (10). Following PCR amplification, the receptor cDNA was subcloned into the bicistronic plasmid pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, CA) using the XhoI/BamHI restriction sites. This construct was transferred to pSinRep5 plasmid for Sindbis virus production (11). Plasmids encoding HA-tagged 5-HT_{2A} receptor mutants (S²⁸⁰A and S²⁸⁰D) were generated using the Quick Change mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). All constructs were confirmed by DNA sequencing.

Cell Cultures—HEK-293 cells, grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed, heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics, were transfected at 40–50% confluence using polyethyleneimine (PEI, Sigma-Aldrich), as previously described (12), and used 48 h after transfection. For stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) experiments (13), cells were maintained for 2 weeks in DMEM deficient in lysine

and arginine, supplemented with 10% dialyzed serum and either L-lysine/L-arginine for light label (KORO, L) or L-Lysine-2HCl (²H₄, 96–98%)/L-Arginine-HCl (¹³C₆, 99%) for semi-heavy label (K4R6, M) or L-Lysine-2HCl (¹³C₆, 99%; ¹⁵N₂, 99%)/L-Arginine-HCl (¹³C₆, 99%; ¹⁵N₄, 99%) for heavy label (K8R10, H) (percentages represent the isotopic purity of the labeled amino acids). Under these conditions, analysis of semi-heavy amino acid incorporation at the protein level indicated a median ratio of 93% (first quartile at 88%, third quartile at 95%). A similar distribution was observed for the incorporation of the heavy amino acids.

Primary cultures of cortical neurons were prepared as described previously (14). Briefly, dissociated cells from the cerebral cortex of 17 day-old Swiss mouse embryos were plated on 6- or 96-well plates coated successively with poly-L-ornithine (mol. Wt. = 40,000; 15 μg/ml) and 10% fetal calf serum + 1 μg/ml laminin. The culture medium included a 1:1 mixture of DMEM and F-12 nutrient supplemented with 33 mM glucose, 2 mM glutamine, 13 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES buffer, pH 7.4, 5 IU/ml (5 mg/ml) penicillin-streptomycin, and a mixture of salt and hormones containing 100 μg/ml transferin, 25 μg/ml insulin, 20 nM progesterone, 60 nM putrescine, and 30 nM Na₂SeO₃. Cultures were infected 5 days after seeding with the Sindbis virus expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptor and were used 7 days after seeding. At this stage, they were shown to contain at least 95% of neurons (14).

Global Quantitative Phosphoproteomics Analyses—HEK-293 cells grown in SILAC media and transiently expressing 5-HT_{2A} receptors were serum-starved for 4 h and challenged for 15 min with either vehicle (L), or lisuride (1 μM, M), or DOI (1 μM, H). Cells were lysed in 0.5 ml of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.27 M sucrose, 1 mM DTT). Cell lysates were clarified by centrifugation at 15,000 × g (20 min at 4 °C) and protein concentration was determined using the Bradford reagent. Equal amounts of proteins (3 mg) from each condition were mixed, reduced with 10 mM DTT, alkylated with 50 mM iodoacetamide and precipitated on ice with trichloroacetic acid (25%, 20 min) before their digestion with trypsin (1/200, w/w) in 2 M urea, 25 mM triethylammonium bicarbonate pH 7.8. Digests were acidified in 1% TFA, desalted on a 1-g Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA), and subjected to hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) using a 4.6 × 250-mm TSKgel Amide-80 5-μm particle column (Tosoh Biosciences) and an Alliance e2695 HPLC system (Waters), as previously described (15). Nine mg of peptides were loaded in 80% solvent B (100% acetonitrile with 0.1% TFA). Solvent A consisted of 0.1% TFA in water. Peptides were eluted with a gradient consisting of 80% B held for 5 min followed by 80% B to 60% B in 40 min and finally 0% B for 5 min. Fourteen fractions were collected throughout the gradient and further enriched in phosphorylated peptides by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) (15).

HILIC fractions were dried and resuspended in 25% acetonitrile/0.1% TFA and incubated for 3 h with 8 μl of Phos-Select beads (Sigma Aldrich) under agitation. Beads were rinsed twice with 100 μl of 25% acetonitrile/0.1% TFA and loaded on a microC18 ZipTip (Millipore). Phosphorylated peptides were then eluted in two steps with 30 μl of 0.4 M NH₄OH and then with 30 μl of 50% acetonitrile. They were analyzed by nano-flow HPLC-nanoelectrospray ionization using a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer coupled to an Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific). Desalting and preconcentration of samples were performed on-line on a Pepmap® precolumn (0.3 mm × 10 mm, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). A gradient consisting of 2–40% buffer B (3–33 min), 40–80% B (33–34 min), 80–0% B (49–50 min), and equilibrated for 20 min in 0% B (50–70 min) was used to elute peptides at 300 nL/min from a Pepmap® capillary (0.075 mm × 150 mm) reversed-phase column

(LC Packings). Mass spectra were acquired using a top-10 collision-induced dissociation (CID) data-dependent acquisition (DDA) method. The LTQ-Orbitrap was programmed to perform a Fourier transform (FT) full scan (60,000 resolution) on 400–1400 Th mass range with the top ten ions from each scan selected for LTQ-MS/MS with multistage activation on the neutral loss of 24.49, 32.66, and 48.99 Th. FT spectra were internally calibrated using a single lock mass (445.1200 Th). Target ion numbers were 500,000 for FT full scan on the Orbitrap and 10,000 MSn on the LTQ.

The raw MS data were analyzed using the MaxQuant/Andromeda software (v. 1.2.2.5) (16) with a false discovery rate of less than 0.01 for peptides and phosphosites and a minimum peptide length of six amino acids. The mass accuracy of the precursor ions was improved by retention time-dependent mass recalibration. Andromeda was used to search the top eight per 100 Da peak lists against the human complete proteome set database (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=organism:9606+keyword:1185>) downloaded on February 22, 2012 (65,835 protein entries), combined with 248 frequently observed contaminants as well as reversed versions of all sequences. This version of the database contains both reviewed sequences from UniProtKB/Swiss-Prot and unreviewed sequences from UniProtKB/TrEMBL. Enzyme specificity was set to trypsin, additionally allowing cleavage N-terminal to proline and up to two missed cleavages. The search included cysteine carbamidomethylation as a fixed modification, protein N-terminal acetylation, oxidation of methionine and phosphorylation of Ser, Thr, and Tyr as variable modifications. Peptide identification was based on a search with a mass deviation of the precursor ion up to 7 ppm after recalibration, and the allowed fragment mass deviation was set to 0.5 Da. Identifications across different replicates and adjacent fractions was performed using the “match between runs” MaxQuant option with a 3 min time window. Quantification of SILAC triplex signals was performed by MaxQuant with standard settings. The phosphoSTY.txt file generated by MaxQuant was uploaded onto Perseus software (v. 1.2.0.17) to calculate B significance of phosphopeptide ratios in each of the three biological replicates (16). The new table was then uploaded onto the R environment in order to plot log H/M ratios against log M/L ratios and color-display the B significance count ($p < 0.05$) for each quantified phosphopeptide.

Targeted Analysis of 5-HT_{2A} Receptor Phosphorylation in HEK-293 Cells—HEK-293 cells transiently expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.27 M sucrose, 1 mM DTT, and a protease inhibitor mixture (Roche). Samples were centrifuged at 15,000 × *g* for 30 min at 4 °C. Solubilized 5-HT_{2A} receptors were immunoprecipitated with the agarose-conjugated anti-HA antibody (Sigma Aldrich). Immunoprecipitated HA-5-HT_{2A} receptors were resolved by SDS-PAGE. Gel bands containing the receptor were excised and digested with trypsin (500 ng per condition). Peptides were analyzed by nano-LC-FT-MS/MS, top six per 30 Da windows peak lists were extracted using MSconvert 3.0 and searched with Mascot 2.4 against the same human Complete Proteome Set database, with phosphorylation of Ser, Thr, and Tyr as variable modifications, 7 ppm precursor mass tolerance, 0.5 Da fragment mass tolerance and trypsin/P digestion. MS2 spectra matching phosphorylated peptides with ion score over 15 were inspected using PhosphoSite software (17) for automatic annotation of unique transitions that pinpoint the position of phosphorylation sites. Ion signals corresponding to phosphorylated peptides were quantified from the maximal intensities measured in their ion chromatograms manually extracted using Qual browser v2.1 (Thermo Fisher Scientific) with a tolerance of 5 ppm for mass deviation, and normalized to signals of their nonphosphorylated counterparts. Ser²⁸⁰

phosphorylation of immunoprecipitated receptors was also analyzed by Western blotting using the phosphosite specific antibody.

Western Blotting—Proteins, resolved onto 10% polyacrylamide gels, were transferred to Hybond C nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were immunoblotted with primary antibodies (anti phospho-Ser²⁸⁰ 5-HT_{2A} receptor, 1:300; anti phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-Erk1,2, 1:1000; anti Erk1,2, 1:1000; anti-HA, 1:1000; Anti-GFP, 1:1000; anti-RSK2, 1:1000) and then with either anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:3000, GE Healthcare). Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence method (ECLTM plus detection reagent, GE Healthcare) and immunoreactive bands were quantified by densitometry using the ImageJ software. In protein phosphorylation analyses, the amount of each phosphoprotein was normalized to the amount of the corresponding total protein detected in the sample.

Analysis of Ser²⁸⁰ Phosphorylation in Mice Prefrontal Cortex—Experiments were performed on wild type or 5-HT_{2A} receptor-deficient mice (8) and conformed to European ethics standards (86/609-EEC) and to decrees of the French National Ethics Committee (N° 87/848) for the care and use of laboratory animals. Mice (~30 g) were injected intraperitoneal with either vehicle (5% DMSO/5% Tween 80) or DOI or lisuride (10 mg/kg each). Thirty min after the onset of the treatment, mice were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg intraperitoneal, Ceva SA) and rapidly perfused transcardiacally with fixative solution containing 4% w/v paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing NaF (100 mM) and sodium orthovanadate (1 mM). Brains were post-fixed for 48 h in the same solution and stored at 4 °C. Fifty micrometers-thick sections were cut with a vibratome (Leica), permeabilized with 0.2% Triton X-100 in Tris buffer saline (TBS) for 20 min, saturated for 1 h with 10% goat serum in TBS containing 0.03% Triton X-100 and incubated for 48 h at 4 °C with primary antibodies (anti phospho-Ser²⁸⁰ 5HT_{2A} receptor, 1:100 or anti 5-HT_{2A} receptor, 1:500) in TBS. After four washes, they were incubated for 1 h with an Alexa Fluor[®] 488-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000, Invitrogen) in TBS. Immunofluorescent staining was observed with a Zeiss Axioimager Z1 microscope equipped with apotome. Images were acquired using the Axiovision 4.8 software driving an AxioCam MRm CCD camera (Carl Zeiss Microimaging).

Inositol Phosphate Production—Inositol phosphate production was analyzed as previously described (18).

Immunocytochemistry and Fluorescent Microscopy—HEK-293 cells transiently expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptors and grown on glass cover-slips were incubated with the rabbit anti HA antibody (1/500, 30 min at 10 °C) and then with drugs for 1 h at 37 °C. Cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde, 4% sucrose in PBS for 20 min, quenched 4 times 10 min with PBS containing 4% sucrose and 0.1 M glycine, and incubated for 60 min at 4 °C with an Alexa Fluor[®] 594-coupled anti-rabbit antibody (1:1000 in PBS supplemented with 2% goat serum, Invitrogen) to label cell surface receptors. They were then rinsed three times PBS containing 2% goat serum, permeabilized with 0.2% (w/v) Triton X-100 in PBS containing 2% goat serum for 15 min and incubated for 30 min at 4 °C with the Alexa Fluor[®] 488-coupled anti-rabbit antibody (1:1000 in PBS supplemented with 2% goat serum, 0.05% Triton X-100) to label internalized receptors. After three washes, coverslips were mounted on glass slides in Mowiol[®] 4.88 (Calbiochem). Series of optical sections were collected with a Zeiss Axioimager Z1 microscope equipped with apotome. Images were acquired using the Axiovision 4.8 software driving an AxioCam MRm CCD camera (Carl Zeiss Microimaging).

ELISA—Quantification of receptor cell surface expression was performed by ELISA under nonpermeabilized conditions as previously described (18).

RESULTS

Phosphoproteome Changes Elicited by DOI and Lisuride in HEK-293 Cells—To directly compare the phosphorylation patterns generated upon 5-HT_{2A} receptor stimulation by a hallucinogenic (DOI) and by a nonhallucinogenic (lisuride) agonist, we used the SILAC technology under three experimental conditions: light condition (vehicle-treated cells), semi-heavy label (lisuride-treated cells), and heavy label (DOI-treated cells). As cultured neurons do not divide *in vitro*, a complete SILAC labeling prerequisite for unbiased quantification could not be achieved in these cultures. Therefore, we performed our phosphoproteomics screen in HEK-293 cells transiently expressing 5-HT_{2A} receptors. We first examined whether this model recapitulates the biased signaling at 5-HT_{2A} receptors initially described in neurons, *i.e.* specific activation of G_{i/o} signaling by hallucinogens (7). Exposure of cells to DOI or LSD induced comparable stimulation of inositol phosphate production and Extracellular-regulated kinase (Erk)1,2 phosphorylation to those elicited by two nonhallucinogenic agonists, lisuride and ergotamine, though activation of PLC by DOI and Erk1,2 phosphorylation elicited by LSD were slightly more pronounced (supplemental Figs. S1A and S2A). Pre-treating cells with Pertussis toxin (PTX) decreased PLC activation induced by DOI and LSD (supplemental Fig. S1B, S1C) and abolished Erk1,2 phosphorylation induced by both hallucinogens (supplemental Fig. S2A), whereas PTX treatment did not affect the lisuride and ergotamine responses (Figs. S1D, S1E, and S2A). PTX likewise prevented Erk1,2 phosphorylation induced by DOI and LSD without affecting lisuride and ergotamine responses in primary cultured cortical neurons (supplemental Fig. S2B). These observations indicate that, similarly to the observations in neurons, hallucinogens selectively engage G_{i/o}-operated signaling in HEK-293 cells, whereas nonhallucinogenic agonists do not.

After a 15-min stimulation of stable isotope-labeled HEK-293 cells with either vehicle or DOI or lisuride, cells were harvested and 1:1:1 mixtures of differentially labeled samples were digested with trypsin and phosphopeptides were enriched by HILIC followed by IMAC. Analysis of phosphopeptide-enriched fractions by nano-LC-FT-MS/MS identified 5995 phosphorylated peptides with a false discovery rate of 1%. A total of 3349 phosphopeptides were robustly quantified in at least two out of the three biological replicates. As shown in Fig. 1A, the majority of them did not exhibit significant changes in abundance, assessed by statistical significance B (16), upon 5-HT_{2A} receptor stimulation by DOI or lisuride (agonist/vehicle ratios ~1). Only 30 phosphorylated peptides were significantly regulated by DOI *versus* vehicle and 24 following lisuride treatment (supplemental Table S1). Most importantly, 16 phosphopeptides were significantly different in abundance between DOI and lisuride-treated cells and 10 of them were significantly regulated by DOI, compared with vehicle (supplemental Table S1).

Hallucinogens but Not Nonhallucinogenic Agonists Induce 5-HT_{2A} Receptor Phosphorylation at Ser²⁸⁰ In Vitro and In Vivo—Among the phosphopeptides exhibiting the highest differences in abundance between DOI and lisuride-treated cells, we identified a peptide located in the third intracellular (i3) loop of the receptor itself and phosphorylated on three Ser residues (²⁷⁸LApSFSFIPQSpSISpSEK²⁹³, supplemental Table S1) corresponding to Ser²⁸⁰, Ser²⁸⁸, and Ser²⁹¹ in the entire receptor sequence. To further analyze 5-HT_{2A} receptor phosphorylation pattern and to confirm its differential phosphorylation by hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists, receptors originating from vehicle- or agonist-treated cells were purified by immunoprecipitation and digested with trypsin. LC-MS/MS analysis of receptor digests identified several phosphorylated forms of the same peptide located in the receptor i3 loop (LASFSFIPQSSISSEK) (Table I). MS2 spectra matching phosphorylated peptides were inspected using Prohssi software (17) for automatic annotation of unique transitions that pinpoint the position of phosphorylation sites (supplemental Fig. S3). In addition to a unique monophosphorylated form (phosphorylated at Ser²⁸⁰), various doubly and triply phosphorylated forms corresponding to phosphorylation on Ser²⁸⁰ and either on Ser²⁸³ or Ser²⁸⁷ or Ser²⁸⁸ or Ser²⁹⁰ or Ser²⁹¹ or on two of these residues) were also detected (Table I). Moreover, quantitative analysis of the corresponding ion signals from extracted ion chromatograms showed that the monophosphorylated peptide exhibited the highest relative abundance and that it was up-regulated by DOI or LSD exposure but not by lisuride or ergotamine (Table I, Fig. 1B, and supplemental Fig. S4). Though less abundant, the other multi-phosphorylated forms were likewise specifically up-regulated by hallucinogenic agonists (Table I and supplemental Fig. S4). In addition, these analyses identified another cluster of phosphorylated serines (Ser²⁹⁸ and Ser³⁰⁵) in a different receptor i3 loop peptide (²⁹⁸SIHREPGSYTGR³⁰⁹) (Table I and supplemental Fig. S4). Both mono-phosphorylated (at Ser²⁹⁸) and doubly phosphorylated forms of this peptide were detected. However, the basal level of phosphorylation of these residues was weakly increased by both hallucinogens and nonhallucinogenic agonists (Table I and supplemental Fig. S4).

Given the apparent higher stoichiometry of Ser²⁸⁰ phosphorylation, compared with the phosphorylation of other residues, and the specific induction of its phosphorylation by hallucinogens, we produced a rabbit antibody against a phosphopeptide encompassing phosphorylated Ser²⁸⁰. We first validated the specificity of this antibody for the phosphorylated site by Western blotting using transfected HEK-293 cells. Although no immunoreactive signal was detected in blots from nontransfected cells, a clear signal was observed at the expected receptor size in blots obtained from cells expressing 5-HT_{2A} receptor, and this immunoreactivity signal increased upon cell exposure to DOI or LSD, but not to ergotamine or lisuride (Fig. 2A). In contrast, DOI exposure did

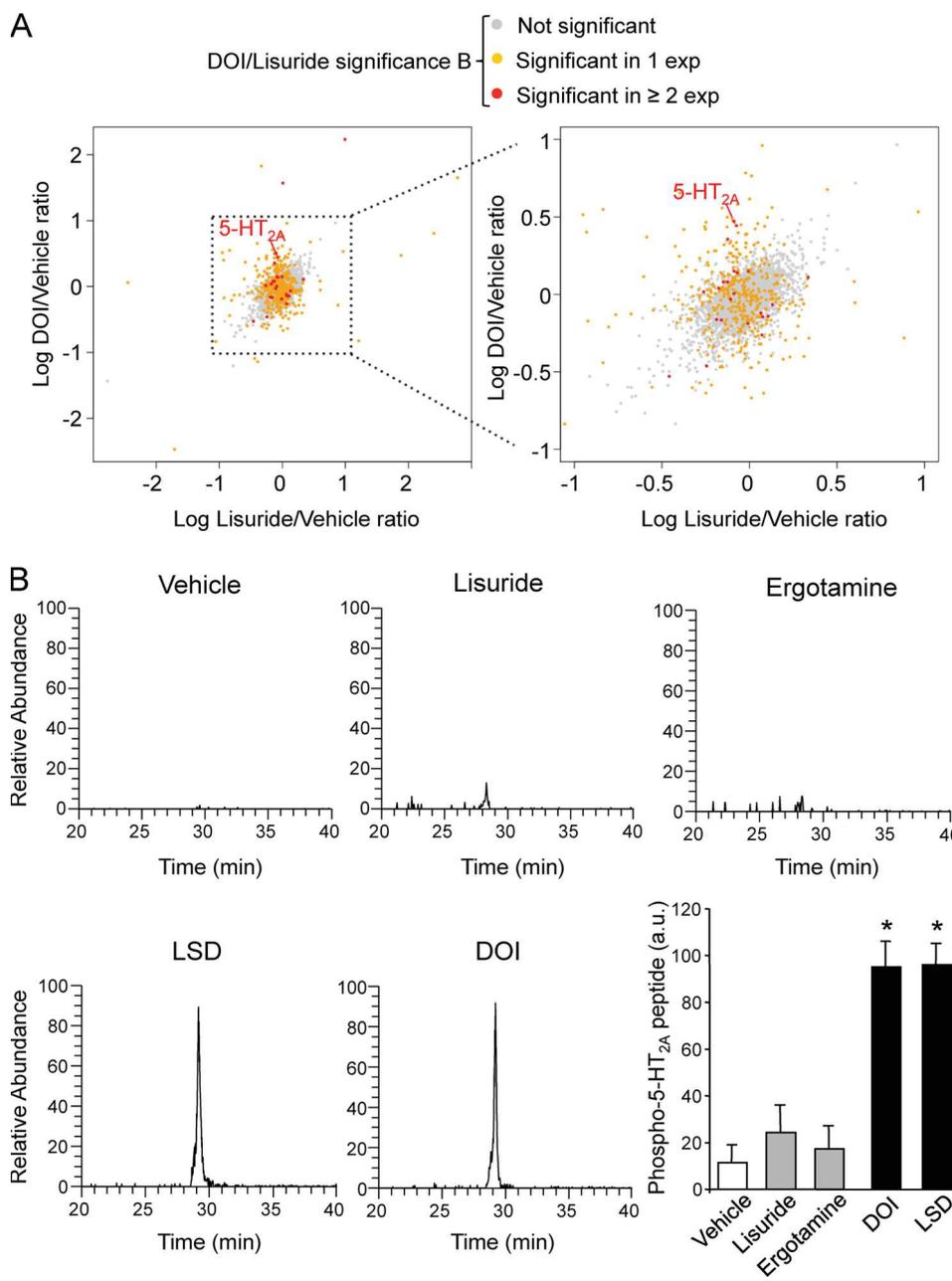


FIG. 1. Hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists differentially phosphorylate 5-HT_{2A} receptor at Ser²⁸⁰. A, Results of the large-scale quantitative phosphoproteomic analysis comparing the phosphorylation events triggered by DOI and lisuride (1 μ M each, 15 min) in HEK-293 cells transiently expressing 5-HT_{2A} receptors. The x axis represents the relative abundance (expressed in log₁₀ of the ratio) of each of the 3349 quantified phosphopeptides in lisuride *versus* vehicle-treated cells, the y axis their relative abundance in DOI *versus* vehicle-treated cells. B, HEK-293 cells transiently expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were challenged for 15 min with vehicle or 1 μ M of either LSD or DOI or lisuride, or ergotamine. Receptors were immunoprecipitated with the agarose bead-conjugated anti HA antibody, digested with trypsin and phosphorylated peptides were analyzed by MS/MS. The data illustrated show representative extracted ion chromatograms of the LApSFSFIPQSSISSEK peptide phosphorylated on a serine corresponding to Ser²⁸⁰ in the entire receptor sequence. Two other independent experiments performed on different sets of cultured cells yielded similar results. The histogram represents the means \pm S.E. of ion signal intensities of the LApSFSFIPQSSISSEK peptide obtained in the three experiments. * $p < 0.05$ *versus* vehicle-treated cells.

not increase the immunoreactive signal in blots obtained from cells expressing 5-HT_{2A} receptors mutated on Ser²⁸⁰ (S²⁸⁰A, Fig. 2B and supplemental Fig. S5). Moreover, the signal observed in the absence of agonist treatment was lower in cells

expressing mutant 5-HT_{2A} receptors than in cells expressing wild type receptors (Fig. 2B). Collectively, these findings demonstrate a strong specificity of this antibody for phosphorylated Ser²⁸⁰ and further confirm the unique capacity of hallu-

TABLE I

List of phosphorylated peptides identified from purified 5-HT_{2A} receptors by nano-LC-MS/MS. HEK-293 cells transiently expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were exposed to either Vehicle or DOI or LSD or lisuride or ergotamine (1 μM each, 15 min). Solubilized receptors were immunoprecipitated with the anti HA antibody, resolved by SDS-PAGE and digested in-gel with trypsin. Peptides were analyzed by nano-LC-MS/MS using multistage activation on the neutral loss of phosphoric acid. MS/MS spectra were manually interpreted. For each peptide, the position of modified residue(s), the position in the protein sequence, experimental mass/charge, theoretical mass, mass deviation, Mascot score, and relative abundance compared with the non-phosphorylated peptide (site occupancy index: maximal intensity observed in the phosphorylated peptide extracted ion chromatogram/sum of the maximal intensities observed in the phosphorylated and the nonphosphorylated peptide extracted ion chromatograms) are indicated. The data are representative of three independent experiments. ND: not determined

Modified sequence	Start-end	Exp m/z (Th)	Mass (Da)	Δ mass (ppm)	Mascot score	Phosphorylation site occupancy index				
						Vehicle	LSD	DOI	Lisuride	Ergo
K.LAsFSFLPQSSLSSEK.L + Phospho (ST)	278–293	904.4283	1806.8441	−1.11	44	0.327	13.286	20.727	1.304	0.842
K.LAsFSFLPQSSLSSEKLFQR.S + 2 Phospho (ST)	278–297	811.3806	2431.1226	−1.05	40	0.076	1.223	1.793	0.318	0.277
K.LAsFSFLPQSSLSSEKLFQR.S + 2 Phospho (ST)	278–297	811.3813	2431.1226	−0.23	25	0.076	1.223	1.793	0.318	0.277
K.LAsFSFLPQSSLSSEKLFQR.S + 3 Phospho (ST)	278–297	838.035	2511.0889	−2.22	21	ND	0.173	0.229	0.085	0.110
R.sIHREPGSYTGR.R + Phospho (ST)	298–309	480.5517	1438.6354	−1.6	80	0.104	0.280	0.252	0.308	0.230
R.sIHREPGsYTGR.R + Phospho (ST)	298–309	480.5522	1438.6354	−0.5	19	0.104	0.280	0.252	0.308	0.230
R.sIHREPGsYTGR.R + 2 Phospho (ST)	298–310	559.2409	1674.7028	−1.18	20	0.117	0.309	0.357	0.407	0.530

cinogens to promote phosphorylation of this residue, compared with nonhallucinogenic agonists.

To explore whether biased 5-HT_{2A} receptor phosphorylation occurs *in vivo*, we injected mice with either DOI or lisuride and examined 5-HT_{2A} receptor phosphorylation in various brain regions known to express the receptor by immunohistochemistry. A robust immunostaining with the anti-phospho-Ser²⁸⁰ antibody was only detected in mice treated with DOI, but not in mice treated with vehicle or lisuride and the highest signal was found in middle layers of prefrontal cortex, which are known to express highest receptor densities (19) and which exhibited the strongest immunoreactive signal with a commercial antibody recognizing 5-HT_{2A} receptor independently of its phosphorylation state (Fig. 2E). As expected and further supporting the specificity of our antibody for phospho-Ser²⁸⁰ 5-HT_{2A} receptor, no immunoreactive signal was detected in prefrontal cortex of DOI-treated 5-HT_{2A} receptor knockout mice (Fig. 2E).

Phosphorylation of 5-HT_{2A} Receptors by Hallucinogens is Protein Kinase C-dependent and G_{i/o}-independent—We next searched for consensus motifs of phosphorylation by kinases in the Ser²⁸⁰ flanking sequence by using two different algorithms: (1) Scansite, which defines scores for phosphorylation sites according to a matrix based on an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases (20), and (2) Group-based Prediction System (GPS, v2.1), which classifies protein kinases into a hierarchical structure with four levels and trains its algorithm against the PhosphoELM database (21), in order to determine individual false discovery rate for each kinase (22). GPS found a strong consensus for Akt/protein kinase B (PKB) (5.7/3.8) and ribosomal S6 kinases (RSKs, 2.0/1.9), whereas Scansite indicated a strong consensus for phosphorylation by protein kinase C delta (PKCδ, score 0.3926, percentile 0.143%) and PKB (0.5238, 0.341%). Thus, pharmacological inhibitors of PKC (NPC-15437, 20 μM) (23), PKB (GSK690693, 1 μM) (24), and

RSKs (SL-0101–1, 10 μM) (25) were tested for a potential effect on DOI-elicited Ser²⁸⁰ phosphorylation. Neither GSK690693 nor SL-0101–1 had any effect on Ser²⁸⁰ phosphorylation in response to DOI, indicating that RSKs and PKB are not involved in this phosphorylation (Fig. 2C). In contrast, pretreatment of cells with NPC-15437 strongly decreased basal Ser²⁸⁰ phosphorylation and abolished the DOI-elicited response, indicating that Ser²⁸⁰ phosphorylation induced by hallucinogens was dependent on PKC activity (Fig. 2C). Moreover, treatment of cells with PTX did not affect Ser²⁸⁰ phosphorylation elicited by DOI (Fig. 2D).

Hallucinogenic and Nonhallucinogenic Agonists Differentially Desensitize and Internalize the 5-HT_{2A} Receptor—Given the role of PKC in 5-HT_{2A} receptor desensitization and internalization and the importance of the 5-HT_{2A} receptor i3 loop in the regulation of receptor responsiveness (26–29), we next examined whether hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists differentially modulate receptor desensitization. Pretreatment of HEK-293 cells with either lisuride or ergotamine for 1 h, followed by extensive drug washout, inhibited inositol phosphate production induced by a further exposure of cells to 5-HT, whereas pretreating cells with DOI or LSD did not significantly affect the 5-HT response (Figs. 3A and 3B). The most pronounced difference in receptor desensitization (non-significant desensitization upon hallucinogen stimulation versus ~50% desensitization upon receptor stimulation by non-hallucinogenic agonists) was observed after a 1 h treatment. After a 2 h treatment, both DOI and LSD desensitized the receptor, though to a differing extent (26 ± 4% desensitization) when compared with cells exposed for 2 h with lisuride or ergotamine (61 ± 5% desensitization). Therefore, 1 h pre-exposures to drugs were undertaken in further experiments. Treatment of HEK-293 cells with ergotamine and lisuride, but not with LSD and DOI, likewise induced strong desensitization of 5-HT_{2A} receptor-operated Erk1,2 signaling (Fig. 3C). Hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists produced a sim-

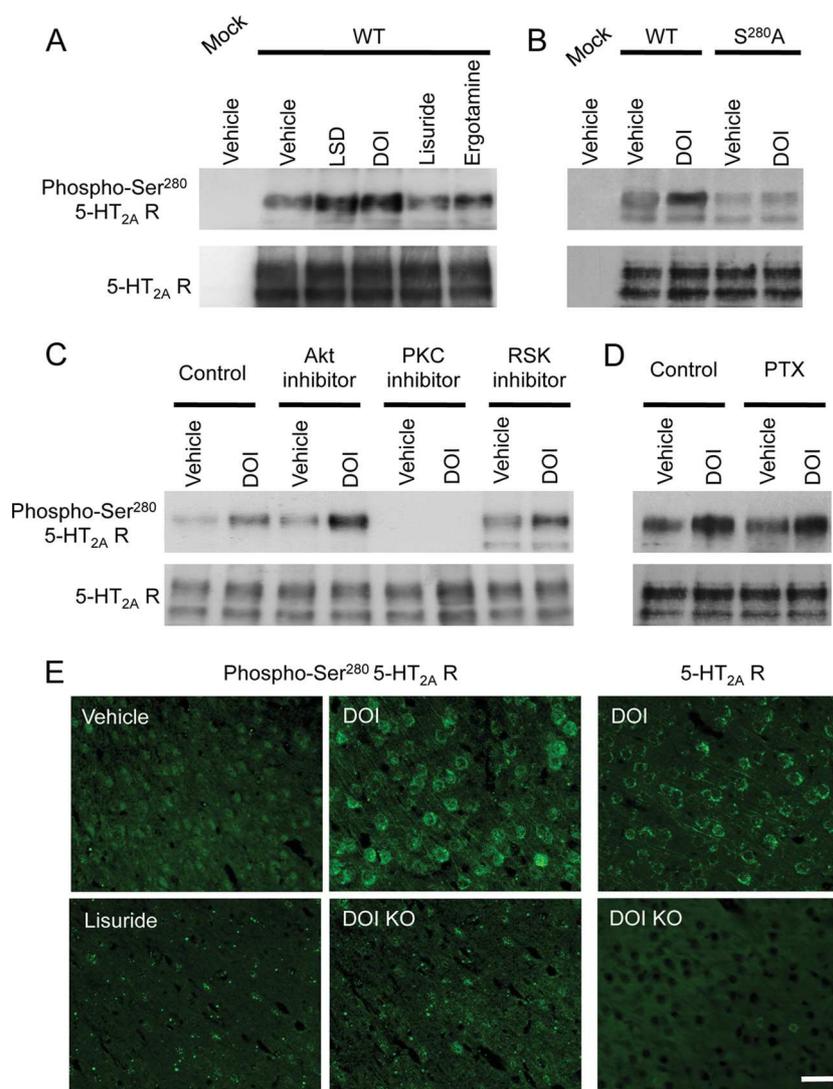


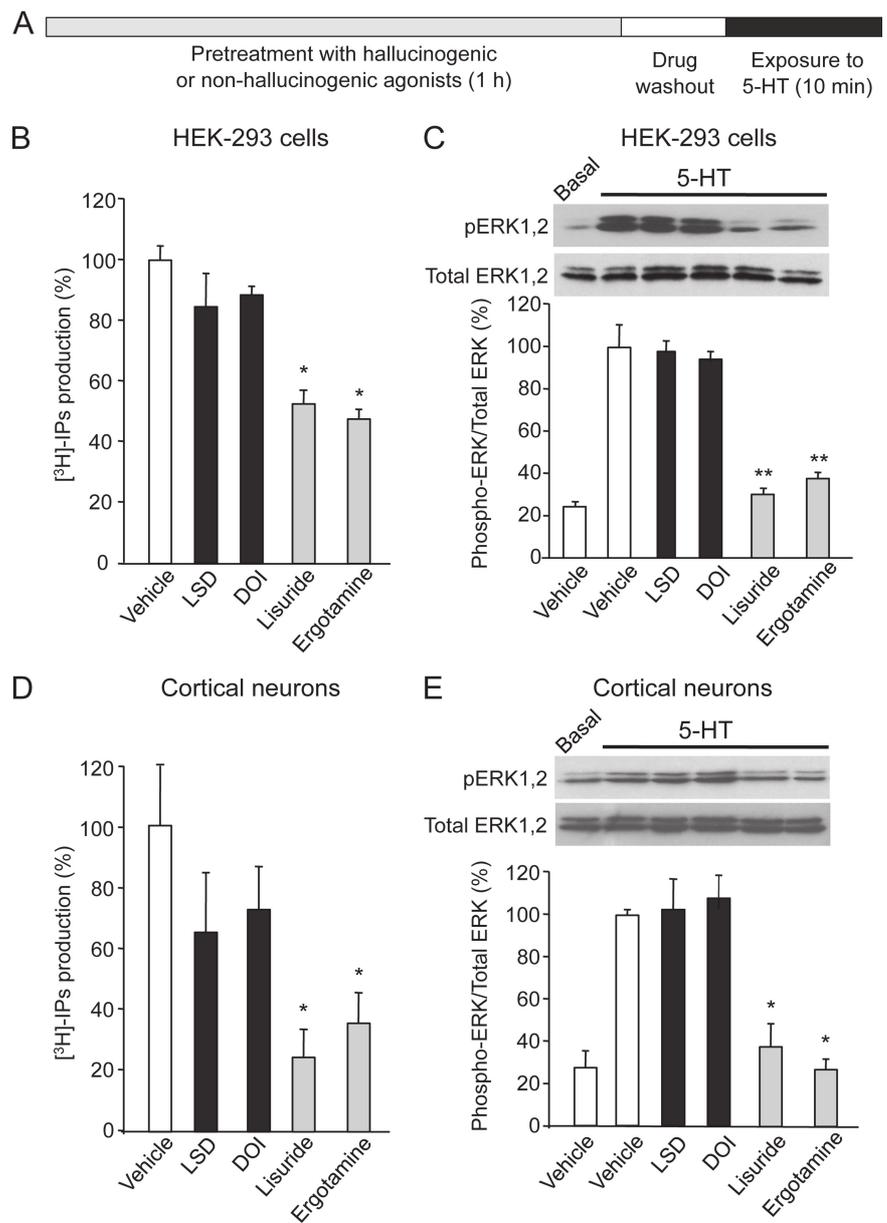
FIG. 2. Validation of the differential phosphorylation of Ser²⁸⁰ by hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-HT_{2A} agonists using a phosphosite antibody. *A-B*, An antibody raised against the GTRAKLApSFSFL+C peptide was validated in HEK-293 cells transiently expressing HA-5-HT_{2A} receptors. Receptors were immunoprecipitated with the agarose bead-conjugated anti HA antibody. The generated antibody provided an immunoreactive signal in Western blots from cells expressing HA-5-HT_{2A} receptors at a molecular weight corresponding to the signal obtained with the anti-HA antibody. This immunoreactive signal increased when cells were treated for 15 min with LSD or DOI but not with lisuride or ergotamine (1 μ M each). Moreover, the signal was strongly attenuated in cells expressing Ser²⁸⁰A receptors (exposed or not to DOI), compared with cells expressing the wild type (WT) receptor. *C-D*, Impact of a 30-min cell pretreatment with NPC-15437 (20 μ M, PKC inhibitor), or GSK690693 (1 μ M, PKB inhibitor) or SL-0101-1 (10 μ M, RSK inhibitor) and of a 18 h treatment with PTX (0.2 μ g/ml) upon DOI-elicited Ser²⁸⁰ phosphorylation. Representative immunoblots of three independent experiments performed on different sets of cultured cells are illustrated. *E*, Immunofluorescence detection of cells positive for phospho-Ser²⁸⁰ 5-HT_{2A} receptor or 5-HT_{2A} receptor in the prefrontal cortex of wild type and 5-HT_{2A} receptor-deficient mice (four mice analyzed per condition) injected intraperitoneally with either vehicle or DOI or lisuride (10 mg/kg, intraperitoneal). Scale bar: 40 μ m.

ilar differential pattern of desensitization at 5-HT_{2A} receptor-transduced signaling in primary cultures of cortical neurons (Figs. 3D and 3E).

As GPCR internalization is often important for desensitization, we also explored whether hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists differentially affect receptor internalization by immunostaining cell-surface receptors in living cells before a 1 h exposure to a hallucinogenic or a nonhallucinogenic agonist. The proportion of internalized 5-HT_{2A} receptors was

much higher in cells treated with lisuride or ergotamine compared with cells exposed to DOI or LSD (Fig. 4A). The higher propensity of nonhallucinogenic agonists to internalize the receptor, compared with hallucinogens, was further confirmed by ELISA (Fig. 4B). Given the importance of the receptor i3 loop in its association with β -arrestins (30), we also compared the ability of the two agonist categories to promote β -arrestin2 recruitment by the receptor. 5-HT_{2A} receptors recruited larger amounts of β -arrestin2 in cells treated ergot-

FIG. 3. Hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists differentially desensitize 5-HT_{2A} receptors. *A*, Schema of the experimental paradigm used to investigate the desensitization of 5-HT_{2A} receptor induced by hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists in HEK-293 cells and neurons. *B* and *D*, Effect of a 1 h pretreatment with either DOI or LSD or lisuride or ergotamine (1 μM each) upon inositol phosphate production elicited by 5-HT (10 μM) in HEK-293 cells (*B*) and neurons (*D*). Data, expressed in % of the 5-HT-elicited response in cells pretreated with vehicle are the means ± S.E. of values obtained in three independent experiments performed on different sets of cultured cells. **p* < 0.05 versus vehicle-pretreated cells (ANOVA followed by Dunnett's test). *C* and *E*, Effects of the corresponding treatments upon 5-HT-elicited Erk1,2 phosphorylation, assessed by sequential immunoblotting with an antibody against phosphorylated Erk1,2 (Thr²⁰²-Tyr²⁰⁴) and an antibody recognizing Erk1,2 independently of their phosphorylation state. Immunoblots representative of three independent experiments are shown. Data, expressed as ratios of phosphorylated to total Erk1,2, represent the means ± S.E. of values obtained in the three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus cells pretreated with vehicle.



amine or lisuride than in cells exposed to LSD or DOI (Fig. 5C), corroborating their differential efficacy to promote receptor internalization.

Ser²⁸⁰ Phosphorylation Underlies Differential Desensitization of the 5-HT_{2A} Receptor by Hallucinogenic and Nonhallucinogenic Agonists—To directly determine the pertinence of Ser²⁸⁰ phosphorylation upon 5HT_{2A} receptor desensitization, this residue was mutated into alanine or aspartate to inhibit or mimic its phosphorylation, respectively. Wild type, S^{280A} and S^{280D} 5-HT_{2A} receptors displayed the same intrinsic efficacy in stimulating PLC and Erk1,2 upon activation by 5-HT (Figs. 5A and 5B). Nonetheless, the differential ability of hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists to desensitize the receptor was not observed in cells expressing S^{280A} or S^{280D}

5-HT_{2A} receptors: hallucinogenic as well as nonhallucinogenic agonists induced a strong desensitization of both PLC and Erk1,2 signaling in cells expressing the S^{280A} receptor (to an extent comparable with that measured in cells expressing the wild type receptor after ergotamine or lisuride pretreatment), whereas all the four agonists tested induced a weak desensitization of receptor-operated signaling in cells expressing S^{280D} 5-HT_{2A} receptor, as observed in cells expressing wild type receptors following treatment with DOI or LSD (Figs. 5B and 5C).

DISCUSSION

The concept of functional selectivity or biased agonism was initially thought to reflect the ability of specific ligands of a

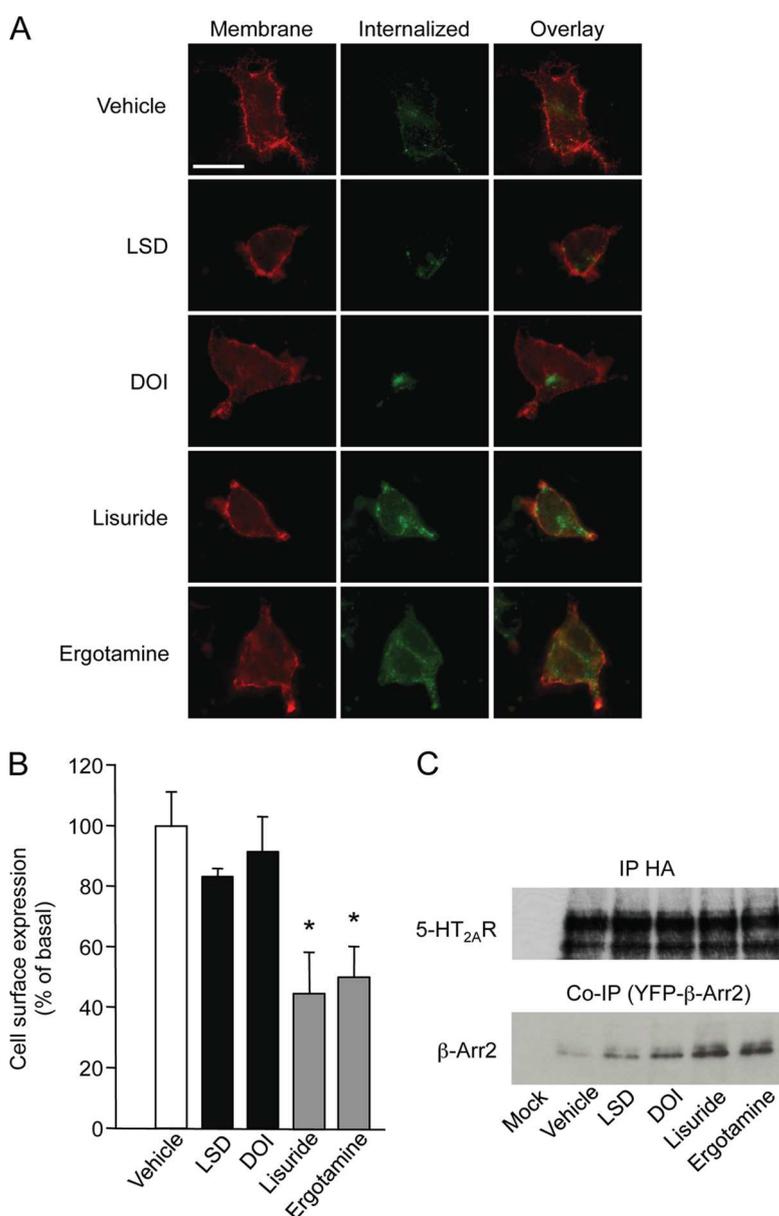
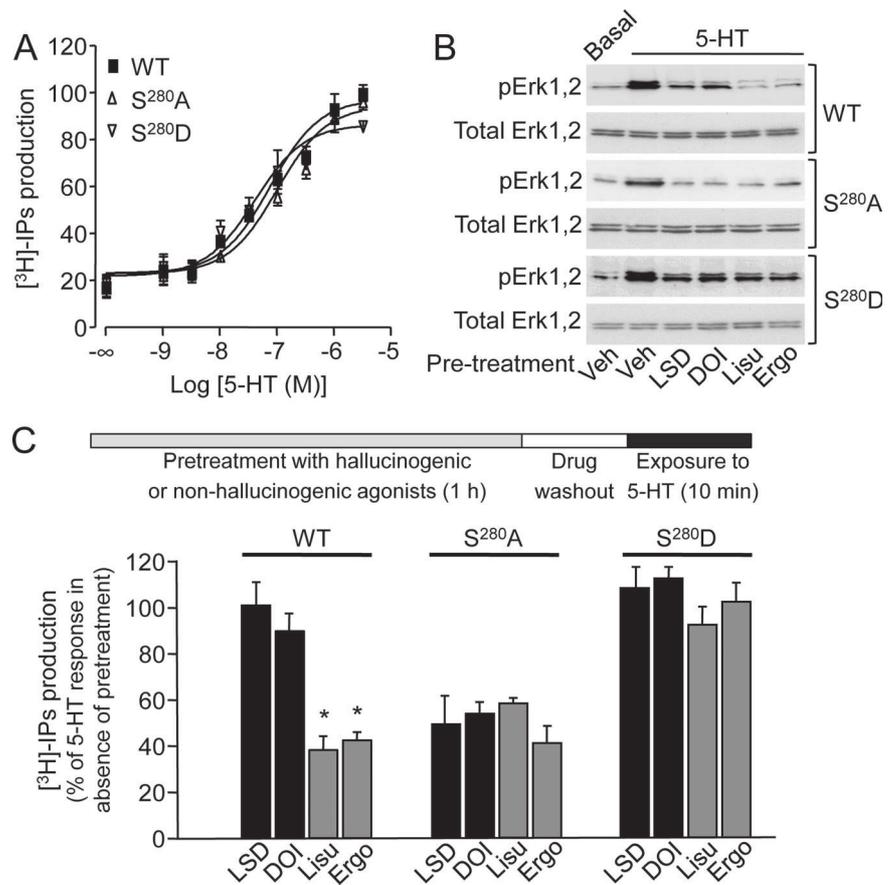


FIG. 4. Hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists differentially internalize 5-HT_{2A} receptors. *A*, HEK-293 cells transiently expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptors were treated for 30 min at 10 °C with a rabbit anti HA antibody and then with either vehicle or DOI or LSD or lisuride or ergotamine (1 μM each) for 1 h at 37 °C. Cell surface receptors were labeled with the Alexa Fluor® 594-coupled anti-HA antibody (red channel) and internalized receptor with the Alexa Fluor® 488-coupled anti-HA antibody (green channel). Double immunofluorescence staining of receptors in single cells is shown. Representative images of three independent experiments are illustrated. *B*, Quantification of cell surface expression of receptors in cells exposed to the same treatments was performed by ELISA in nonpermeabilizing conditions. Data are means ± S.E. of quadruplicate determinations performed in a representative experiment. Two other independent experiments yielded similar results. * *p* < 0.05 versus vehicle-treated cells (ANOVA followed by Dunnett's test). *C*, The data illustrated show the differential recruitment of β-arrestin2 by the 5-HT_{2A} receptor (assessed by co-immunoprecipitation) in cells co-expressing HA-tagged 5-HT_{2A} receptor and YFP-tagged β-arrestin2 and exposed to the same treatments. The Western blots illustrated are representative of three independent experiments.

given GPCR to induce or stabilize different active conformations capable of activating distinct signaling pathways (31–33). The difference in 5-HT_{2A} receptor-operated signaling upon activation by hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists represents one of the most remarkable examples of functional selectivity so far characterized (9). More recently,

phosphorylation of GPCRs at specific sites has emerged as one mechanisms contributing to functional selectivity (34) and several studies have revealed the capacity of different ligands of a given receptor to promote preferential receptor phosphorylation at distinct sites (35–38). The present report likewise demonstrated the ability of a subset of 5-HT_{2A} receptor ago-

FIG. 5. Ser²⁸⁰ phosphorylation underlies differential 5-HT_{2A} receptor desensitization by hallucinogenic and non-hallucinogenic agonists. *A*, Inositol phosphate production induced by incremental concentrations of 5-HT in HEK-293 cells transiently expressing wild type or S²⁸⁰A or S²⁸⁰D 5-HT_{2A} receptors. Data, expressed in % of the maximal 5-HT response in cells expressing wild type receptors are the means ± S.E. of quadruplicate determinations performed in a typical experiment. Two other experiments performed on different sets of cultured cells yielded similar results. *B*, Effect of a 1 h pretreatment with either vehicle (Veh) or DOI or LSD or lisuride or ergotamine (1 μM each) upon ERK1,2 phosphorylation elicited by 5-HT (10 μM) in HEK-293 cells expressing wild type or S²⁸⁰A or S²⁸⁰D 5-HT_{2A} receptors. Immunoblots representative of three independent experiments are shown. *C*, Effect of the corresponding treatments upon inositol phosphate production elicited by 5-HT (10 μM) in HEK-293 cells expressing wild type or S²⁸⁰A or S²⁸⁰D 5-HT_{2A} receptors. Data, expressed in % of the 5-HT-elicited response in cells pretreated with vehicle, are the means ± S.E. of values obtained in three independent experiments. * *p* < 0.05 versus vehicle-pretreated cells (ANOVA followed by Dunnett's test).



nists to induce phosphorylation of one well-defined site, despite a similar intrinsic efficacy to transduce signals. Biased 5-HT_{2A} receptor phosphorylation elicited by the different agonists tested correlated with their behavioral outcomes and might represent one critical step underlying functional selectivity at these receptors.

Mass spectrometry analyses identified several phosphorylated forms of the same peptide located in the receptor i3 loop (LASFSFIPQSSISSEK). These included a unique monophosphorylated form (phosphorylated at Ser²⁸⁰), and several less abundant doubly or triply phosphorylated forms systematically phosphorylated at Ser²⁸⁰. All these phosphorylated peptides were up-regulated by hallucinogens but not by nonhallucinogenic agonists. Collectively, these observations clearly identify Ser²⁸⁰ phosphorylation as the primary event governing further phosphorylation of downstream serine residues. Differential phosphorylation of Ser²⁸⁰ upon receptor activation by hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists was further established *in vivo* following systemic administration of these compounds to mice, by using a phosphosite specific antibody. Further supporting the relevance of Ser²⁸⁰ phosphorylation, the most prominent phospho-Ser²⁸⁰ immunoreactive signal in mice treated with a hallucinogenic agonist was detected in prefrontal cortex, the brain region involved in the psychomimetic effects of hallucinogens (8).

We identified another cluster of phosphorylated serines (Ser²⁹⁸ and Ser³⁰⁵) in a receptor i3 loop peptide (SIHREPG-SYTGR). Both monophosphorylated (at Ser²⁹⁸) and doubly phosphorylated forms of this peptide were detected in the present study, in contrast with a previous large-scale analysis of synapse phosphoproteome in the mouse, which only identified phosphorylated Ser²⁹⁸ (39). The phosphorylation of Ser²⁹⁸ and Ser³⁰⁵ was weakly induced by both hallucinogens and nonhallucinogenic agonists. Moreover, our studies did not detect phosphorylation of Ser³¹⁴, another serine located in the receptor i3 loop previously identified as a RSK2 substrate (26). Notably, phosphorylation of this residue was detected *in vitro* by incubating receptor i3 loop or the entire purified 5-HT_{2A} receptor with recombinant RSK2, whereas the present study investigated the receptor phosphorylation state in HEK-293 cells. Further experiments suggested a role of Ser³¹⁴ phosphorylation in attenuation of 5-HT_{2A} receptor signaling induced by EGF and PDGF in a variety of cell types, including neurons (40). Our results suggest that in the absence of growth factors, Ser³¹⁴ phosphorylation might occur at a lower stoichiometry than the other phosphorylated residues identified in the present study, even upon agonist stimulation of 5-HT_{2A} receptors. Together with previous findings, they also identify the receptor i3 loop, which contains 18 potential phosphorylation sites for Ser/Thr kinases, as a hot

spot of phosphorylation potentially important for regulating receptor functional activity.

In an effort to identify protein kinase(s) contributing to hallucinogen-elicited Ser²⁸⁰ phosphorylation, we found that it was dependent on PKC activity, though we cannot conclude at this stage whether PKC directly phosphorylates Ser²⁸⁰ or whether the phosphorylation of this residue is elicited by a closely related kinase different from RSK and PKB and activated by PKC. This observation was quite unexpected as both hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists activate the PLC pathway and therefore PKC. Moreover, PTX treatment did not affect DOI-elicited Ser²⁸⁰ phosphorylation, indicating that biased 5-HT_{2A} receptor phosphorylation is not triggered by a pathway (Gi/o-dependent) selectively engaged by hallucinogens but rather by a common pathway activated by both hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists. We thus hypothesize that Ser²⁸⁰ might be accessible for PKC phosphorylation only in a 5-HT_{2A} receptor conformation that is specifically stabilized by hallucinogens.

Another important finding of the present study is the different ability of hallucinogenic and nonhallucinogenic agonists to induce 5-HT_{2A} receptor desensitization and internalization, observed in both HEK-293 cells and cortical neurons. To our knowledge, no study has so far compared the ability of hallucinogenic and nonhallucinogenic compounds to desensitize 5-HT_{2A} receptors. Nonetheless, the present findings are consistent with a recent study, which demonstrated that DOI was less efficient than 5-HT to internalize eGFP-tagged 5-HT_{2A} receptors stably expressed in HEK-293 cells (27). They also provide convergent evidence indicating that the different effects of hallucinogenic *versus* non hallucinogenic agonists upon receptor desensitization reflect their differential capacity to promote Ser²⁸⁰ phosphorylation: (1) mutating Ser²⁸⁰ into alanine or aspartate abolished the difference in the agonist effects upon receptor desensitization; (2) hallucinogens were able to desensitize S²⁸⁰A receptor to an extent comparable to that induced by nonhallucinogenic agonists in cells expressing wild type receptor and (3) nonhallucinogenic agonists did not promote desensitization of the Ser²⁸⁰D receptor mutant. Collectively, these observations establish a direct link between Ser²⁸⁰ phosphorylation and the low capacity of hallucinogens to desensitize the receptor and suggest that Ser²⁸⁰ is phosphorylated at a high stoichiometry following hallucinogen treatment. These findings contrast with a previous study which showed that mutating into alanine two serine residues, one (Ser⁴²¹) located in the receptor C terminus and the other (Ser¹⁸⁸) in the i2 loop, strongly reduced quipazine-mediated receptor desensitization, whereas the deletion of residues 280–296 or residues 280–310 in the i3 loop (*i.e.* Ser²⁸⁰ and downstream residues phosphorylated upon hallucinogen treatment) had no effect on the time course and extent of 5-HT_{2A} receptor desensitization (41). However, it is likely that the agonist used to induce receptor desensitization (quipazine), which is devoid of hallucinogenic activity in humans

(42), does not induce S²⁸⁰ phosphorylation, like lisuride and ergotamine. Phosphorylation of other residues (*e.g.* Ser¹⁸⁸ and/or Ser⁴²¹), though not detected in our MS/MS analyses, might thus underlie 5-HT_{2A} receptor desensitization induced by any receptor agonist, whereas the specific phosphorylation of Ser²⁸⁰ (and/or of downstream serines in i3 loop) by hallucinogens might act as a brake limiting receptor desensitization. Alternatively, Ser²⁸⁰ phosphorylation might facilitate 5-HT_{2A} receptor resensitization that occurs in the continuous presence of agonist, consistent with previous findings indicating that receptor resensitization, like Ser²⁸⁰ phosphorylation, is also dependent of PKC (28).

Initial studies on 5-HT_{2A} receptor desensitization and internalization showed that they are both β -arrestin-independent (43), contrasting with what is more generally observed for numerous GPCRs. However, the situation is probably more complex than previously imagined, as a more recent study revealed a differential pattern of β -arrestin sensitivity for agonist-induced receptor internalization: though treatment with DOI or the 5-HT precursor L-5-hydroxy-tryptophan displayed similar efficacies to promote receptor internalization, DOI-induced receptor internalization was β -arrestin-independent, whereas 5-HT-induced internalization requires β -arrestins (44). β -arrestin-independent receptor internalization elicited by DOI treatment corroborates with the low ability of this compound to promote β -arrestin recruitment by the receptor (compared with nonhallucinogenic agonists), a property shared by LSD and likely reflecting the unique ability of hallucinogens to promote Ser²⁸⁰ phosphorylation. Whether β -arrestins contributes to receptor-internalization elicited by the nonhallucinogenic agonists remains to be elucidated.

In conclusion, our observations show that ligand identity not only determines the nature of 5-HT_{2A} receptor-operated signaling but also the pattern of receptor phosphorylation at a site (Ser²⁸⁰) involved in desensitization and internalization. They highlight the power of quantitative phosphoproteomics to identify mechanisms underlying functional selectivity and of potential relevance to the behavioral responses induced by biased ligands. The clinical significance of the biased 5-HT_{2A} receptor phosphorylation remains to be established. In this regard, it would be of considerable interest to explore in future studies how Ser²⁸⁰ phosphorylation is affected by the different classes of antipsychotics and by 5-HT_{2A} receptor heterodimerization with mGlu2 metabotropic glutamate receptor, a process critical for hallucinogen psychomimetic activity (45, 46).

* This work was supported by grants from la Fondation pour la Recherche Médicale (Contracts Equipe FRM 2005 and 2009), ANR (Contract n° ANR-08-MNPS-0011), CNRS, INSERM University Montpellier 1 and University Montpellier 2. Mass spectrometry experiments were carried out using facilities of the Functional Proteomic Platform of Montpellier Languedoc-Roussillon.

§ This article contains supplemental Figs. S1 to S5 and Table S1.

‡‡ To whom correspondence should be addressed: Institut de

Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: +33 434 35 92 13; Fax: + 33 467 54 24 32; E-mail: franck.vandermoere@igf.cnrs.fr.

§§ These authors equally contributed to the study.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Meltzer, H. Y., Massey, B. W., and Horiguchi, M. (2012) Serotonin receptors as targets for drugs useful to treat psychosis and cognitive impairment in schizophrenia. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1572–1586
- Roth, B. L., Berry, S. A., Kroeze, W. K., Willins, D. L., and Kristiansen, K. (1998) Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation. *Crit. Rev. Neurobiol.* **12**, 319–338
- Gray, J. A., and Roth, B. L. (2007) Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **33**, 1100–1119
- Aghajanian, G. K., and Marek, G. J. (1999) Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology* **21**, 16S–23S
- Nichols, D. E. (2004) Hallucinogens. *Pharmacol. Ther.* **101**, 131–181
- Gonzalez-Maeso, J., and Sealfon, S. C. (2009) Psychedelics and schizophrenia. *Trends Neurosci.* **32**, 225–232
- Gonzalez-Maeso, J., Weisstaub, N. V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Lira, A., Bradley-Moore, M., Ge, Y., Zhou, Q., Sealfon, S. C., and Gingrich, J. A. (2007) Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* **53**, 439–452
- Gonzalez-Maeso, J., Yuen, T., Ebersole, B. J., Wurmbach, E., Lira, A., Zhou, M., Weisstaub, N., Hen, R., Gingrich, J. A., and Sealfon, S. C. (2003) Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **23**, 8836–8843
- Gonzalez-Maeso, J., and Sealfon, S. C. (2009) Agonist-trafficking and hallucinogens. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1017–1027
- Becamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galeotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J., and Marin, P. (2004) The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 20257–20266
- Malinow, R., Hayashi, Y., Maletic-Savatic, M., Zaman, S. H., Poncer, J. C., Shi, S. H., Esteban, J. A., Osten, P., and Seidenman, K. (2010) Introduction of green fluorescent protein (GFP) into hippocampal neurons through viral infection. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb prot5406
- Dubois, F., Vandermoere, F., Gernez, A. I., Murphy, J., Toth, R., Chen, S., Geraghty, K. M., Morrice, N. A., and MacKintosh, C. (2009) Differential 14–3–3 affinity capture reveals new downstream targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2487–2499
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386
- Weiss, S., Pin, J. P., Sebben, M., Kemp, D. E., Sladeczek, F., Gabrion, J., and Bockaert, J. (1986) Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2238–2242
- McNulty, D. E., and Annan, R. S. (2008) Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 971–980
- Cox, J. R., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* **26**, 1367–1372
- Martin, D. M., Nett, I. R., Vandermoere, F., Barber, J. D., Morrice, N. A., and Ferguson, M. A. (2010) Prophossi: automating expert validation of phosphopeptide-spectrum matches from tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* **26**, 2153–2159
- Chanrion, B., Mannoury la Cour, C., Gavarini, S., Seimandi, M., Vincent, L., Pujol, J. F., Bockaert, J., Marin, P., and Millan, M. J. (2008) Inverse agonist and neutral antagonist actions of antidepressants at recombinant and native 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors: differential modulation of cell surface expression and signal transduction. *Mol. Pharmacol.* **73**, 748–757
- Miner, L. A., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E., and Sesack, S. R. (2003) Ultrastructural localization of serotonin_{2A} receptors in the middle layers of the rat prefrontal cortex. *Neuroscience* **116**, 107–117
- Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M. F., Piwnica-Worms, H., and Cantley, L. C. (1994) Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr. Biol.* **4**, 973–982
- Dinkel, H., Chica, C., Via, A., Gould, C. M., Jensen, L. J., Gibson, T. J., and Diella, F. (2011) Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites—update 2011. *Nucleic Acids Res.* **39**, D261–267
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008) GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1598–1608
- Sullivan, J. P., Connor, J. R., Shearer, B. G., and Burch, R. M. (1991) 2,6-Diamino-N-([1-oxotridecyl]-2-piperidinyl)methylhexanamide (NPC 15437): a selective inhibitor of protein kinase C. *Agents Actions* **34**, 142–144
- Heerding, D. A., Rhodes, N., Leber, J. D., Clark, T. J., Keenan, R. M., Lafrance, L. V., Li, M., Safonov, I. G., Takata, D. T., Venslavsky, J. W., Yamashita, D. S., Choudhry, A. E., Copeland, R. A., Lai, Z., Schaber, M. D., Tummino, P. J., Strum, S. L., Wood, E. R., Duckett, D. R., Eberwein, D., Knick, V. B., Lansing, T. J., McConnell, R. T., Zhang, S., Minthorn, E. A., Concha, N. O., Warren, G. L., and Kumar, R. (2008) Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-((3S)-3-piperidinylmethyl)oxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *J. Med. Chem.* **51**, 5663–5679
- Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Xu, Y., Errington, T. M., Hecht, S. M., and Lannigan, D. A. (2005) Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res.* **65**, 1027–1034
- Strachan, R. T., Sheffler, D. J., Willard, B., Kinter, M., Kiselar, J. G., and Roth, B. L. (2009) Ribosomal S6 Kinase 2 Directly Phosphorylates the 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) Serotonin Receptor, Thereby Modulating 5-HT_{2A} Signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 5557–5573
- Raote, I., Bhattacharyya, S., and Panicker, M. M. (2013) Functional selectivity in serotonin receptor 2A (5-HT_{2A}) endocytosis, recycling, and phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* **83**, 42–50
- Bhattacharyya, S., Puri, S., Miledi, R., and Panicker, M. M. (2002) Internalization and recycling of 5-HT_{2A} receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14470–14475
- Berg, K. A., Stout, B. D., Maayani, S., and Clarke, W. P. (2001) Differences in rapid desensitization of 5-hydroxytryptamine_{2A} and 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor-mediated phospholipase C activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 593–602
- Gelber, E. I., Kroeze, W. K., Willins, D. L., Gray, J. A., Sinar, C. A., Hyde, E. G., Gurevich, V., Benovic, J., and Roth, B. L. (1999) Structure and function of the third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor: the third intracellular loop is alpha-helical and binds purified arrestins. *J. Neurochem.* **72**, 2206–2214
- Kenakin, T. (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7Tm receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 407–415
- Galandrin, S., Oligny-Longpre, G., and Bouvier, M. (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 423–430
- Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M., and Mailman, R. B. (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 1–13
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K., and Lefkowitz, R. J. (2012) Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**, 179–197
- Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Huang, T. Y., Bressler, E. A., Hara, M. R., Shenoy, S. K., Gygi, S. P., and Lefkowitz, R. J. (2011) Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci. Signal.* **4**, ra51
- Butcher, A. J., Prihandoko, R., Kong, K. C., McWilliams, P., Edwards, J. M., Bottrill, A., Mistry, S., and Tobin, A. B. (2011) Differential G-protein-

- coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J. Biol. Chem.* **286**, 11506–11518
37. Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., and Benovic, J. L. (2010) Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.* **285**, 7805–7817
38. Wisler, J. W., DeWire, S. M., Whalen, E. J., Violin, J. D., Drake, M. T., Ahn, S., Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2007) A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16657–16662
39. Trinidad, J. C., Barkan, D. T., Gullledge, B. F., Thalhammer, A., Sali, A., Schoepfer, R., and Burlingame, A. L. (2012) Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol. Cell. Proteomics.* **11**, 215–229
40. Strachan, R. T., Allen, J. A., Sheffler, D. J., and Roth, B. L. (2010) p90 Ribosomal S6 kinase 2, a novel GPCR kinase, is required for growth factor-mediated attenuation of GPCR signaling. *Biochemistry* **49**, 2657–2671
41. Gray, J. A., Compton-Toth, B. A., and Roth, B. L. (2003) Identification of two serine residues essential for agonist-induced 5-HT_{2A} receptor desensitization. *Biochemistry* **42**, 10853–10862
42. Fiorella, D., Rabin, R. A., and Winter, J. C. (1995) Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the stimulus effects of hallucinogenic drugs. II: Reassessment of LSD false positives. *Psychopharmacology (Berl)* **121**, 357–363
43. Bhatnagar, A., Willins, D. L., Gray, J. A., Woods, J., Benovic, J. L., and Roth, B. L. (2001) The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 8269–8277
44. Schmid, C. L., Raehal, K. M., and Bohn, L. M. (2008) Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on beta-arrestin-2 interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1079–1084
45. Gonzalez-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., Lopez-Gimenez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., and Sealfon, S. C. (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**, 93–97
46. Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuellar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L. F., Neve, R. L., Milligan, G., Sealfon, S. C., Lopez-Gimenez, J. F., Meana, J. J., Benson, D. L., and Gonzalez-Maeso, J. (2012) Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT_{2A}.mGlu2) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J. Biol. Chem.* **287**, 44301–44319