



HAL
open science

Mécanisme d'adressage dendritique du récepteur 5-HT1A de la sérotonine : identification de Yif1B, protéine d'échafaudage essentielle au recrutement de Rab6, Yip1A et de la tubuline

Sana Al Awabdh

► **To cite this version:**

Sana Al Awabdh. Mécanisme d'adressage dendritique du récepteur 5-HT1A de la sérotonine : identification de Yif1B, protéine d'échafaudage essentielle au recrutement de Rab6, Yip1A et de la tubuline. Neurosciences [q-bio.NC]. UPMC - Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 2011. Français. NNT : 2011PA066198 . tel-04380497

HAL Id: tel-04380497

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-04380497v1>

Submitted on 8 Jan 2024

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
NEUROSCIENCES

Présentée par
Sana AL AWABDH

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Mécanisme d'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A} de la sérotonine:
Identification de Yif1B, protéine d'échafaudage essentielle au recrutement
de Rab6, Yip1A et de la tubuline**

Soutenue le 6 octobre 2011

Devant le jury composé de :

Professeur François Couraud

Docteur Bruno Goud

Docteur Philippe Marin

Docteur Thierry Galli

Docteur Bénédicte Dargent

Docteur Michèle Darmon

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma gratitude aux Docteurs Philippe Marin et Bruno Goud qui ont accepté d'être membre rapporteur du jury de cette thèse, aux Docteurs Thierry Galli et Bénédicte Dargent qui ont bien voulu consacrer du temps à examiner mon travail, et enfin au Professeur François Couraud qui me fait l'honneur de présider le jury.

Je tiens à remercier très chaleureusement la directrice de cette thèse, Michèle Darmon, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche passionnant et pour m'avoir accordé toute sa confiance pendant toutes mes années passées au laboratoire. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité, sa gentillesse, sa générosité, son savoir et sa rigueur scientifique. Je la remercie pour m'avoir guidée et conseillée à chaque instant de cette thèse tout en me laissant une grande liberté ce qui m'a permis de m'exprimer pleinement dans mon travail. Je lui suis également très reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité de faire de nombreuses rencontres enrichissantes en participant à des congrès. Ce projet n'aurait pas abouti sans son aide précieuse, en particulier ces derniers temps. Si ces années de thèse ont été un réel plaisir pour moi, c'est en grande partie grâce à Michèle.

Je remercie vivement Michel Hamon qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui m'a soutenue tout au long de ces années. Je souhaite lui exprimer le profond respect que j'ai pour sa disponibilité, son enthousiasme et tous les efforts qu'il fournit chaque jour pour maintenir un environnement propice à des recherches scientifiques audacieuses. Je le remercie également pour toutes ses lettres de recommandations (plus qu'élogieuses) mais également pour toutes ses corrections (abstracts, posters, demandes de financement...), le plus souvent demandées à la dernière minute, et qu'il a toujours pris le temps de faire.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Boris Emerit qui a toujours été disponible et attentif, tant du point de vue humain que professionnel. Je lui suis très reconnaissante de tout ce qu'il a fait pour moi, en particulier pour le temps qu'il a consacré à la relecture de ce manuscrit. Boris a toujours su répondre à mes interrogations avec une rigueur et une clarté irréprochables que ce soit en biochimie ou en biologie cellulaire. Ses cultures de neurones ont permis la conduite de toutes les expériences de ce projet et je le remercie de réaliser en ce moment les dernières expériences concernant l'identification des moteurs moléculaires impliqués dans le trafic du récepteur 5-HT_{1A}.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont participé à ce projet ... je ne les citerai pas tous ici. Mais j'aimerais faire une dédicace spéciale à Tahar, pour sa rigueur, sa gentillesse et sa patience face à mes problèmes de Biacore; Stéphanie, pour sa générosité et sa vitalité, je tiens tout particulièrement à la remercier pour nous avoir montré la technique de vidéomicroscopie et aussi pour nous avoir fortement encouragées à rechercher les moteurs moléculaires, étude qui me tenait tant à cœur mais que j'avais mis de côté par manque de temps !

Merci à Justine pour tout le temps qu'elle a consacré pour la préparation des nombreuses présentations orales ainsi que pour ses judicieux conseils tout le long de cette thèse. Je la remercie en particulier pour son caractère qui rend le quotidien au laboratoire très agréable et animé.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes collègues de bureau, les « filles », qui sont devenues très rapidement des amies; Elodie, alias « fourmito », la seule qui ne m'a toujours pas abandonnée ☺, j'ai beaucoup apprécié son caractère, ses blagues quotidiennes, ses rêves bizarres très fréquents qu'elle partageait au café, et pour encore plein d'autres bonnes raisons, tout cela va me manquer...Je remercie Eleni, alias « Elenos », que j'apprécie notamment pour sa générosité et sa gentillesse mais également pour beaucoup d'autres de ses qualités. J'admire Eleni pour son courage et sa force face aux douloureux événements qu'elle a vécu ces trois dernières années... Enfin, une pensée amicale revient à Camille qui a partagé pendant plus d'un an notre bureau.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à toutes les personnes que j'ai eues le plaisir de côtoyer durant ces quelques années au laboratoire. A tous les membres actuels du site Pitié Salpêtrière de l'U894 et également à ceux de l'U677. Je ne citerai pas tout le monde, ils sont et ont été si nombreux, j'en oublierai sûrement. Je remercie Damien pour son amitié, sa disponibilité et surtout pour m'avoir « passé le flambeau ». Merci à Cécile, « mon étudiante » de BTS qui m'a beaucoup aidée pour les manips de Biacore. Merci à Sylvie alias mon « chauffeur », je la remercie pour toutes les fois où j'ai eu le privilège de me faire raccompagner en voiture souvent jusqu'en bas de chez moi...Je tiens à remercier tout particulièrement les doctorants pour cet environnement si agréable au quotidien. Si ma thèse a été un vrai moment de bonheur, c'est en partie grâce à tous ces moments de détente et de festivités que nous avons partagés et que je garderai en mémoire!

Je remercie mes amis Kahina, Ben, Jeanne, Jérôme, Alia, Mymy, Elaine... mais aussi Tulio, pour leur soutien et pour tous ces moments de détente en dehors du laboratoire...

Je remercie mes frères et sœurs, Sinan, Salam et Saria, pour leur amour et leur soutien permanent, et tout particulièrement pour la complicité que nous partageons.

Enfin, je remercie mes parents, Salim et Samira, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui et qui ont toujours porté beaucoup d'intérêt à mes études. Je leur suis très reconnaissante de m'avoir permis d'étudier en toute sérénité et ainsi, me consacrer pleinement à ma thèse. Je n'oublierai jamais tous les efforts qu'ils ont fournis pour ma réussite. Je suis très fière de leur parcours et je leur dédie cette thèse.

PUBLICATIONS

ARTICLES

Al Awabdh S., Miserey-Lenkei S., Bouceba T., Kano F., Marinach-Patrice C., Masson J., Hamon M., Emerit M. B., and Darmon M. Rab6 and Yip1A: two key partners in the vesicular Yif1B-scaffolding complex for the serotonin 5-HT_{1A} receptor dendritic targeting. (*en préparation*).

Masson J., Lainé J., **Al Awabdh S.**, Dauphin A., Hamon M., Emerit M. B., and Darmon M. (2011) Cellular and subcellular localization of Yif1B, a protein involved in dendritic receptor targeting in rat central nervous system. *EJN (Soumis)*.

Carrel D. *, Masson J. *, **Al Awabdh S.**, Borg Capra C., Lenkei Z., M. Hamon M., Emerit M. B., and Darmon M. (2008) Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *premiers co-auteurs. *J Neurosci.* 28(32):8063-73.

COMMUNICATIONS

S. Al Awabdh, M.B Emerit, J. Masson, M. Hamon, M. Darmon.

Communication orale : Control of the dendritic targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor as an alternative antidepressant therapy". *The 24th congress of the European College of NeuroPsychopharmacology (ECNP)*. Paris, France, 2011.

S. Al Awabdh, T. Bouceba, S. Miserey-Lenkei, M. Hamon, M.B. Emerit, M. Darmon.

Poster : The 5-HT_{1A} receptor is targeted into the dendrites by an original intracellular pathway. *10^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences*. Marseille, France, 2011.

S. Al Awabdh, J. Masson, M. Hamon, M.B Emerit, M. Darmon.

Poster : YIF1B: a key partner for the distal dendritic targeting of the G-protein coupled serotonin 5-HT_{1A} receptor. *The 50th Annual Meeting of the American Society of Cell Biology (ASCB)*. Philadelphie, USA, 2010.

S. Al Awabdh, M.B Emerit, M. Hamon, M. Darmon.

Communication orale : Interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} de la sérotonine et Yif1B, une protéine partenaire impliquée dans son adressage dendritique. *18^{ème} colloque de l'Ecole Doctorale Cerveau, Cognition, Comportement (ED3C)*. Roscoff, France, 2010.

S. Al Awabdh, M.B Emerit, M. Hamon, M. Darmon.

Poster : Biochemical analysis of the interaction between the 5-HT_{1A} serotonergic receptor and Yif1B, a partner protein implicated in the distal dendritic targeting of the receptor. *9^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences*. Bordeaux, France, 2009.

S. Al Awabdh, J. Masson, D. Carrel, C. Borg-Capra, M. Hamon, M.B Emerit, M. Darmon. *Poster* : Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *The 6th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS)*. Genève, Suisse, 2008.

Mécanisme d'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A} de la sérotonine: Identification de Yif1B, protéine d'échafaudage essentielle au recrutement de Rab6, Yip1A et de la tubuline

Les récepteurs 5-HT_{1A} de la sérotonine présents à la membrane somatodendritique des neurones du raphé jouent un rôle clé dans le délai d'action des antidépresseurs. J'ai entrepris d'identifier les protéines partenaires impliquées dans l'adressage neuronal polarisé du récepteur 5-HT_{1A}, celles-ci pouvant constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Suite à la découverte au laboratoire de Yif1B, première protéine partenaire du récepteur 5-HT_{1A} impliquée dans son adressage dendritique, le premier volet de mon travail de thèse a abouti à la caractérisation de l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et Yif1B. En combinant des approches de mutagenèse dirigée, de GST-Pull Down et de résonance plasmonique de surface (ou Biacore), j'ai pu mettre en évidence, dans l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}, un motif tribasique en interaction directe avec trois résidus acides de l'extrémité N-terminale de Yif1B. Dans le deuxième volet de mon travail, j'ai caractérisé les mécanismes de ce routage spécifique par une approche multidisciplinaire mêlant protéomique et biochimie, analyses topologiques sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe et vidéomicroscopie sur des neurones vivants. J'ai ainsi pu identifier une nouvelle voie d'adressage dendritique dans laquelle Yif1B est la protéine d'échafaudage qui assemble le récepteur 5-HT_{1A} avec Yip1A et Rab6, les autres partenaires du complexe cargo vésiculaire qui transporte le récepteur le long des microtubules dendritiques. Enfin, l'identification des moteurs moléculaires impliqués dans cet adressage, complète la description de cette nouvelle voie.

Mots-clés : trafic, neurone, récepteur, sérotonine, protéine Rab, cytosquelette

Mechanism of the dendritic addressing of the 5-HT_{1A} serotonergic receptor: Identification of Yif1B, a scaffold protein essential for the recruitment of Rab6, Yip1A and the tubulin

The serotonergic 5-HT_{1A} receptors localized at the plasma membrane of the soma and dendrites of the raphe neurons play a key role in the onset of antidepressant action. The aim of my work was to identify partner proteins involved in the polarized 5-HT_{1A} receptor targeting in neurons. Thus, these proteins could be new targets for innovative therapeutic strategies. Following the discovery in the Lab of Yif1B, the first 5-HT_{1A} receptor partner protein implicated in its dendritic targeting, the first part of my thesis work has resulted in the characterization of the interaction between the 5-HT_{1A} receptor and Yif1B. By combining directed mutagenesis, GST-Pull Down and Surface Plasmon Resonance (or Biacore), I have highlighted the role of a tribasic motif in the C-tail of the 5-HT_{1A} receptor, that is in direct interaction with three aspartic acid residues in the N-tail of Yif1B. In the second part of my work, I have characterized the mechanism of this specific trafficking by a multidisciplinary approach combining proteomic, biochemistry, topological analysis on primary culture of hippocampal neurons and videomicroscopy on live neurons. Thus, I have identified a new dendritic targeting pathway involving Yif1B as a scaffold protein assembling the 5-HT_{1A} receptor with Yip1A and Rab6, two other partners of the vesicular cargo complex transporting the receptor along the dendritic microtubules. Finally, the identification of the molecular motors involved in this addressing process complete the description of this new pathway.

Key words: traffic, neuron, receptor, serotonin, Rab protein, cytoskeleton

U894 INSERM/UPMC, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, site Pitié Salpêtrière, Faculté de Médecine de l'UPMC, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	- 1 -
TABLE DES ABREVIATIONS	- 7 -
TABLE DES ILLUSTRATIONS	- 9 -
INTRODUCTION GENERALE	- 11 -
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	- 15 -
I. LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G	- 17 -
I.1. RAPPELS HISTORIQUES	- 17 -
I.2. GENERALITES SUR LES RCPG ET LEUR ROLE DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL.....	- 19 -
I.3. STRUCTURE DES RCPG	- 19 -
I.4. CLASSIFICATION DE LA SUPERFAMILLE DES RCPG.....	- 21 -
I.5. ACTIVATION ET SIGNALISATION DES RCPG	- 25 -
I.5.1. Les voies dépendantes des protéines G.....	- 25 -
I.5.1.a. Les protéines G.....	- 25 -
I.5.1.b. Le cycle des protéines G, sa régulation et la signalisation en aval.....	- 25 -
I.5.2. Les voies indépendantes des protéines G.....	- 26 -
I.6. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA VIE D'UN RCPG	- 27 -
II. L'ADRESSAGE DENDRITIQUE DU RECEPTEUR SEROTONINERGIQUE 5-HT_{1A}	- 29 -
II.1. LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE	- 29 -
II.1.1. Présentation de la sérotonine.....	- 29 -
II.1.2. Implications physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine	- 29 -
II.1.3. Métabolisme de la sérotonine	- 31 -
II.1.4. Distribution centrale des neurones sérotoninergiques	- 32 -
II.2. LES RECEPTEURS DE LA SEROTONINE.....	- 33 -
II.3. LE RECEPTEUR 5-HT _{1A}	- 35 -
II.3.1. Généralités sur le récepteur 5-HT _{1A}	- 35 -
II.3.1.a. Structure et caractéristiques biochimiques du récepteur 5-HT _{1A}	- 35 -
II.3.1.b. Pharmacologie du récepteur 5-HT _{1A}	- 37 -
II.3.1.c. Couplages fonctionnels du récepteur 5-HT _{1A}	- 37 -
II.3.1.d. Distribution anatomique du récepteur 5-HT _{1A}	- 38 -
II.3.2. Rôle fonctionnel du récepteur 5-HT _{1A} dans le traitement de la dépression.....	- 39 -
II.3.2.a. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)	- 41 -

	Effet d'un traitement aigu.....	- 41 -
	Effet d'un traitement chronique	- 41 -
II.3.3.	Adressage somato-dendritique du récepteur 5-HT _{1A}	- 42 -
II.3.3.a.	Adressage différentiel in vivo des récepteurs 5-HT _{1A} et 5-HT _{1B}	- 42 -
II.3.3.b.	Modèles d'adressage in vitro des récepteurs 5-HT _{1A} et 5-HT _{1B}	- 43 -
II.3.3.c.	Les régions C-terminales cytosoliques des récepteurs 5-HT _{1A} et 5-HT _{1B} sont cruciales pour leurs adressages respectifs	- 45 -
II.3.3.d.	Yif1B, partenaire du récepteur 5-HT _{1A} impliquée dans le trafic vésiculaire ..	- 45 -
III.	LE TRAFIC VESICULAIRE INTRACELLULAIRE	- 46 -
III.1.	LES DIFFERENTES ETAPES DU TRAFIC VESICULAIRE.....	- 46 -
III.1.1.	Présentation générale du trafic vésiculaire intracellulaire	- 46 -
III.1.2.	Le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi.....	- 47 -
III.1.2.a.	Généralités sur le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi	- 47 -
III.1.2.b.	Le transport antérograde RE-Golgi	- 49 -
III.1.2.c.	Le transport rétrograde Golgi-RE	- 49 -
III.1.3.	Le transport intraGolgi	- 49 -
III.1.4.	Le transport entre le Golgi et la membrane plasmique.....	- 51 -
III.2.	LES ACTEURS DU TRAFIC VESICULAIRE DANS LES CELLULES.....	- 51 -
III.2.1.	Présentation générale des acteurs du trafic vésiculaire	- 51 -
III.2.2.	Les protéines Rab	- 53 -
III.2.2.a.	Présentation générale des protéines Rab	- 53 -
III.2.2.b.	Les protéines régulatrices du cycle des Rab.....	- 53 -
III.2.2.c.	Le rôle des protéines Rab dans le trafic vésiculaire	- 54 -
	Les protéines Rab du trafic entre le RE et le Golgi.....	- 54 -
	Les protéines Rab du trafic intragolgien	- 56 -
	Les protéines Rab du trafic entre le Golgi et la membrane plasmique.....	- 56 -
III.2.3.	Les protéines Yip	- 59 -
III.2.3.a.	Présentation générale des protéines Yip	- 59 -
III.2.3.b.	Le rôle des protéines Yip dans le trafic vésiculaire en général	- 60 -
III.2.3.c.	Les protéines Yip entre le RE et le Golgi.....	- 61 -
	Yip1p/Yip1A.....	- 61 -
	Yif1p	- 62 -
	Le complexe Yip1/Yif1	- 63 -
III.2.3.d.	Le rôle des protéines Yip dans le recrutement des Rab.....	- 63 -

III.2.3.e.	La protéine Yip3 entre le Golgi et la MP	- 64 -
III.2.4.	Les moteurs moléculaires associés aux microtubules	- 67 -
III.2.4.a.	Présentation générale des microtubules	- 67 -
III.2.4.b.	Les kinésines.....	- 69 -
Structure et classification des kinésines ou Kif	- 69 -	
Directionnalité et modèle de déplacement des kinésines.....	- 70 -	
III.2.4.c.	Les dynéines	- 72 -
Structure et classification des dynéines cytoplasmiques.....	- 72 -	
La structure de la dynactine, cofacteur essentiel de la dynéine cytoplasmique ..	- 73 -	
III.2.4.d.	Rôles des kinésines et des dynéines dans le trafic intracellulaire	- 75 -
Entre le RE et l'appareil de Golgi.....	- 75 -	
Dans l'appareil de Golgi	- 75 -	
Entre le Golgi et la membrane plasmique.....	- 76 -	
III.2.4.e.	Rab6 et les moteurs moléculaires.....	- 77 -
Lien entre Rab6 et la Rabkinesine 6.....	- 77 -	
Lien entre Rab6, son effecteur Bicaudal et le complexe dynéine/dynactine	- 77 -	
Lien entre Rab6, son effecteur Bicaudal et Kif5B.....	- 79 -	
Lien entre Rab6B et le complexe dynéine/dynactine	- 79 -	
IV.	LE ROLE DES MICROTUBULES DANS LE TRAFIC NEURONAL POLARISE.....	- 81 -
IV.1.	LES NEURONES : DES CELLULES POLARISEES.....	- 81 -
IV.2.	LES « RE MOBILES » ET LES « GOLGI OUTPOSTS »	- 81 -
IV.2.1.	Localisation de ces « mini-organites » dans les neurones	- 81 -
IV.2.2.	Rôle de ces « mini-organites » dans l'adressage neuronal de cargos.....	- 83 -
IV.3.	L'ORGANISATION DES MICROTUBULES DANS LES NEURONES	- 85 -
IV.4.	LES PRINCIPAUX MOTEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LE TRANSPORT NEURONAL POLARISE.....	- 87 -
IV.4.1.	Les kinésines impliquées dans le transport neuronal	- 87 -
IV.4.2.	Les dynéines dans le transport neuronal	- 88 -
IV.4.3.	La coordination entre les dynéines et les kinésines dans les neurones	- 89 -
IV.4.4.	Les protéines d'échafaudage impliquées dans la formation de complexes cargo- moteur moléculaire	- 90 -
	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	- 91 -
	RESULTATS.....	- 95 -
I.	YIF1B EST UNE PROTEINE CRUCIALE POUR L'ADRESSAGE DU RECEPTEUR 5-HT_{1A} VERS LES DENDRITES DISTALES DES NEURONES (ARTICLE 1).....	- 97 -

I.1.	YIF1B EST LA PREMIERE PROTEINE PARTENAIRE IDENTIFIEE INTERAGISSANT AVEC L'EXTREMITÉ C-TERMINALE DU RECEPTEUR 5-HT _{1A}	- 97 -
I.2.	YIF1B EST EXPRIMEE DE FAÇON ENDOGENE DANS LES NEURONES DE RAPHE	- 98 -
I.3.	YIF1B COLOCALISE AVEC LE RECEPTEUR 5-HT _{1A} ET CYCLERAIT ENTRE LE RE ET L'APPAREIL DE GOLGI ..	- 98 -
I.4.	YIF1B EST CRUCIALE POUR L'ADRESSAGE DU RECEPTEUR 5-HT _{1A} VERS LES DENDRITES DISTALES.....	- 99 -
I.5.	LE ROLE DE YIF1B SEMBLE ETRE SPECIFIQUE DE L'ADRESSAGE DU RECEPTEUR 5-HT _{1A}	- 99 -
I.6.	L'INTERACTION DU RECEPTEUR 5-HT _{1A} AVEC YIF1B EST INDISPENSABLE POUR SON ADRESSAGE	- 99 -
	ARTICLE 1.....	- 101 -
II.	YIF1B EST UNE PROTEINE D'ECHAFAUDAGE RECRUTANT LES PROTEINES YIP1A ET RAB6 DANS LES VESICULES CARGOS DU RECEPTEUR 5-HT_{1A} ESSENTIELLES POUR SON ADRESSAGE LE LONG DES MICROTUBULES DENDRITIQUES :	
	IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE VOIE D'ADRESSAGE DENDRITIQUE DES RCPG (ARTICLE 2)	- 103 -
I.1.	QUESTIONS SOULEVEES SUITE AU PREMIER ARTICLE :.....	- 103 -
II.1.	RESULTATS DE L'ARTICLE 2 :.....	- 103 -
II.1.1.	Identification des motifs impliqués dans l'interaction entre le récepteur	- 103 -
II.1.2.	Défaut d'adressage du récepteur muté 5-HT _{1A} KdiR	- 105 -
II.1.3.	Yip1A et Rab6, deux nouveaux partenaires du récepteur 5-HT _{1A}	- 105 -
II.1.4.	Yif1B, protéine d'échafaudage reliant le récepteur 5-HT _{1A} à ses nouveaux partenaires	- 106 -
II.1.5.	Co-localisation du complexe 5-HT _{1A} /Yif1B et de ses nouveaux partenaires.....	- 107 -
II.1.6.	Mise en évidence d'un transport vésiculaire dynamique bidirectionnel du récepteur 5-HT _{1A} et de ses partenaires dans les dendrites	- 108 -
II.1.7.	Rôle des microtubules dans l'adressage du récepteur 5-HT _{1A}	- 109 -
II.1.8.	Rôle fonctionnel des différents éléments du complexe Yif1B-dépendant dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT _{1A}	- 110 -
	ARTICLE 2.....	- 111 -
	DISCUSSION	- 113 -
I.	PRINCIPAUX RESULTATS.....	- 115 -
II.	IDENTIFICATION DES MOTIFS D'INTERACTION DU COMPLEXE 5-HT_{1A}/YIF1B	- 115 -
III.	INTERACTION ENTRE YIF1B ET YIP1A	- 118 -
III.1.	INTERACTION BIOCHIMIQUE DU COMPLEXE YIF1B/YIP1A	- 118 -
III.2.	ROLE DE L'INTERACTION DE YIF1B/YIP1A	- 120 -
IV.	INTERACTION YIF1B/RAB6	- 120 -
IV.1.	INTERACTION BIOCHIMIQUE YIF1B/RAB6	- 120 -
IV.2.	ROLE DE RAB6 DANS LE TRAFIC DU RECEPTEUR 5-HT _{1A}	- 121 -

IV.3.	ROLE PROBABLE DE YIF1B EN TANT QUE RAB-GDF	- 121 -
V.	QUELS MOTEURS MOLECULAIRES ASSURENT LE TRANSPORT BIDIRECTIONNEL DU RECEPTEUR 5-HT_{1A} DANS LES DENDRITES ?.....	- 122 -
VI.	L'ADRESSAGE DENDRITIQUE DU RECEPTEUR 5-HT_{1A} : VOIE CONVENTIONNELLE OU GOLGI OUTPOSTS-DEPENDANTE ?.....	- 124 -
VI.1.	IMPLICATION D'UN OU PLUSIEURS COMPLEXES MULTIPROTEIQUES YIF1B-DEPENDANTS ?.....	- 124 -
VI.2.	YIF1B, CHEF D'ORCHESTRE DU TRAFIC DU RECEPTEUR 5-HT _{1A} VERS LES DENDRITES DES NEURONES.	- 124 -
VI.3.	SCENARIO EVENTUEL DU TRAFIC DU RECEPTEUR 5-HT _{1A} DANS LES NEURONES	- 125 -
VI.3.1.	Entre le RE et l'appareil de Golgi.....	- 125 -
VI.3.2.	Au niveau de l'appareil de Golgi	- 127 -
VI.3.3.	Entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique	- 128 -
VI.3.4.	Trafic intracellulaire dendritique	- 128 -
VI.3.4.a.	Du soma vers les dendrites	- 128 -
VI.3.4.b.	Dans les dendrites proximales	- 129 -
VI.3.4.c.	Dans les dendrites distales.....	- 129 -
	PERSPECTIVES	- 131 -
I.	DETERMINATION DU ROLE PRECIS DE YIF1B DANS LE TRAFIC INTRACELLULAIRE.....	- 133 -
II.	GENERALISATION DU ROLE DE YIF1B DANS L'ADRESSAGE DENDRITIQUE D'AUTRES RECEPTEURS	- 134 -
III.	PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES.....	- 134 -
III.1.	TRANSPOSITION DES RESULTATS OBTENUS SUR LES AUTORECEPTEURS 5-HT _{1A}	- 134 -
III.2.	APPLICATIONS IN VIVO	- 135 -
III.2.1.	Intérêt thérapeutique d'un peptide mimétique, inhibiteur spécifique de l'interaction 5-HT _{1A} /Yif1B, dans des modèles comportementaux de dépression	- 136 -
III.2.2.	Souris dont le gène Yif1B est invalidé constitutivement ou spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques	- 137 -
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 139 -
	ANNEXES.....	- 167 -
	ARTICLE 3.....	- 169 -

TABLE DES ABREVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTT	transporteur de la sérotonine
8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tétraline
AC	adenylate cyclase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
Akt	Serine/threonine-protein kinase ou PKB
AMPA	acide 22-amino-3-(5-méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPc	adénosine 3',5' monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
Boucle I3	troisième boucle intracellulaire
CGN	cis-Golgi network
COP	coat protein complex
ERES	endoplasmic reticulum exit site
ERGIC	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GDF	GDI displacement factor
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanosine diphosphate
GRK	G protein-coupled Receptor Kinase
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanosine triphosphate
LLC-PK1	pig kidney cell line
MAP	mitogen-activated proteins
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MP	membrane plasmique
NMDA	N-methyl-D-aspartate

NRD	Noyau du raphé dorsal
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
Rab	Ras-related protein in brain
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
SNC	système nerveux central
TGN	trans-golgi network
TPH	tryptophane-hydroxylase
Trk	tyrosine kinase
VMAT	transporteur vésiculaire des monoamines
VTC	vesiculo-tubular compartment
Yif	Yip-interacting factor
Yip	Ypt-interacting protein

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : L'histoire de la pharmacologie	- 17 -
Figure 2 : Transduction du signal par les RCPG.....	- 18 -
Figure 3 : Structure de la Rhodopsine bovine	- 20 -
Figure 4 : Les différentes classes de la superfamille des RCPG	- 22 -
Figure 5 : Activation et signalisation des RCPG.....	- 24 -
Figure 6 : Les différentes étapes du cycle de vie des RCPG.....	- 27 -
Figure 7 : Représentation anatomique schématique et implications physiologiques et physiopathologiques des voies sérotoninergiques dans le SNC.....	- 28 -
Figure 8 : Métabolisme de la sérotonine	- 30 -
Figure 9 : Structure du récepteur 5-HT _{1A} de rat.....	- 34 -
Figure 10 : Voies de signalisation régulées par la stimulation du récepteur 5-HT _{1A}	- 36 -
Figure 11 : Rôle de l'autorécepteur 5-HT _{1A} sur la neurotransmission sérotoninergique lors d'un traitement aigu ou chronique par des inhibiteurs sélectifs de la sérotonine	- 40 -
Figure 12 : Mise en évidence du rôle de l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT _{1A} dans son adressage vers les dendrites.....	- 44 -
Figure 13 : Les protéines de manteau impliquées dans le trafic vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi.....	- 48 -
Figure 14 : Le transport intragolgien.....	- 50 -
Figure 15 : Les différents acteurs du trafic membranaire	- 52 -
Figure 16 : Les protéines régulant le cycle d'activation/inactivation des protéines Rab.....	- 54 -
Figure 17 : Les protéines Rab dans le trafic vésiculaire	- 55 -
Figure 18 : Les différentes fonctions de Rab6 dans le trafic intracellulaire	- 57 -
Figure 19 : Les protéines interagissant avec les membres de la famille des Yip.....	- 58 -
Tableau 1 : Correspondance entre les différentes nomenclatures des protéines Yip chez les mammifères et nomenclature de leurs orthologues chez la levure.....	- 59 -
Figure 20 : Rôle des protéines Yip en tant que connecteurs fonctionnels dans le trafic vésiculaire.....	- 60 -
Figure 21 : Rôle des protéines Yip comme Rab-GDF	- 64 -
Figure 22 : Représentation schématique des « rails » de la cellule.....	- 66 -
Figure 23 : Structure et classification des kinésines	- 68 -
Figure 24 : Modèle de marche des kinésines processives.....	- 71 -

Figure 25 : Structure du complexe dynéine-dynactine.....	- 72 -
Figure 26 : Les moteurs moléculaires dans le trafic intracellulaire	- 74 -
Figure 27 : La polarité des microtubules dans les cellules épithéliales de l'intestin et les moteurs moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire.....	- 76 -
Figure 28 : Rab6 et ses effecteurs dans les membranes de l'appareil de Golgi	- 78 -
Figure 29 : Mise en évidence par microscopie électronique, d'une voie de sécrétion dans les dendrites distales de l'hippocampe	- 80 -
Figure 30 : Les deux modes possibles de transport entre le RE et l'appareil de Golgi dans les neurones	- 82 -
Figure 31 : L'organisation mixte des microtubules dans les dendrites proximales	- 84 -
Figure 32 : Les kinésines dans le trafic dendritique et axonal	- 86 -
Figure 33 : La dynactine assure la coordination du transport bidirectionnel impliquant deux moteurs moléculaires se déplaçant dans des sens opposés	- 89 -
Figure 34 : Comparaison des séquences protéiques des différents membres de la famille des Yip chez le rat	- 117 -
Figure 35 : Modélisation de l'interaction entre Yif1B et Yip1A dans une vésicule dérivée du RE transportant le récepteur 5-HT _{1A}	- 119 -
Figure 36 : Scénario possible du trafic du récepteur 5-HT _{1A} dans les neurones.....	- 126 -

INTRODUCTION GENERALE

Parmi les nombreux récepteurs de la sérotonine, les types 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} ont beaucoup de caractéristiques communes. Ces deux membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G sont à la fois auto- et hétéro-récepteurs, sont caractérisés par une affinité élevée pour la sérotonine et présentent une forte homologie de séquence.

Le récepteur 5-HT_{1A} module la décharge des neurones sérotoninergiques du raphé, comme attendu de sa localisation somato-dendritique. De plus, ce récepteur semble jouer un rôle dans l'action centrale des traitements par antidépresseurs, sa désensibilisation rendant compte du délai d'action thérapeutique de ces psychotropes. En ce qui concerne le récepteur 5-HT_{1B}, de nombreux travaux ont établi qu'il module la libération de neurotransmetteurs en exerçant une action inhibitrice au niveau des terminaisons axonales où il est localisé. Le mécanisme sous-tendant la désensibilisation de ces récepteurs n'est pas connu mais il est probable que, comme pour d'autres récepteurs couplés aux protéines G, ce phénomène implique leur internalisation. Ainsi, les mécanismes d'adressage à la membrane, d'ancrage et d'interaction avec le cytosquelette pourraient jouer un rôle essentiel dans la fonctionnalité de ces récepteurs.

Au laboratoire, plusieurs études se sont concentrées sur l'analyse de la différence d'adressage des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} dans les neurones du système nerveux central. La transfection de cellules épithéliales polarisées, puis de neurones en culture, avec des constructions codant des chimères de ces récepteurs, a permis de caractériser les séquences responsables de cet adressage différentiel. Ces travaux ont montré qu'une des régions impliquées est leur extrémité C-terminale cytoplasmique.

Par la suite, la technique du double hybride a permis l'identification de Yif1B, la première protéine interagissant avec la région C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}. Son rôle précis dans l'adressage de ce dernier a constitué un nouveau projet de recherche dans lequel j'ai été intégrée et qui a fait l'objet de ma thèse.

Après une présentation générale de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et des différents niveaux de régulation de leur fonctionnement, je décrirai le récepteur 5-HT_{1A}, sa distribution dans les neurones du système nerveux central, ainsi que son adressage subcellulaire différent de celui du 5-HT_{1B}. Je développerai ensuite l'état actuel des connaissances sur les différents acteurs contrôlant le trafic intracellulaire en général et particulièrement le transport polarisé neuronal. Les résultats expérimentaux feront l'objet d'une cinquième partie et seront suivis d'une discussion générale dans laquelle seront abordées les perspectives de ce travail.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les récepteurs couplés aux protéines G

I.1. Rappels historiques

Au début du XX^{ème} siècle, les pères fondateurs de la pharmacologie, Paul Ehrlich et John Newport Langley (Langley, 1908; Ehrlich, 1913), ont démontré l'existence de « substances réceptives » expliquant ainsi les effets de composés appliqués sur des organismes ou organes isolés (**Figure 1**). Par la suite, Alfred Clark, Raymond Ahlquist et James Black ont décrit les relations entre des composés et leurs effets physiologiques en apportant de nouveaux concepts fondamentaux : le couplage récepteur-ligand, l'occupation du récepteur et également la notion d'affinité (pour revue, Maehle, 2009). Cependant, le « récepteur » est resté une entité pharmacologique abstraite jusque dans les années 1960-70. Puis, les progrès de la biochimie ont permis la purification de protéines (Northup et al., 1980), la mise en évidence d'effecteurs (Birnbaumer et al., 1969) et de seconds messagers (Robison et al., 1967) et la détection directe des récepteurs à l'aide de ligands radiomarqués (Mukherjee et al., 1975). Enfin en 1986, le premier récepteur couplé aux protéines G a été cloné, il s'agissait alors du récepteur β_2 adrénergique des catécholamines (Dixon et al., 1986). On s'est immédiatement rendu compte qu'il présentait une surprenante homologie de séquence avec la rhodospine, récepteur qui permet la détection de la lumière, les deux possédant une structure commune à 7 domaines transmembranaires.

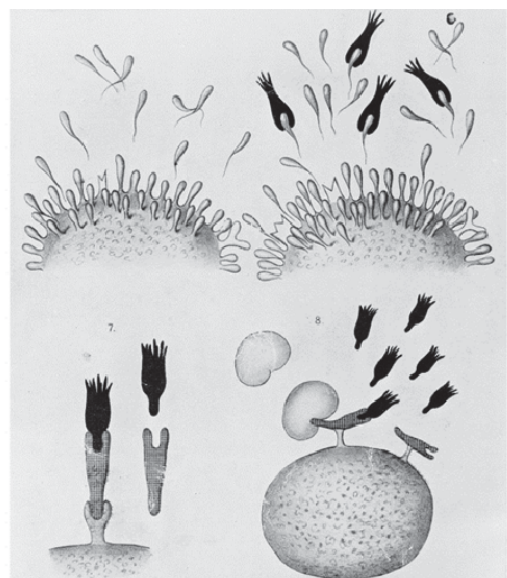


Figure 1 : L'histoire de la pharmacologie

La théorie des chaînes latérales développée par Paul Ehrlich qu'il nommera par la suite « récepteurs », lui a valu le prix Nobel en 1908 (D'après, Maehle, 2009).

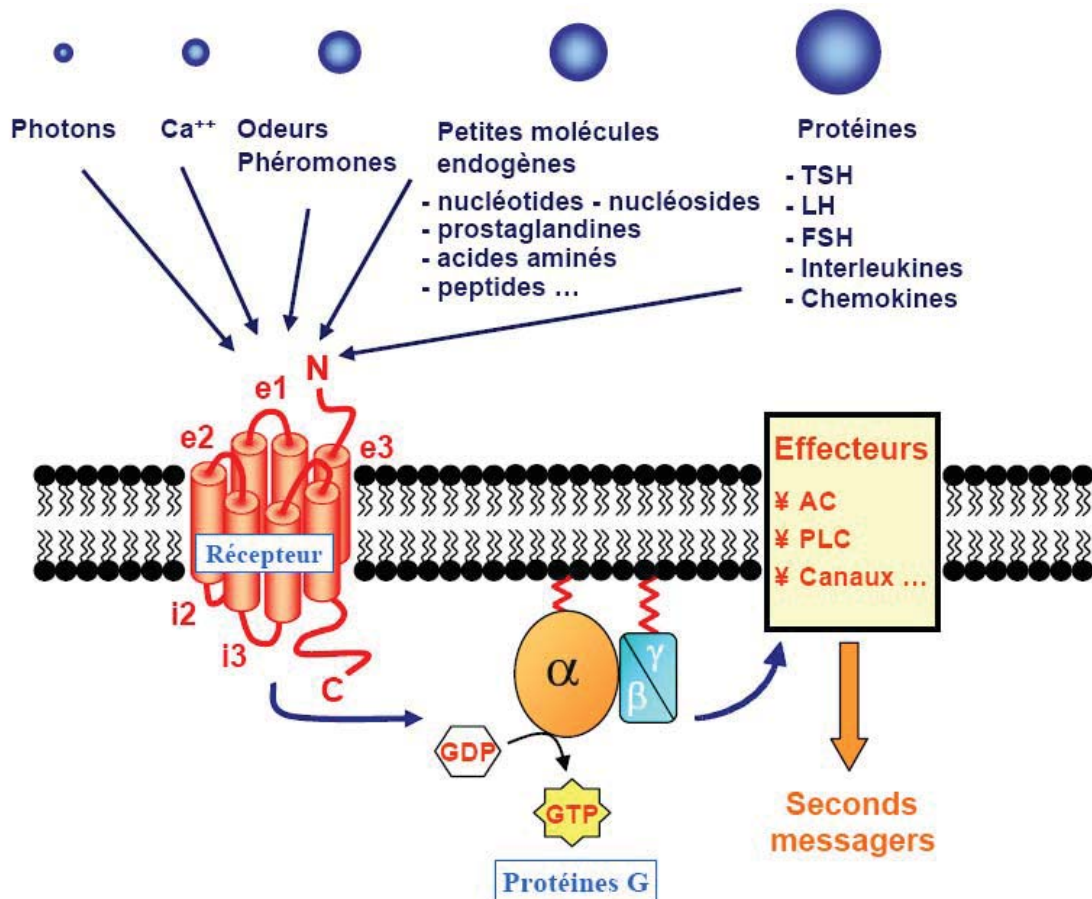


Figure 2 : Transduction du signal par les RCPG

Après la fixation d'un ligand extracellulaire sur le récepteur, celui-ci active la protéine G qui, à son tour, régule des effecteurs qui déclenchent des cascades de réactions intracellulaires (D'après Maurel, 2006).

1.2. Généralités sur les RCPG et leur rôle dans la transduction du signal

L'organisme doit en permanence analyser de façon simultanée une importante quantité d'informations provenant de l'environnement extérieur et de substances endogènes. La réception de ces signaux et leur traduction par l'organisme nécessitent des récepteurs à la surface de la cellule.

Parmi eux, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment la plus grande famille de récepteurs membranaires puisqu'elle représente environ 2% du génome humain (Fredriksson et al., 2003). Environ 80% des hormones et neurotransmetteurs connus activent des mécanismes cellulaires par le biais de RCPG (Birnbaumer et al., 1990). De plus, ces récepteurs sont à l'origine de nombreux processus physiologiques et sont également des cibles thérapeutiques de choix. En effet, environ 40 à 50% des médicaments du marché pharmaceutique actuel agissent sur les RCPG et/ou leur machinerie de régulation (Allen and Roth, 2010).

Le mode de signalisation des RCPG est à l'origine de leur nom puisque leur liaison avec un composé extracellulaire (ou ligand) provoque l'activation des voies de signalisation intracellulaires impliquant le plus souvent des protéines G. Ces récepteurs partagent une structure commune composée de 7 domaines transmembranaires (7TM), ils sont donc également appelés les récepteurs à 7TM (**Figure2**), « en serpent » ou heptahélicoïdaux (Pierce et al., 2002).

1.3. Structure des RCPG

La rhodopsine a été le premier RCPG humain à avoir été cloné en 1984 (Nathans and Hogness, 1984) et il est considéré comme le prototype de cette superfamille bien qu'il soit un peu particulier. En effet, ce récepteur n'est pas activé par la fixation de son ligand, le rétinol, mais il est associé à ce dernier qui change de conformation (isomérisation de cis en trans) sous l'effet de la lumière, ce qui entraîne l'activation de la rhodopsine. La structure secondaire de la rhodopsine bovine prédite à partir de la structure de la bactériorhodopsine (Nathans and Hogness, 1983) est constituée d'une très longue extrémité N-terminale extracellulaire (N) suivie de 7 hélices α -transmembranaires (H1 à H7), reliées entre elles par 3

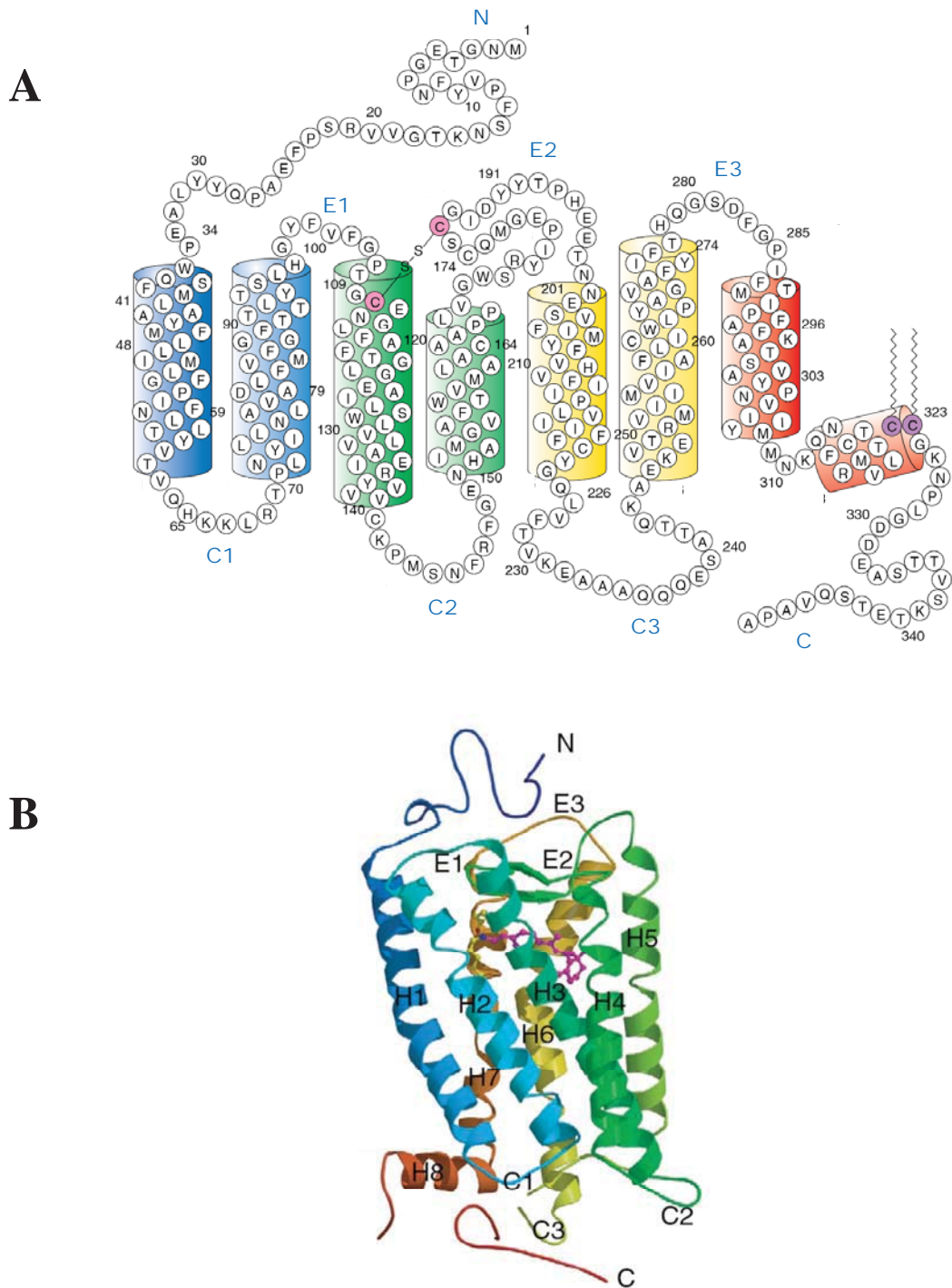


Figure 3 : Structure de la Rhodopsine bovine

Les RCPG sont des protéines composées d'une longue extrémité N-terminale extracellulaire suivie de 7 hélices transmembranaires reliées par 3 boucles cytoplasmiques (C1 à C3) et 3 boucles extracellulaires (E1 à E3) et se terminent par une extrémité C-terminale cytosolique.

A- Structure primaire de la rhodopsine (Hargrave and McDowell, 1992).

B- Structure tridimensionnelle de la rhodopsine associée au rétinale (PDB1f88) en cylindre obtenue par cristallographie (Palczewski et al., 2000).

(D'après Sakmar, 2002).

boucles cytoplasmiques (C1 à C3) et 3 boucles extracellulaires (E1 à E3), et se termine par une extrémité C-terminale intracellulaire (C) (**Figure 3A**).

Enfin, il y a une dizaine d'années, la structure tridimensionnelle de la rhodopsine bovine (**Figure 3B**) a été déterminée par cristallographie (Palczewski et al., 2000). Le modèle proposé montre une organisation spatiale des hélices transmembranaires en forme de cylindre, plus ou moins inclinées dans la membrane. De plus, toujours selon ce modèle, la région C-terminale cytoplasmique formerait une huitième hélice α parallèle à la membrane plasmique.

Certains RCPG subissent des modifications post-traductionnelles, les plus fréquentes sont la glycosylation de certains résidus situés dans l'extrémité N-terminale (Wheatley and Hawtin, 1999) et la palmitoylation de cystéines de l'extrémité C-terminale qui permet l'insertion de cette dernière dans la membrane plasmique (Chini and Parenti, 2009).

1.4. Classification de la superfamille des RCPG

A partir de la prédiction de cette structure heptahélicoïdale, environ 900 RCPG ont été identifiés dans le génome humain. Parmi eux, 450 se fixent à des ligands endogènes : peptides, acides aminés, lipides, nucléotides-nucléosides, neurotransmetteurs... (Takeda et al., 2002). L'autre moitié des RCPG détectent une très grande variété de stimuli provenant de l'extérieur : photons, phéromones, Ca^{2+} , substances odorantes et gustatives...

En se basant sur la nature de leurs ligands et sur les similarités de leurs séquences protéiques, les RCPG exprimés chez les mammifères ont été classés en 3 familles A, B et C (**Figure 4**) dont les membres présentent au moins 20% d'homologie dans les régions transmembranaires (Foord et al., 2005). Deux familles ont été ajoutées par la suite, celle des Frizzled/Smoothed, et celle des récepteurs voméronasaux et du goût amer (Vassilatis et al., 2003).

La famille A est de loin la plus nombreuse, avec comme prototype la rhodopsine. Elle contient donc la majorité des RCPG, dont les récepteurs visuels et olfactifs. Ces RCPG reconnaissent le plus souvent des hormones et des neuromédiateurs (ou neuromodulateurs), comme par exemple, les récepteurs des amines biogènes (adrénaline, noradrénaline, dopamine, sérotonine, histamine,...), les récepteurs peptidiques, ceux des hormones protéiques ou encore les récepteurs cannabinoïdes.

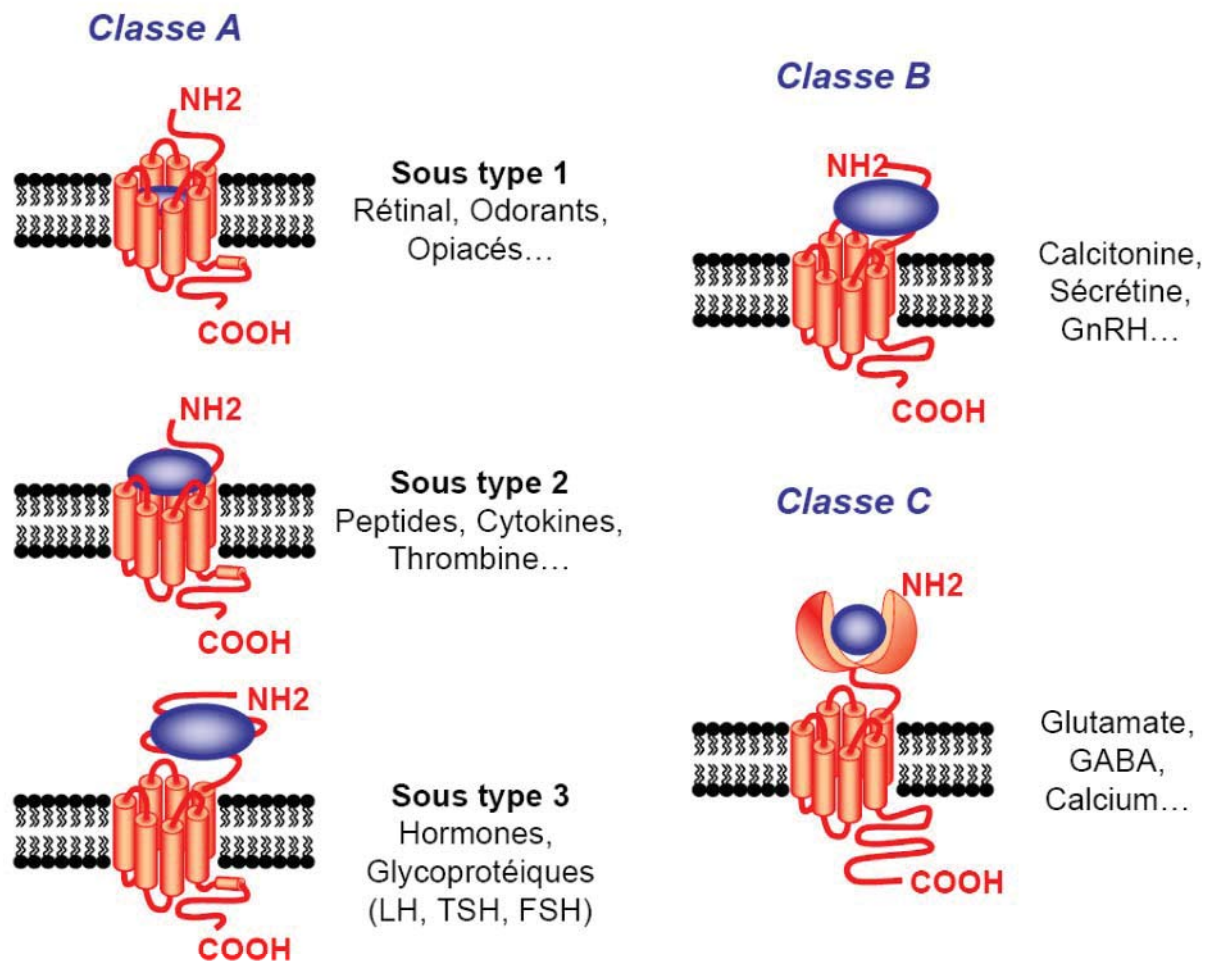


Figure 4 : Les différentes classes de la superfamille des RCPG

Représentation schématique des 3 principales classes de RCPG (A, B et C). Ces récepteurs ont été classés en se basant sur la nature de leurs ligands ainsi que sur la similarité de leurs séquences protéiques (D'après Maurel, 2006).

Par conséquent, cette famille peut être subdivisée en plusieurs sous-familles (**Figure 4**). Etant donné le fort degré de conservation des séquences protéiques des membres de la famille, les acides aminés qui sont systématiquement présents dans ces séquences sont certainement impliqués dans l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle des récepteurs. D'ailleurs, cette famille est caractérisée par une empreinte protéique ou signature, composée d'une vingtaine d'acides aminés (Fredriksson et al., 2003), et répertoriée dans le site Prosite (PS00237). Les sites de liaison des ligands impliquent principalement les domaines transmembranaires ainsi que les boucles extracellulaires. Le RCPG étudié dans cette thèse appartient à cette famille, il s'agit du récepteur 5-HT_{1A} de la sérotonine.

La famille B est plus restreinte, composée de récepteurs ayant pour ligands des hormones peptidiques gastrointestinales (sécrétine, glucagon, ghréline...), la calcitonine, l'hormone parathyroïdienne... Leur structure est caractérisée par une très longue extrémité N-terminale (entre 100 à 500 acides aminés) contenant des cystéines conservées et engagées dans des ponts disulfures. Cette extrémité ainsi que les boucles extracellulaires sont impliquées dans la fixation des différents ligands (**Figure 4**).

La famille C est également plutôt restreinte. C'est la famille des récepteurs métabotropiques du glutamate, du récepteur GABA_B et du récepteur sensible au calcium. Ces récepteurs sont caractérisés par un très grand domaine extracellulaire (environ 600 acides aminés) composé de deux lobes formant une cavité où vient se fixer le ligand et appelé « Venus Fly trap module » (**Figure 4**). Enfin, ils sont souvent retrouvés sous forme d'hétérodimères (Pin et al., 2003).

Il est important de noter que de nombreux récepteurs n'ont été identifiés comme appartenant à la superfamille des RCPG que par leur homologie de séquence avec d'autres membres déjà caractérisés. Ces derniers sont appelés RCPG orphelins car ils n'ont pas de ligand connu. Pour l'anecdote, le premier récepteur orphelin appelé G21, a été identifié chez l'homme par homologie avec le récepteur β_2 -adrénergique et a ensuite été caractérisé comme étant précisément le récepteur 5-HT_{1A} (Kobilka et al., 1987; Fargin et al., 1988).

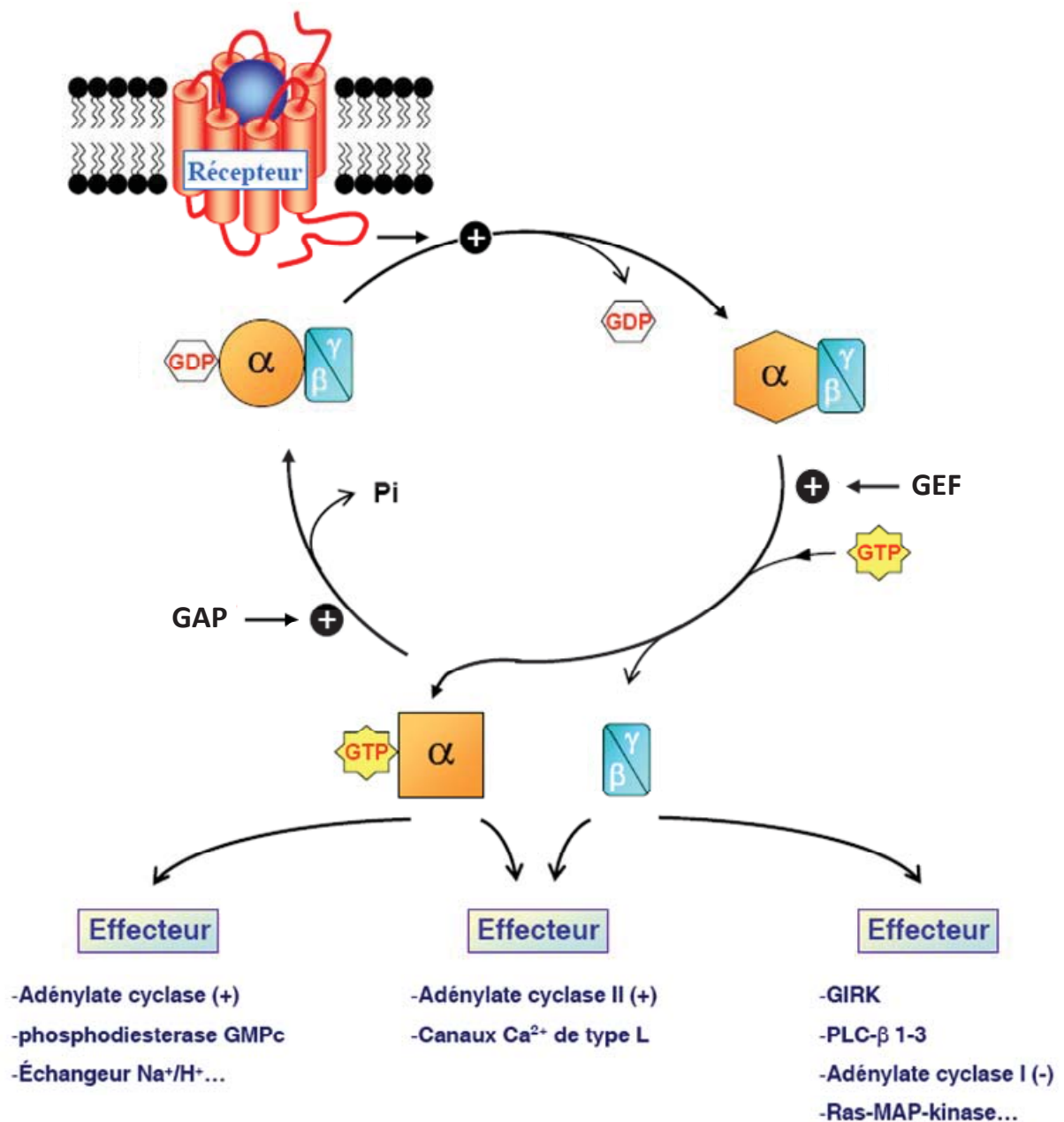


Figure 5 : Activation et signalisation des RCPG

Représentation schématique du cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques. Ce cycle est régulé par les GTPase Activating Proteins (GAP) qui hydrolysent le GTP en GDP ainsi que les Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF) qui remplacent le GDP par le GTP. (D'après Maurel, 2006).

I.5. Activation et signalisation des RCPG

I.5.1. Les voies dépendantes des protéines G

I.5.1.a. Les protéines G

Les protéines G sont appelées ainsi puisqu'elles portent une activité GTPasique, elles hydrolysent le guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Il existe deux grandes classes de protéines G : les protéines G hétérotrimériques qui sont associées aux RCPG et participent à leur signalisation et les petites protéines G monomériques qui seront évoquées plus loin dans ce manuscrit (chapitre III). Comme leur nom l'indique, les protéines G hétérotrimériques sont constituées de 3 sous-unités : α , β et γ , de masses moléculaires respectives $\sim 39-45$, $\sim 35-39$ et $\sim 6-9$ kDa. Ces protéines intracellulaires sont localisées préférentiellement au niveau de la membrane plasmique et forment un complexe tripartite.

I.5.1.b. Le cycle des protéines G, sa régulation et la signalisation en aval

Les protéines G représentent les principaux effecteurs et répondent toutes au même mécanisme d'activation/inactivation permettant ainsi une transduction réversible et spécifique des signaux dans les cellules (Cabrera-Vera et al., 2003). Lorsque la sous-unité α est fixée au GDP au niveau de son domaine GTPase, le complexe $\beta\gamma$ s'associe à cette dernière pour former un hétérotrimère inactif. Selon le modèle classique, la fixation du ligand par le récepteur se traduit par des changements de conformation du récepteur qui va ainsi se coupler à la sous-unité α de la protéine G qui perd son affinité pour le GDP et l'expulse. Ceci permet alors son remplacement par du GTP qui est présent à de très hautes concentrations dans la cellule. Cet échange de nucléotide induit une diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le complexe $\beta\gamma$ (**Figure 5**). Les sous-unités dissociées régulent alors différents effecteurs spécifiques tels les adénylates cyclases (AC), les phospholipases C (PLC) aboutissant à des variations de concentrations en second messagers (AMPc, Ca^{2+} intracellulaire...) qui activent des cascades de signalisation, les canaux ioniques et les Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), les phosphodiesterase (PDE), les GPCR kinases (GRK)...

L'état actif dure jusqu'à l'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α puis enfin les sous-unités α -GDP et $\beta\gamma$ se réassocient ensuite pour reformer une protéine G hétérotrimérique inactive (**Figure 5**).

De plus, le cycle d'activité des protéines G trimériques peut être régulé par d'autres partenaires : les inhibiteurs des protéines G ou GTPase Activating Protein (GAP) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP mais également ses activateurs ou G-protein Exchange Factor (GEF) qui pour leur part favorisent le remplacement du GTP en GDP (**Figure 5**). Citons la famille Regulators of G-protein Signaling (RGS) qui régulent le cycle des protéines G et possèdent également des rôles d'effecteurs et de molécules d'échafaudage dans le complexe Récepteur-Protéine G.

1.5.2. Les voies indépendantes des protéines G

Il a été montré plus récemment que certains effets physiologiques de l'activation des RCPG ne dépendent pas de l'activation de protéines G (Hall et al., 1999 ; Kristiansen, 2004). Il peuvent être régulés par d'autres types de récepteurs tel que les récepteurs à tyrosine-kinase par un mécanisme appelé transactivation (Delcourt et al., 2007). Certaines protéines participant à la régulation de l'activité des RCPG ont également un rôle dans la signalisation. On peut citer l'exemple de l'interaction des RCPG avec les β -arrestines, essentielles pour leur désensibilisation et impliquées dans l'activation des MAPK (Luttrell and Lefkowitz, 2002).

Un autre mécanisme de régulation des RCPG par une voie indépendante des protéines G est la formation d'hétérodimères entre certains RCPG et des protéines appelées Receptor Activity Modifying Proteins (RAMP). Les protéines RAMP facilitent l'export vers la membrane des récepteurs et modifient leurs propriétés de liaison et de signalisation (Hay et al., 2006). De plus, il est important de noter le rôle crucial des protéines d'échafaudage facilitant l'interaction des RCPG avec leurs effecteurs assurant d'une part, l'activation de cascades de signalisation et d'autre part, la localisation subcellulaire appropriée des récepteurs (Bockaert et al., 2004a).

I.6. Les différentes étapes de la vie d'un RCPG

Le fonctionnement d'un RCPG peut être résumé par un schéma simplifié contenant une phase d'activation suivie d'une phase d'inactivation. En effet, le récepteur localisé à la surface cellulaire est tout d'abord stimulé par son ligand (activation), une cascade de réactions est ainsi déclenchée aboutissant à la réponse physiologique de la cellule. Cette réponse est arrêtée grâce à la désensibilisation du récepteur. Celle-ci peut être due à un découplage entre le RCPG et sa protéine G ou bien à son internalisation. Une fois dans la cellule, le récepteur sera soit réutilisé par la cellule et pour cela elle le reconduira à la membrane plasmique (recyclage), soit il sera dégradé par la voie lysosomale ou ubiquitine-protéasome (dégradation). Dans ce dernier cas, la synthèse de RCPG, leur trafic et leur maintien dans leur zone d'activité vont être nécessaires pour la mise en place de nouveaux RCPG fonctionnels (Figure 6).

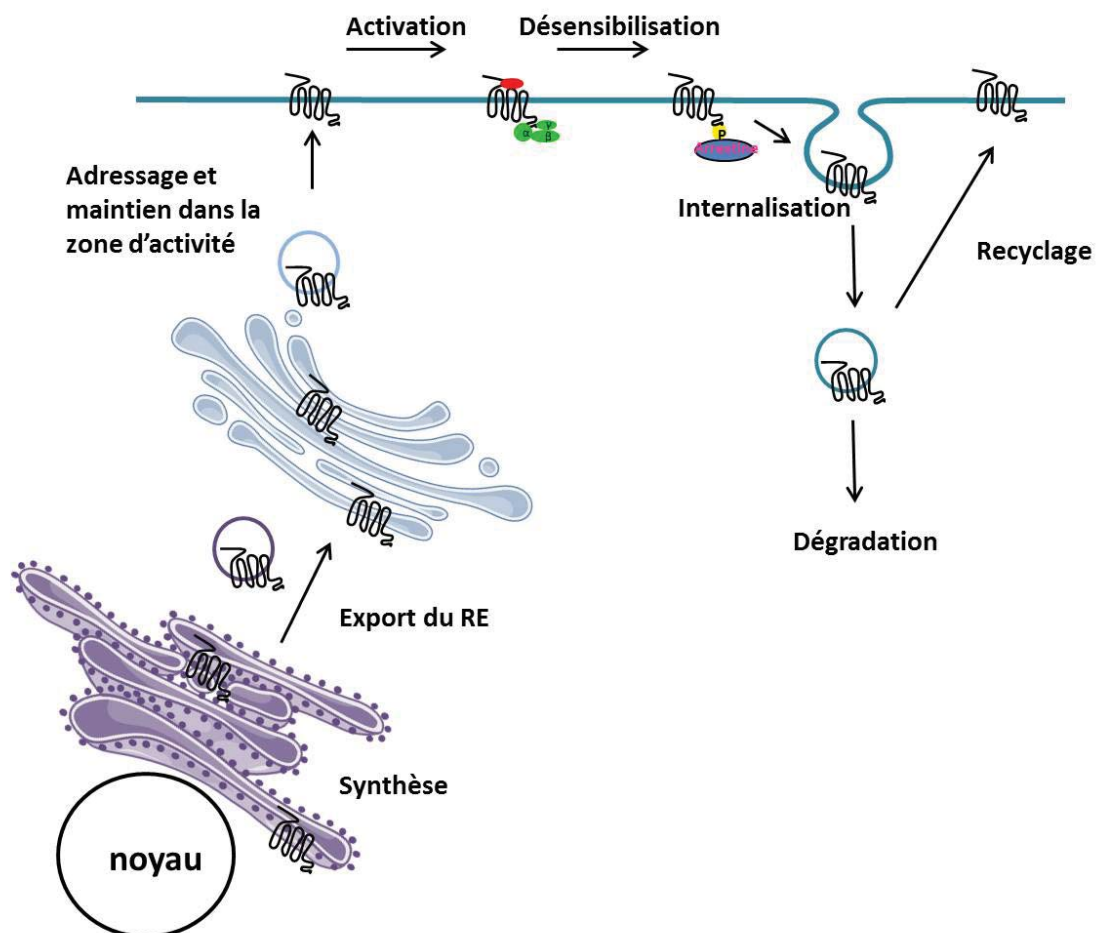


Figure 6 : Les différentes étapes du cycle de vie des RCPG

Représentation schématique des différents niveaux de régulation du fonctionnement des RCPG.

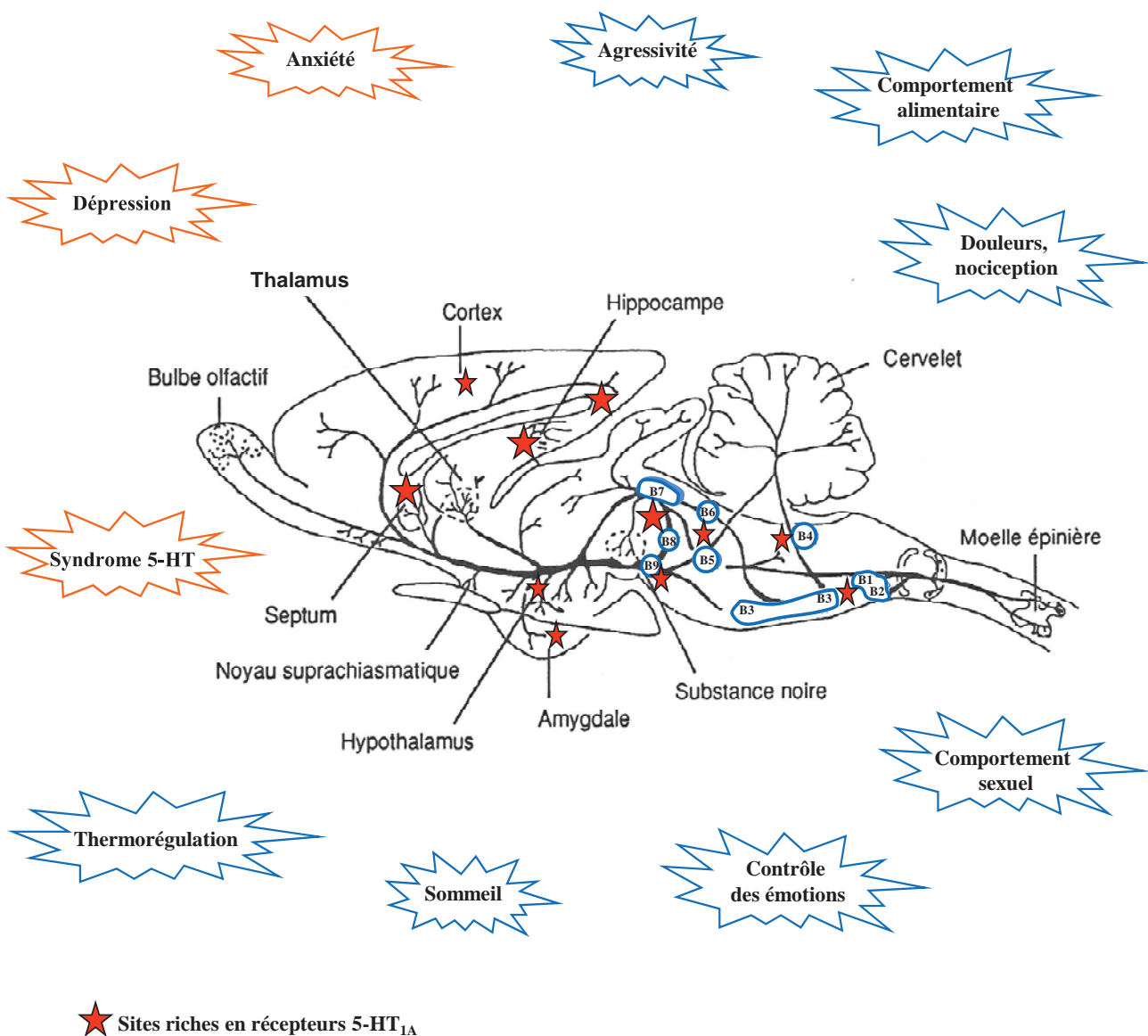


Figure 7 : Représentation anatomique schématique et implications physiologiques et physiopathologiques des voies sérotoninergiques dans le SNC

Les noyaux du raphé contenant les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont indiqués en bleu. Ces groupes de cellules riches en 5-HT sont numérotés de B1 à B9 selon l'axe caudo-rostral (Dahlstrom and Fuxe, 1964). Le système 5-HT, notamment au travers de ses récepteurs 5-HT_{1A}, est associé aux diverses fonctions physiologiques et pathologies indiquées sur la figure. Les sites riches en récepteurs 5-HT_{1A} sont indiqués par une étoile rouge.

II. L'adressage dendritique du récepteur sérotoninergique 5-HT_{1A}

II.1. *Le système sérotoninergique*

II.1.1. *Présentation de la sérotonine*

La sérotonine est une indolamine appelée aussi 5-hydroxytryptamine (5-HT), dérivée du tryptophane, qui joue un rôle crucial chez la plupart des êtres vivants (Adayev et al., 2005) y compris les plantes (Ramakrishna et al., 2011). Elle a d'abord été définie comme étant le facteur libéré par les plaquettes sanguines, qui entraîne une vasoconstriction locale (Rapport et al., 1948). La 5-HT a aussi été appelée « entéramine » parce qu'elle est responsable de la contraction de muscles lisses au niveau gastro-entérique (Erspamer and Asero, 1952) et a ensuite été identifiée dans le système nerveux central (Twarog and Page, 1953). Son appartenance à la famille des neurotransmetteurs centraux a été proposée au vu de sa distribution hétérogène dans le cerveau (Amin et al., 1954; Brodie and Shore, 1957).

II.1.2. *Implications physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine*

La 5-HT est une hormone impliquée dans différentes fonctions de nombreux tissus périphériques tels que le système cardiovasculaire, le foie, les poumons, la glande surrénale...mais elle est également un neurotransmetteur majeur du système nerveux central ayant un rôle dans de très nombreuses fonctions physiologiques et comportementales incluant le sommeil, la prise alimentaire, la douleur, la régulation de l'humeur et les fonctions cognitives (**Figure 7**).

Un dysfonctionnement du système sérotoninergique est associé à de nombreuses pathologies notamment des maladies psychiatriques qui touchent de plus en plus la population générale telles que la dépression (Delgado et al., 1990), l'anxiété (Thiebot, 1986) mais également la conduite suicidaire ainsi que les troubles obsessionnels compulsifs (Meltzer and Arora, 1986).

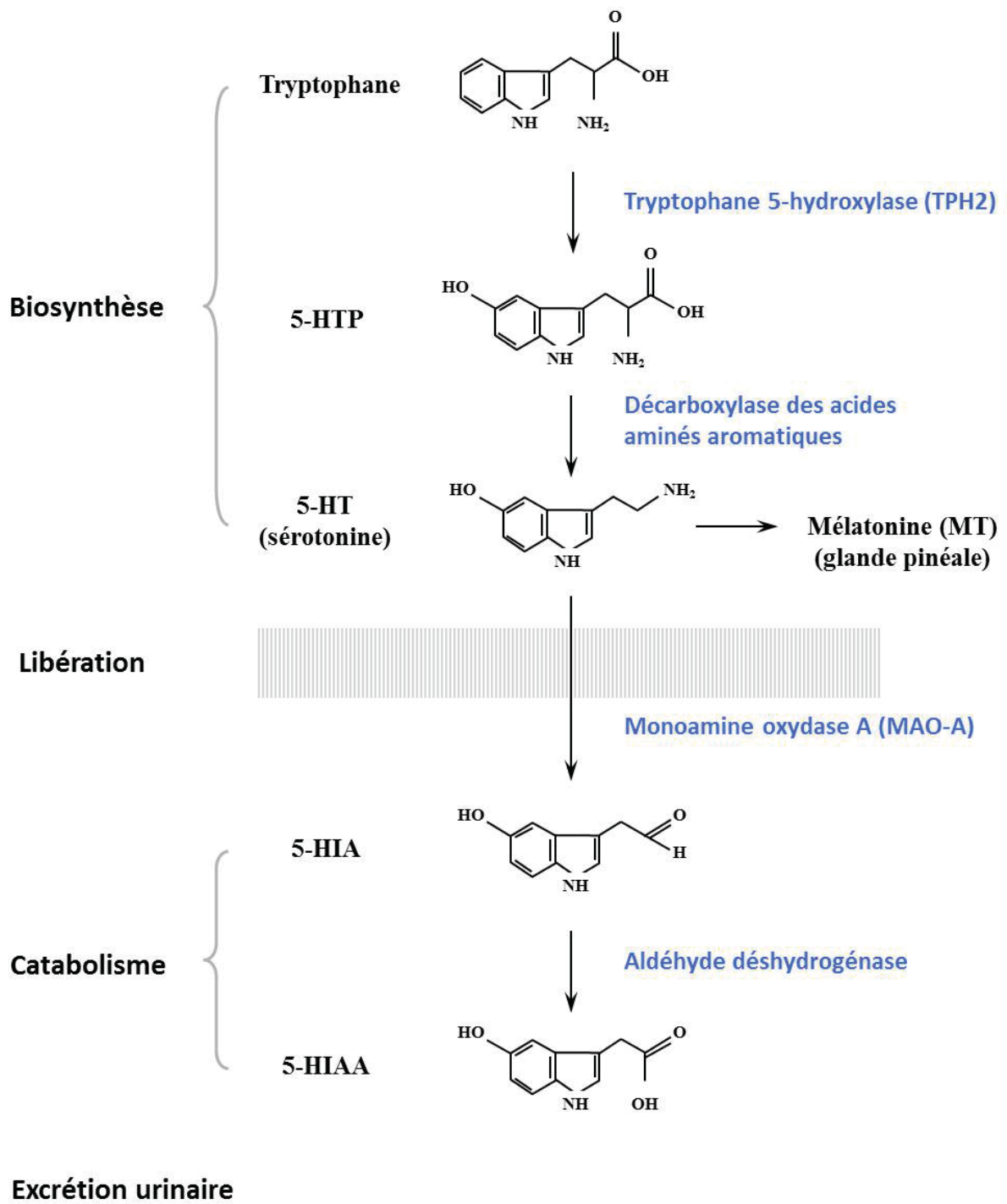


Figure 8 : Métabolisme de la sérotonine

De nombreux médicaments utilisés en psychiatrie ciblent le système sérotoninergique notamment les antidépresseurs et les anxiolytiques, qui modulent la recapture ou la dégradation de la 5-HT dans le but d'augmenter sa concentration extracellulaire et ainsi faciliter la neurotransmission sérotoninergique.

Enfin, l'intervention de la sérotonine dans un si grand nombre de fonctions physiologiques est expliquée par l'innervation de l'ensemble du SNC par les projections sérotoninergiques mais aussi par la présence de nombreux récepteurs de la 5-HT.

II.1.3. Métabolisme de la sérotonine

Dans le système nerveux central, la 5-HT est synthétisée exclusivement par les neurones sérotoninergiques à partir d'un acide aminé essentiel, le L-tryptophane (**Figure 8**). Celui-ci est transporté du sang au système nerveux central à travers la barrière hémato-encéphalique. Dans le cytoplasme des neurones sérotoninergiques, la synthèse de 5-HT requiert une cascade de réactions enzymatiques dont l'étape limitante est l'hydroxylation du L-tryptophane en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase 2 (TPH2), enzyme spécifique des neurones sérotoninergiques (Cote et al., 2003). Il est important de noter que la TPH1 est quant à elle exprimée dans la glande pinéale et les cellules entérochromaffines de l'intestin où elle catalyse cette même réaction limitante d'hydroxylation du précurseur (Darmon et al., 1988; Cote et al., 2003).

La 5-HT synthétisée peut être captée et stockée dans des vésicules de sécrétion par un système de transport antiport proton/5-HT commun aux monoamines, assuré par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT). On recense actuellement deux transporteurs vésiculaires des monoamines, VMAT1 et VMAT2, ce dernier étant majoritaire dans le SNC des mammifères à l'âge adulte (Erickson et al., 1992).

Cette neuroamine peut ensuite être libérée par exocytose en réponse à l'arrivée de potentiels d'action au niveau des terminaisons sérotoninergiques. Une libération de 5-HT peut également intervenir au niveau des corps cellulaires et des dendrites des neurones sérotoninergiques, par un mécanisme encore mal connu qui semble ne dépendre que partiellement du niveau d'activité de ces neurones (Osborne and Hamon, 1988).

L'action de la 5-HT libérée dans l'espace extracellulaire sur les récepteurs sérotoninergiques pré- et post-synaptiques est limitée dans le temps et en intensité par deux mécanismes d'inactivation. Le premier est la recapture de la 5-HT libérée par les neurones

sérotoninergiques eux-mêmes par une protéine spécifique, le transporteur plasmique de la 5-HT ou 5-HTT. Ce transport peut être inhibé notamment par les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et certains antidépresseurs tricycliques (ATC). Le second mécanisme est la dégradation de la 5-HT par la monoamine oxydase A (MAO-A) localisée dans la membrane externe des mitochondries des astrocytes et des neurones non-sérotoninergiques. Les neurones sérotoninergiques expriment quant à eux une autre enzyme, la MAO-B, qui a une faible affinité pour la 5-HT et l'utilise donc très peu comme substrat.

La désamination oxydative de la 5-HT par la MAO-A conduit à la formation du 5-hydroxyindole-acétaldéhyde ou 5-HIA (Feldam and Quenzer, 1984). Cet aldéhyde subit une oxydation additionnelle par une aldéhyde-déshydrogénase pour former l'acide 5-hydroxyindole-acétique (5-HIAA), principal métabolite de la 5-HT (**Figure 8**). La teneur en 5-HIAA dans les tissus cérébraux et le liquide céphalorachidien révèle indirectement l'activité sérotoninergique, c'est-à-dire de la libération et de l'utilisation de la 5-HT (ou "turn over").

II.1.4. Distribution centrale des neurones sérotoninergiques

La cartographie des voies sérotoninergiques a d'abord été établie par histochimie de fluorescence (Dahlstroem and Fuxe, 1964) puis par autoradiographie de la [³H]5-HT préalablement captée (Calas et al., 1974; Descarries et al., 1990) Finalement, le marquage avec des anticorps dirigés contre la 5-HT elle-même a permis d'établir la carte précise de l'innervation sérotoninergique centrale (Steinbusch and Nieuwenhuys, 1981).

Les neurones sérotoninergiques sont rassemblés en 9 amas cellulaires, les noyaux du raphé numérotés de B1 à B9 (Dahlstroem and Fuxe, 1964) situés dans le tronc cérébral (**Figure 7**). Ils peuvent être divisés en deux groupes : les noyaux antérieurs du raphé dont les efférences se projettent vers les parties antérieures du cerveau et les noyaux plus postérieurs situés au niveau du bulbe et dont les projections sont en majorité spinales.

Le système de projection ascendant, formé principalement par les axones des corps cellulaires situés dans les noyaux dorsal et médian du raphé, représente la seule source de 5-HT dans les régions antérieures du cerveau. D'autres structures cérébrales hébergent des amas de neurones dont le corps cellulaire est riche en 5-HT, cependant, certains de ces neurones ne seraient pas capables d'en synthétiser, et l'amine intracellulaire révélerait uniquement leur capacité à l'accumuler, sans doute via sa recapture par son transporteur, le 5HTT (Frankfurt and Azmitia, 1983).

II.2. Les récepteurs de la sérotonine

L'identification des récepteurs sérotoninergiques est une histoire à épisodes comportant la mise en évidence de plusieurs sous-groupes et l'établissement de classifications successives. L'essentiel des connaissances provient des études pharmacologiques basées sur les mesures de liaison membranaire de ligands radioactifs spécifiques. Plus récemment, l'application des techniques de la biologie moléculaire a permis le clonage et le séquençage des ADN complémentaires des ARN messagers codant les protéines réceptrices (Baez et al., 1995).

Aujourd'hui, on admet l'existence d'au moins 15 récepteurs distincts répartis en sept classes : 5-HT₁ à 5-HT₇ (Boess and Martin, 1994; Barnes and Sharp, 1999). Tous ces récepteurs, à l'exception du récepteur 5-HT₃, appartiennent à la superfamille des RCPG.

Les récepteurs de la famille 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F) et probablement 5-HT_{5A} sont couplés négativement à l'adénylate cyclase et leur stimulation entraîne une diminution de la production d'AMPc dans les cellules. Par contre, les récepteurs 5-HT_{4,6,7} sont couplés positivement à l'adénylate cyclase. Les récepteurs 5-HT_{1A} régulent par ailleurs l'ouverture de canaux calciques et potassiques et la stimulation des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₇ dans les neurones de l'hippocampe provoque l'activation des protéines G monomériques Rho1 et Cdc42. Les récepteurs 5-HT₂ interagissent quant à eux positivement avec les phospholipases C, D et A2.

Le récepteur 5-HT₃ est un récepteur-canal ionique composé (chez les rongeurs) des sous-unités 5-HT_{3A} et 5-HT_{3B} (Maricq et al., 1991; Davies et al., 1999). Stimulé par la 5-HT, ce récepteur ionotrope transmet une information excitatrice en provoquant une entrée de Na⁺ dans la cellule et une dépolarisation membranaire.

L'état actuel des connaissances est sujet à modifications. En effet, certains récepteurs sérotoninergiques sont mal caractérisés. De plus, des variants issus d'épissages alternatifs ou de processus d'édition des transcrits primaires ont été caractérisés dans le cas des récepteurs 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇.

Mon travail de thèse ayant exclusivement porté sur les récepteur 5-HT_{1A}, seules les données relatives à ce récepteur seront détaillées ici.

Extracellulaire

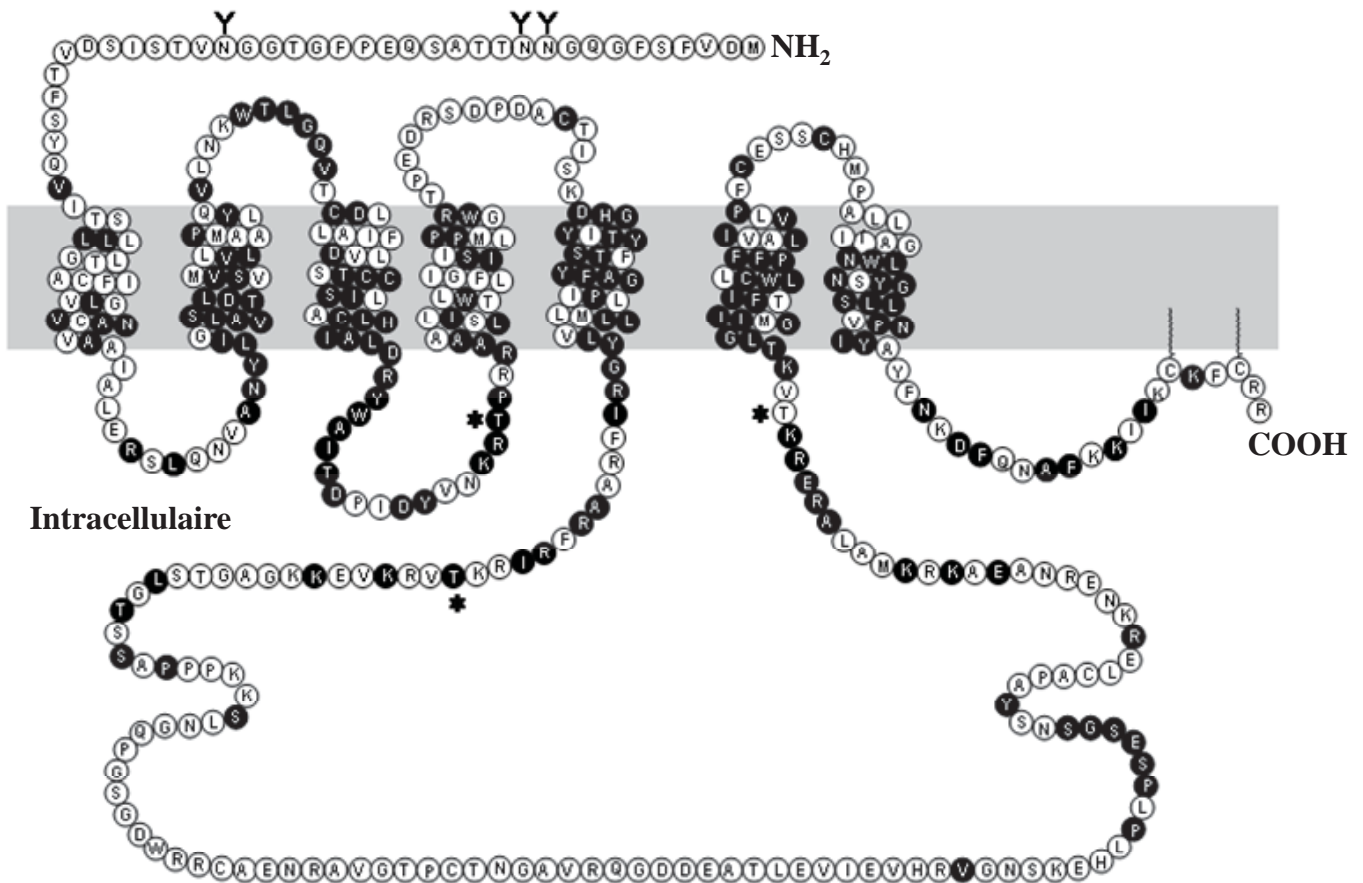


Figure 9 : Structure du récepteur 5-HT_{1A} de rat

Les acides aminés communs avec le récepteur 5-HT_{1B} sont représentés en noir. Les sites potentiels de N-glycosylation sont représentés par des Y et les sites potentiels de phosphorylation sont marqués par des étoiles. Les cystéines palmitoylées sont ancrées à la membrane plasmique par un groupement palmitate (D'après Albert et al., 1990).

II.3. Le récepteur 5-HT_{1A}

II.3.1. Généralités sur le récepteur 5-HT_{1A}

II.3.1.a. Structure et caractéristiques biochimiques du récepteur 5-HT_{1A}

Les gènes des récepteurs de la 5-HT ont été le plus souvent clonés en se basant sur l'homologie des séquences transmembranaires existant dans la superfamille des RCPG. Le premier gène à avoir été ainsi cloné est celui du récepteur 5-HT_{1A} humain. Kobilka *et al.* (1987) ont isolé un gène dépourvu d'intron appelé alors G21 en criblant une banque génomique humaine avec une sonde β_2 -adrénergique. Ce gène sera identifié un an plus tard comme étant le gène codant le récepteur 5-HT_{1A} (Fargin *et al.*, 1988). Par une stratégie similaire, Albert *et al.* ont ensuite cloné le récepteur 5-HT_{1A} de rat qui possède une forte homologie, soit 89%, avec le récepteur humain.

Ce récepteur est une protéine comprenant 422 acides aminés (**Figure 9**), soit un poids moléculaire théorique de 46 kDa pour la protéine de rat (Albert *et al.*, 1990). La partie N-terminale extracellulaire contient 3 asparagines glycosylées, expliquant un poids moléculaire de 63 kDa estimé par des études biochimiques (El Mestikawy *et al.*, 1989). Le récepteur 5-HT_{1A} possède les caractéristiques des récepteurs couplés à une protéine G inhibitrice (G_i ou G_o), c'est à dire une troisième boucle intracellulaire longue (128 acides aminés) et une très courte extrémité C-terminale (18 acides aminés). Cette dernière contient deux cystéines palmitoylées, permettant un ancrage supplémentaire du récepteur dans la membrane plasmique (Papoucheva *et al.*, 2004). Enfin, des sites consensus de phosphorylation (groupements hydroxyles des résidus sérine, thréonine et tyrosine) par la protéine kinase C (PKC) ont été identifiés dans les boucles I2 et I3 et participeraient à la désensibilisation du récepteur (Raymond, 1991).

Des anticorps spécifiques du 5-HT_{1A}R ont été développés soit à partir d'une protéine de fusion dont la partie antigénique est constituée de la totalité de la boucle I3 (Gérard *et al.*, 1994), soit à partir d'un peptide synthétique de 26 acides aminés correspondant à une portion très sélective de cette boucle (El Mestikawy *et al.*, 1990). Cette dernière approche a permis d'obtenir des anticorps dont l'utilisation en immunoradiographie a confirmé les données obtenues avec l'agoniste [³H]8-OH-DPAT chez le rat (Riad *et al.*, 1991).

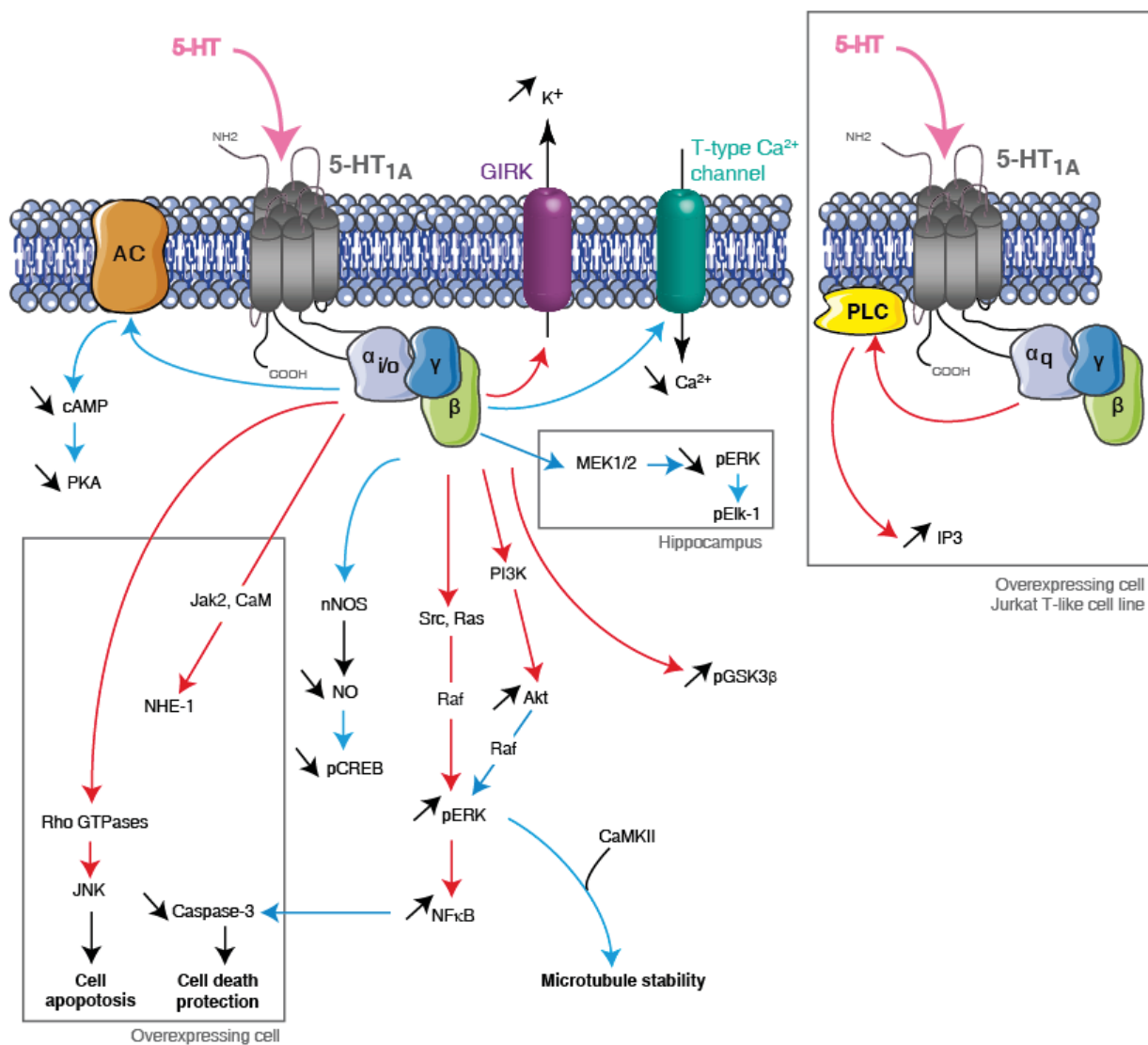


Figure 10 : Voies de signalisation régulées par la stimulation du récepteur 5-HT_{1A}

Le récepteur 5-HT_{1A} est couplé négativement à l'adénylate cyclase. Son activation diminue la libération de la sérotonine dans les neurones par hyperpolarisation due à une modification de la conductance des canaux ioniques, augmentation des canaux potassiques et diminution des canaux calciques. La stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} régule la voie phospho-ERK mais également d'autres voies connues telles que AKT. Les régulations inhibitrices sont représentées par des flèches bleues et les activatrices une inhibition en rouge (D'après Masson et al., 2011).

Ces anticorps sont également utilisables pour le marquage immunocytochimique à l'échelle ultrastructurale des récepteurs 5-HT_{1A} (Langlois et al., 1996; Darmon et al., 1998; Jolimay et al., 2000).

II.3.1.b. Pharmacologie du récepteur 5-HT_{1A}

Comme l'ensemble des récepteurs appartenant à la famille 5-HT₁, le récepteur 5-HT_{1A} possède une forte affinité pour son ligand endogène, la 5-HT (K_i= 1,7 nM chez le rat).

Parmi les récepteurs de la 5-HT, le type 5-HT_{1A} reste le plus étudié depuis le développement d'un agoniste sélectif, le 8-OH-DPAT (Hjorth et al., 1982), et de son dérivé tritié (Gozlan et al., 1983). Le 8-OH-DPAT est l'agoniste de choix bien qu'il possède une affinité non négligeable pour les récepteurs 5-HT₇. A l'heure actuelle, de nombreux autres composés possédant des propriétés agonistes vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} sont disponibles, en particulier, les azapirones comme la buspirone et l'ipsapirone (agonistes partiels), qui possèdent des propriétés antidépressives et anxiolytiques (Traber and Glaser, 1987).

En revanche, relativement peu d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} ont été développés et la majorité d'entre eux présentent une faible sélectivité. C'est le cas du (-) pindolol, du (-) propranolol et du (-) tertatolol qui possèdent également des propriétés antagonistes vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1B} et des récepteurs β-adrénrgiques (Sprouse and Aghajanian, 1986; Adrien et al., 1989; Prisco et al., 1993; Jolas et al., 1994). Toutefois, quelques molécules telles que le WAY 100635 et son analogue halogéné, le p-MPPI, sont des antagonistes à haute affinité et de bonne spécificité pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Le radiomarquage de ces composés a d'ailleurs conduit à la synthèse de radioligands utilisés aujourd'hui pour la visualisation et la quantification des récepteurs 5-HT_{1A} cérébraux *in vivo* par tomographie d'émission de positons chez l'animal (Riad et al., 2004; Aznavour et al., 2006b; Aznavour et al., 2006a) mais aussi chez l'homme (Derry et al., 2006).

II.3.1.c. Couplages fonctionnels du récepteur 5-HT_{1A}

Le récepteur 5-HT_{1A} est un récepteur couplé aux protéines G de type G_i/G_o, en effet, les différentes voies de signalisation activées par la stimulation de ce récepteur (**Figure 10**) sont sensibles à la toxine pertussique (Raymond et al., 1993; Mannoury la Cour et al., 2006).

De plus, ce récepteur est couplé négativement à son effecteur principal, l'adénylate cyclase. Sa stimulation induit donc une diminution de la synthèse d'AMPc (De Vivo and Maayani, 1986; Weiss et al., 1986).

Par ailleurs, les récepteurs 5-HT_{1A} régulent l'activité de canaux ioniques potassiques et calciques (Andrade et al., 1986; Penington and Kelly, 1990). Cette activité est indépendante de l'adénylate cyclase mais fait également intervenir les protéines G_i/G_o (Clarke et al., 1987; Innis and Aghajanian, 1987). En particulier, la stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} entraîne l'ouverture de canaux potassiques de type GIRK (G-protein-gated inwardly rectifying K⁺) qui se traduit par une hyperpolarisation et par l'inhibition de la décharge électrique des neurones (Sprouse and Aghajanian, 1987; Innis et al., 1988). Cette voie fait intervenir une interaction directe entre le canal ionique et la sous-unité βγ de la protéine G_o (Oleskevich, 1995).

Dans certaines lignées cellulaires transfectées, le récepteur 5-HT_{1A} peut également activer, via une protéine-G, la phospholipase C (Fargin et al., 1989; Liu and Albert, 1991) et les protéines ERK 1 et 2 (Garnovskaya et al., 1996; Cloez-Tayarani et al., 2004), mais également la voie AKT (Hsiung et al., 2005) y compris dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat (Cowen et al., 2005). Enfin, des études montrent l'activation de la voie ERK dans les neurones du SNC chez le rat, plus précisément dans l'hypothalamus suite à la stimulation du récepteur natif par son agoniste (Sullivan et al., 2005; Crane et al., 2007).

II.3.1.d. Distribution anatomique du récepteur 5-HT_{1A}

La distribution des récepteurs 5-HT_{1A} dans le SNC (**Figure 7**) a d'abord été établie par autoradiographie quantitative avec divers radioligands, en particulier le [³H]8-OH-DPAT (Marcinkiewicz et al., 1984), l'[*³H]ipsapirone (Glaser and Traber, 1985), la [³H]buspirone (Brüning et al., 1989) et le [³H]WAY-100635 (Gozlan et al., 1995). Quel que soit le ligand utilisé, on trouve une forte concentration de récepteurs 5-HT_{1A} dans les structures limbiques comme l'hippocampe (région CA1 et gyrus dentatus), le septum latéral, l'amygdale, le cortex frontal et entorhinal, qui jouent un rôle clé dans le contrôle de l'humeur et des émotions. Une forte densité de récepteurs 5-HT_{1A} est également visualisée dans les noyaux antérieurs (dorsal et médian) du raphé, où sont localisés les corps cellulaires des neurones à l'origine de l'innervation sérotoninergique centrale.

Des sites de liaison sont également présents dans le cortex cérébral, le tronc cérébral (région ventro-latérale du bulbe) et les couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière.

Des études d'hybridation *in situ* ont montré que l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{1A} est présent dans les mêmes régions qui contiennent le récepteur lui-même repéré par la liaison de radioligands spécifiques (Chalmers and Watson, 1991; Miquel et al., 1991; Pompeiano et al., 1992), suggérant qu'il reste localisé dans des compartiments proches de son lieu de synthèse.

Des études impliquant soit la lésion sélective des neurones sérotoninergiques suite à l'administration intracérébrale de la 5,7-DHT (Vergé et al., 1986), soit un double marquage immunocytochimique à l'aide d'anticorps anti-5-HT_{1A} et anti-5-HT (Sotelo et al., 1990), ont montré que les récepteurs 5-HT_{1A} sont situés à la surface des somas et des dendrites des neurones sérotoninergiques dans les noyaux antérieurs du raphé. Ces autorécepteurs participent au contrôle de l'activité électrique et métabolique des neurones sérotoninergiques.

L'utilisation des anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur 5-HT_{1A} (El Mestikawy et al., 1990) a confirmé en microscopie électronique la présence du récepteur sur les corps cellulaires et les dendrites des neurones, qu'ils soient sérotoninergiques ou non, dans toutes les structures cérébrales étudiées (Kia et al., 1996; Riad et al., 2000a).

II.3.2. Rôle fonctionnel du récepteur 5-HT_{1A} dans le traitement de la dépression

La stimulation des autorécepteurs 5-HT_{1A} du noyau du raphé dorsal (NRD) exerce un frein sur la neurotransmission sérotoninergique (Sprouse and Aghajanian, 1987), puisqu'elle déclenche une inhibition de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques avec comme conséquence une diminution de la libération de la 5-HT (rétrocontrôle négatif), associée à une réduction de la vitesse de renouvellement (turn-over) de l'indolamine (Hamon et al., 1988; Hjorth and Magnusson, 1988).

Il est par ailleurs clairement établi que les récepteurs 5-HT_{1A} sont impliqués dans les pathologies liées aux troubles de l'humeur, telles que la dépression et l'anxiété. L'administration d'agonistes par voie systémique produit à la fois des effets anxiolytiques et antidépresseurs aussi bien chez l'homme que dans des modèles appropriés chez l'animal.

Traitement aigu

Traitement chronique

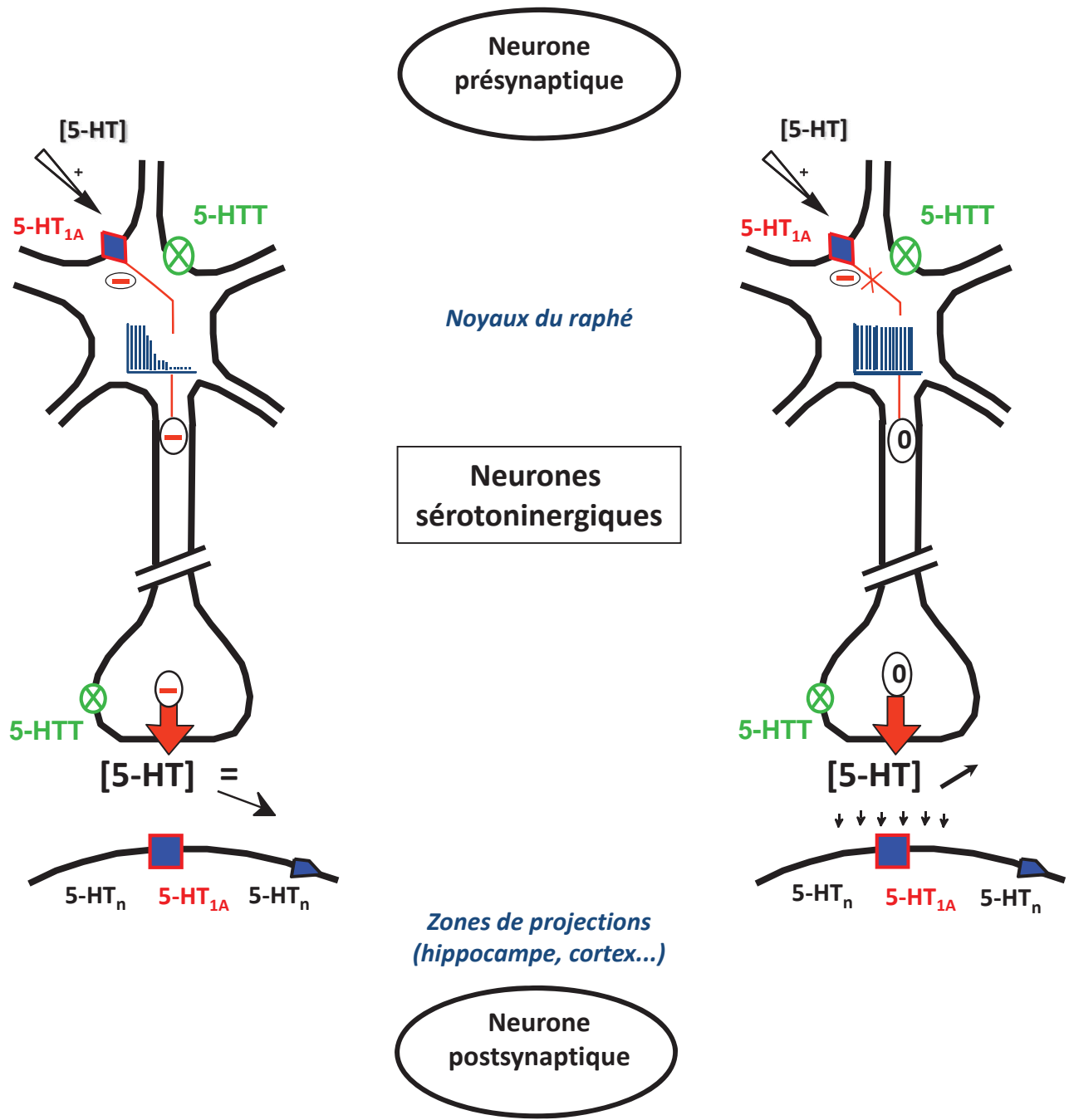


Figure 11 : Rôle de l'autorécepteur 5-HT_{1A} sur la neurotransmission sérotoninergique lors d'un traitement aigu ou chronique par des inhibiteurs sélectifs de la sérotonine

(D'après, Lanfumey and Hamon, 2006)

II.3.2.a. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)

Le chef de file de la famille des ISRS est la fluoxétine et par la suite, d'autres molécules ont été synthétisées : la paroxétine, la sertraline, le citalopram... (Fabre and Hamon, 2003). Ils ont tous une activité antidépressive et leur mécanisme d'action repose sur le blocage sélectif de la recapture de la 5-HT, via le blocage du transporteur de la 5-HT (5-HTT) (Hoffman et al., 1991).

Effet d'un traitement aigu

L'administration aiguë d'ISRS a pour conséquence une augmentation du taux de 5-HT extracellulaire au niveau du NRD, alors qu'il reste inchangé au niveau des aires de projection des neurones sérotoninergiques (Adell and Artigas, 1991). Ces données confirment le rétrocontrôle inhibiteur exercé par les autorécepteurs 5-HT_{1A} sur la décharge neuronale, démontré par des données électrophysiologiques. En effet, le blocage du transporteur au niveau du NRD induit une augmentation du taux de 5-HT extracellulaire conduisant à une activation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A}. Cette activation entraîne alors une diminution de la libération de 5-HT dans les aires de projection, qui compense l'élévation du taux extracellulaire normalement due au blocage du transporteur. Il en résulte un taux inchangé de 5-HT extracellulaire en post-synaptique (**Figure 11**).

Effet d'un traitement chronique

Lors d'un traitement chronique par un ISRS (21 à 28 jours), les taux extracellulaires de 5-HT augmentent à la fois au niveau du NRD et dans ses zones de projection (Bel and Artigas, 1993). Des enregistrements électrophysiologiques des neurones sérotoninergiques du NRD effectués après un traitement chronique par un ISRS ont mis en évidence une diminution de l'efficacité des agonistes 5-HT_{1A} à inhiber l'activité électrique de ces neurones (Le Poul et al., 1995). Ces résultats traduisent la survenue d'une désensibilisation fonctionnelle de l'autorécepteur 5-HT_{1A} du NRD, en réponse à leur stimulation prolongée par la 5-HT endogène non recaptée lors du traitement par l'ISRS. Ce mécanisme d'action explique en partie la latence de l'effet clinique antidépresseur qui n'est effectif qu'après 3 à 4 semaines de traitement, période où les tentatives de suicides chez les patients sévèrement atteints sont fortement augmentées (**Figure 11**).

II.3.3. Adressage somato-dendritique du récepteur 5-HT_{1A}

La fonction des récepteurs étant directement liée à leur localisation dans leur zone d'activité, comprendre mieux les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} vers la membrane plasmique du soma et des dendrites pourrait nous amener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la dépression et/ou de l'anxiété.

II.3.3.a. Adressage différentiel in vivo des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}

Contrairement aux observations rapportées dans le cas du récepteur 5-HT_{1A}, la distribution régionale du récepteur 5-HT_{1B} chez le rat et la souris n'est pas superposable à celle de son ARN messenger. Ainsi, l'ARN messenger du récepteur 5-HT_{1B} est présent dans le NRD, alors que cette structure ne contient pas de récepteurs (Doucet et al., 1995). A l'inverse, une forte densité de récepteurs 5-HT_{1B} est trouvée dans la substance noire alors que son transcrit y est absent. Ces données confortent des résultats antérieurs suggérant que les récepteurs 5-HT_{1B} migrent à partir des somas où ils sont synthétisés vers les terminaisons axonales où ils jouent le rôle d'autorécepteurs ou d'hétérorécepteurs (Jolimay et al., 2000). Enfin, en microscopie électronique, le marquage des récepteurs 5-HT_{1B} avec des anticorps spécifiques est bien confiné aux fibres et terminaisons axonales dans toutes les structures cérébrales étudiées (Sari et al., 1997; Riad et al., 2000b).

En conclusion, même si les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} peuvent être exprimés dans les mêmes neurones, par exemple dans le raphé, ils présentent une localisation différente dans la membrane plasmique qui est à l'origine de leur mécanisme d'action respectif. Ainsi, les récepteurs 5-HT_{1A} sont en effet somato-dendritiques alors que les récepteurs 5-HT_{1B} sont situés sur les axones ou les terminaisons. Ceci suggère qu'il existerait dans les séquences de chaque récepteur des signaux responsables de la différence d'adressage.

II.3.3.b. Modèles d'adressage in vitro des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}

L'analyse de cette différence a été réalisée *in vitro* dans deux modèles cellulaires distincts. Les deux récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} ont d'abord été transfectés de façon stable dans la lignée épithéliale LLC-PK1 (Langlois et al., 1996), puis de façon transitoire dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat (Jolimay et al., 2000).

L'utilisation de cellules épithéliales comme modèle d'adressage neuronal est pertinente car des correspondances d'adressage membranaire ont été observées avec les neurones, comme cela avait été suggéré par Dotti et al. (1991). Ces deux types cellulaires appartiennent à la catégorie des cellules polarisées. Les cellules épithéliales sont caractérisées par un pôle apical et un pôle basolatéral séparés par des jonctions serrées qui empêchent la diffusion, entre ces deux domaines, des différents constituants de la membrane. Des expériences d'expression de protéines virales dans des cultures primaires de neurones ont permis d'établir une correspondance entre le domaine apical et les terminaisons axonales d'une part et les domaines basolatéral et somato-dendritique d'autre part (Rodriguez-Boulan and Powell, 1992). Les jonctions serrées pourraient correspondre au segment initial de l'axone qui joue un rôle crucial dans la genèse du potentiel d'action d'une part et dans la sélectivité des éléments adressés spécifiquement dans l'axone d'autre part (Colman, 1999).

Dans les deux modèles cellulaires, une différence d'adressage a été retrouvée entre les récepteurs. Dans les cellules LLC-PK1, le récepteur 5-HT_{1A} est basolatéral alors que le récepteur 5-HT_{1B} est localisé dans l'appareil de Golgi (Darmon et al., 1998). Dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe, le récepteur 5-HT_{1A} est somatodendritique (**Figure 12A**) alors que le récepteur 5-HT_{1B} est axonal (**Figure 12B**). Ces résultats signifient donc que la correspondance d'adressage entre les deux types cellulaires présente des limites, en particulier dans le cas du récepteur 5-HT_{1B} (Jolimay et al., 2000). C'est pourquoi le travail présenté dans ce manuscrit concerne l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} dans le modèle de culture primaire de neurones.

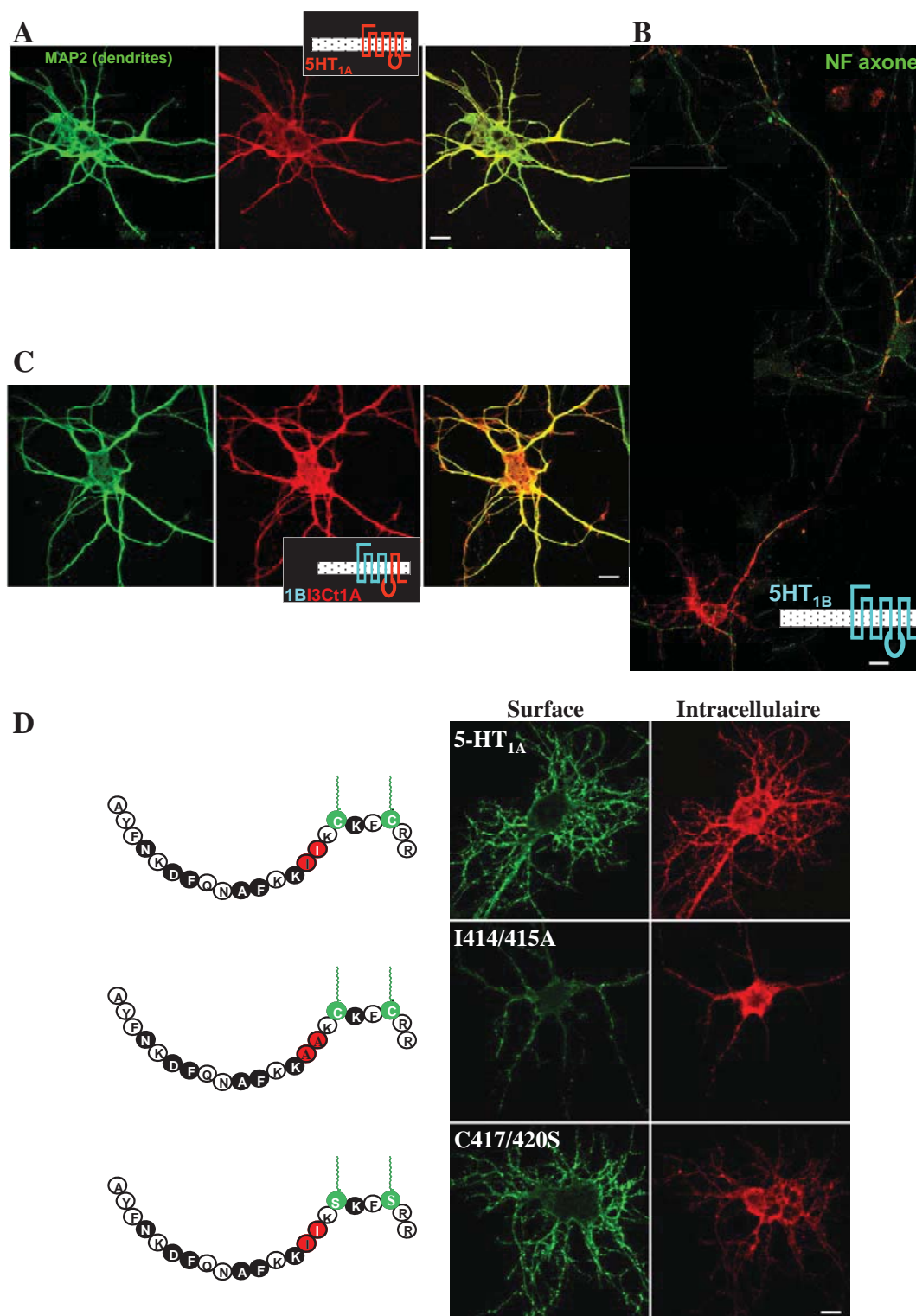


Figure 12 : Mise en évidence du rôle de l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A} dans son adressage vers les dendrites

A- 5-HT_{1A} somatodendritique (MAP2, microtubule-associated-protein 2), **B-** 5-HT_{1B} axonal (NF, Neurofilament), **C-** Etude de la chimère 1B13Ct1A (Jolimay et al., 2000), **D-** Etude des mutants du récepteur 5-HT_{1A} (Carrel et al., 2006).

II.3.3.c. Les régions C-terminales cytosoliques des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont cruciales pour leurs adressages respectifs

Etant donné que les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} présentent une forte homologie de séquence (43% d'identité répartis principalement dans les séquences transmembranaires), l'adressage de récepteurs tronqués ainsi que de protéines chimères a été analysé afin de délimiter les motifs impliqués dans l'adressage.

La délétion de la courte région C-terminale des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} entraîne leur séquestration dans le RE, indiquant que cette région joue un rôle essentiel dans le trafic intracellulaire de ces récepteurs (Jolimay et al., 2000). De plus, la construction de chimères a permis de montrer l'existence d'un message d'adressage dans l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A} (**Figures 12C**). Enfin, un motif dileucine présent dans cette extrémité C-terminale est essentiel pour sa sortie du RE (**Figure 12D**) (Carrel et al., 2006).

Cependant, toutes ces études ne permettaient pas d'expliquer la différence d'adressage des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}.

II.3.3.d. Yif1B, partenaire du récepteur 5-HT_{1A} impliquée dans le trafic vésiculaire

L'équipe de Michèle Darmon a donc recherché des protéines interagissant avec l'extrémité C-terminale de ces récepteurs par la technique du double hybride. C'est ainsi que la protéine Yif1B a été identifiée comme partenaire du récepteur 5-HT_{1A}. Celle-ci n'avait jamais été caractérisée auparavant chez les mammifères, mais son orthologue chez la levure était connu pour jouer un rôle crucial dans la sécrétion et dans le trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi.

Nous nous sommes donc intéressés de plus près au trafic intracellulaire dans les cellules eucaryotes en général mais également dans les neurones qui représentent « le summum de la polarisation cellulaire » (Horton and Ehlers, 2003a).

III. Le trafic vésiculaire intracellulaire

III.1. Les différentes étapes du trafic vésiculaire

III.1.1. Présentation générale du trafic vésiculaire intracellulaire

Le prix Nobel en 1974 a été décerné à Georges Palade et ses collaborateurs pour leurs travaux de microscopie électronique montrant le devenir des protéines nouvellement synthétisées dans les cellules exocrines du pancréas (Caro and Palade, 1964). Comme toutes les protéines, les RCPG sont synthétisés et repliés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). C'est à ce niveau qu'ils acquièrent leur structure à 7 domaines transmembranaires. Les récepteurs correctement repliés sont exportés dans des vésicules vers un compartiment tubulaire situé entre le RE et l'appareil de Golgi appelé ERGIC ou réseau cistogolgien (CGN). Puis, ils sont ensuite entraînés jusqu'à l'appareil de Golgi et traversent le réseau transgolgien (TGN) avant d'être adressés à la membrane plasmique (MP) (**Figure 6**).

Le transport des protéines d'un compartiment à un autre de la cellule est assuré par des vésicules spécifiques. Ces vésicules doivent être formées à partir du compartiment donneur, se détacher et aller vers un compartiment accepteur, ce qui implique différents acteurs qu'on citera dans le chapitre suivant. Par ailleurs, ce transport est bidirectionnel ; en effet on distingue le transport antérograde (aller : RE vers la MP) et le transport rétrograde (retour : MP vers le RE). L'ensemble des mécanismes impliqués dans ce trafic est hautement conservé chez les eucaryotes même s'il est intéressant de noter l'absence d'ERGIC chez les eucaryotes unicellulaires tels que la levure.

De plus, parmi les RCPG, certains ne suivent pas cette voie canonique d'adressage ; il existe des récepteurs qui sont adressés à la membrane nucléaire où ils sont fonctionnels (Vaniotis et al., 2011), d'autres sont déjà actifs dans le RE (Revankar et al., 2005), et enfin certains d'entre eux ont besoin de s'oligomériser dans le RE pour être exportés vers la membrane plasmique (Pin et al., 2009). On ne développera pas ces différents points étant donné que le récepteur 5-HT_{1A} auquel nous nous intéressons dans cette thèse n'est pas concerné par ces exceptions. En revanche, nous détaillerons les étapes successives du trafic intracellulaire permettant l'adressage des protéines de surface.

III.1.2. Le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi

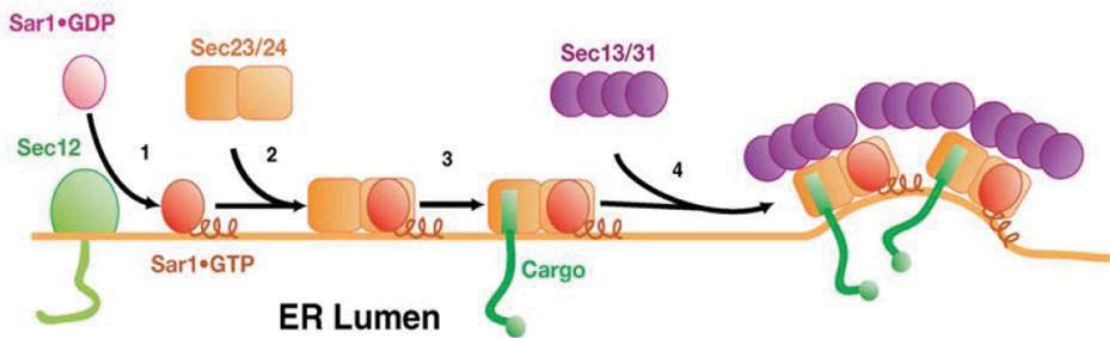
III.1.2.a. Généralités sur le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi

Nous commencerons par introduire le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi qui sont les premiers compartiments impliqués dans le trafic vésiculaire. On distingue deux types de RE, le RE rugueux (RER) comportant au niveau de sa membrane les ribosomes et le RE lisse (REL) qui en est dépourvu. Le RER que nous nommerons RE tout le long de ce mémoire est celui qui nous intéresse puisque qu'il est impliqué dans la synthèse et le repliement des protéines. L'appareil de Golgi est quant à lui composé de trois citernes et c'est à son niveau qu'ont lieu les modifications post-traductionnelles indispensables pour la maturation et la fonctionnalité des protéines.

Le trafic entre ces deux compartiments est caractérisé par sa bidirectionnalité (Lee et al., 2004), le transport antérograde permettant la livraison à l'appareil de Golgi des protéines nouvellement synthétisées dans le RE par les vésicules COPII, et un transport rétrograde qui quant à lui rapporte les protéines matures du cis-Golgi vers le RE. Ce dernier concerne les protéines résidentes du RE ainsi que celles qui cyclent continuellement entre les deux compartiments (Aridor et al., 1995), il est assuré par des vésicules COPI. Nous noterons simplement que le nom de COPI provient du fait que c'est le premier complexe de revêtement vésiculaire à avoir été découvert (avant COPII).

Il est important de noter que les vésicules COPII fusionnent directement avec le Golgi dans les cellules des plantes ainsi que chez la levure, en revanche, dans les cellules de mammifères, ces vésicules fusionnent entre elles pour former une structure intermédiaire pleiomorphe appelée ERGIC ou bien compartiment tubulo-vésiculaire (VTC). Le VTC ou ERGIC est un site majeur de tri des vésicules aussi bien du transport antérograde que du transport rétrograde (Ben-Tekaya et al., 2005; Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006) contribuant aussi au repliement et au contrôle qualité des protéines nouvellement synthétisées (Propsting et al., 2005).

A Transport antérograde : vésicules COPII



B Transport rétrograde : vésicules COPI

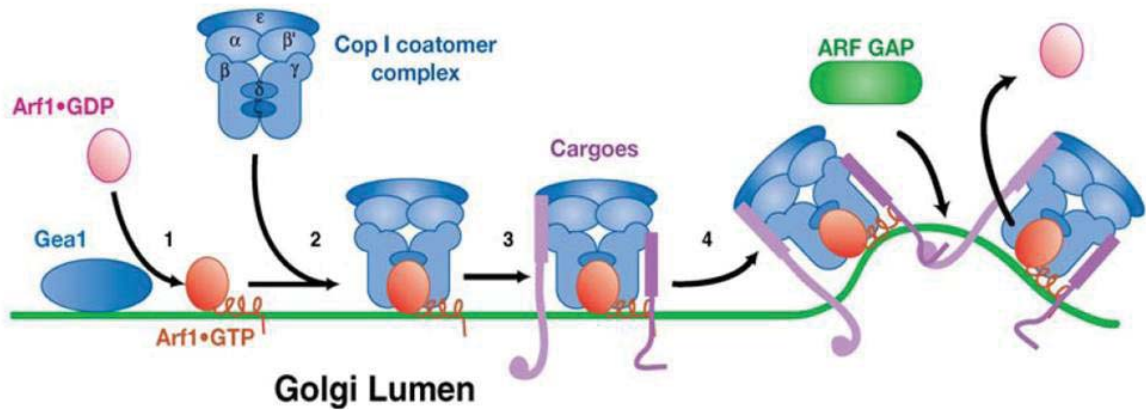


Figure 13 : Les protéines de manteau impliquées dans le trafic vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi

Représentation schématique des différentes étapes de la formation des vésicules (A) COPII et (B) COPI (D'après Lee et al., 2004).

III.1.2.b. Le transport antérograde RE-Golgi

Le transport antérograde est assuré par des vésicules recouvertes d'un complexe de revêtement de nature protéique appelé coat protein complex II (COPII). La formation de ces vésicules a lieu dans des zones spécifiques de la membrane du RE appelées les ERES (ER exit sites) ou RE transitionnel (tRE) et nécessite une cascade de réactions qui commence par l'activation de Sar1, une petite GTPase monomérique. Comme toutes les GTPases elle alterne entre une forme inactive Sar1-GDP cytoplasmique et une forme active Sar1-GTP. Sec12 est un facteur d'échange membranaire qui active Sar1 en échangeant le GDP en GTP. Sar1-GTP est alors ancré à la membrane et recrute l'hétérodimère Sec23/24 qui lui-même interagit avec l'hétérotétramère Sec13/31. La polymérisation de ce complexe est à l'origine de la déformation de la membrane en un bourgeon qui se détache pour devenir une vésicule séquestrant et exportant des protéines synthétisées notamment les RCPG (**Figure 13A**).

III.1.2.c. Le transport rétrograde Golgi-RE

Le transport rétrograde est assuré par des vésicules recouvertes de protéines coat protein complex I (COPI) au niveau des membranes du Golgi dans lesquelles est inséré Arf1 grâce à Gea1, facteur échangeant Arf1-GDP en Arf1-GTP. Ce dernier recrute le complexe COPI composé de 7 sous-unités qui contiennent des motifs de reconnaissance de cargo permettant leur recrutement à la membrane. Enfin, par un mécanisme inconnu les protéines COPI se polymérisent, déformant ainsi la membrane et facilitant le recrutement de la ARF GAP, protéine activant l'activité GTPasique de Arf, conduisant à la dissociation de cette dernière de la membrane du Golgi (**Figure 13B**).

III.1.3. *Le transport intraGolgi*

L'appareil de Golgi assure la glycosylation et la maturation des protéines cargos synthétisées dans le RE, il est un centre de tri des vésicules avant leur transport vers leur destination finale. Cette structure très dynamique est composée de plusieurs citernes pouvant s'auto-organiser grâce aux interactions établies entre différents composants. L'exemple de

l'effet réversible de la brefeldine A sur l'organisation structurale du Golgi illustre bien le caractère dynamique de cet organite. En effet, cette drogue désassemble en quelques minutes les citernes golgiennes en bloquant l'activité de Arf1 (Sciaky et al., 1997), et lorsqu'elle est enlevée du milieu, ce compartiment se réorganise et redevient fonctionnel, ce qui suggère le rôle essentiel de Arf1 dans le maintien de la structure du Golgi.

Les vésicules de transport transitent continuellement entre les différentes citernes golgiennes de façon bidirectionnelle. Ce trafic hautement dynamique doit être parfaitement orchestré. Ainsi, ont été mises en évidence depuis une dizaine d'années, des cordes moléculaires appelées Golgines connectant les citernes golgiennes entre elles, ainsi que les vésicules aux citernes. Ces golgines peuvent être transmembranaires ou associées à d'autres protéines membranaires du trafic. Ce lien physique éviterait la dispersion des vésicules dans le cytosol entre les lieux de bourgeonnement et de fusion (Short et al., 2005).

Enfin, plusieurs modèles sont aujourd'hui proposés pour expliquer le trafic intragolgien (Jackson, 2009) mais nous ne citerons que celui appelé de « compartiments stables » ou de « trafic vésiculaire antérograde » décrit par Palade en 1975 et qui est resté pendant de longues années le seul paradigme favorisé par les scientifiques.

Dans ce modèle, les citernes cis médian et trans Golgi ainsi que le réseau transgolgien (TGN) sont des structures stables retenant les protéines résidentes du Golgi et les cargos sécrétés sont quant à eux transportés par des vésicules COPI dans le sens antérograde d'un compartiment à un autre du Golgi, et sortent du TGN, soit dans des vésicules recouvertes de clathrines (CCV), soit dans d'autres systèmes de sécrétion (Figure 14).

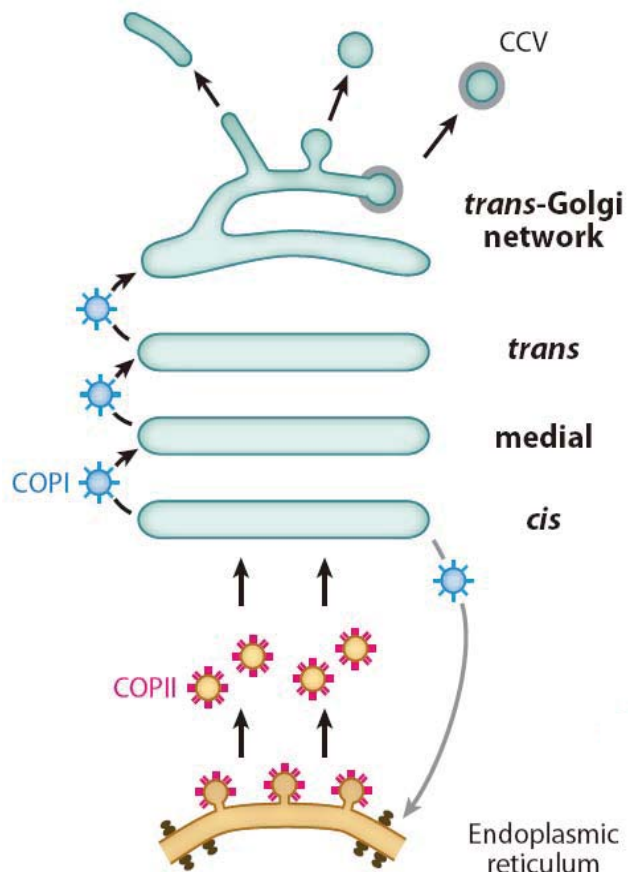


Figure 14 : Le transport intragolgien
(D'après Glick and Nakano, 2009)

III.1.4. Le transport entre le Golgi et la membrane plasmique

Le transport des protéines dans le Golgi se termine par leur passage dans le réseau transgolgien d'où bourgeonnent les vésicules avant d'être dirigées vers leurs destinations finales qui peuvent être la membrane plasmique ou bien des systèmes endomembranaires.

En effet, ce compartiment est particulièrement relié au trafic post-endocytique composé des endosomes précoces, tardifs, de recyclage et des lysosomes. Un trafic bidirectionnel endosome-TGN caractérise ce transport mais nous ne nous y intéresserons pas ici, étant donné que l'objectif de notre étude concerne le versant antérograde du trafic qui adresse le récepteur 5-HT_{1A} à la membrane plasmique, et non l'autre versant du trafic qui concerne le cycle endocytose-recyclage, l'autre phénomène impliqué dans la régulation de l'activité du récepteur.

III.2. Les acteurs du trafic vésiculaire dans les cellules

III.2.1. Présentation générale des acteurs du trafic vésiculaire

Les protéines impliquées dans le transport vésiculaire sont nombreuses et hautement conservées à travers l'évolution, de la levure aux mammifères (Shakoori et al., 2003; Pereira-Leal, 2008).

Tout d'abord, la protéine synthétisée à transporter ou protéine cargo est reconnue par les protéines cytosoliques du manteau COP via un signal spécifique présent dans son extrémité cytosolique (**Figure 15**). Ces protéines vont ensuite permettre la formation et le bourgeonnement des vésicules à partir de la membrane du compartiment donneur. Puis, l'arrimage et l'amorçage de ces vésicules sur le compartiment accepteur sont assurés en partie par les SNAREs (*S*ensitive *N*-ethylmaleimide factor *A*ssociated *P*roteins *R*Eceptors). Les SNAREs sont des protéines transmembranaires qui sont classées en deux groupes ; les v-SNARE situés au niveau de la vésicule et les t-SNARE qui se trouvent dans la membrane du compartiment cible (target en anglais) (**Figure 15**). Les SNAREs sont situés dans des compartiments cellulaires déterminés et permettent ainsi de définir l'identité d'un organe. Ces protéines vont interagir avec les facteurs d'arrimage présents à la membrane du

compartiment accepteur qui eux-mêmes sont associés à des protéines Rab/Ypt (Ras related in brain). Un complexe d'amarrage est ainsi formé déterminant spécifiquement le compartiment cible accepteur de la vésicule transportant le cargo (**Figure 15**). Le rôle des protéines Rab dans les étapes du trafic membranaire est détaillé plus loin dans cette thèse. Cependant, il est intéressant de noter que l'activité de ces protéines dépend entre autre de leur recrutement à la membrane, notamment à travers leur interaction avec certains membres de la famille des protéines Yip (Ypt Interacting Protein) dont fait partie Yif1B, le partenaire du récepteur 5-HT_{1A} identifié peu avant mon arrivée au laboratoire et qui fait l'objet de ma thèse. Le peu de données disponibles sur cette famille sera décrit précisément dans cette introduction. Enfin, nous évoquerons également dans ce mémoire le rôle crucial des moteurs moléculaires associés au cytosquelette dans la directionnalité du transport des vésicules cargos.

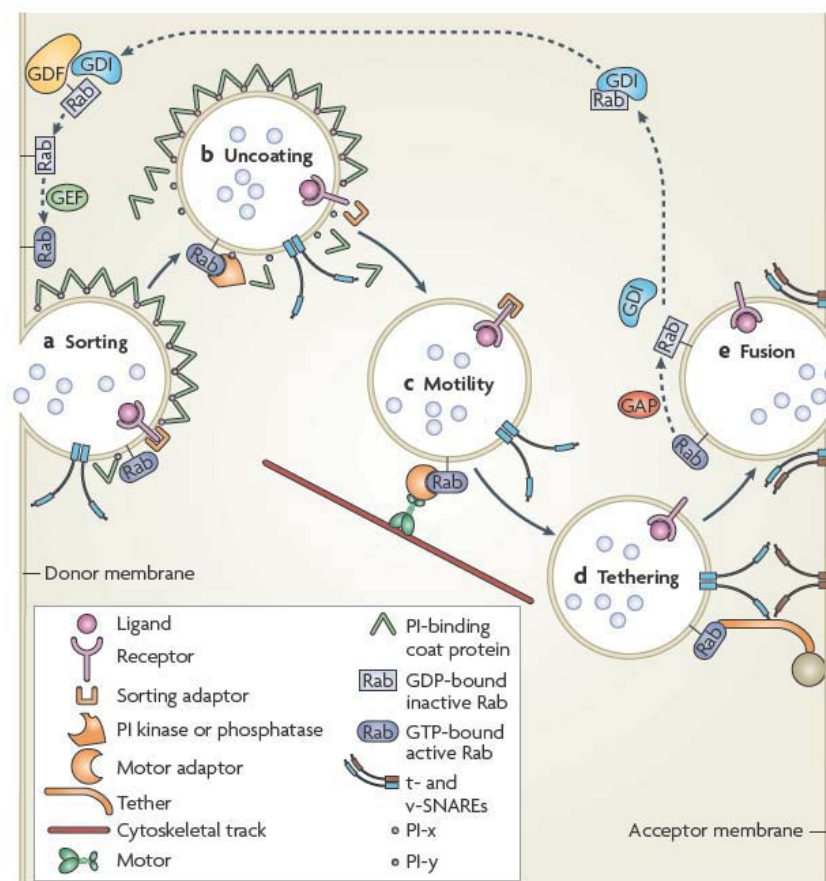


Figure 15 : Les différents acteurs du trafic membranaire
(D'après Stenmark, 2009)

III.2.2. Les protéines Rab

III.2.2.a. Présentation générale des protéines Rab

Les protéines Rab sont des petites GTPases monomériques constituant la plus grande classe de la superfamille des Ras. Ces protéines ont un poids moléculaire d'environ 20 à 29 kDa et comme les autres GTPases, elles cyclent entre une forme cytoplasmique inactive liée au GDP et une forme active membranaire liée au GTP. Ce sont des protéines ubiquitaires impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la formation de vésicules, l'appariement et la fusion des vésicules, le transport antérograde et rétrograde mais également la motilité cellulaire et le trafic de protéines de surface (pour revue, Segev, 2001).

Aujourd'hui, plus de 60 Rab ont été identifiées dans le génome humain et 11 chez la levure (*Ypt*), elles ont été classées en se basant sur des données phylogénétiques ainsi que sur leurs fonctions en plusieurs groupes. Chaque protéine Rab possède une fonction spécifique dans le trafic vésiculaire, fonction directement liée à leur localisation respective. Aujourd'hui, 16 Rab sont désormais cristallisées dans leur forme active et inactive, dont au moins une par groupe, ce qui devrait permettre de mieux comprendre la relation structure-fonction des différents membres de cette superfamille.

III.2.2.b. Les protéines régulatrices du cycle des Rab

Comme toutes les GTPases, les Rab subissent un cycle d'activation/inactivation régulé par diverses protéines. En effet, dès sa synthèse terminée, la protéine Rab est escortée par une REP (Rab Escort Protein) vers une géranyl-géranyl-transférase (GGTase), enzyme qui catalyse l'ajout de ces groupements lipidiques cruciaux pour l'insertion membranaire des Rab. Dans le cytoplasme, ces derniers sont séquestrés par un inhibiteur de la dissociation du GDP (GDI : *guanine nucleotide dissociation inhibitor*) formant un complexe stable Rab-GDI et empêchant ainsi son ancrage à la membrane (**Figure 16**). En revanche, Rab est ensuite recrutée à la membrane par un facteur de déplacement du GDI (GDF : *GDI displacement factor*) spécifique d'un organite, permettant ainsi son activation par une GEF, facteur échangeant le GDP en GTP. Une fois activée Rab-GTP peut interagir avec un effecteur spécifique qui l'amène vers sa zone d'action (**Figure 16**). Il est important de noter qu'une

même protéine Rab peut avoir plusieurs fonctions cellulaires grâce à sa capacité à interagir avec différents effecteurs. Enfin, une enzyme catalysant l'hydrolyse de la Rab-GTP en Rab-GDP (GAP : *GTPase activating protein*) recycle ainsi le complexe vers le cytoplasme où il va à nouveau interagir avec un GDI (**Figure 16**). L'assemblage et la dissociation de complexes multiprotéiques comprenant les Rab sont ainsi régulés.

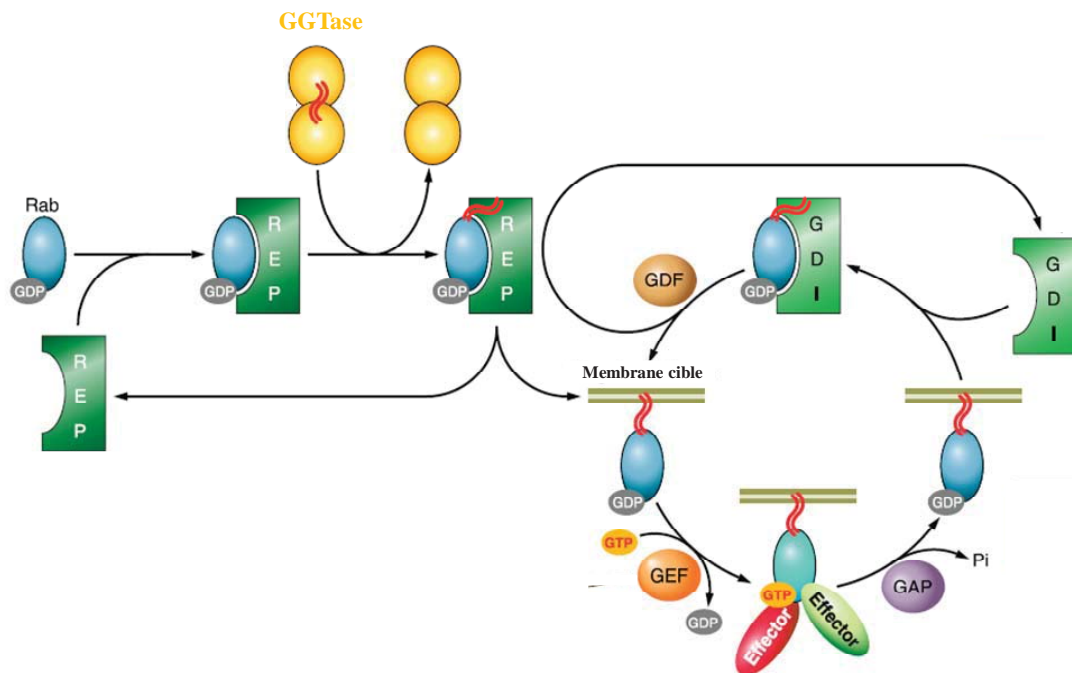


Figure 16 : Les protéines régulant le cycle d'activation/inactivation des protéines Rab
(D'après Hutagalung and Novick, 2011)

III.2.2.c. Le rôle des protéines Rab dans le trafic vésiculaire

Les protéines Rab du trafic entre le RE et le Golgi

Trois membres de la famille Rab sont impliqués dans le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi : Rab1, Rab2 (Plutner et al., 1991; Tisdale et al., 1992) et Rab6 (White et al., 1999) (**Figure 17**).

Rab1 est localisée dans le cis-Golgi (Segev et al., 1988) mais également dans le compartiment intermédiaire pré-golgien (Saraste et al., 1995). Des données ont d'ailleurs permis de préciser le rôle de Rab1 dans l'appariement des vésicules au niveau du cis-Golgi (Moyer et al., 2001) et dans la distribution du compartiment intermédiaire dans les neurites de cellules PC12 différenciées (Sannerud et al., 2006).

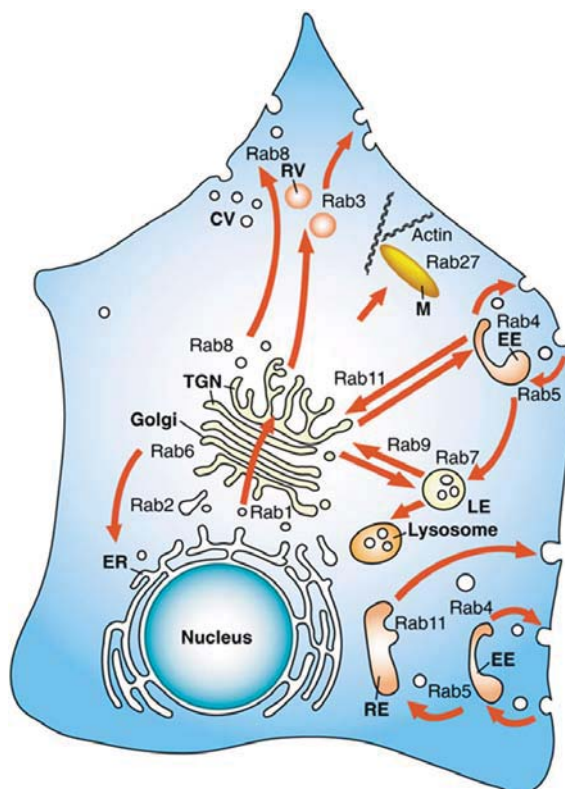


Figure 17 : Les protéines Rab dans le trafic vésiculaire

(D'après Stenmark and Olkkonen, 2001)

De plus, la protéine Rab1 est essentielle au transport du RE vers le Golgi de nombreuses protéines (Nuoffer et al., 1994; Dugan et al., 1995; Yoo et al., 2002). En ce qui concerne les RCPG, Wu et ses collègues ont démontré qu'elle est indispensable au trafic des récepteurs adrénergiques $\alpha_{1(A \text{ et } B)}$ et $\beta_{(1 \text{ et } 2)}$ et de l'angiotensine AT_1 mais qu'elle n'a pas d'effet sur le transport du récepteur adrénergique α_{2B} (Wu et al., 2003; Filipeanu et al., 2004; Filipeanu et al., 2006). Ainsi, leurs résultats montrent d'une part le rôle important de Rab1, certainement généralisable à d'autres RCPG, et d'autre part que le transport du RE vers le Golgi implique probablement plusieurs voies ou du moins plusieurs modes de régulation.

La protéine Rab2 située dans l'ERGIC (Chavrier et al., 1990) est impliquée dans le transport antérograde et rétrograde entre le RE et le Golgi (Tisdale et al., 1992; Tisdale and Balch, 1996; Tisdale, 1999) et est également indispensable pour l'adressage à la membrane plasmique des RCPG adrénergiques α_{2B} et β_2 (Dong and Wu, 2007).

En ce qui concerne Rab6, il a clairement été montré que cette protéine ne joue pas de rôle dans le transport antérograde RE-Golgi (Tisdale et al., 1992) mais dans le transport rétrograde Golgi-RE (Tisdale et al., 1992; Martinez et al., 1997; Echard et al., 2000). Tout comme Rab1 et Rab2, Rab6 est également impliquée dans l'adressage à la surface cellulaire des récepteurs adrénergiques β_2 et de l'angiotensine AT_1 (Dong and Wu, 2007).

Les protéines Rab du trafic intragolgien

Les protéines Rab1 et Rab6 sont toutes les deux cruciales dans le transport intragolgien (**Figure 17**).

La protéine Rab1 est essentielle non seulement pour le transport entre le RE et l'appareil de Golgi, mais également pour le trafic antérograde intragolgien notamment chez la levure (Nuoffer et al., 1994; Peter et al., 1994; Jedd et al., 1995).

La protéine Rab6 est associée aux citernes de l'appareil de Golgi mais également au réseau transgolgien (TGN) où elle joue un rôle essentiel dans le trafic vésiculaire rétrograde permettant aux vésicules de passer du TGN au transGolgi puis de traverser les différentes citernes golgiennes (Goud et al., 1990; Antony et al., 1992; Martinez et al., 1994; Mayer et al., 1996; Echard et al., 2000).

Les protéines Rab du trafic entre le Golgi et la membrane plasmique

De nombreuses protéines Rab sont impliquées dans le système endomembranaire postgolgien plus précisément entre le TGN, les endosomes, les lysosomes et la membrane plasmique. Notons seulement que Rab4 et Rab11 régulent le recyclage du récepteur 5-HT_{1A} (Fichter et al., 2010). En revanche, nous nous intéresserons aux protéines Rab8 et Rab6 qui sont impliquées dans le transport de vésicules vers la membrane plasmique (**Figure 17**).

En effet, la protéine Rab8 est essentielle pour le transport entre le réseau transgolgien et la membrane plasmique notamment de la protéine VSVG dans les cellules épithéliales et dans les neurones d'hippocampe (Huber et al., 1993b; Huber et al., 1993a), mais également de RCPG tel que le transport antérograde du récepteur adrénergique $\alpha 2$ dans des cellules non polarisées (Dong et al., 2010) et de la rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (Deretic, 1997).

De plus, Rab6 est retrouvée dans des vésicules postgolgiennes dans des cellules spécialisées comme les neurones de l'hypothalamus et les cellules de la rétine (Jasmin et al., 1992; Deretic and Papermaster, 1993; Tixier-Vidal et al., 1993). Elle est impliquée non seulement dans le transport rétrograde endosome-TGN (Mallard et al., 2002) mais également dans le transport antérograde de la rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (Deretic and Papermaster, 1993).

Enfin, il a été montré récemment que Rab6 et Rab8 coopèrent pour contrôler l'exocytose de vésicules sécrétées (Grigoriev et al., 2007; Grigoriev et al., 2011). Ce mécanisme pourrait être le même que celui observé pour le transport de la rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (Deretic, 1997).

Pour conclure, une même protéine Rab peut être impliquée dans plusieurs étapes du transport vésiculaire, ce qui est expliqué par leur capacité à interagir avec différents effecteurs. La **Figure 18** illustre ce fait avec l'exemple de Rab6 qui intervient avec ses différentes isoformes dans de nombreuses étapes du transport vésiculaire.

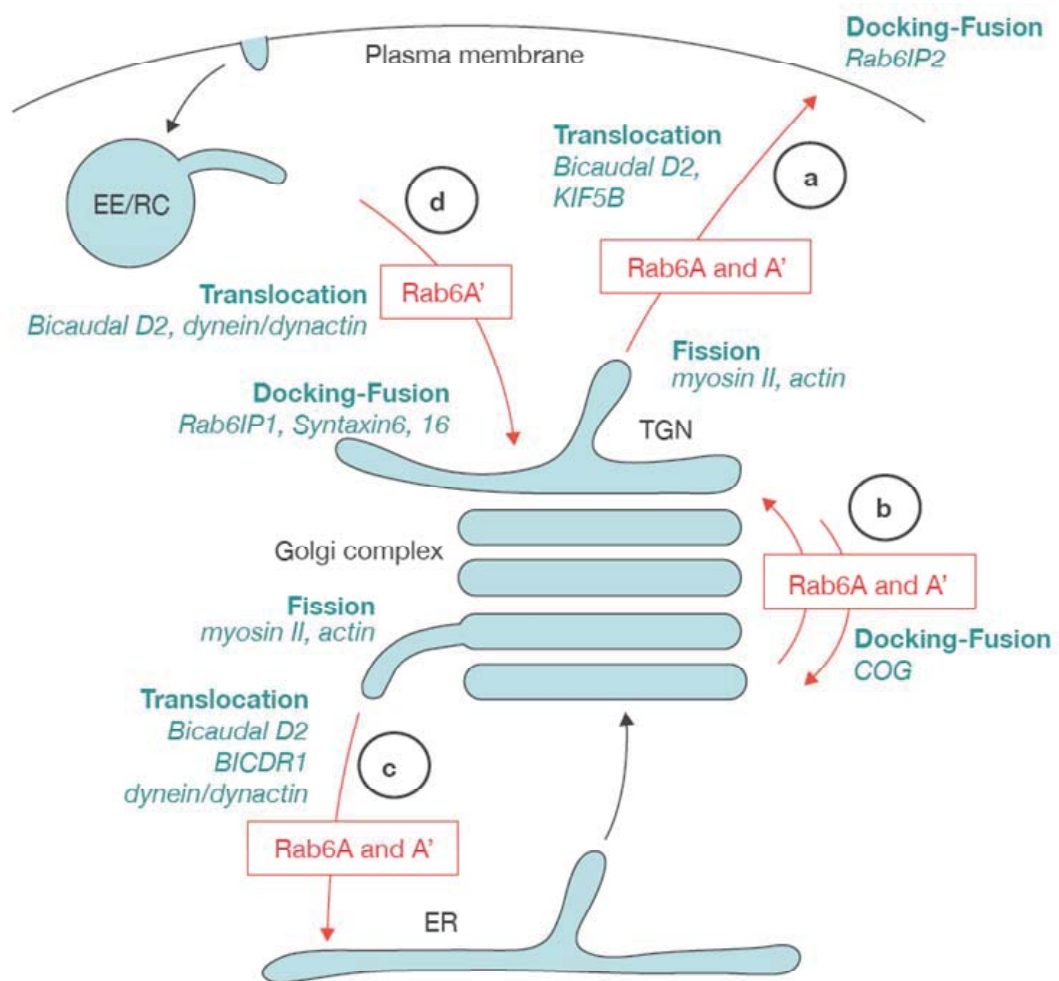


Figure 18 : Les différentes fonctions de Rab6 dans le trafic intracellulaire
(D'après Valente et al., 2010)

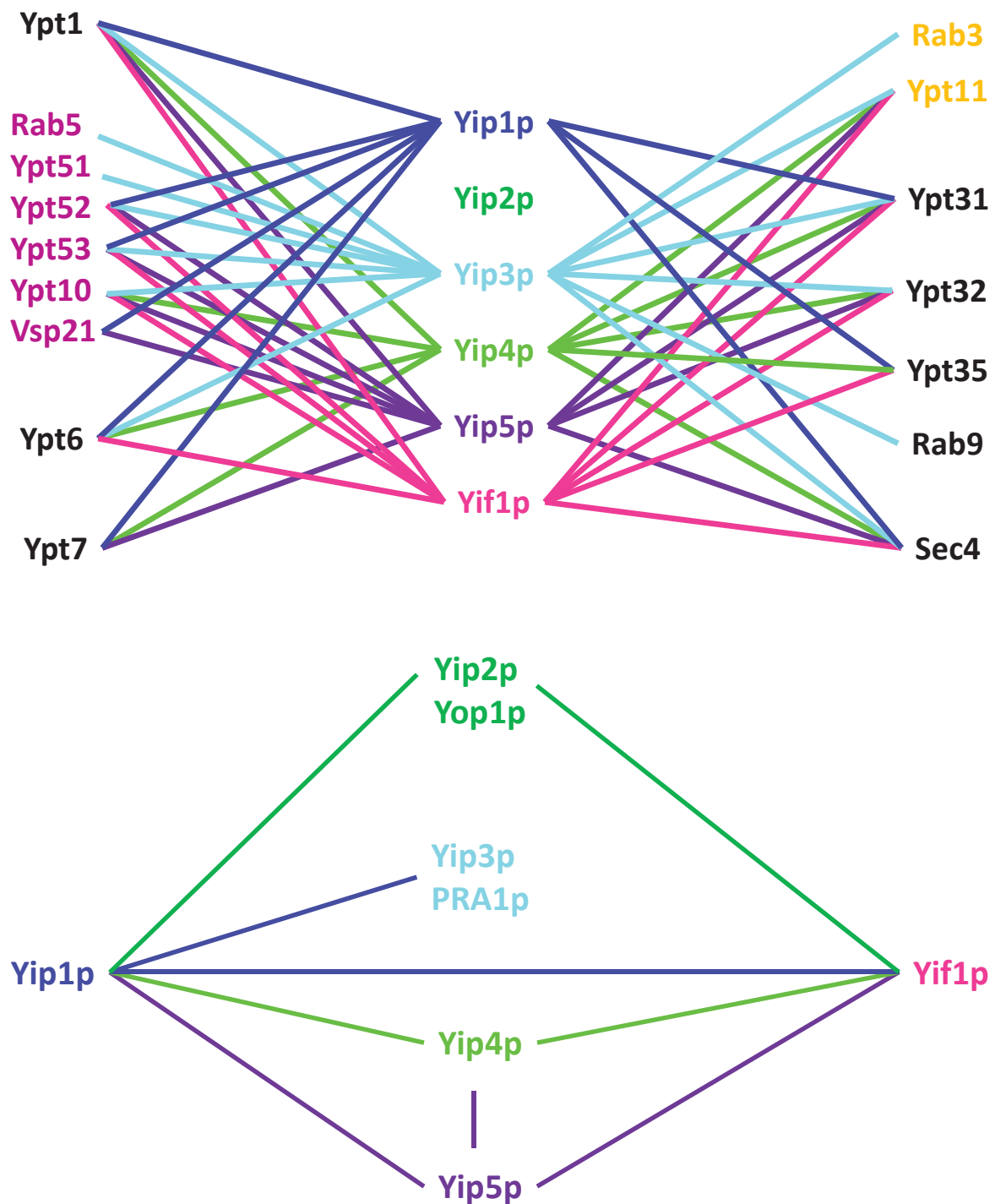


Figure 19 : Les protéines interagissant avec les membres de la famille des Yip

Les membres de la famille Yip interagissent avec les protéines Rab (A) mais également entre eux (B). Représentation schématique des interactions démontrées dans la littérature.

Correspondance nomenclature des protéines Rab levure/mammifères : Ypt1/Rab1, Ypt6/Rab6, Ypt7/Rab7, Ypt11/Rab3, Ypt31-32/Rab11, Ypt10-51-52-53-Vsp21/Rab5, Ypt35/Rab35, Sec4/Rab8.

III.2.3. Les protéines Yip

III.2.3.a. Présentation générale des protéines Yip

Le nom de protéines Yip (Ypt-interacting protein) provient de leur capacité à interagir avec les Ypt (Rab), ce qui a été à l'origine de leur identification (Yang et al., 1998) (**Figure 19A**). Ce sont des protéines très conservées à travers l'évolution qui ont été davantage étudiées chez la levure. Sur la base de leur similarité de séquence et leur topologie, 8 membres ont été décrits chez l'Homme (Yip1 à Yip6, Yif1A et Yif1B) et 6 chez la levure (Yip1 à Yip5, Yif1p) (**Tableau 1**). Ces protéines présentent un poids moléculaire compris entre 25 et 35 KDa et sont caractérisées par une structure commune constituée d'une longue extrémité N-terminale suivie de 5 domaines transmembranaires à l'exception de Yip3 qui en possède uniquement 4 (Lin et al., 2001). Un domaine appelé Yip, retrouvé dans la plupart des membres de la famille, est une séquence consensus caractérisée par un motif DLYGP suivi d'un dipeptide GY mais également d'une proline très conservée située en amont de ces motifs (**Figure 34**). Ces protéines ont également été appelées FinGER (Five span transmembrane proteins localized in the Golgi apparatus and some in the ER), puisqu'en plus de partager une structure commune à 5 régions hydrophobes, elles sont toutes situées entre le RE et l'appareil de Golgi (Shakoori et al., 2003). Enfin, la plupart d'entre elles sont ubiquitaires.

Mammifères								
FinGER5	FinGER9	FinGER2	FinGER3	FinGER4	FinGER1	FinGER6	FinGER7	FinGER8
Yip1A/ YipF5	Yip1B/ YipF7	Yip2/ YipF2	Yip3/ YipF3	Yip4/ YipF4	Yip5/ YipF1	Yip6/ YipF6	Yif1A	Yif1B
Levure								
Yip1p		Yip2p/ Yop1	Yip3	Yip4p	Yip5p	Yip6p	Yif1p	

Tableau 1 : Correspondance entre les différentes nomenclatures des protéines Yip chez les mammifères et nomenclature de leurs orthologues chez la levure.

III.2.3.c. Les protéines Yip entre le RE et le Golgi

Yip1p/Yip1A

Le premier membre de la famille à avoir été identifié par l'équipe de Gallwitz, il y a une dizaine d'année, est la protéine Yip1p de la levure *Saccharomyces Cerevisae* (Yang et al., 1998). Son orthologue chez les mammifères, Yip1A, est le membre de la famille, avec Yip3, dont la fonction est la mieux décrite. Yip1p/Yip1A est une protéine ubiquitaire (Tang et al., 2001; Shakoori et al., 2003) impliquée dans le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi mais sa localisation ainsi que sa fonction exacte restent encore controversées.

En effet, certains chercheurs la décrivent comme une protéine golgienne (Yang et al., 1998; Tang et al., 2001; Shakoori et al., 2003) et d'autres la situent plutôt dans le RE au niveau des ERES (Tang et al., 2001; Kano et al., 2004). Yip1A a également été décrite dans le compartiment intermédiaire ou ERGIC (Yoshida et al., 2008; Kano et al., 2009; Dykstra et al., 2010). Le transcrit de Yip1A est exprimé de façon ubiquitaire et la protéine Yip1A partage 31 % d'identité de séquence avec son orthologue Yip1p ce qui peut sous-entendre une fonction conservée de cette protéine de la levure aux mammifères. Une étude soutient cette hypothèse puisque qu'elle montre que la déplétion de Yip1p dans le modèle de levure peut être compensée par l'expression de Yip1A (Chen and Collins, 2005).

Son gène est essentiel pour la viabilité de la cellule et des mutants de Yip1p présentent des défauts de sécrétion de protéines qui se retrouvent anormalement accumulées dans le RE démontrant un rôle de cette protéine dans le transport vésiculaire dès la sortie du RE. De plus, Yip1p interagit avec la protéine Ypt1 (Rab1) connue pour jouer un rôle dans le trafic antérograde entre le RE et l'appareil de Golgi (Yang et al., 1998).

Concernant sa fonction, Yip1 colocalise avec des protéines COPII (Sec23/24) et sa surexpression perturbe le transport antérograde de cargo entre le RE et l'appareil de Golgi (Tang et al., 2001). Plus précisément, l'équipe de Barlowe a identifié un rôle de Yip1p dans la biogénèse de vésicules COPII et plus précisément dans leur bourgeonnement (Heidtman et al., 2003). La protéine Yip1A joue un rôle essentiel dans la structure du RE (Dykstra et al., 2010) et de l'appareil de Golgi (Yoshida et al., 2008) mais elle est également impliquée dans le transport antérograde (Dykstra et al., 2010) et rétrograde (Kano et al., 2009) de protéines entre ces deux compartiments.

Enfin, chez les mammifères, Yip1A possède un homologue, Yip1B, qui lui, est spécifiquement exprimé dans le cœur. Néanmoins aucune fonction ne lui a encore été attribuée.

Yif1p

Tout comme Yip1, la séquence de Yif1 est très conservée à travers l'évolution. Yif1 est une protéine essentielle de la levure *S. cerevisiae* formant un complexe stable avec Yip1p et elle interagit également avec Ypt1 (Rab1) mais aussi avec d'autres Rab (Ito et al., 2000; Matern et al., 2000; Calero et al., 2002).

Les membres de la famille Yip pourraient partager les mêmes fonctions mais aussi les mêmes partenaires protéiques, en effet Yif1p peut compenser la perte de fonction de Yip1p mais pas Yip4 (Calero et al., 2002). En revanche, la surexpression de Yip1p ne compense pas le manque de Yif1p, ce qui démontre que le rôle de Yip1p semble se situer en amont de Yif1p (Matern et al., 2000).

Des résultats montrent que l'extrémité N-terminale de Yif1p interagit directement ou non avec Sly1p (Matern et al., 2000), une protéine de sécrétion formant un complexe stable avec Sed5p, une t-SNARE localisée au niveau du Golgi (Grabowski and Gallwitz, 1997; Peng and Gallwitz, 2004).

Il est intéressant de noter que la localisation golgienne de Yif1p est perturbée dans un modèle de levure de la maladie neurodégénérative de Batten. En effet, Yif1p se retrouve dans les vacuoles des levures mutantes BTN (Btn1-/- et Btn3-/-) mais aussi dans les mutants Ypt6-/- et de certaines SNAREs telles que Tlg2, Snx4, Vam6... (Chattopadhyay et al., 2003; Kim et al., 2005; Kama et al., 2007; Kanneganti et al., 2011). Ces résultats supportent l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre ces différentes familles de protéines.

Tout comme Yip1, chez les mammifères, il existe 2 gènes codant pour des homologues de Yif1, Yif1A et Yif1B. Tous les deux codant pour des protéines ubiquitaires mais il est intéressant de noter que Yif1A est fortement exprimée dans le muscle squelettique, alors que Yif1B est présente particulièrement dans le cerveau et les testicules.

Aucune donnée n'est disponible sur Yif1B, en revanche concernant la protéine Yif1A, nous savons qu'elle est localisée sur des membranes de ERGIC (Breuza et al., 2004) et également dans des vésicules COPII (Otte et al., 2001). De plus tout comme Yip1A, la déplétion de Yif1A provoque une fragmentation de l'appareil de Golgi (Yoshida et al., 2008).

Le complexe Yip1/Yif1

L'ensemble des résultats de l'équipe de Gallwitz mettent en évidence l'existence *in vivo* du complexe Yif1p-Yip1p qui avait été montré *in vitro* (Andrulis et al., 1998; Matern et al., 2000). Ce dernier joue un rôle crucial dans la fusion avec les membranes du Golgi des vésicules provenant du RE. Son implication dans ce processus a lieu dès la formation des vésicules au moment du bourgeonnement de la membrane du RE (Barrowman et al., 2003). Le complexe Yif1p/Yip1p interagit *in vivo* avec Bos1p et Sec22p qui sont des SNAREs également impliquées dans le trafic entre le RE et le Golgi (Barrowman et al., 2003).

De plus, ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Collins démontrant qu'un mutant de levure *yip1-40* (E70V), qui perd son interaction avec Yif1p, Ypt1 et Ypt31, présente une nette diminution de l'efficacité de transport entre le RE et le Golgi et aussi un défaut de formation des vésicules dérivées du RE (Chen et al., 2004).

Yos1p est une protéine de 87 acides aminés avec 2 domaines transmembranaires, sa séquence est très conservée chez les eucaryotes et elle interagit également avec le complexe Yif1p/Yip1p. Son inactivation bloque le transport antérograde RE-Golgi reflétant son rôle essentiel pour le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi (Heidtman et al., 2005).

Enfin, ce complexe biochimique existe également entre les formes humaines Yif1A et Yip1A qui sont toutes les deux protéines cyclant entre le RE et l'appareil de Golgi en passant par l'ERGIC mais son rôle fonctionnel dans le trafic vésiculaire reste indéterminé (Jin et al., 2005; Yoshida et al., 2008).

III.2.3.d. Le rôle des protéines Yip dans le recrutement des Rab.

Les protéines Yip sont connues pour jouer un rôle dans le trafic vésiculaire et notamment dans le recrutement à la membrane des protéines Rab (Pfeffer and Aivazian, 2004; Chen and Collins, 2005). En effet, en plus d'avoir la capacité d'interagir entre elles, les protéines Yip se lient également aux Rab, permettant ainsi leur recrutement à la membrane, et en conséquence induisant leur localisation spécifique, afin de jouer leur rôle dans le transport vésiculaire.

III.2.3.e. La protéine Yip3 entre le Golgi et la MP

Parmi les huit membres de la famille Yip, la protéine Yip3 est la mieux caractérisée avec Yip1A. Elle a été identifiée par double hybride réalisé sur une banque d'ADNc de cerveau de rat, cette protéine présentait une forte similarité de séquence avec Yip3 de levure (Yip3p), particulièrement au niveau de ses domaines hydrophobes (deux au moins). L'origine de son nom PRA1 (Prenylated Rab Aceptor 1) vient du fait qu'elle interagit spécifiquement avec la forme diprénylée de Rab3A (Martincic et al., 1997; Figueroa et al., 2001).

Yip3 (ou PRA1) est localisée dans le Golgi (Figueroa et al., 2001) ainsi que dans des compartiments post-golgiens, les endosomes tardifs (Sivars et al., 2003). Son extrémité C-terminale est requise pour cette localisation (Gougeon et al., 2002), en effet la délétion de cette dernière conduit d'une part, à un défaut de localisation de la protéine Yip3 qui se retrouve dans le RE au lieu du Golgi et d'autre part, inhibe sa capacité à interagir avec Rab3 et VAMP2, une v-SNARE (Hutt et al., 2000). Yip3 est donc un bon exemple illustrant le rôle de « connecteur » entre les Rab et les SNAREs. Enfin, il est intéressant de noter que le mutant de PRA1/Yip3 désorganise le Golgi et provoque un défaut dans le transport antérograde (Gougeon et al., 2002).

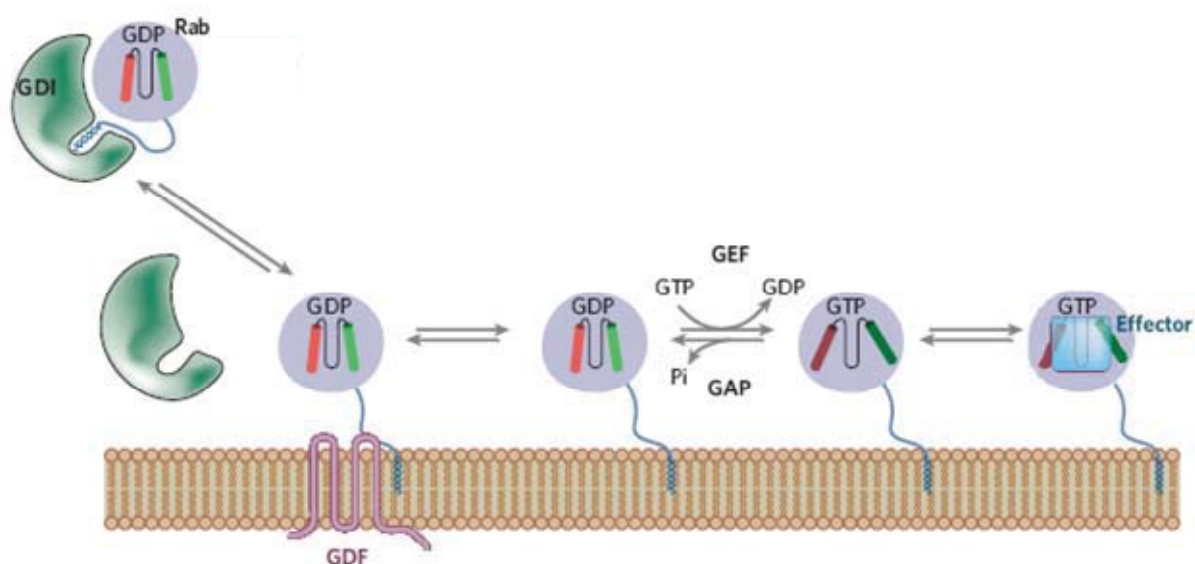


Figure 21 : Rôle des protéines Yip comme Rab-GDF

Modèle représentant le recrutement des protéines Rab par une GDF au niveau des membranes des compartiments cibles (D'après Behnia and Munro, 2005).

La première étude évoquant le rôle d'une certaine protéine transmembranaire, encore non identifiée, en tant que GDF de la protéine Rab9 permettant son recrutement dans les endosomes, a été publiée il y a une dizaine d'années (Dirac-Svejstrup et al., 1997). Puis, il a été montré que cette protéine transmembranaire correspond à Yip3, qui permet la dissociation de Rab9 de son GDI, recrutant ainsi Rab9 à la membrane des endosomes (Sivars et al., 2003).

De plus, PRA1/Yip3 interagit avec la GDI qui perd son affinité pour Rab3, permettant ainsi le recrutement de Rab3 à la membrane. Ces résultats suggèrent que le recrutement de Rab3 à la membrane nécessite l'action de PRA1 qui joue le GDF en s'opposant à la GDI (Hutt et al., 2000) (**Figure 21**).

Ainsi, Yip3 pourrait jouer un rôle dans la fusion membranaire comme « connecteur » des protéines Rab et SNARE puisqu'elle interagit avec Rab3A dans les endosomes, mais également avec VAMP2, une v-SNARE (Martincic et al., 1997).

Pour conclure, il est intéressant de noter que les Yip humaines ont été retrouvées dans de nombreux tissus. Cependant, leur expression est particulièrement élevée dans le cerveau, suggérant des fonctions spécifiques de ces dernières dans le système nerveux central (Pfeffer and Aivazian, 2004) auquel appartient le récepteur 5-HT_{1A} étudié dans cette thèse.

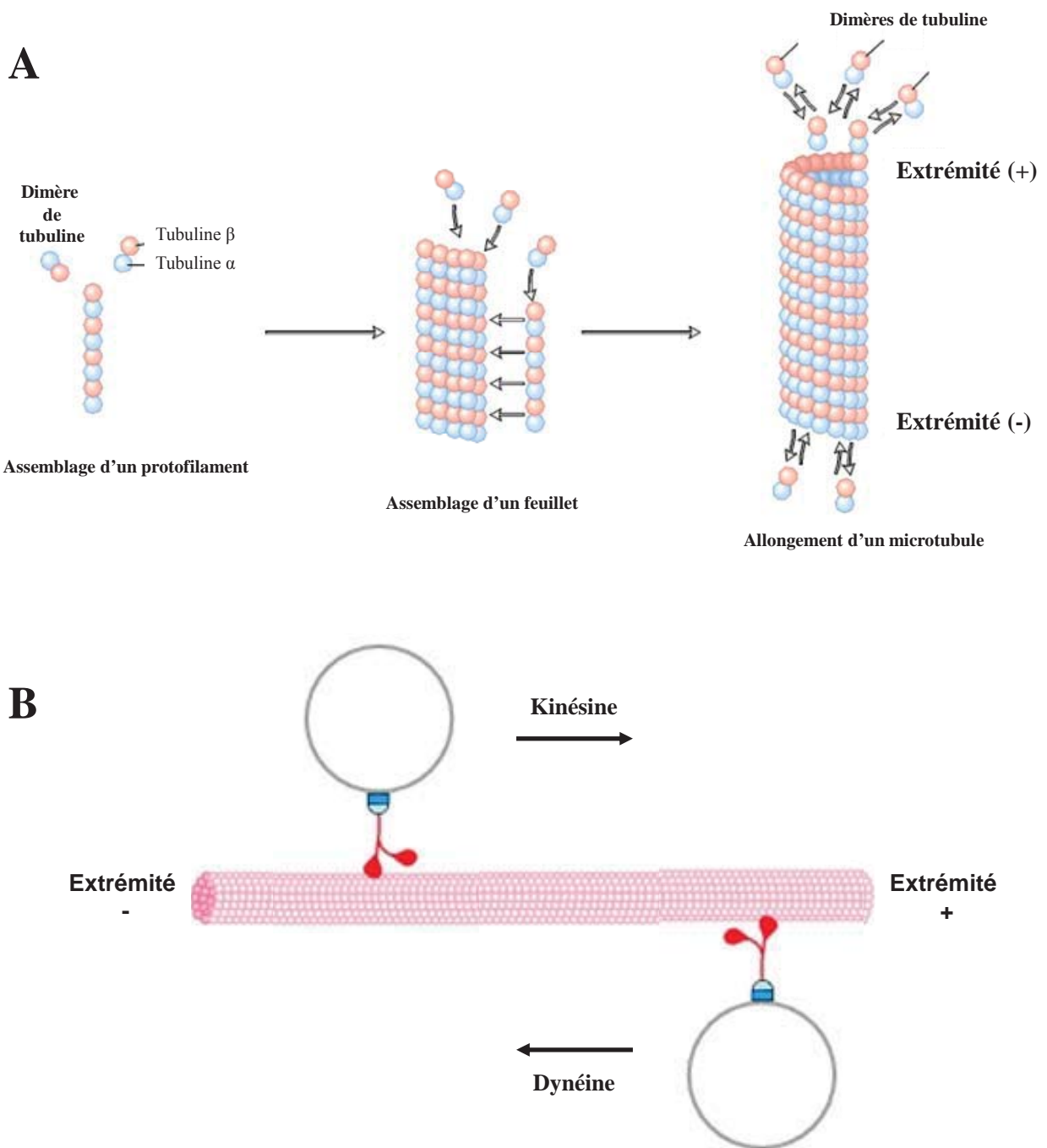


Figure 22 : Représentation schématique des « rails » de la cellule

A- Les différentes étapes de l'assemblage des microtubules

B- Les moteurs moléculaires associés aux microtubules

(D'après Lodish et al., 2005).

III.2.4. Les moteurs moléculaires associés aux microtubules

III.2.4.a. Présentation générale des microtubules

Les microfilaments et les microtubules (MT) sont des polymères de protéines servant de « rails » à la plupart des mouvements dans la cellule, et notamment pour le transport de protéines. Nous nous intéresserons dans ce travail uniquement aux microtubules, ils résultent d'un assemblage de 13 protofilaments étant eux-mêmes formés d'hétérodimères de tubuline α et β (Tilney et al., 1973). Ces derniers sont des structures dynamiques qui subissent un cycle de polymérisation / dépolymérisation constant, cette instabilité aidant au réarrangement du réseau dans la cellule et participant notamment à l'assemblage du fuseau mitotique. Le centrosome est le principal centre organisateur de microtubules dans les cellules animales. Les microtubules sont composés de deux extrémités, l'extrémité « plus » se polymérise plus vite que l'extrémité « moins » (**Figure 22A**). Les dimères de tubuline se lient à plusieurs alcaloïdes végétaux ayant une activité thérapeutique (colchicine, vinblastine et taxol) et à des produits chimiques de synthèse (nocodazole). La vinblastine et le taxol sont efficaces en chimiothérapie anticancéreuse parce qu'ils interfèrent avec l'instabilité dynamique des microtubules du fuseau mitotique, bloquant ainsi la division cellulaire. Le nocodazole quant à lui, inhibe l'assemblage des microtubules en se liant aux dimères de tubuline, diminuant ainsi leur affinité pour les microtubules.

De plus, il existe de nombreuses protéines associées à ces polymères de tubuline, notamment les dynéines et les kinésines qui sont des moteurs moléculaires qui se déplacent le long de ces rails. Ces protéines motrices sont responsables de tous les mouvements des éléments intracellulaires y compris les vésicules cargos le long des microtubules. Elles jouent donc un rôle crucial dans le trafic d'organites ou de vésicules cargos contenant des protéines telles que les récepteurs ou les canaux ioniques. Les dynéines se déplacent vers l'extrémité « moins » des microtubules alors que la plupart des kinésines se déplacent vers l'extrémité « plus » (**Figure 22B**).

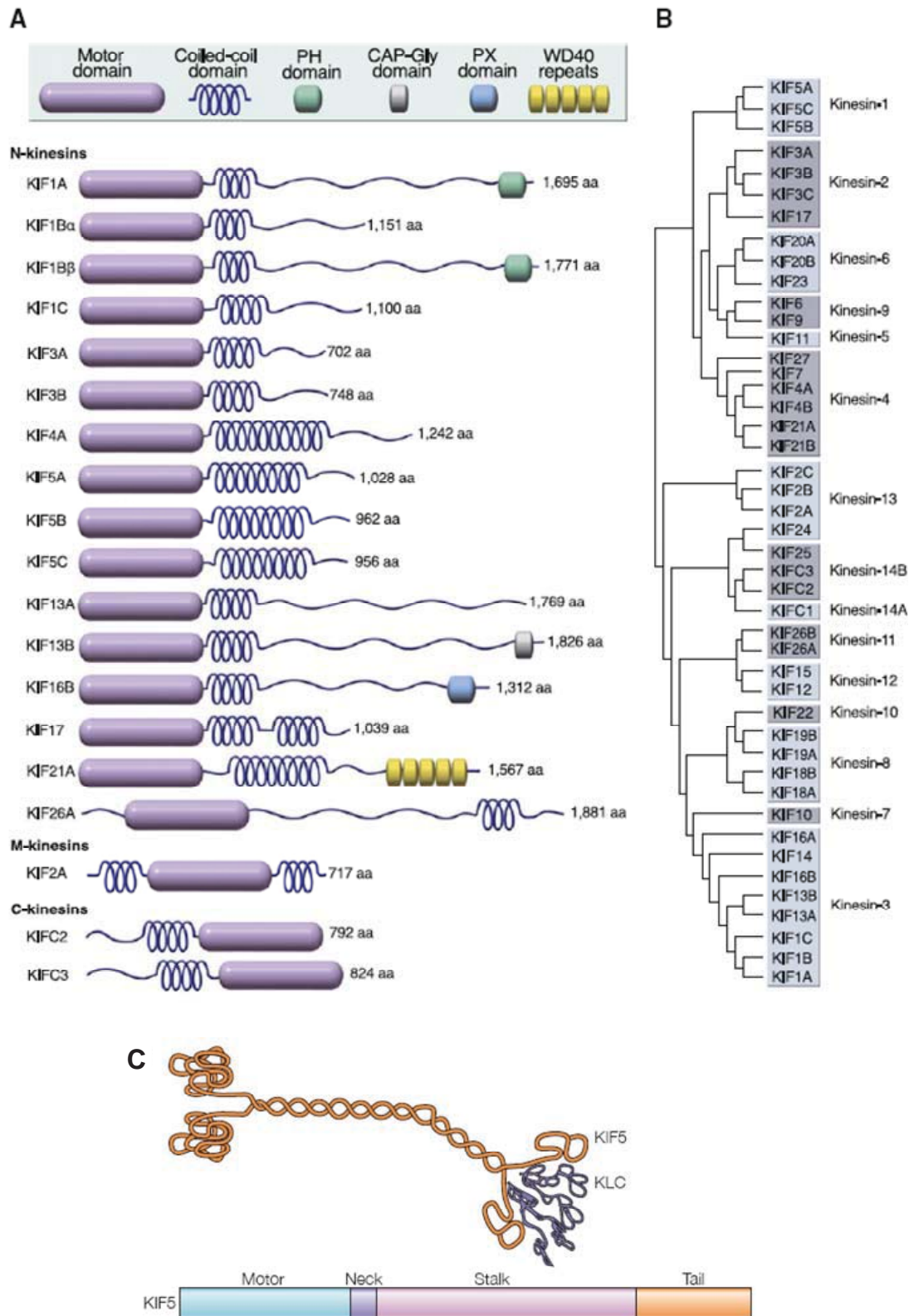


Figure 23 : Structure et classification des kinésines

Structures (A) et classification (B) des différentes kinésines (D'après Hirokawa et al., 2010).
 (C) Structure de la kinésine conventionnelle Kif5B (D'après Hirokawa and Takemura, 2005).

Comme toutes les protéines motrices, celles associées aux microtubules possèdent des « têtes » dotées d'une activité ATPasique qui permet leur déplacement le long des rails et « des queues » qui servent d'adaptateurs en vue d'interagir avec différentes structures intracellulaires. En effet, ces enzymes chimiomécaniques utilisent le principe de transfert de l'énergie chimique de l'hydrolyse d'ATP en énergie mécanique pour créer un déplacement directionnel de la protéine motrice le long des microtubules. Ces protéines interviennent dans les transports intracellulaires et la division cellulaire, où elles sont requises pour la motilité de nombreux cargos au sein de la cellule.

Nous détaillerons ici la classification et la structure de ces 2 familles de moteurs moléculaires ainsi que leurs fonctions dans le trafic intracellulaire.

III.2.4.b. Les kinésines

Structure et classification des kinésines ou Kif

La superfamille des kinésines est classée en 14 sous-familles de protéines présentes dans tous les organismes eucaryotes, elle est constituée de 45 membres aussi bien chez la souris que chez l'Homme (**Figure 23A et B**), 23 et 21 chez la Drosophile et *C. Elegans* respectivement, et enfin 6 kinésines sont dénombrées chez *S. Cerevisiae*. Sur les 45 kinésines de souris, 44 ont des orthologues humains. La « kinésine 1 » est la première à avoir été découverte, elle a été identifiée comme protéine motrice associée aux microtubules pour le transport antérograde axonal (Brady, 1985; Vale et al., 1985). Par la suite, cette kinésine correspondra à Kif5B qui est considérée comme la « kinésine conventionnelle ».

La fonction de transport des cargos *via* les kinésines s'explique par l'organisation structurale de ces protéines. De façon générale, on remarquera que les kinésines sont des protéines multimériques (souvent homodimériques), organisées en quatre domaines distincts (domaine « moteur », « cou », « tige » et « queue ») dont l'architecture reste très conservée au sein de cette famille protéique (**Figure 23A et C**).

- Le domaine moteur : cette région de forme globulaire constitue le noyau catalytique de la kinésine. Il possède un site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'un site de liaison au microtubule. Ce domaine sert d'interface entre la kinésine et le microtubule, et constitue la

région la plus conservée en séquence entre les kinésines (20 à 90% d'identité de séquence protéique).

- Le domaine de connexion ou « cou » : Cette région-charnière est généralement courte (une dizaine de résidus). Elle se situe entre le domaine moteur et le domaine de dimérisation qui lui succède. Le « cou » interagit avec le domaine catalytique pour amplifier le déplacement de la tête motrice lors du processus de marche.
- Le domaine de dimérisation ou « tige » : cette région se replie en une longue hélice α s'organisant en un enroulement super-hélice (coiled-coil) via la dimérisation de deux chaînes de kinésines associées par ce même domaine.
- Le domaine d'interaction au cargo ou « queue » : ce domaine se situe à l'extrémité opposée du domaine moteur et sert à recruter la cible à transporter. Le repliement de la queue reste ambigu, et il est très peu probable qu'il soit conservé parmi les kinésines, cela en raison d'une très forte divergence de séquence entre les domaines « queue » référencés, mais aussi en raison des différents types de cargos transportés spécifiquement selon les kinésines.

Si les kinésines sont essentiellement homodimériques, certains de ces moteurs moléculaires, dont la kinésine conventionnelle (Kif5B), s'associent avec des chaînes légères additionnelles (**Figure 23C**), les KLC (kinesin light chain), sous la forme d'hétérodimères ou d'hétérotétramères. De même, il a été observé des kinésines dites bipolaires s'assemblant en homotétramère.

De plus, les kinésines se différencient également par leur sens de déplacement spécifique, dirigé vers l'extrémité (+) ou (-) des microtubules. Sur la base de leur homologie de séquence, les 45 kinésines (ou kif) murines et humaines ont été classées en 3 sous-familles sur la base de la position de leur domaines moteurs (Miki et al., 2001) : les N-kinésines (39 gènes dont Kif5B, Kif17) possédant leur domaine moteur dans leur extrémité N-terminale (70% des kinésines) tandis que les C-kinésines (KifC1, KifC2 and KifC3) présentent leur domaine moteur à l'extrémité C-terminales (20%) ou encore les M-kinésines (Kif2A, Kif2B and Kif2C) dont le domaine moteur est central (10%). Alors que les N- et M-kinésines se déplacent vers l'extrémité (+), les C-kinésines se déplacent vers l'extrémité (-) (**Figure23B**).

Directionnalité et modèle de déplacement des kinésines

La kinésine présente donc un sens de « marche » spécifique, orienté vers l'une ou l'autre des extrémités du microtubule selon la famille à laquelle elle appartient. Le domaine

«cou» joue vraisemblablement un rôle prépondérant dans le sens de ce mouvement. Ainsi, lorsque les domaines moteurs de deux kinésines qui vont dans des sens opposés sont échangés, les chimères résultantes acquièrent alors la directionalité du «cou» conservé (Case et al., 1997; Endow, 1999). De façon similaire, l'échange des domaines « cou » entre différentes kinésines, impose aux mutants ainsi créés le sens de déplacement originare du nouveau «cou» (Endow and Higuchi, 2000). Ces expériences révèlent donc l'importance de cette région intermédiaire entre le domaine moteur et l'enroulement super-hélice dans l'acquisition de la directionalité.

Certaines kinésines se déplacent sur les microtubules sur de longues distances, effectuant ainsi de nombreux pas successifs avant de se détacher de leur support. On parle dans ce cas de kinésines processives. C'est par exemple le cas de la kinésine conventionnelle (Kif5B), capable de parcourir des distances de l'ordre du micromètre (une centaine de pas) avant de se détacher du microtubule.

L'un des modèles suggérés pour le mode de déplacement des kinésines processives est appelé « hand-over-hand » (Asbury et al., 2003). Il consiste en un mécanisme dans lequel les deux domaines moteurs interagissent alternativement le long du protofilament. La tête arrière se détacherait pour venir se fixer sur le prochain dimère de tubuline du même protofilament. Les pas alternatifs des deux têtes motrices seraient alors reliés au déphasage de leur cycle ATPasique, de sorte qu'au moins un domaine moteur soit en contact avec le microtubule. Ce modèle s'appuie notamment sur le changement d'affinité du domaine moteur envers la tubuline en fonction de son état nucléotidique. Les états ATP et sans nucléotide correspondent aux formes affines pour le microtubule, tandis que l'état ADP tend vers une forte diminution de l'affinité moteur / microtubule (**Figure 24**).

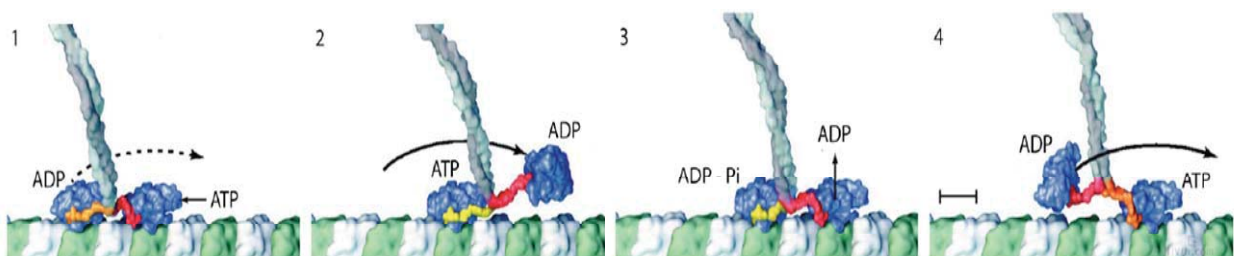


Figure 24 : Modèle de marche des kinésines processives

(D'après Vale and Milligan, 2000)

III.2.4.c. Les dynéines

Structure et classification des dynéines cytoplasmiques

Les dynéines peuvent être divisées en deux classes en se basant sur leur structure et leur fonction. Les dynéines axonémales impliquées dans le mouvement des cils et des flagelles qui ne seront pas évoquées dans ce manuscrit, et les dynéines cytoplasmiques auxquelles nous nous intéresserons, qui ont pour fonction le transport dirigé vers les extrémités (-) le long des microtubules.

La dynéine cytoplasmique est une protéine multimérique de taille exceptionnellement grande, composée de plusieurs sous-unités codées par de multiples gènes particulièrement chez les mammifères. Leur nomenclature n'est pas encore bien définie mais en se basant sur la relation phylogénétique des gènes et leur fonction, il existerait deux complexes différents, les dynéines cytoplasmiques 1 et 2 (Pfister et al., 2005).

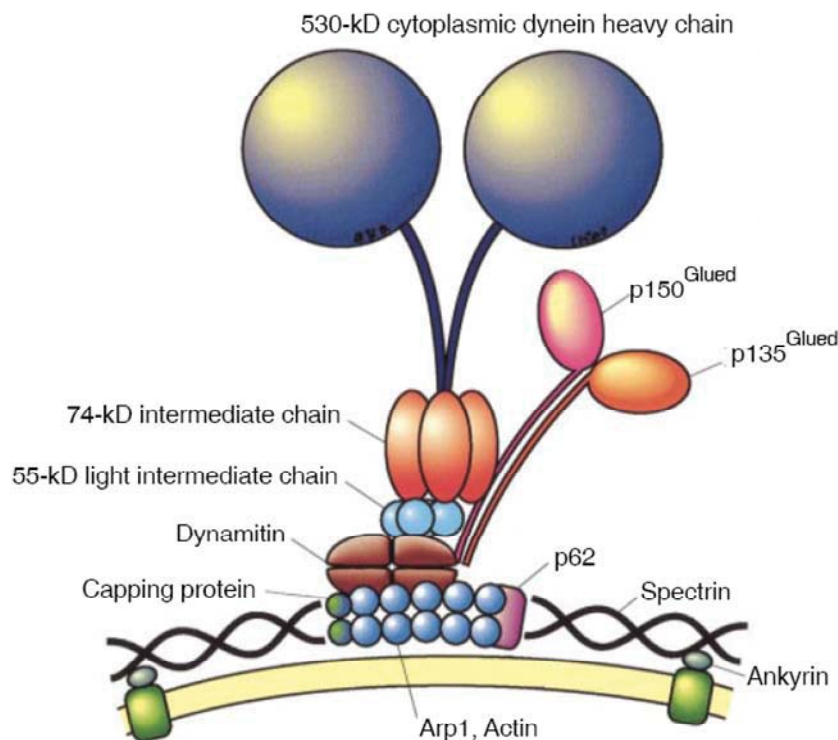


Figure 25 : Structure du complexe dynéine-dynactine

(D'après Hirokawa, 1998)

Leur structure est composée de deux chaînes lourdes (DHC) de 530 kDa, de 3 chaînes intermédiaires (DIC) de 74 kDa et 4 chaînes intermédiaires légères (DLC) de 55 kDa et quelques chaînes légères (LC) (**Figure 25**). Les DHCs ont une structure assez conservée où l'hydrolyse de l'ATP a lieu pour générer l'activité motrice permettant le déplacement de la dynéine le long des microtubules. Les DIC et les DLC sont nécessaires à l'interaction avec les différentes sous-unités de la dynactine (**Figure 25**).

Il existe différentes dynéines mais nous ferons référence dans ce manuscrit seulement à la dynéine cytoplasmique conventionnelle (ou dynéine cytoplasmique 1) qui est le moteur moléculaire caractérisé originellement et contenant la chaîne lourde humaine DHC1 ou son orthologue chez les différents organismes eucaryotes. De plus, parmi les 3 différentes DHC connues, seule la DHC1 est exprimée dans le cerveau (Vaisberg et al., 1996).

La structure de la dynactine, cofacteur essentiel de la dynéine cytoplasmique

Contrairement à la kinésine, la dynéine ne peut transporter un cargo à elle seule, elle a besoin de la dynactine, un co-facteur essentiel qui attache les vésicules de transport à la dynéine permettant ainsi sa processivité. Ce co-facteur de la dynéine ubiquitaire et très conservé (Gill et al., 1991) consiste en 11 sous-unités polypeptidiques distinctes qui ont toutes été clonées et séquencées dans diverses espèces (Allan, 2000). Il s'agit de : p150^{glued}, p62, p50, Arp1, l'actine conventionnelle, Arp11, p37, p32, p27, p25 et p24 (**Figure 25**). La partie distale du bras latéral de la dynactine contient deux molécules de p150^{Glued}. Initialement cloné chez la poule et le rat, elle a été nommée ainsi car sa séquence protéique présentait de fortes similitudes avec celle de la protéine Glued essentielle au développement précoce de la drosophile. Puis, toujours chez la drosophile, il a été montré par la suite que cette protéine fait partie du complexe dynactine et constitue l'orthologue fonctionnel de la p150^{glued} des vertébrés. La dynactine est nécessaire à la dynéine pour engendrer un déplacement de vésicules *in vitro* (Schroer and Sheetz, 1991). Cependant, la présence de la dynactine ne permet que d'augmenter la fréquence des événements de transport. Cela indique plutôt que ce complexe multimérique serait responsable du chargement de la dynéine cytoplasmique sur l'élément à transporter (Steffen et al., 1997; Waterman-Storer et al., 1997). Elle pourrait non seulement diriger la dynéine vers les cibles particulières y compris les vésicules cargos (Schroer and Sheetz, 1991), mais également permettre au complexe de rester attaché aux microtubules pendant le cycle ATPasique par l'intermédiaire du site de liaison aux microtubules de la p150^{glued} (King and Schroer, 2000).

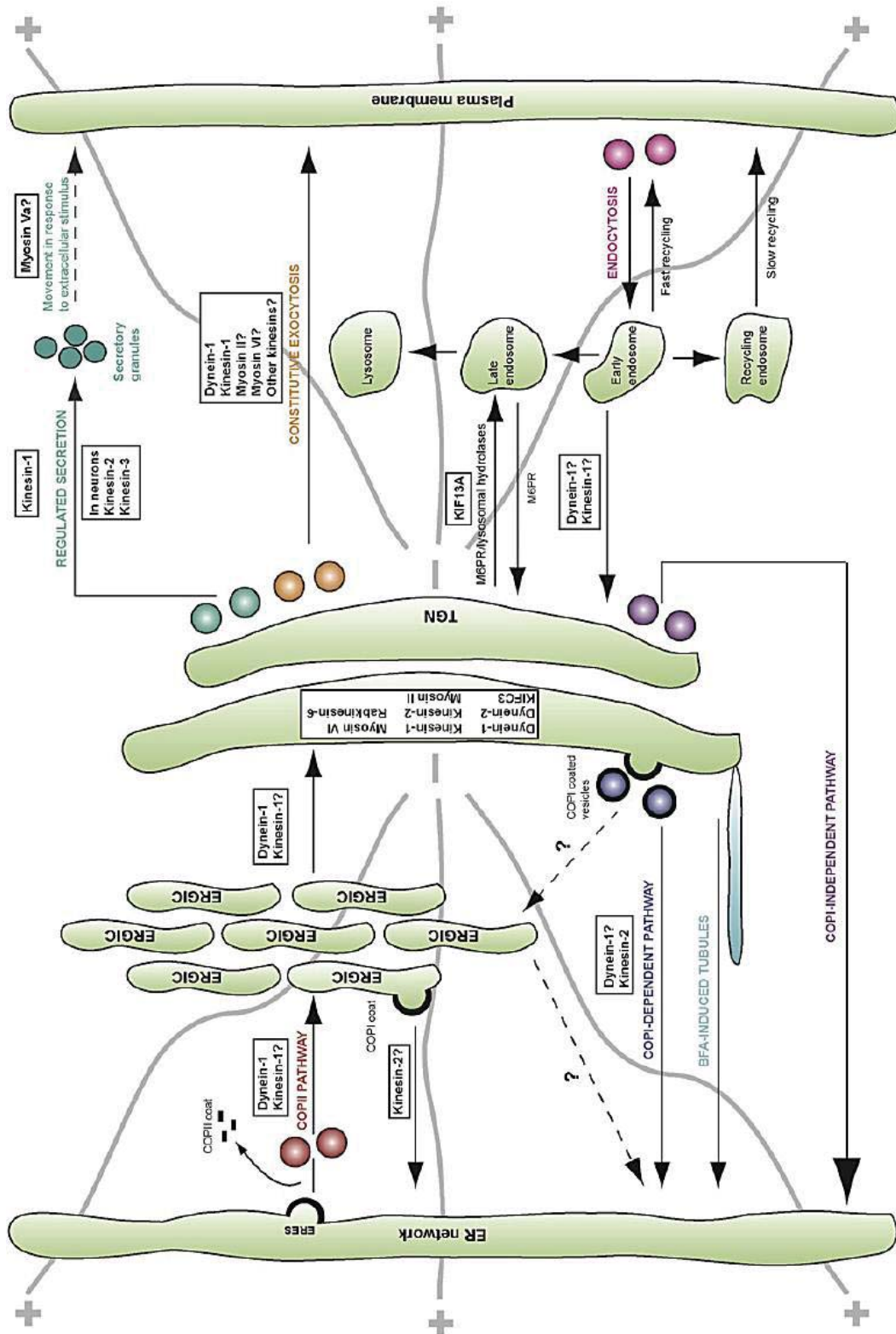


Figure 26 : Les moteurs moléculaires dans le trafic intracellulaire

Représentation schématique des moteurs moléculaires impliqués dans les étapes du trafic intracellulaire. Les microtubules et leurs extrémités (+) et (-) sont représentés en gris (D'après Brownhill et al., 2009).

III.2.4.d. Rôles des kinésines et des dynéines dans le trafic intracellulaire

Entre le RE et l'appareil de Golgi

Compte tenu de la polarité des microtubules entre le RE et l'appareil de Golgi, avec leurs extrémités (+) vers le RE et leurs extrémités (-) vers le Golgi, le rôle crucial des dynéines et du complexe dynéine-dynactine dans le trafic antérograde RE-Golgi (Burkhardt et al., 1997; Gupta et al., 2008) et des kinésines comme Kif1C, Kif5B et Rabkinésine 6 dans le transport rétrograde Golgi-RE (Lippincott-Schwartz et al., 1995; Dorner et al., 1998; Echard et al., 2000; Stauber et al., 2006) semble plutôt logique (**Figure 26**). L'invalidation du gène de kif1c ou de kif5b ne conduit pas à une perturbation de ce transport suggérant que la fonction de ces protéines motrices dans le transport Golgi-RE est redondant (Tanaka et al., 1998; Nakajima et al., 2002). De plus, la morphologie et la mobilité du compartiment intermédiaire ERGIC situé entre le RE et le Golgi sont régulées par la dynéine et Kif5B (Tomas et al., 2010).

Par contre, le rôle de Kif5B dans le transport antérograde RE-Golgi (Gupta et al., 2008) semble incohérent au vu de la polarité des microtubules entre ces deux compartiments (**Figure 26**).

Dans l'appareil de Golgi

La dynéine cytoplasmique est un moteur moléculaire essentiel à l'organisation des compartiments intracellulaires y compris l'appareil de Golgi (Harada et al., 1998), puisque son implication a été montrée dans la localisation centrosomale de l'appareil de Golgi (Corthesy-Theulaz et al., 1992). De plus, KifC3, une C-kinésine qui se dirige vers l'extrémité (-) des microtubules et la Rabkinésine6 ou Kif20A, cruciale pour la cytokinèse, joue également un rôle dans l'organisation du Golgi (Xu et al., 2002). Parmi les autres kinésines, Kif5B et Kif3 semblent avoir une influence sur l'architecture du Golgi (Feiguin et al., 1994; Stauber et al., 2006) (**Figure 26**).

Enfin, la rabkinésine 6 est également essentielle pour le transport intragolgien (Echard et al., 1998) (**Figure 26**).

Entre le Golgi et la membrane plasmique

La dynéine cytoplasmique est localisée dans le Golgi (Vaisberg et al., 1996) mais également dans les lysosomes (Harada et al., 1998) et les endosomes (Lin and Collins, 1992) où elle joue un rôle essentiel notamment dans le transport rétrograde vers le Golgi (Ligon et al., 2004; Hehnlly et al., 2006).

Parmi les kinésines, Kif5B est essentielle pour le transport de protéines membranaires entre le Golgi et la membrane plasmique (Kreitzer et al., 2000; Jaulin et al., 2007).

Il est intéressant de noter que compte tenu de la polarité des microtubules entre le Golgi et la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales de l'intestin (extrémités (-) à la périphérie) (**Figure 27**), la dynéine cytoplasmique peut être également impliquée dans le transport des membranes dérivées du Golgi vers la membrane plasmique apicale dans ces cellules (Fath et al., 1994).

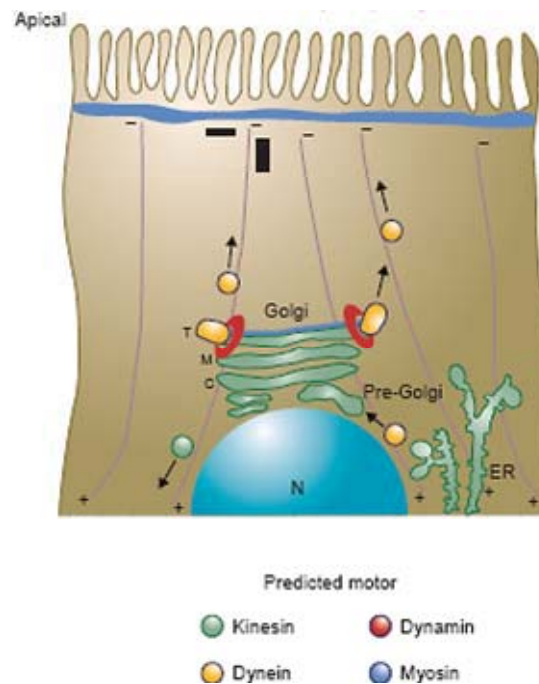


Figure 27 : La polarité des microtubules dans les cellules épithéliales de l'intestin et les moteurs moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire
(D'après Allan et al., 2002)

Pour conclure, comme nous pouvons le voir dans la **Figure 26**, il reste beaucoup d'interrogations sur les rôles respectifs des moteurs moléculaires associés aux microtubules dans les différentes étapes du trafic intracellulaire qui ne sont pas cohérents avec l'orientation des microtubules dans les cellules.

III.2.4.e. Rab6 et les moteurs moléculaires

Le transport de vésicules dans l'axone est perturbé en présence d'un excès de GTP γ S suggérant le rôle éventuel des petites protéines G (telles que les Rab) dans la régulation de l'association de moteurs aux cargos ou à l'activation de ces moteurs (Bloom et al., 1993)

De plus, contrairement à la forme GDP, la forme GTP des protéines Rab possède la capacité à recruter des moteurs moléculaires au niveau des compartiments intracellulaires, ce qui fait des membres de cette famille de bons candidats dans la fonction de régulateurs de l'association et dissociation entre les moteurs moléculaires et leurs organites cibles. Parmi les protéines Rab, Rab3, Rab5 et Rab6 ont déjà été décrites comme interagissant avec les moteurs moléculaires. Etant donné que Rab5 et Rab3 jouent un rôle dans la régulation de l'endocytose, et que nous étudions dans cette thèse le transport d'un récepteur du soma vers le compartiment dendritique, nous nous sommes intéressés uniquement à Rab6.

Lien entre Rab6 et la Rabkinesine 6

Nous mentionnerons tout d'abord la rabkinésine 6 (Echard et al., 1998), la première motrice à avoir été identifiée comme effecteur de Rab6, elle est également appelée KIF20A, RabKIFL (Hill et al., 2000) ou encore MKLP2 (Neef et al., 2003). C'est une protéine motrice ubiquitaire, interagissant spécifiquement avec la forme active Rab6-GTP et colocalisant avec des marqueurs du Golgi médian. Elle est par conséquent située sur les membranes de l'appareil de Golgi et est impliquée dans le transport rétrograde du Golgi vers le RE (Echard et al., 1998).

Lien entre Rab6, son effecteur Bicaudal et le complexe dynéine/dynactine

De plus, il y a une dizaine d'années, l'équipe du Dr Hoogenraad a démontré le rôle essentiel de Rab6 dans la formation du complexe dynéine/dynactine au niveau du Golgi, à travers son interaction directe avec son effecteur BICD1/2.

Cela a commencé par l'identification de la protéine BicaudalD 2 (BICD2) s'associant à la dynéine et aux sous-unités p150^{glued} et p50/dynamitine de la dynactine et permettant ainsi

la formation du complexe dynéine-dynactine à la surface des membranes de l'appareil de Golgi (Hoogenraad et al., 2001). BICD2 est une protéine adaptatrice cruciale pour la formation du complexe Rab6-dynactine (Short et al., 2002), elle interagit directement avec Rab6-GTP et des colocalisations entre ces deux protéines sont observées au niveau du réseau transgolgien (TGN) et dans des vésicules cytoplasmiques (**Figure 28**). L'interaction de Rab6-GTP avec la protéine p150^{glued}, une autre sous-unité de la dynactine, permet le recrutement de cette dernière à la membrane du Golgi (Short et al., 2002). Cette interaction semble avoir été décrite auparavant par l'équipe du Dr Goud qui avait montré qu'une protéine, présentant un poids moléculaire de 150 kDa et ayant un très large domaine coiled-coil, interagit avec la forme Rab6-GTP, mais ne connaissant pas sa fonction, les auteurs l'avaient désigné « clone1 » (Cuif et al., 1999; Echard et al., 2000). L'association de BICD1/2 à la membrane du Golgi est Rab6-dépendante et la surexpression de BICD2 favorise le recrutement du complexe dynéine-dynactine dans les vésicules Rab6 et le transport rétrograde COPI-indépendant entre le Golgi et le RE (Matanis et al., 2002).

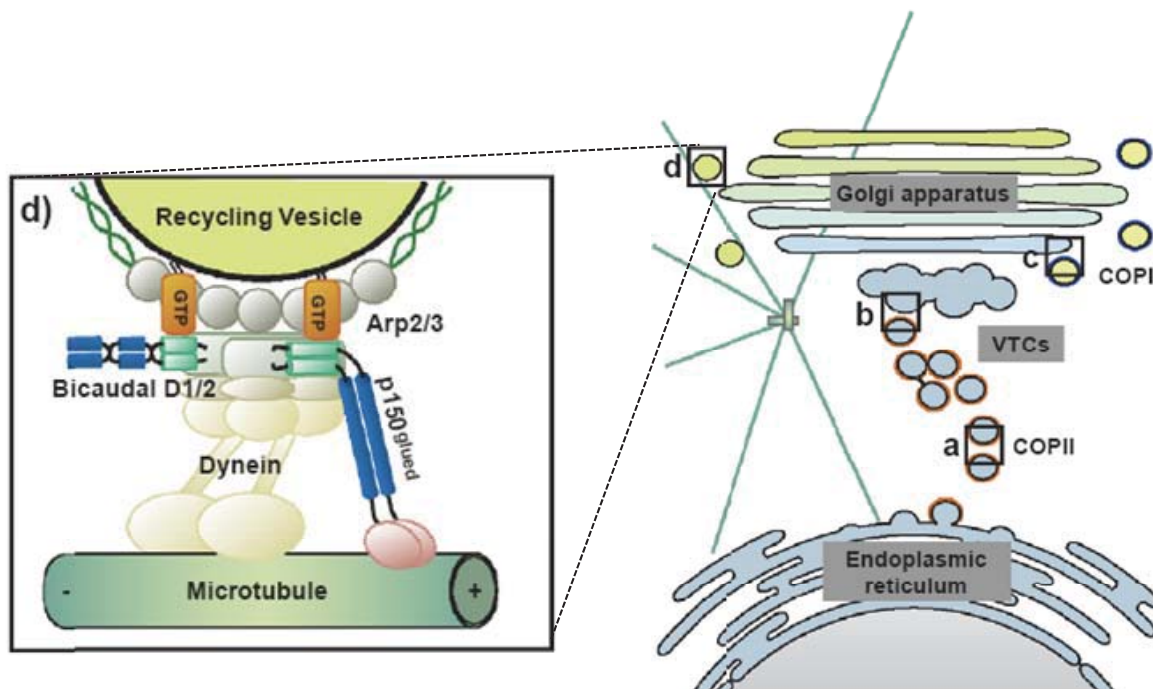


Figure 28 : Rab6 et ses effecteurs dans les membranes de l'appareil de Golgi

Au niveau des membranes du Golgi, Rab6-GTP (en orange) se lie au complexe dynéine-dynactine à travers son interaction directe avec Bicaudal D1/2 (D'après Short et al., 2005).

Lien entre Rab6, son effecteur Bicaudal et Kif5B

BICD2 interagit également avec Kif5B ce qui explique que Rab6, à travers cette interaction, assure le mouvement Kif5B-dépendant de vésicules sécrétées du Golgi vers les extrémités (+) des microtubules (Grigoriev et al., 2007) et donc par conséquent le transport antérograde. Ces résultats expliquent non seulement que les mutants de Rab6 présentent des défauts d'exocytose durant l'oogénèse chez la Drosophile (Coutelis and Ephrussi, 2007) mais également le rôle de Rab6 dans le trafic des protéines membranaires telle que la rhodopsine qui est considérée, rappelons-le, comme le prototype des RCPG (Deretic, 1998) ou le récepteur β 2-adrénérgique (Dong and Wu, 2007).

En conclusion, en recrutant BICD1/2 au niveau du réseau transgolgien, Rab6 semble être importante dans le transport bidirectionnel intracellulaire le long des microtubules.

Lien entre Rab6B et le complexe dynéine/dynactine

Pour conclure, le complexe dynéine/dynactine se lie également à Rab6B, l'isoforme de Rab6 spécifique des neurones, à travers BicaudalD1 (Wanschers et al., 2007), suggérant ainsi un rôle de Rab6 dans le transport antérograde ou rétrograde dans les neurones.

Enfin, il est intéressant de noter qu'une interaction directe entre Rab6A, Rab6A', Rab6B et la dynéine a été démontrée dans les membranes du Golgi (Wanschers et al., 2008).

Nous allons finir cette partie introductive en rappelant quelques données existantes sur le trafic intracellulaire neuronal polarisé dépendant des microtubules et impliquant certains moteurs moléculaires.

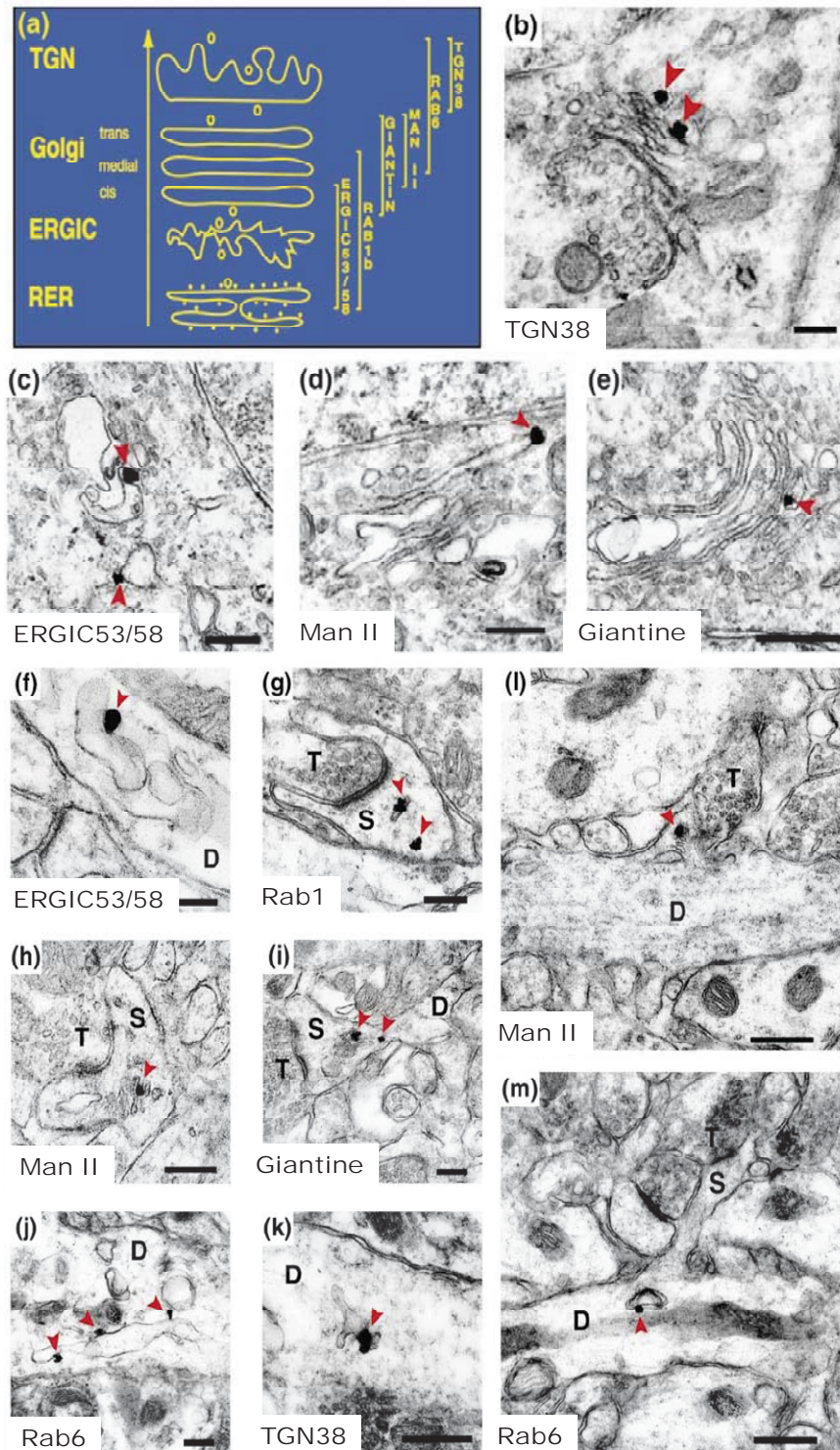


Figure 29 : Mise en évidence par microscopie électronique, d'une voie de sécrétion dans les dendrites distales de l'hippocampe

(a) Illustration de la distribution de marqueurs connus dans la voie de sécrétion du RE au TGN. Localisation subcellulaire de ces compartiments dans le soma (b à e) et dans les dendrites (f à m). (D'après Pierce et al., 2001).

IV. Le rôle des microtubules dans le trafic neuronal polarisé

IV.1. *Les neurones : des cellules polarisées*

Les neurones sont le « summum de la spécialisation cellulaire » (Horton and Ehlers, 2003a), cette spécialisation morphologique et fonctionnelle permet d'assurer la détection, la transmission et le stockage de l'information indispensable aux organismes supérieurs. Cette polarisation est la séparation entre le compartiment axonal, où se propagent les potentiels d'action et où s'organisent les terminaisons présynaptiques libérant les neurotransmetteurs, et le compartiment somatodendritique, où sont présentes les spécialisations postsynaptiques qui intègrent les signaux envoyés par les neurones afférents (Craig and Banker, 1994).

IV.2. *Les « RE mobiles » et les « Golgi Outposts »*

IV.2.1. *Localisation de ces « mini-organites » dans les neurones*

L'existence de marqueurs du RE, du compartiment intermédiaire (ERGIC), du Golgi et du réseau transgolgien avaient été démontrée initialement dans les dendrites proximales par microscopie à fluorescence dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe (Krijnse-Locker et al., 1995). Une étude publiée il y a une dizaine d'années a montré par microscopie électronique sur des coupes d'hippocampe de rat, l'existence de RE, de Golgi et même d'ERGIC dans les dendrites et les épines dendritiques distales (**Figure 29**), suggérant ainsi l'existence d'un système membranaire satellite proche des synapses et ressemblant à celui retrouvé dans le soma. Grâce à ces organites dendritiques retrouvés à la proximité des épines, le transport vésiculaire de protéines y compris de récepteurs membranaires, peut avoir lieu localement et rapidement permettant ainsi une plasticité neuronale en réponse à une modification de l'activité dans la synapse (Pierce et al., 2001).

Puis, Horton et Ehlers ont montré que dans les neurones, les protéines sont transportées entre le RE et le Golgi selon deux modes possibles. En effet, dans tous les neurones, les vésicules cargos bourgeonnent à partir du RE dans les sites de sortie (ERES)

présents dans le soma et les dendrites, et sont transportées vers le Golgi (Horton and Ehlers, 2003b). Dans cet article, ils montrent également que les ERES présentent un transport bidirectionnel dans les dendrites. En ce qui concerne le Golgi, dans certains neurones, il est présent uniquement dans le soma, les ERES parcourent donc de longues distances pour fusionner avec le Golgi. Alors que dans d'autres neurones, en plus du Golgi somatique, sont présents de nombreux Golgi dendritiques ou « Golgi ouposts » impliqués également dans la sécrétion et permettant ainsi aux ERES de parcourir de très courtes distances (**Figure 30**).

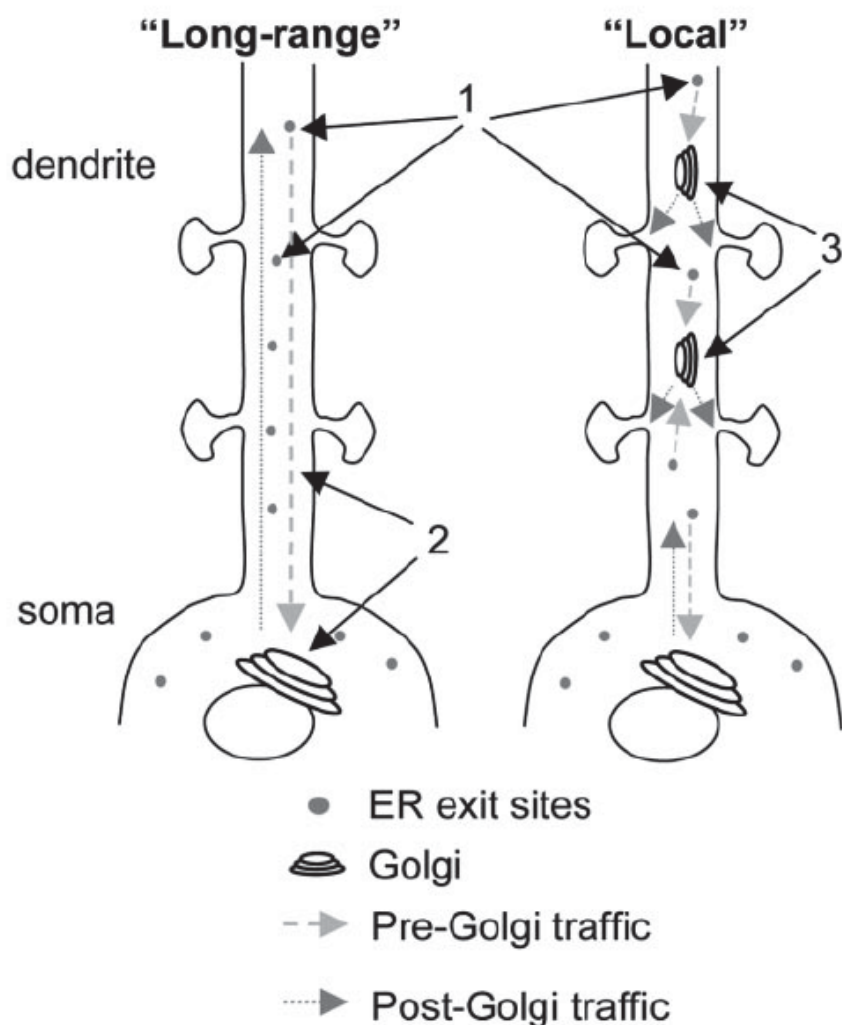


Figure 30 : Les deux modes possibles de transport entre le RE et l'appareil de Golgi dans les neurones

(D'après Horton and Ehlers, 2003b)

Les protéines des manteaux COPII Sec23 et Sar1 présentes dans les ERES jouent un rôle essentiel dans la croissance dendritique (Ye et al., 2007) et axonale (Aridor and Fish, 2009).

Enfin, il est intéressant de noter que la dynéine est le moteur moléculaire clé du transport des « Golgi Outposts » vers les dendrites proximales spécifiquement (Zheng et al., 2008). Cette localisation spécifique du Golgi joue un rôle dans l'architecture dendritique des neurones pyramidaux puisqu'elle détermine la formation de la dendrite apicale caractéristique de ces types de neurones (Horton et al., 2005).

IV.2.2. Rôle de ces « mini-organites » dans l'adressage neuronal de cargos

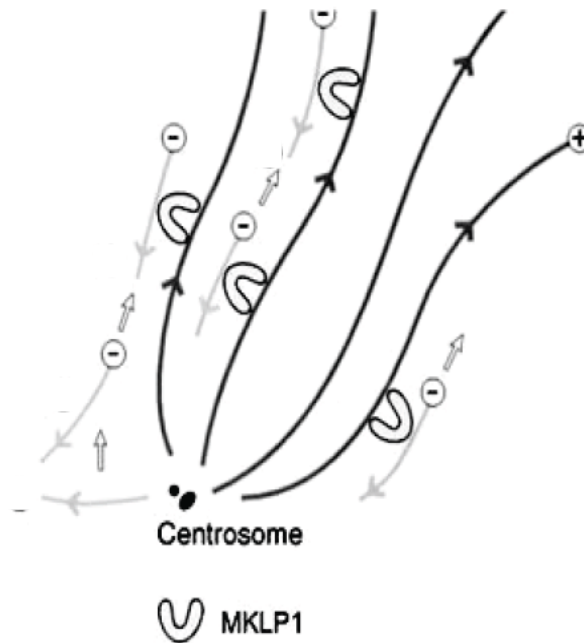
Des expériences de vidéomicroscopie montrent sur des neurones d'hippocampe de rat en culture vivants, que le mode de transport assuré par des Golgi Outposts est emprunté par la protéine membranaire VSVG (vesicular stomatitis virus glycoprotein) d'une part, protéine utilisée pour les études de transport antérograde mais également par le BDNF d'autre part, facteur neurotrophique sécrété essentiel notamment pour la neurogénèse (Horton and Ehlers, 2003b).

Une étude a montré que les vésicules cargos contenant des sous-unités NR1 du récepteur NMDA sont recrutées par la protéine Sar1 dans les ERES présents dans les dendrites distales (Aridor et al., 2004) alors que Sec24, une protéine du même complexe est essentielle dans l'adressage du transporteur GABA-1 vers l'axone (Farhan et al., 2008; Reiterer et al., 2008).

Plus récemment, une étude concernant l'adressage dendritique des récepteurs glutamatergiques a montré que les sous-types AMPA sont transportés à la membrane plasmique via une voie classique impliquant le Golgi somatique alors que les sous-unités NR1 et NR2B des récepteurs NMDA empruntent une voie non conventionnelle contournant le Golgi somatique et impliquant des compartiments appelés « RE mobile » qui se déplacent très rapidement dans les dendrites pour remettre ces récepteurs aux Golgi Outposts (Jeyifous et al., 2009).

Les moteurs moléculaires présents dans les neurones sont donc à l'origine de l'adressage des organites mais aussi de nombreux cargos vers l'axone ou les dendrites.

A



B

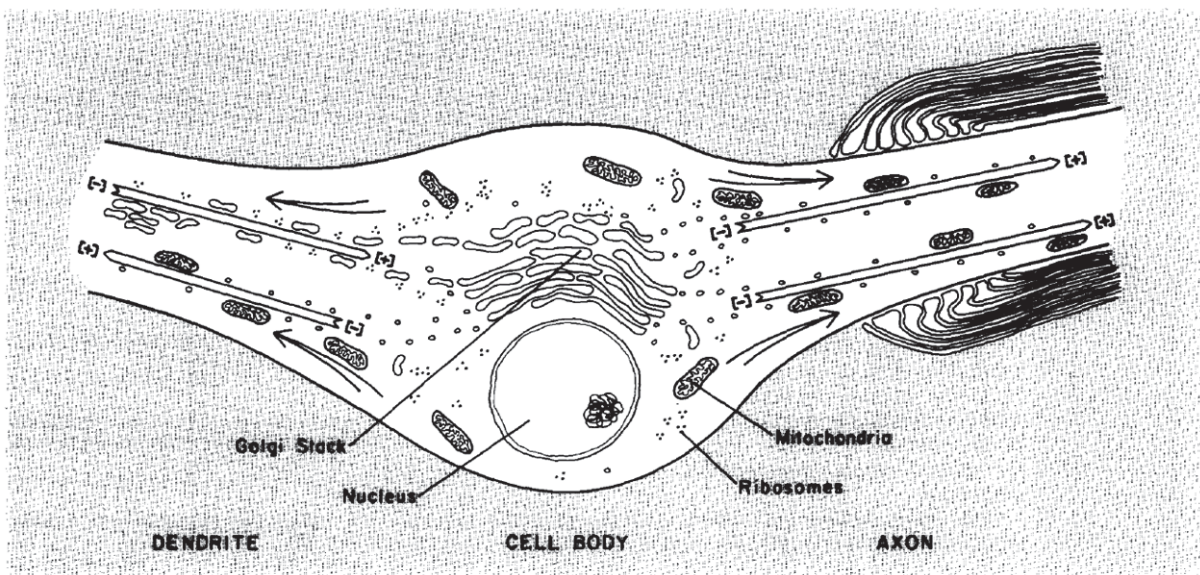


Figure 31 : L'organisation mixte des microtubules dans les dendrites proximales

A- Modèle représentant la formation, par MKLP-1, des microtubules à polarité non uniforme dans les dendrites proximales. Les symboles (-) et (+) indiquent les extrémités des microtubules (polarité aussi symbolisée par la flèche). MKLP-1 capte et ponté les microtubules de façon antiparallèle puis transporte les brins à polarité inversée vers la périphérie (D'après Kobayashi et al., 1998).

B- Représentation schématique illustrant l'orientation de la polarité des microtubules dans l'axone et les dendrites ainsi que le transport sélectif d'organites le long de ces microtubules (D'après Baas et al., 1989).

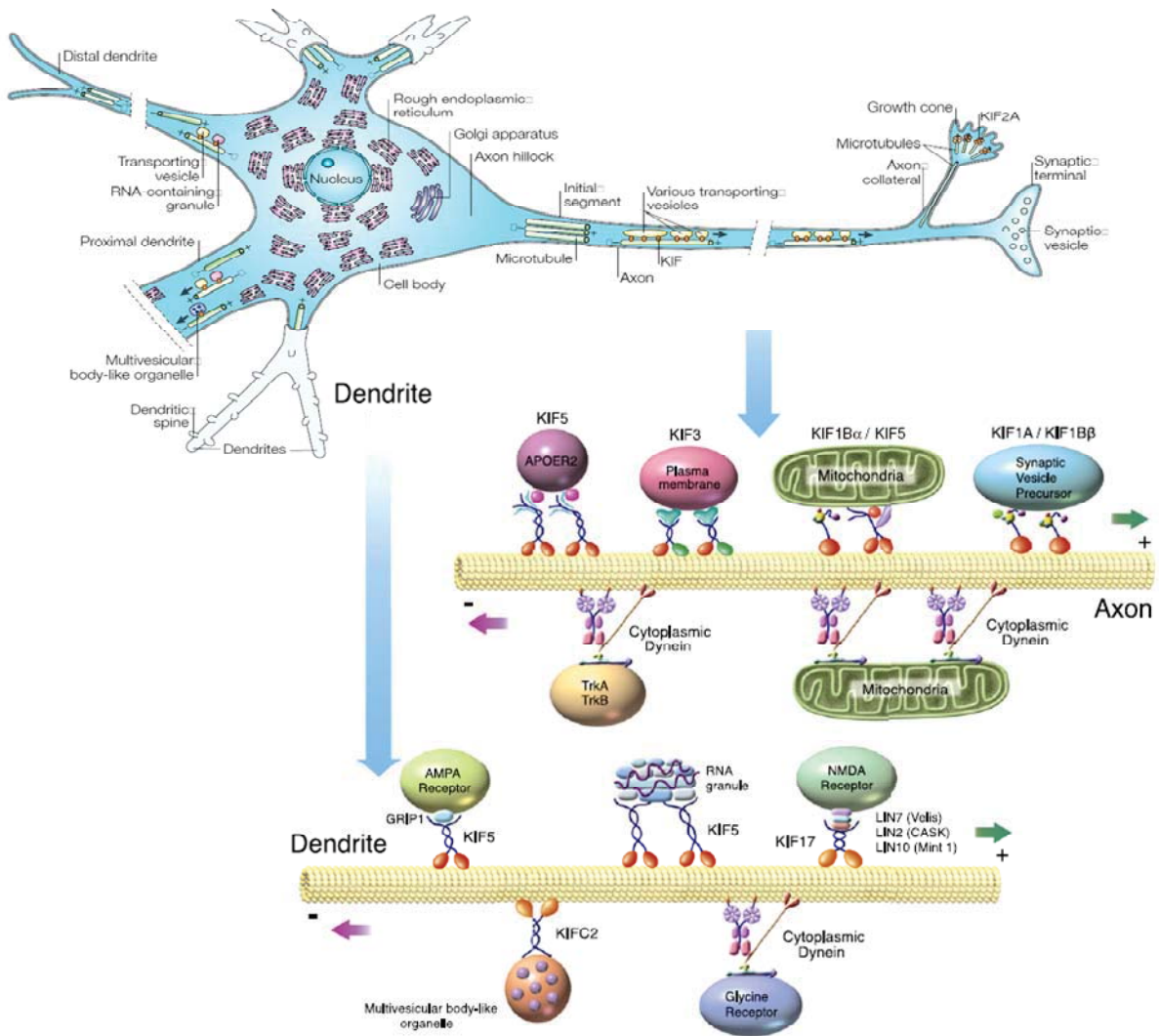
IV.3. L'organisation des microtubules dans les neurones

L'organisation des microtubules dans les neurones, et donc, par conséquent, les moteurs moléculaires impliqués dans le transport, peuvent être à l'origine de la sélectivité de l'adressage polarisé de vésicules cargo. En effet, les microtubules axonaux présentent une orientation uniforme avec leur extrémité (+) vers la partie distale de l'axone (Baas et al., 1988). En revanche, les microtubules des dendrites proximales présentent une polarité mixte avec des extrémités (+) et (-) orientées vers la partie distale, alors que ceux des dendrites distales, tout comme dans l'axone, ont une polarité uniforme avec leur extrémité (+) orientée vers la partie distale des dendrites (Baas et al., 1988).

La polarité mixte des microtubules dans les dendrites proximales est expliquée par le recrutement dans les neurones de la kinésine CHO1/MKLP1 transportant, comme nous pouvons le voir dans la **Figure 31A**, des microtubules du soma vers les dendrites en croissance, permettant ainsi la mise en place de ces microtubules antiparallèles dans les dendrites proximales (Sharp et al., 1996; Sharp et al., 1997). L'inhibition de l'expression de MKLP1 dans les cultures de neurones conduit à une rapide redistribution des microtubules dans les dendrites qui acquièrent la même organisation des microtubules que l'axone, c'est-à-dire, une polarité uniforme avec des extrémités (+) vers la partie distale (Yu et al., 1997).

Par conséquent, les kinésines qui se déplacent vers les extrémités (+) sont des protéines motrices capables de transporter des cargos du soma vers l'axone et/ou les dendrites et les dynéines qui se déplacent vers les extrémités (-) permettraient l'adressage de cargos spécifiquement vers les dendrites (Kapitein et al., 2010). Ce phénomène (**Figure 31B**), avait déjà été soupçonné il y a 20 ans pour expliquer la localisation dendrite-spécifique du Golgi et des ribosomes (Black and Baas, 1989).

A



B

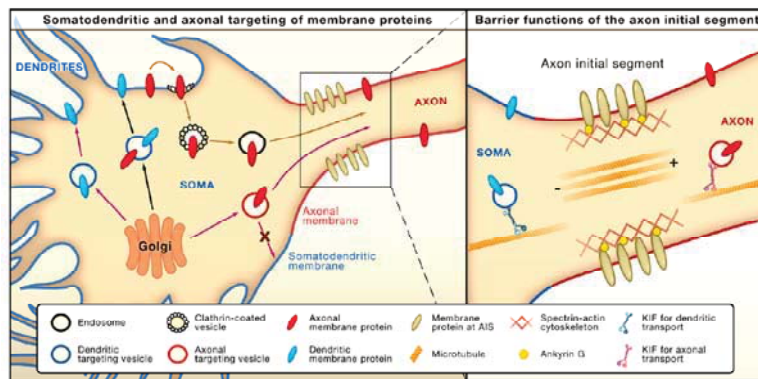


Figure 32 : Les kinésines dans le trafic dendritique et axonal

A- Exemples de transport de cargo le long des microtubules dendritiques et axonaux (D'après Hirokawa and Takemura, 2005; et Hirokawa et al., 2010).

B- Le rôle des ankyrines du segment initial de l'axone comme filtre sélectif d'adressage axonal (D'après Xiao and Jan, 2009).

IV.4. Les principaux moteurs moléculaires impliqués dans le transport neuronal polarisé

IV.4.1. Les kinésines impliquées dans le transport neuronal

Les moteurs moléculaires impliqués dans le transport axonal sont davantage étudiés que ceux impliqués dans le trafic dendritique. Le transport axonal est crucial pour le transport des vésicules contenant les neurotransmetteurs vers les terminaisons nerveuses. Des anomalies dans ce transport peuvent être à l'origine de maladies neurodégénératives telles que Huntington, Alzheimer ou encore la sclérose latérale amyotrophique (De Vos et al., 2008). Kif5B et Kif17 sont les principales kinésines connues pour jouer un rôle dans le transport neuronal de récepteurs et de canaux ioniques (Hirokawa et al., 2009), ce transport est impliqué dans certaines fonctions supérieures du cerveau. En effet, une meilleure capacité de mémoire et d'apprentissage est observée chez les souris surexprimant Kif17 (Wong et al., 2002) ou Kif5B (Puthanveetil et al., 2008).

Kif17 est impliquée dans l'adressage de cargos spécifiquement vers les dendrites alors que Kif5B peut transporter des cargos dans l'axone et dans les dendrites (**Figure 32A**).

Dans la classe des kinésine-1, en plus de Kif5B qui est ubiquitaire (uKHC), il existe deux autres isoformes spécifiques des neurones, Kif5A et Kif5C (Kanai et al., 2000). Ces 3 isoformes forment des homodimères et des hétérodimères et semblent avoir des fonctions similaires (Kanai et al., 2000). Kif5B transporte dans l'axone de nombreuses protéines y compris le récepteur TrkB (Arimura et al., 2009), le récepteur GABA_A (Twelvetrees et al.) mais aussi le canal Kv3 (Xu et al., 2010) ou encore la syntaxine (Su et al., 2004). KIF5B est également impliquée dans le transport dendritique comme le montre notamment l'étude sur les sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA (Setou et al., 2002) (**Figure 32A**).

Le rôle de Kif5B dans l'adressage axonal et dendritique peut être expliqué par le fait que certains cargos transportés par Kif5B seraient suffisamment efficaces pour traverser le filtre sélectif constitué des ankyrines du segment initial de l'axone (**Figure 32B**) alors que d'autres ne le seraient pas et seraient dirigés vers les dendrites (Song et al., 2009).

Kif17 qui appartient à la famille des kinésine-2, est caractérisée par sa localisation somatodendritique. Kif17 dirige l'adressage dendritique de récepteurs tels que la sous-unité NR2B du récepteur NMDA (Setou et al., 2000; Guillaud et al., 2003) ou bien le récepteur

GluR5 (Kayadjanian et al., 2007), mais également de canaux ioniques, comme par exemple le canal potassique Kv 4.2 (Chu et al., 2006) (**Figure 32A**).

La sélectivité de l'adressage vers les dendrites des cargos NR2B et GluR2 par Kif17 semble être expliquée par l'incapacité de ces complexes cargos-Kif à traverser le segment initial de l'axone (Song et al., 2009) (**Figure 32B**).

Il est intéressant de noter que certaines protéines motrices comme les C-kinésines peuvent assurer le transport rétrograde d'organites dans les dendrites (Saito et al., 1997), cette capacité vient du fait que ces kinésines se déplacent vers l'extrémité (-) des microtubules (**Figure 32A**).

IV.4.2. Les dynéines dans le transport neuronal

Le transport rétrograde axonal assuré par les dynéines (Lalli et al., 2003) est impliqué également dans des maladies neurodégénératives (Hafezparast et al., 2003) mais également dans le transport des récepteurs de la glycine (Fuhrmann et al., 2002; Maas et al., 2006), des récepteurs aux neurotrophines, TrkA (Moises et al., 2007), p75 (Lalli and Schiavo, 2002) et TrkB (Deinhardt et al., 2006) ou encore le transport d'organites membranaires (Hirokawa et al., 1990) tels que les mitochondries (Russo et al., 2009).

Les dynéines sont également impliqués dans le transport des « Golgi outposts » vers les dendrites (Zheng et al., 2008), suggérant qu'elles peuvent jouer un rôle important dans la machinerie de sécrétion dendritique. De plus, il est intéressant de noter que la rhodospine, le prototype des RCPG, interagit physiquement avec les chaînes légères de la dynéine qui pourrait donc être impliquée dans le transport postgolgien des récepteurs dans les cellules photoréceptrices (Tai et al., 1999).

Enfin, les dynéines dirigent spécifiquement les sous-unités GluR2 des récepteurs-canaux AMPA vers les dendrites puisque leur inhibition conduit à la redistribution anormale des récepteurs dans l'axone (Kapitein et al., 2010). Ce fait est à rapprocher des données qui montrent un rôle de Kif5B dans le transport dendritique des sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA (Setou et al., 2002). Ces deux études suggèrent que le même récepteur peut dépendre de deux moteurs moléculaires pour son transport dendritique mais que la dynéine assure la spécificité d'adressage vers les dendrites étant donné, rappelons-le, que Kif5B peut diriger non seulement vers les dendrites mais également vers l'axone.

IV.4.3. La coordination entre les dynéines et les kinésines dans les neurones

Il a été rapporté que l'interaction de la dynéine à la sous-unité p150^{glued} de la dynactine est essentielle pour le transport rétrograde axonal (Waterman-Storer et al., 1997).

De plus, la présence de la protéine p150^{glued} joue un rôle essentiel dans le transport bidirectionnel des mitochondries dans les neurones de *Drosophila* (Martin et al., 1999; Pilling et al., 2006). La dynactine permettrait à la dynéine de participer activement dans ce transport en augmentant sa stabilité, et rester active pendant le mouvement vers l'extrémité « - » et en la laissant inactive pendant le mouvement vers l'extrémité « + » (Gross et al., 2002). La dynactine (p150^{glued}) joue ainsi un rôle crucial dans la coordination indispensable entre les dynéines et les kinésines durant un transport bidirectionnel (**Figure 33**).

Les dynactines interagissent physiquement avec la kinesin-1 dans le cerveau (Ligon et al., 2004) ce qui permettrait le transport des dynéines et donc la localisation dans des sites spécifiques où elles doivent être fonctionnelles. En effet, il a été montré très récemment que le transport antérograde du complexe dynéine/dynactine vers la partie distale de l'axone est assuré par KIF5B (Yamada et al., 2010).

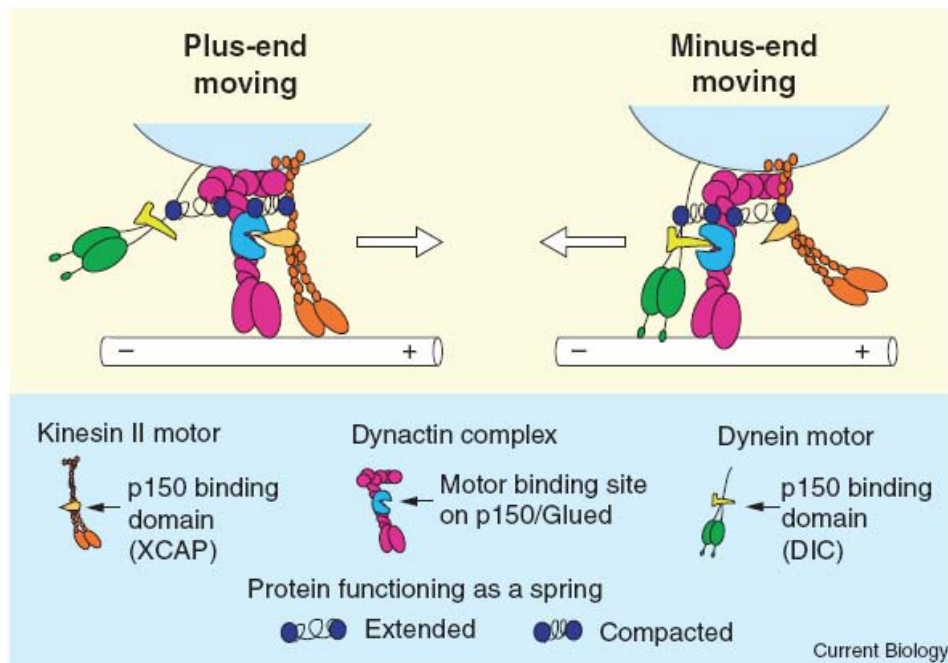


Figure 33 : La dynactine assure la coordination du transport bidirectionnel impliquant deux moteurs moléculaires se déplaçant dans des sens opposés

(D'après Gross et al., 2002)

IV.4.4. Les protéines d'échafaudage impliquées dans la formation de complexes cargo-moteur moléculaire

Toutes ces interactions entre les vésicules cargos et les moteurs moléculaires requièrent des protéines d'échafaudage permettant ainsi le transport de ces cargos le long des microtubules.

Nous pouvons citer la protéine GRIP pour le recrutement de Kif5B dans les cargo contenant le récepteur AMPA (Setou et al., 2002) ou mLin/CASK/SAP97 pour le complexe Kif17/NMDA (**Figure 32A**). Ces protéines d'échafaudage ont des domaines PDZ reconnus par des motifs consensus présents dans la séquence de certains récepteurs.

Parmi les RCPG, les récepteurs sérotoninergiques comme les récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} et 5-HT₄ ont des protéines à domaine PDZ comme partenaires qui peuvent différer selon que ces récepteurs sont pré ou post-synaptiques (Bockaert et al., 2004a).

En revanche, le récepteur 5-HT_{1A} étudié dans cette thèse n'a pas de séquence reconnue par les domaines PDZ.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Mon projet de thèse s'est inscrit dans la continuité des travaux engagés au sein de l'équipe de Michèle Darmon concernant l'élucidation des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'adressage somatodendritique du récepteur 5-HT_{1A} de la sérotonine. Les études antérieures réalisées au laboratoire ont mis en évidence le rôle crucial de l'extrémité C-terminale du récepteur dans le trafic du 5-HT_{1A}R vers les dendrites. Cependant, le mécanisme par lequel cette région est impliquée dans l'adressage du récepteur vers les dendrites était encore incompris. L'existence de partenaires jouant le rôle de protéines d'adressage pouvait être une voie de recherche intéressante. En effet, de telles interactions ont été démontrées, notamment avec les protéines à domaines PDZ, qui participent au regroupement et à l'adressage de certains récepteurs neuronaux dans des compartiments subcellulaires particuliers. Le récepteur 5-HT_{1A} n'a pas de séquence consensus reconnue par ces protéines mais, par analogie, il était tentant d'imaginer pour lui aussi l'existence de protéines impliquées dans leur adressage.

Lors de mon arrivée, l'équipe venait d'identifier la première protéine interagissant avec l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A} à l'aide de la technique du double hybride réalisée *in vivo* chez la levure. Cette protéine, Yif1B, n'avait jamais été caractérisée chez les mammifères, mais elle a tout de même été sélectionnée parmi les autres candidats, étant donné son fort score d'interaction et de par le rôle connu de son orthologue chez la levure (Yif1p) dans le trafic vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi.

Le premier objectif de mon travail lors de mon arrivée au laboratoire a donc consisté à confirmer *in vitro* l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et sa protéine partenaire Yif1B. En parallèle, d'autres expériences de l'équipe ont révélé le rôle de cette protéine dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}. L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet du premier article inclus dans ce mémoire.

Dans cet article, nous démontrons que le rôle de Yif1B en tant que partenaire d'adressage semble être spécifique au récepteur 5-HT_{1A} malgré son expression ubiquitaire. En effet, alors que les extrémités C-terminales des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} présentent une forte homologie de séquence, Yif1B n'interagit pas avec le récepteur 5-HT_{1B}. De plus, l'adressage de trois autres récepteurs somatodendritiques a été étudié et, contrairement au récepteur 5-HT_{1A}, leur distribution n'a pas été perturbée après inhibition de l'expression de Yif1B.

En résumé, nous avons ainsi montré que l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et sa protéine partenaire Yif1B joue un rôle crucial dans l'adressage du récepteur vers les dendrites distales.

Suite à ce premier article, une question s'est naturellement posée : Comment une protéine ubiquitaire, impliquée dans le trafic intracellulaire général (chez la levure), pourrait avoir un rôle dans l'adressage spécifique d'un récepteur dans un compartiment spécialisé du neurone. Autrement dit, comment Yif1B pourrait elle jouer un rôle spécifique dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A} ?

Pour y répondre, nous avons proposé deux axes de recherche constituant mon projet de thèse:

- D'une part, la caractérisation des acides aminés impliqués dans l'interaction du récepteur 5-HT_{1A} avec sa protéine partenaire.
- D'autre part, l'identification d'autres protéines du trafic intracellulaire impliquées dans le complexe d'adressage 5-HT_{1A}/Yif1B. En effet, la composition du complexe macromoléculaire pourrait déterminer la sélectivité de ce transport neuronal vers les dendrites exclusivement.

RESULTATS

I. Yif1B est une protéine cruciale pour l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites distales des neurones (article 1)

I.1. Yif1B est la première protéine partenaire identifiée interagissant avec l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}

Pour comprendre le mécanisme par lequel l'extrémité C-terminale du récepteur est impliquée dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}, nous nous sommes proposés d'identifier des partenaires protéiques d'adressage. Ce projet a été mené en collaboration avec Catherine Borg-Capra de la société Hybrigenics, société spécialisée dans la technique du double hybride. L'équipe de Michèle Darmon a construit les hameçons et la société Hybrigenics a préparé la banque et réalisé le criblage. Les hameçons construits étaient des protéines de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et la région du récepteur 5-HT_{1A} importante pour son adressage : la boucle I3, l'extrémité C-terminale ou la boucle I3 jointe à l'extrémité C-terminale. La banque criblée a été une banque d'ADNc d'hippocampe de rat puisque l'ARNm du récepteur y est exprimé à des niveaux plus élevés qu'ailleurs. L'entreprise Hybrigenics avait communiqué à l'équipe la liste des clones positifs identifiés. Cette liste contenait notamment le nom du gène, s'il était connu, correspondant à la séquence du clone obtenu par comparaison avec la banque de données GenBank, ainsi qu'un score appelé PBS (Predicted Biological Score) indicateur de la fiabilité de l'interaction.

Malgré la courte séquence de l'extrémité C-terminale du récepteur, l'analyse a permis l'identification de nombreux partenaires potentiels, au contraire des boucles I3 pour lesquels un nombre très faible de clones positifs ont été mis en évidence. Cette différence ne peut s'expliquer par une différence du nombre d'interactions testées, car celles-ci sont comparables. Par contre, ce résultat concorde avec ceux obtenus par criblage double-hybride dans le cas d'autres RCPG. Le peu d'interactions observées en général avec les boucles I3 résulterait de leur difficulté à atteindre une conformation native lorsqu'elles sont isolées du reste du RCPG (Bockaert et al., 2004b).

Parmi les protéines partenaires candidates, Michèle Darmon et ses collègues ont choisi d'étudier particulièrement la protéine Yif1B, qui interagit avec la région C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}. Elle n'avait jamais été caractérisée chez les mammifères. Leur choix a été motivé d'une part par le score PBS élevé et d'autre part par le fait que l'homologue de Yif1B

chez la levure, appelée Yif1p, soit localisée dans l'appareil de Golgi et joue un rôle crucial dans le transport vésiculaire (Matern et al., 2000). Michele Darmon et collaborateurs ont donc considéré qu'il s'agissait d'un excellent candidat dans la recherche de protéines participant à l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}.

Des faux positifs étant souvent obtenus avec la technique du double hybride, l'interaction biochimique a donc été étudiée par des expériences de GST Pull Down lors de mon stage de Master. Elles ont été réalisées en utilisant comme appât, l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A} fusionnée à la GST (GST-CT1A) et comme proie, la protéine Yif1B. Cette dernière a été extraite, à partir de lignées exprimant Yif1B de façon stable mais aussi à partir de différentes structures cérébrales d'intérêt : le cervelet, l'hippocampe et le raphé, Yif1B étant exprimé de façon endogène dans toutes ces régions. L'interaction entre l'extrémité C-terminale et Yif1B a ainsi été confirmée par une méthode de biochimie *in vitro*. Précisons également que, malgré la forte homologie de séquence entre les extrémités C-terminales du 5-HT_{1A} et du 5-HT_{1B}, ce dernier n'interagit pas avec Yif1B, suggérant que l'interaction avec Yif1B pourrait être spécifique au récepteur 5-HT_{1A}.

1.2. Yif1B est exprimée de façon endogène dans les neurones de raphé

La production d'anticorps polyclonaux spécifiques anti-Yif1B par immunisation de lapins (avec un peptide N-terminal) a permis de montrer que cette protéine est ubiquitaire avec une forte expression dans le cerveau. De plus, Yif1B est présente dans les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal où est également exprimé le récepteur 5-HT_{1A}.

1.3. Yif1B colocalise avec le récepteur 5-HT_{1A} et cyclerait entre le RE et l'appareil de Golgi

Les expériences d'immunofluorescence de cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat ont permis l'observation de la localisation du récepteur 5-HT_{1A} et de sa partenaire Yif1B dans des mêmes vésicules. De plus, cette protéine colocalise également partiellement avec des marqueurs du RE et de l'appareil de Golgi dans des lignées cellulaires suggérant aussi son rôle éventuel dans le trafic intracellulaire.

1.4. Yif1B est cruciale pour l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites distales

L'inhibition de l'expression de Yif1B par des expériences de siRNA sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat transfectées avec le récepteur 5-HT_{1A}eGFP (5-HT_{1A} étiqueté eGFP en C-terminal), conduit à une forte perturbation de la distribution dendritique du récepteur. En effet, en absence de Yif1B, le récepteur 5-HT_{1A} se retrouve séquestré dans le soma et les dendrites proximales, montrant ainsi, un rôle fonctionnel de Yif1B dans l'adressage du récepteur vers les dendrites distales.

1.5. Le rôle de Yif1B semble être spécifique de l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}

Les mêmes expériences d'inhibition de l'expression de Yif1B par des siRNA ont été réalisées pour évaluer son implication éventuelle dans l'adressage de trois autres récepteurs dendritiques : le récepteur de la somatostatine (sst2A), le récepteur purinergique (P2X₂) et enfin le récepteur 5-HT_{3A} de la sérotonine. Aucune perturbation de distribution de ces récepteurs n'a été observée en absence de Yif1B, montrant ainsi que le rôle de cette protéine dans la répartition dendritique semble être spécifique pour le récepteur 5-HT_{1A}.

1.6. L'interaction du récepteur 5-HT_{1A} avec Yif1B est indispensable pour son adressage

Enfin, pour montrer le rôle de l'interaction 5-HT_{1A}/Yif1B dans l'adressage du récepteur vers les dendrites, nous avons transfecté des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat avec la construction 5-HT_{1A}-eGFP, en surexprimant ou non l'extrémité C-terminale du récepteur (CT1A). Cette extrémité CT1A en excès interagit par compétition avec Yif1B et perturbe fortement l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}-eGFP vers les dendrites distales.

Ce résultat nous permet de confirmer que l'extrémité du récepteur 5-HT_{1A} doit interagir physiquement avec sa protéine partenaire Yif1B pour qu'il puisse être normalement adressé vers les dendrites distales.

Article 1

**Targeting of the 5-HT_{1A} Serotonin Receptor to Neuronal
Dendrites is Mediated by Yif1B**

Carrel Damien, Masson Justine, Al Awabdh Sana, Lenkei Zolt, Borg Capra Catherine,
Hamon Michel, Emerit Michel-Boris and Darmon Michèle.

(Accepté dans le Journal of Neuroscience)

Targeting of the 5-HT_{1A} Serotonin Receptor to Neuronal Dendrites Is Mediated by Yif1B

Damien Carrel,^{1,2*} Justine Masson,^{1,2,3*} Sana Al Awabdh,^{1,2,3} Catherine Borg Capra,⁴ Zsolt Lenkei,⁵ Michel Hamon,^{1,2,3} Michel Boris Emerit,^{1,2,3} and Michèle Darmon^{1,2,3}

¹Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Site Pitié-Salpêtrière, Institut Fédératif de Recherche 70 des Neurosciences, Unité Mixte de Recherche (UMR) 677, F-75013 Paris, France, ²Inserm, U677, F-75634 Paris Cedex 13, France, ³Inserm, UMR 894, Paris F-75014, France, ⁴Hybrigenics, F-75014 Paris, France, and ⁵Laboratoire Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles–Centre National de la Recherche Scientifique, F-75005 Paris, France

The 5-HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}R) is the most extensively characterized serotonin (5-HT) receptor mainly because of its involvement in the mode of action of antidepressants. The 5-HT_{1A}R is confined to the somatodendritic domain of central neurons, where it mediates serotonin-evoked hyperpolarization. Our previous studies underlined the role of the short 5-HT_{1A}R C-terminal domain in receptor targeting to dendrites. We used this 17 aa region as bait in a yeast two-hybrid screen, and identified, for the first time, an intracellular protein interacting with the 5-HT_{1A}R. This protein is homologous to the yeast Yif1p, previously implicated in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus, but not yet characterized in mammals. We confirmed 5-HT_{1A}R–Yif1B interaction by glutathione *S*-transferase pull-down experiments using rat brain extracts and transfected cell lines. Yif1B is highly expressed in the brain, and specifically in raphe 5-HT_{1A}R-expressing neurons. Colocalization of Yif1B and 5-HT_{1A}R was observed in small vesicles involved in transient intracellular trafficking. Last, inhibition of endogenous expression of Yif1B in primary neuron cultures by small interfering RNA specifically prevented the addressing of 5-HT_{1A}R to distal portions of the dendrites, without affecting other receptors, such as sst2A, P2X₂, and 5-HT_{3A} receptors. Together, our results provide strong evidence that Yif1B is a member of the ER/Golgi trafficking machinery, which plays a key role in specific targeting of 5-HT_{1A}R to the neuronal dendrites. This finding opens up new pathways for the study of 5-HT_{1A}R regulation by partner proteins and for the development of novel antidepressant drugs.

Key words: Yif1B; 5-HT_{1A} receptor; dendrite; trafficking; GPCR; intermediate compartment

Introduction

Serotonin [5-hydroxytryptamine (5-HT)] is a neuromodulator acting through a large family of receptors for the regulation of a wide range of physiological functions in the CNS as well as in the periphery (Barnes and Sharp, 1999). Among these receptors, the 5-HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}R) is a Gi/Go-protein-coupled receptor (GPCR) that modulates adenylyl cyclase and MAP (mitogen-activated protein) kinase activities (Kushwaha et al., 2006; Turner et al., 2007), and acts as autoreceptor and heteroreceptor in brain (Lanfumeu and Hamon, 2004). It is localized at the plasma membrane of soma and dendrites (Sotelo et al., 1990; Kia et al., 1996;

Riad et al., 2000), where it controls the excitability pattern (Haj-Dahmane et al., 1991). In addition, the 5-HT_{1A}R is critically involved in the mode of action of antidepressant drugs, because its delayed desensitization is responsible, at least in part, for the delayed therapeutic efficacy in chronic treatment (Le Poul et al., 1995).

Because the 5-HT_{1A}R localization in dendritic membrane is closely related to its inhibiting effect on raphe neuron firing, it was important to investigate the mechanisms responsible for this localization. In contrast to other classes of receptors, little data are available on the intracellular trafficking and sorting of the serotonin receptors. Numerous studies on GPCRs have revealed that interaction of their carboxyl C-terminal domain with PDZ domain-containing proteins plays a critical role in the regulation of their desensitization/resensitization and trafficking (for review, see Bockaert et al., 2004). However, the 5-HT_{1A}R C terminus is a very short domain without any PDZ recognition motif. In previous studies, we have demonstrated that the C terminus of the 5-HT_{1A}R is implicated in its basolateral localization in epithelial cells (Darmon et al., 1998) and its dendritic targeting in neurons (Jolimay et al., 2000). Furthermore, we showed that a dileucine motif in the short cytosolic C-terminal domain is necessary for 5-HT_{1A}R export from the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane (Carrel et al., 2006). However, the pre-

Received Oct. 2, 2007; revised May 29, 2008; accepted June 21, 2008.

This work was supported by grants from Inserm, Université Pierre et Marie Curie, and European Community NewMood (LSHM-CT-2003-503474) Program. D.C. was a recipient of fellowships from the French Ministère de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale during performance of this work. We are grateful to Dr. Michel Maitre (Inserm U575, Strasbourg, France) and Dr. Michel Bornens (Unité Mixte de Recherche 144 Centre National de la Recherche Scientifique/Institut Curie, Paris, France) for their kind gifts of anti-tryptophan hydroxylase antibodies and anti CTR-433 antibody, respectively. We are indebted to Dr. Nacira Tabti for critical reading of this manuscript.

*D.C. and J.M. contributed equally to this work and should be considered joint first authors.

Correspondence should be addressed to Michèle Darmon, Inserm, Unité Mixte de Recherche 894, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75634 Paris Cedex 13, France. E-mail: michelle.darmon-guenoun@upmc.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4487-07.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/288063-11\$15.00/0

cise molecular mechanism by which the C terminus regulates receptor export to the dendrites remained to be clarified. Thus, we searched for proteins that would interact with 5-HT_{1A}R C terminus and contribute to 5-HT_{1A}R trafficking in neurons. Using the yeast two-hybrid screening procedure, we identified Yif1B, a homolog of the yeast Yif1p, as the first known protein interacting with the 5-HT_{1A}R C terminus. We confirmed this interaction by glutathione *S*-transferase (GST) pull-down experiments performed on Yif1B-transfected cell lines and brain extracts. Coexpression of 5-HT_{1A}R and Yif1B in the rat brain and their subcellular colocalization in transfected LLC-PK1 cells strongly support this partnership. Small interfering RNA (siRNA) inhibition of endogenous Yif1B expression in cultured neurons from rat embryos clearly demonstrated its decisive role in 5-HT_{1A}R dendritic targeting.

Materials and Methods

Antibodies. The following primary antibodies were used: rabbit anti-green fluorescent protein (GFP) antibody (Millipore Bioscience Research Reagents; 1:1000), mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (GE Healthcare; 1:5000), rabbit anti-actin antibody (Sigma; 1:2000) sheep anti-tryptophan hydroxylase (TPH) antibody (Ehret et al., 1991) (1:1000), mouse monoclonal anti-Flag M2 antibody (Sigma; 1:3000), rabbit anti-calregulin antibody (Santa Cruz Biotechnology; 1:100), mouse monoclonal anti-CTR433 antibody (Jasmin et al., 1989) (median Golgi; 1:200), rabbit anti-giantin antibody (CRP; 1:2000), and affinity-purified anti-5-HT_{1A} rabbit antibody (1:500) (el Mestikawy et al., 1990). The secondary antibodies used were CY3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:1600 dilution; Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 488-, 568-, and 546-conjugated antibodies from Invitrogen (1:1600), and HRP-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies (Sigma). Yif1B antiserum was produced by immunization of rabbits with the N-terminal cytoplasmic ¹²TPRLRKWPSKRRV²⁴ peptide (see supplemental Fig. S1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) coupled to ovalbumin (NeoMPS). The antibody was affinity purified as described previously (Doucet et al., 1998).

Animals. Adult male Sprague Dawley rats (250–300 g body weight) were housed in agreement with the institutional guidelines for use of animals and their care, in compliance with national and international laws and policies (Council directives no. 87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permission 75-116 to M.H. and 75-974 to M.D.)

Plasmid constructs. The C-terminal cytoplasmic domain (amino acids 406–422) of the rat 5-HT_{1A}R (Albert et al., 1990) was PCR-amplified and cloned in a yeast two-hybrid vector (Hybrigenics) and in pGEX-6p1 (GE Healthcare), for GST-tagged fusion protein production. The rat 5-HT_{1A}R sequence (Albert et al., 1990) without the stop codon was inserted between the *Hind*III and *Age*I sites of the pEGFP-N1 plasmid (Clontech) generating the 5-HT_{1A}-enhanced GFP (eGFP) construct. The rat 5-HT_{1A} Δ 407 plasmid was constructed by PCR inserting a stop codon at amino acid 407 and resulted in a truncated 5-HT_{1A}R (Jolimay et al., 2000). The plasmid encoding the C terminus (CT1A) fused to cyan fluorescent protein (CFP) was obtained by cloning the last 18 aa of the rat 5-HT_{1A} receptor between the *Sac*II and the *Bam*HI sites of the pCFP-C1 vector (Clontech). The cDNA of Yif1B was synthesized with reverse transcriptase from rat brain RNA, amplified with the forward primer 5'-AAGCATGCACGCGACAGGTTTG-3' (nucleotides 38–59 of NM_198734) and reverse primer 5'-CAGTTCACCGTACAAGG-TGGAA-3' (nucleotides 960–981), and cloned into pCB6 vector (Brewer and Roth, 1991) downstream of the CMV promoter, or in frame downstream of the flag epitope of the pFlag-CMV-6a vector (Sigma). The 425 nt probe for Northern blot was amplified with forward primer 5'-AAGCATGCACGCGACAGGTTTG-3' (nucleotides 38–59) and reverse primer 5'-TGTCCTGTTGGTACTGGACCTC-3' (nucleotides 441–462), and cloned into TA cloning vector (Invitrogen). The Yif1B siRNAs were double-stranded stealth RNAs from Invitrogen: siRNA(Yif1B-1), 5'-CCAGCCAUGGCUUUAUCAACCUACA-3' (nucleotides 509–533

of Yif1B); the control siRNA(contr-1) was 5'-CCAGUACUUC-GUACUCCAAUCGACA-3'; siRNA(Yif1B-2), 5'-CGGUACUCAUG-UACUGGCUCACCUU-3' (nucleotides 937–961 of Yif1B), and the control siRNA(contr-2) was 5'-CGGACUCAUGCGGUCACUCCAUCUU-3'. All plasmid constructs were checked by sequencing the entire insert. The plasmids encoding sst2A-eGFP (Lelouvier et al., 2008), P2X₂-eGFP (Boué-Grabot et al., 2003), and enhanced yellow fluorescent protein (eYFP)-5-HT3A (Grailhe et al., 2004) have already been used and described.

Yeast two-hybrid screening. A rat hippocampus random-primed cDNA library transformed into the Y187 yeast strain and containing 10,000,000 independent fragments was used for mating. High mating efficiency was obtained by using a specific mating method (United States patents no. 6187535, 6531284, and 6913886). The screen was first performed on a small scale to adapt the selective pressure to the intrinsic property of the bait. No autoactivation of the bait was observed. Then, the full-scale screen was performed in conditions ensuring a minimum of 50,000,000 interactions tested, to cover five times the primary complexity of the yeast-transformed cDNA library (Rain et al., 2001). Fifty-nine million interactions were actually tested with the C-terminal cytoplasmic domain (amino acids 406–422) of rat 5-HT_{1A}R. After selection on medium lacking leucine, tryptophan, and histidine, 210 positive clones were picked, and the corresponding prey fragments were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. Sequences were then filtered and contiged as described previously (Formstecher et al., 2005) and compared with the latest release of the GenBank database using BLASTN (Altschul et al., 1997). A Predicted Biological Score was attributed to assess the reliability of each interaction, as described previously (Wojcik et al., 2002). Briefly, the Predicted Biological Score relies on two different levels of analysis: first, a local score takes into account the redundancy and independence of prey fragments, as well as the distributions of reading frames and stop codons in overlapping fragments; second, a global score takes into account the interactions found in all the screens performed at Hybrigenics using the same library. In addition, potential false-positives were flagged by a specific "E" Predicted Biological Score. This was done by discriminating prey proteins containing "highly connected" domains, previously found several times in screens performed on libraries derived from the same organism. The Predicted Biological Scores have been shown to positively correlate with the biological significance of interactions (Wojcik et al., 2002).

Northern blot experiments. The mRNA Northern blot NBA (Normalized By Amount of RNA; BioChain Institute) was hybridized using [α -³²P]dCTP (GE Healthcare) labeled probe made following the Rediprime II Random Prime Labeling System (GE Healthcare). After exposure to a MP Hyperfilm (GE Healthcare) for 24 h, the blot was scanned with a digital camera.

Western blot experiments. LLC-PK1 cells expressing Yif1B were grown on 90 mm dishes, and tissues were dissected from adult male rats and then homogenized by sonication in sample buffer (Laemmli, 1970). The protein content in supernatants was measured using the BCA protein assay kit for reducing agents (Pierce). Proteins (1 μ g) were analyzed by SDS-PAGE followed by blotting to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and incubation with Yif1B affinity-purified antiserum (1:500), and reprobed with a rabbit actin antibody (Sigma; 1:2000). For normalization with α -tubulin, the proteins were blotted to nitrocellulose membrane, which was then incubated with anti- α -tubulin monoclonal antibody (1:1000).

Cell culture and transfections. LLC-PK1 cells and COS-7 cells were grown in DMEM GlutaMax I (Invitrogen) supplemented with 4.5 g/L and 1 g/L glucose, respectively, 10% fetal bovine serum, 10 U/ml penicillin G, and 10 g/ml streptomycin (Jolimay et al., 2000; Carrel et al., 2006). LLC-PK1 and COS-7 cells (50% confluent) were transfected using Lipofectin reagent (Invitrogen) and FuGENE (Roche), respectively, according to the manufacturers' protocols. For GST pull-down experiments, LLC-PK1 cells were transfected by electroporation using Gene Pulser Xcell electroporation system (Bio-Rad; 135 V, 1800 μ F in 200 μ l of DMEM containing 5 \times 10⁶ cells and 10 μ g of plasmid DNA). Hippocampal neuron cultures from 18-d-old rat embryos were performed according to the procedure described previously (Boué-Grabot et al., 2004a,b). Hippocampal neurons were transfected after 7–8 d *in vitro*

(DIV) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (Boué-Grabot et al., 2004a,b). For cotransfection experiments in the presence of siRNA, the plasmids (2 μ g) and the siRNA (2 μ l of a 20 mM solution) were thoroughly mixed before the addition of Lipofectamine 2000 (1.25 μ l/cover-slip). All cells were used 48 h after transfection.

GST pull-down assay. GST-tagged fusion proteins were produced in the BL21DE3 strain of *Escherichia coli* (Stratagene). After induction at 28°C with 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, the bacterial pellet was sonicated in PBS, 0.1% Triton X-100, and protease inhibitors (Sigma) and centrifuged at 14,000 \times g for 15 min. Supernatants were incubated overnight with glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) at 4°C, then washed in PBS. Extracts from LLC-PK1 cells expressing Yif1B or from hippocampus and cerebellum dissected from Sprague Dawley rats were homogenized by sonication in buffer A (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40, protease inhibitors, 100 mg of tissue/ml of buffer). After centrifugation at 15,000 \times g for 10 min, 100–200 μ g of proteins from cell lysates or 1 mg of proteins from tissue homogenates were incubated with glutathione-Sepharose beads coupled to the different GST fusion proteins in buffer A containing 2.5 mg/ml bovine serum albumin, overnight at 4°C. After washing three times, the proteins retained on the beads were eluted in sample buffer (Laemmli, 1970) and loaded on SDS-PAGE gel, followed by blotting to PVDF membrane and incubation with Yif1B affinity-purified antiserum (1:500).

Immunofluorescence. For brain section immunofluorescence, rats were deeply anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. Brains were postfixed in the same fixative for 24 h, and sections (30 μ m) were obtained using a vibratome. For immunofluorescence on transfected cells or neurons, coverslips with attached cells were washed three times with PBS+ (PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂) at 37°C, and fixed for 15 min at 37°C with PBS+ containing 4% paraformaldehyde and 4% sucrose. For brain slices and coverslips, immunofluorescence experiments were performed as described previously (Boué-Grabot et al., 2004a,b). Immunofluorescence images were generated using a Leica TCS-400 laser scanning confocal microscope (100 \times oil-immersion lens) or a TCS SP2 AOBs laser scanning confocal microscope (63 \times oil-immersion lens). The percentage of colocalization was calculated on confocal images acquired with a pixel size of 100 nm (objective 63 \times , zoom 2.5), without any saturation of the two labels, and was calculated with the “colocalization threshold” program of ImageJ (Costes et al., 2004). The total dendritic tree length was measured with the “length measurement” of the Lucia 4.7 software (Nikon).

Quantification of dendrite fluorescence. Contrast and brightness of confocal images were chosen to ensure that all relevant pixels were within linear range and were maintained identical for all measurements. For double-labeling experiments, pictures were generated using Adobe Photoshop 7.0. Fluorescence profiles along dendrites were generated using the Lucia 4.71 software (Nikon). For the comparison of 5-HT_{1A}R-eGFP distribution, all neurons showing intact morphology along their longest dendrite, with unambiguous visual identification of the axon, were analyzed (one dendrite per neuron). The variability of distribution in individual neurons was eliminated by using the cumulated fluorescence profiles obtained for 20 neurons in each group.

Results

Identification of Yif1B as a 5-HT_{1A}R C terminus-interacting protein using the yeast two-hybrid assay

To identify proteins interacting specifically with 5-HT_{1A}R, we performed a yeast two-hybrid screening of a rat hippocampus cDNA library using the 5-HT_{1A}R cytoplasmic C terminus (residues 406–422) as bait. Five clones corresponded to amino acids 22–311 of a protein recently named Yif1B (accession number: NP_942029), and were scored B as a Predicted Biological Score (Wojcik et al., 2002). This protein, not yet characterized in mammals, appeared as the ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Yif1p, a 35.5 kDa transmembrane protein that was first described as a Yip1p-interacting factor (Matern et al., 2000). Yip1p is localized in the Golgi membrane and ER-derived antero-

grade transport COPII vesicles (Otte et al., 2001). Yif1p was shown to interact with Yip1p and with transport Rab GTPases, and to play a critical role in ER–Golgi trafficking (Matern et al., 2000).

Rattus norvegicus Yif1B is a 311 aa protein. Transmembrane prediction with TMHMM2.0 (Krogh et al., 2001) showed that it contains five transmembrane segments clustered in the C-terminal moiety, a long hydrophilic N-terminal domain within the cytoplasm, and a very short C terminus turned to the ER lumen (Fig. 1A). Bioinformatics analysis revealed that Yif1B protein is well conserved across species, with the following identity scores to *Rattus norvegicus*: *Saccharomyces cerevisiae* 28%, *Xenopus laevis* 76%, *Mus musculus* 97%, and *Homo sapiens* 89% (Fig. 1B). Yif1p is present as only one gene in yeast and *Caenorhabditis elegans* and corresponds to two closely related genes in mammals. In rat, Yif1A and Yif1B display 50% identity in amino acids clustered after the first 60 aa (as shown in the alignment in supplemental Fig. S1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These two related genes belong also to a family already described as a five-passed transmembrane protein family sharing homology in the transmembrane domains (Shakoori et al., 2003)

High expression of Yif1B in brain tissue

The expression of Yif1B in various tissues was analyzed by Northern blot. The hybridization revealed a single band of \sim 1.4 kb corresponding to the size expected from the length of the sequenced cDNA (1193 bp) plus the polyA-tail (\sim 200 residues). As shown in Figure 2A, Yif1B mRNA was expressed in a wide range of tissues, but was particularly abundant in brain. In addition, we detected high levels of Yif1B mRNA in rat heart, kidney, and lung and lower levels in spleen, muscle, and intestine. The negative data with human lung mRNA (Fig. 2A) confirmed the specificity of our probe under the used hybridization conditions.

The pattern of expression of Yif1B protein was well correlated to that of its mRNA in all tissues. Western blots were performed on 1 μ g of proteins from various tissues using the polyclonal antibody obtained after immunization of a rabbit with an N-terminal peptide from the protein (Fig. 1A). The antiserum, tested on LLC-PK1 cells transfected with rat Yif1B, recognized an \sim 34 kDa band (Fig. 2B) corresponding to the size expected from the open reading frame of Yif1B. The faint labeling corresponding to the same size was also observed in untransfected cells that most probably reflected cross-reaction of rabbit antibodies with porcine Yif1B protein endogenously expressed in LLC-PK1 cell line. Yif1B was particularly abundant in whole brain extract, kidney, and spleen, present at lower levels in heart and lung (Fig. 2C). Loading control experiment performed using actin antibody shows that the level of Yif1B is low in the muscle in comparison with that of actin. Yif1B was also well detected in raphe extracts. The \sim 45 kDa band observed in brain and raphe (Fig. 2C) corresponded most probably to a nonspecific cross-reaction of the antibody with brain tissues on Western blot.

Direct interaction of Yif1B with the 5-HT_{1A}R C terminus is revealed by GST pull-down experiments

Direct interaction between 5-HT_{1A}R and Yif1B was assessed by GST pull-down experiments on extracts of cells transfected with Yif1B or rat brain tissue homogenates as a source of native Yif1B. We used a fusion protein made of the 5-HT_{1A}R cytoplasmic C terminus coupled to GST (GST-CT1A) and for controls, a fusion protein made of GST coupled to the third intracellular loop of 5-HT_{1A}R (I31A) and a fusion protein made of GST coupled to the

cytoplasmic C terminus of the 5-HT_{1B} receptor, which did not interact with Yif1B in yeast two-hybrid screening. GST-CT1A, but not GST, GST-I31A, or GST-CT1B, was able to pull down Yif1B from the three regions tested (Fig. 2E–G) (hippocampus, raphe, and cerebellum), and from LLC-PK1 cells transfected with Yif1B cDNA (Fig. 2D). The nonspecific band at ~45 kDa observed on Western blots of hippocampus or cerebellum extracts is not detected when the protein was retained by the GST-CT1A beads (Fig. 2E,F), attesting thereby to the specificity of such interaction.

Together, the yeast two-hybrid and the GST pull-down data demonstrate that the C terminus of 5-HT_{1A}R and Yif1B are capable of direct physical interaction.

Yif1B is expressed in serotonergic neurons of the rat brain

In the next series of experiments, we checked for the presence of Yif1B in brain areas known to express 5-HT_{1A}R, such as the anterior raphe (Sotelo et al., 1990). Direct immunolabeling of Yif1B and 5-HT_{1A}R could not be performed, because their respective antibodies were both raised in rabbits. This was overcome by labeling serotonin neurons of the anterior raphe either with sheep antibodies directed against TPH (the first enzyme for serotonin synthesis) or rat antibodies directed against serotonin. This was combined with Yif1B immunofluorescence labeling using crude rabbit antibodies. Microphotographs in Figure 3 show that Yif1B is well expressed in serotonergic neurons labeled either with anti-5-HT (Fig. 3A) or with anti-TPH antibodies (Fig. 3B). Superimposed immunofluorescence images clearly showed that in these neurons, Yif1B is present in intracellular vesicles different from those labeled by the 5-HT antibody (Fig. 3A). The specificity of the Yif1B labeling on slices was attested by control experiments with the serum saturated with the immunization peptide or with the 45 kDa band seen on Western blot (data not shown).

Yif1B colocalizes with 5-HT_{1A}R in vesicles of the intermediate compartment

The nature of the intracellular compartment where Yif1B is localized was investigated in COS-7 and LLC-PK1 transfected cell lines using specific markers of the ER (calregulin) and of the median Golgi apparatus (CTR433). In these cell lines, Yif1B antibody revealed a punctate immunolabeling pattern. The specificity of this peculiar pattern was confirmed by using a Flag epitope-tagged Yif1B cDNA (Fig. 4A1,A2). The colocalized pixels are shown in white (Fig. 4A4). Subsequent double-immunofluorescence experiments showed that the punctate la-

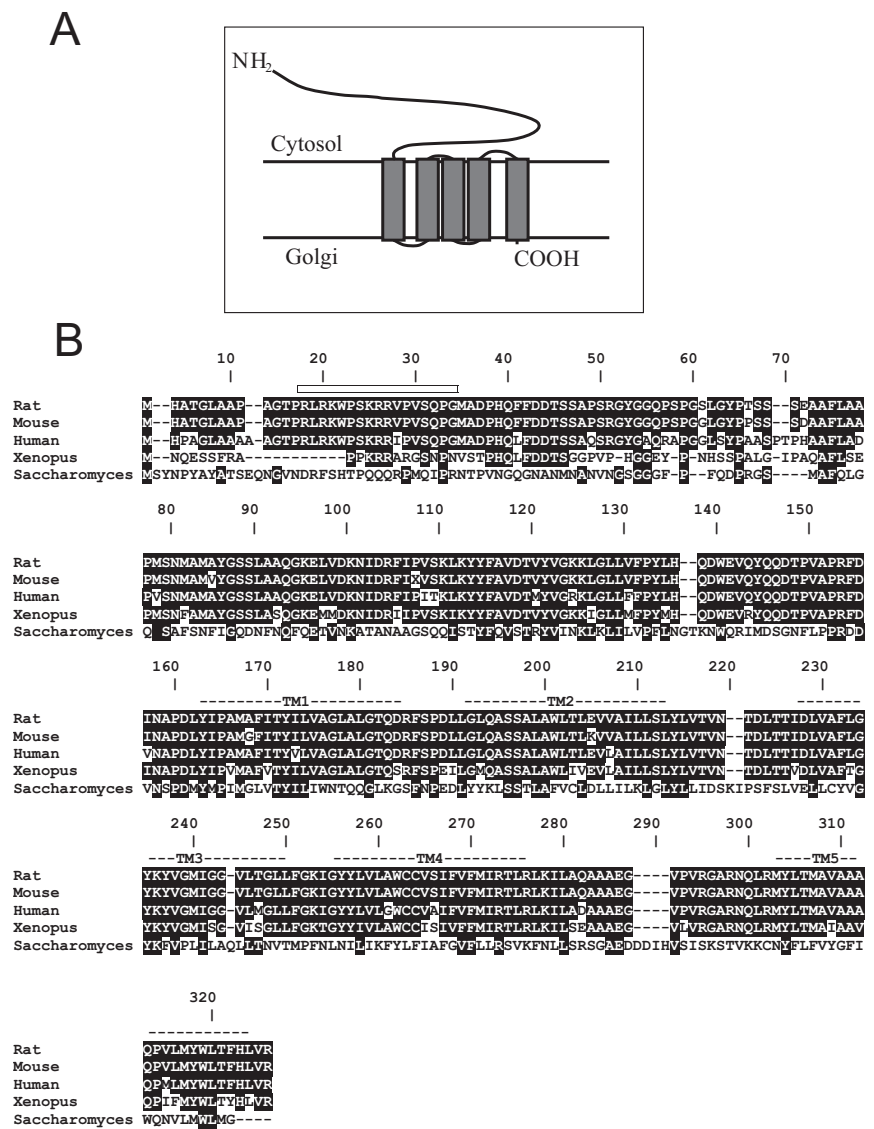


Figure 1. Interspecies comparison of Yif1B sequence. **A**, Schematic predicted topology of the Yif1B protein in Golgi membrane with five transmembrane domains and a large cytoplasmic N terminus. **B**, The amino acid sequence of Yif1B from rat (Yif1-interacting factor homolog B, *Rattus norvegicus*, accession numbers: NP_942029 and XP_214879) is aligned with those of homologous proteins in mouse (Yif1-interacting factor homolog B, *Mus musculus*, accession number: NP_084163.1), human (YIF1B protein, *Homo sapiens*, accession number: AAH91477.2), *Xenopus laevis* (LOC443676 protein, *Xenopus laevis*, accession number: AAH73660.1), and yeast (Yif1p, *Saccharomyces cerevisiae*, accession number: NP_014136.1). Identical amino acid residues between rat Yif1B and other Yif1Bs or the Yif1p ancestor are in white in black box. Putative transmembrane domains are marked TM1–TM5. The rat sequence (TPRLRKWPSKRRV) represents the peptide used for the production of specific polyclonal anti-Yif1B antibody in rabbit.

being observed for Yif1B partially colocalized with calregulin (Fig. 4B), a marker of the ER, and with CTR433 (Fig. 4C), a marker of the Golgi apparatus. The percentage of colocalization (Fig. 4B,C4) was quantified as the ratio of the colocalized pixels to those labeled by Yif1B and reached 47.44% (± 2.23 , SEM; $n = 26$) for the ER, and 24.45% (± 1.063 , SEM; $n = 52$) for the Golgi apparatus. Therefore, Yif1B appeared to be present in vesicles partially overlapping the ER and the Golgi apparatus and partially excluded from these compartments (Yif1B+/ER-/Golgi-) as expected for vesicles belonging to the intermediate compartment (IC). Such localization is in agreement with the function of Yif1p in yeast (Matern et al., 2000).

Colocalization between the 5-HT_{1A}R and Yif1B was investi-

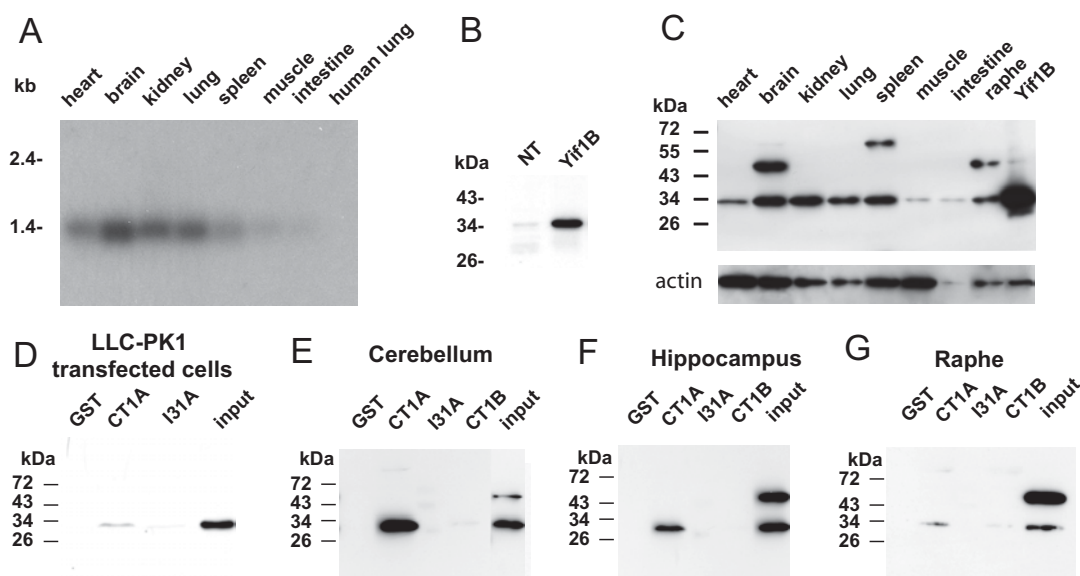


Figure 2. Yif1B mRNA and protein expression in rat tissues and direct interaction of Yif1B from rat brain homogenates with the 5-HT_{1A}R C-tail. **A**, Yif1B mRNA expression in rat tissues was analyzed by Northern blot. Each lane represents 3 μ g of mRNA from each rat tissue; the human lung is used as a control for the hybridization specificity. The ³²P-labeled Yif1B probe consisted of 425 bp in the 5' end of the rat cDNA. **B**, **C**, Yif1B protein expression in LLC-PK1 cells untransfected or transfected with Yif1B (**B**) and in rat tissues (**C**) was analyzed by Western blot using anti-Yif1B affinity-purified polyclonal antibody (1:1000). Each lane represents 1 μ g of total protein, and the same Western blot was also revealed with actin antibody at the bottom. **D–G**, GST pull-down experiments on Yif1B-transfected LLC-PK1 cells (**D**) and brain tissue homogenates: cerebellum (**E**), hippocampus (**F**), or raphe (**G**). Extracts were incubated with beads coupled to GST alone or to GST fused with CT1A, I31A, or CT1B. Interaction was analyzed by Western blot with anti-Yif1B affinity-purified polyclonal antibody (1:1000). "Input" represents 2.5 μ g of proteins (tissue extract prepared as in **C**). Results are representative of at least three independent experiments.

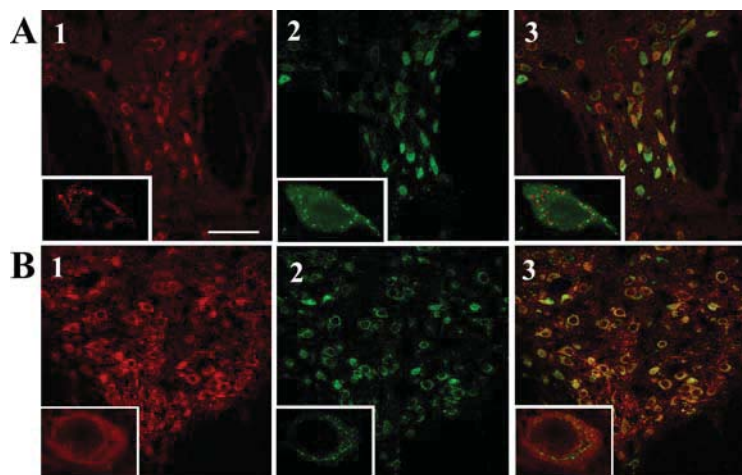


Figure 3. Yif1B expression in serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **A**, **B**, Rat dorsal raphe nucleus sections immunolabeled with anti-TPH antibody (**A**; red) or with anti-serotonin antibody (**B**; red) and polyclonal crude anti-Yif1B antiserum (1:5000; in green). Overlay shows the superposition of the two labels. Insets correspond to enlargement of a double-labeled cell. Scale bar, 75 μ m.

gated in LLC-PK1 cells stably expressing the 5-HT_{1A}R coupled to GFP (5-HT_{1A}-eGFP), and transiently transfected with Yif1B. As shown in Figure 5A, the 5-HT_{1A}-eGFP was mostly localized at the plasma membrane, as previously shown (Carrel et al., 2006). Interestingly, 5-HT_{1A}-eGFP was also found to colocalize with Yif1B in vesicle-like puncta (Fig. 5A). The quantification of the colocalization (Fig. 5A4) showed that only 12.95% of the 5-HT_{1A}-labeled pixels were colocalized with Yif1B (± 1.86 , SEM; $n = 68$). The level of colocalization was highly heterogeneous, probably depending on the amount of intracellular receptor in the trafficking pathway, which may vary from cell to cell, and with the level of expression. In Yif1B-overexpressing cells, the 5-HT_{1A}R was highly colocalized with Yif1B (supplemental Fig. S2, available at

www.jneurosci.org as supplemental material). In hippocampal neurons also, Yif1B colocalized with the 5-HT_{1A}R, mostly in the soma but also in small dots in the dendrites (Fig. 5B). These results provide strong evidence that Yif1B partially colocalizes with the 5-HT_{1A}R in intracellular vesicles, where Yif1B can play a role in trafficking. The partial colocalization probably reflects a transient interaction occurring during the intracellular trafficking of the receptor.

Inhibition of Yif1B expression prevents the distal dendritic targeting of 5-HT_{1A}R

To delineate the implication of Yif1B in 5-HT_{1A}R trafficking, we inhibited the endogenous expression of Yif1B and analyzed the effects on 5-HT_{1A}R localization. We first selected a small double-stranded siRNA sequence that was effective in inhibiting rat Yif1B expression in LLC-PK1 stably transfected cells

(supplemental Fig. S3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Then we inhibited Yif1B endogenous expression in primary cultures of hippocampal neurons in which the recombinant 5-HT_{1A}R remained mainly confined to the somato-dendritic compartment (Jolimay et al., 2000). Inhibition of endogenous Yif1B expression reached $\sim 80\%$ 48 h after transfection with a double-stranded siRNA as assessed by Western blot (Fig. 6A1) and relative quantification with respect to α -tubulin (Fig. 6B). As controls, we used neurons transfected with eYFP as transfection itself could, on its own, modify protein expression level. The siRNA (Yif1B-1 or contr-1) was also cotransfected

with eYFP. The chosen siRNA sequence was therefore effective to inhibit the endogenous Yif1B expression in neurons 48 h after transfection. Another siRNA [siRNA(Yif1B-2)] was also tested and proved efficient in inhibiting the Yif1B endogenous expression (Fig. 6A2,B).

The siRNA(Yif1B-1) was used to inhibit Yif1B expression in neurons cotransfected with 5-HT_{1A}-eGFP. In line with previous studies (Carrel et al., 2006), neurons transfected with 5-HT_{1A}-eGFP alone or with siRNA(contr-1) displayed immunofluorescence in dendrites, where it overlapped α -tubulin labeling (Fig. 7A). The 5-HT_{1A}-eGFP labeling of neurons transfected with both 5-HT_{1A}-eGFP and Yif1B(siRNA-1) was confined to the proximal portion of the dendrites. To ensure that this effect was not caused by changes in dendrite structure, we measured the labeling of α -tubulin and 5-HT_{1A}-eGFP in transfected neurons along the longest dendrite for each neuron as exemplified in Figure 7B. The curves depicted in Figure 7C represent cumulated fluorescence intensity for 5-HT_{1A}-eGFP and tubulin along dendrites in transfected neurons versus the distance from the soma. Immunofluorescence analysis showed that 5-HT_{1A}-eGFP and α -tubulin had a similar distribution in neurons transfected with 5-HT_{1A}-eGFP alone or with siRNA(contr-1). Indeed, the total dendritic length of neurons is the same in the three different conditions as shown in supplemental Figure S4 (available at www.jneurosci.org as supplemental material). In addition, inhibition of Yif1B did not change the pattern of expression of Golgi markers as shown in supplemental Figure S5 (available at www.jneurosci.org as supplemental material). In the case of cotransfection with siRNA (Yif1B-1), the pattern of α -tubulin labeling was not significantly different from that of control neurons, whereas that of 5-HT_{1A}-eGFP extended along dendrites on a much shorter distance than α -tubulin. The clear-cut difference observed between the corresponding curves demonstrates that Yif1B interferes with the 5-HT_{1A}R transport to the distal part of the dendrites without affecting tubulin distribution.

Similar experiments were performed on neurons cotransfected with other receptors, i.e., the somatostatin sst2A receptor, the purinergic P2X₂, or the serotonin 5-HT_{3A}, each receptor belonging to a different class of receptors: seven-transmembrane GPCR, two-transmembrane nucleotide receptor, or four-transmembrane channel receptor, respectively. No effect of the siRNA(Yif1B-1) was observed on the dendritic localization of sst2A, P2X₂ receptors, or 5-HT_{3A} localization (Fig. 8A*b–d*), in comparison with the effect observed on the 5-HT_{1A}R (Fig. 8A*a*). For each receptor, we represented the cumulated fluorescence intensity of the receptor along dendrites in transfected neurons versus the distance from the soma (Fig. 8, right). Except for the 5-HT_{1A}R, no effect of Yif1B inhibition could be visualized. This confirms the specific effect of Yif1B in targeting 5-HT_{1A}R to neuronal dendrites.

As a control for the specificity of siRNA, inhibition was made by transfecting a second siRNA(Yif1B-2) in neurons together with 5-HT_{1A}-eGFP. Endogenous expression of Yif1B was also efficiently inhibited by ~40%, as shown by Western blot experiments (Fig. 6A2). The effect of this second siRNA on 5-HT_{1A}-eGFP targeting to dendrites was the same as that observed for

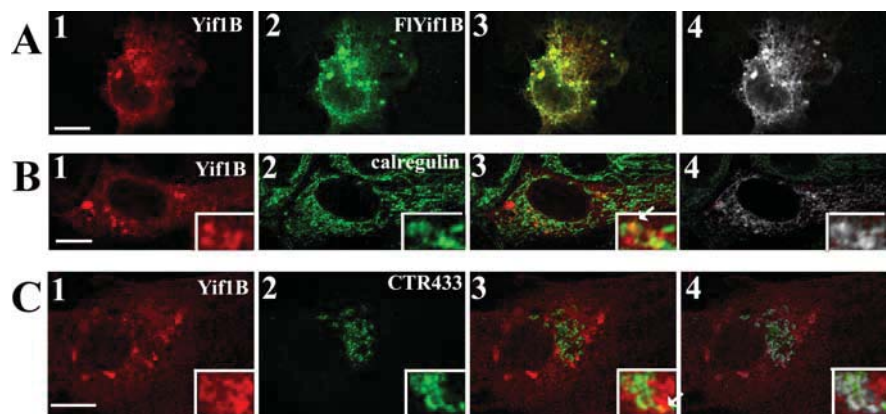


Figure 4. Yif1B subcellular localization. **A–C**, Transfection of COS-7 cells (**A**) with Flag-Yif1B or Yif1B and of LLCPK1 cells with Flag Yif1B cDNA (**B**, **C**). Yif1B labeling (anti-Yif1B affinity-purified polyclonal antibody; 1:1000) is in red (**A1**, **B1**, **C1**). Flag, calregulin, and CTR433 labeling are shown in green (**A2**, **B2**, **C2**), and colocalized pixels are shown in white on the superposed labeling (**A4**, **B4**, **C4**). Some punctate colocalizations are shown by arrows in insets. Scale bars, 10 μ m.

the first siRNA, by comparing Figure 8A*a* and Figure 8B. The inhibition of 5-HT_{1A}-eGFP dendritic targeting was similar with the two siRNAs, suggesting that the effect was specific to the Yif1B sequence and did not result from an off-target effect of a particular siRNA sequence, as has already been described in neurons (Alvarez et al., 2006).

5-HT_{1A} receptor distribution in the dendritic tree is dependent on the C-terminal segment

We analyzed the localization of a 5-HT_{1A}R without its C terminus (5-HT_{1A} Δ 407) (Jolimay et al., 2000) and showed that it is localized in the soma, which confirms that the C terminus plays a role on the dendritic 5-HT_{1A}-eGFP localization, probably via the interaction between Yif1B and the C terminus of the 5-HT_{1A}R. In Figure 9 is plotted the cumulated fluorescence intensity of the 5-HT_{1A}-eGFP and 5-HT_{1A} Δ 407 receptor along dendrites in transfected neurons versus the distance from the soma; comparison of the two plots shows clearly that the truncated 5-HT_{1A}R is restricted to the cell body. We also performed a competition experiment by overexpressing the C terminus of the 5-HT_{1A}R together with the full-length 5-HT_{1A}R and analyzed the localization of the 5-HT_{1A}-eGFP. In Figure 9, the cumulated fluorescence intensity of the 5-HT_{1A}-eGFP cotransfected with CT1A-CFP reveals that its dendritic localization is impaired in comparison with the 5-HT_{1A}-eGFP alone. This experiment suggests that the overexpression of the 5-HT_{1A}R C terminus prevented the interaction between the full-length receptor and Yif1B, and confined the 5-HT_{1A}R in a proximal dendritic compartment. This result confirms that the role of Yif1B in the 5-HT_{1A}R dendritic targeting is mediated by a direct interaction between the C terminus of 5-HT_{1A}R and Yif1B.

Discussion

In the present study, we identified for the first time a protein (Yif1B), which interacts with the 5-HT_{1A}R and plays a key role in its targeting to neuronal dendrites. Direct interaction between Yif1B and the 5-HT_{1A}R C terminus was demonstrated by yeast two-hybrid screening and GST pull-down assays. Such interaction probably takes place in vesicles located in the IC (between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus), where Yif1B is confined. Yif1B is expressed in serotonergic neurons of the raphe area, and inhibition of its expression in cultured neurons prevents the transport of 5-HT_{1A}R to the distal part of the

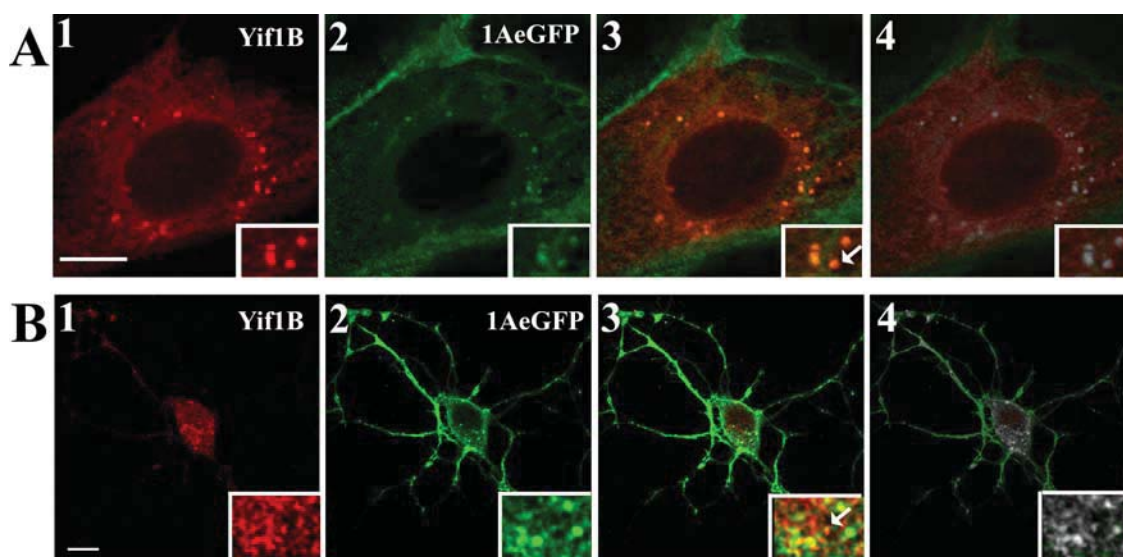


Figure 5. Yif1B localization with 5-HT_{1A}R. **A**, Transfection of 5-HT_{1A}-eGFP-stable LLC-PK1 cells with Yif1B. Yif1B immunofluorescence is shown in red (anti-Yif1B affinity-purified polyclonal antibody; 1:1000; **A1**), and eGFP autofluorescence is shown in green (**A2**). **B**, Primary cultures of rat hippocampal neurons (DIV 7) were cotransfected with a plasmid encoding the 5-HT_{1A}-eGFP and Yif1B. Superposition of labels shown in **1** and **2** is visible in **3**. In **4**, the colocalized pixels are shown in white. Arrows show Yif1B and 5-HT_{1A}R colocalization in insets. Scale bars, 10 μ m.

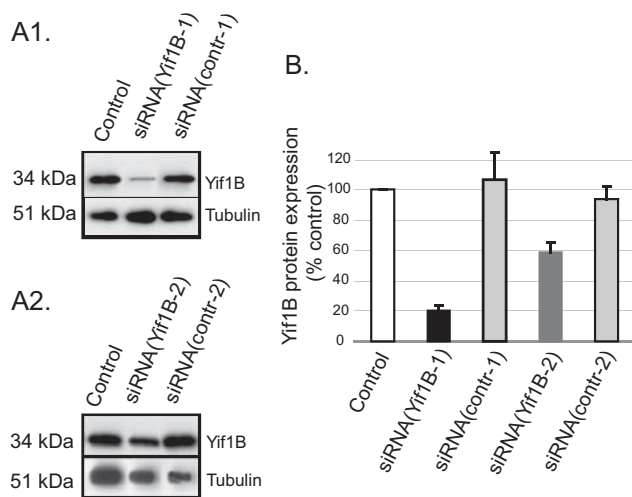


Figure 6. Downregulation of the protein Yif1B by siRNA in primary cultures of rat hippocampal neurons. **A1**, **A2**, Yif1B was detected by Western blots (anti-Yif1B affinity-purified polyclonal antibody; 1:1000) of protein extracts, 48 h after transfection of neurons at DIV 7; α -tubulin was detected by Western blots on the same sample (mouse antibody; 1:1000) to normalize the amount of extract. **A1**, siRNA(Yif1B-1); **A2**, siRNA(Yif1B-2). All neurons were cotransfected with a control plasmid (encoding eYFP). “Control” corresponds to eYFP alone, “siRNA(Yif1B-1/2)” to eYFP plus siRNA(Yif1B-1/2), and “siRNA(contr-1/2)” to eYFP plus siRNA(contr-1/2). **B**, Quantification of Yif1B protein expression (normalized with reference to α -tubulin expression) in transfected neurons ($n = 5$, in 3 independent experiments). Bars represent mean, and error bars represent SEM.

dendrites, but of no other receptors that we have tested (somatostatin sst_{2A}, purinergic P2X₂, and serotonin 5-HT_{3A}). This result suggests that a ubiquitous protein plays, in addition to its ubiquitous role, a specific function in a specialized cell, such as the dendritic targeting of a specific receptor in a neuron.

Yif1B is the ortholog of a yeast protein involved in ER-to-Golgi trafficking

Yif1B and Yif1A are the two mammalian orthologs of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Yif1p. As reflected by its name (Yip1p-interacting factor 1), Yif1p was first described as a partner of another

yeast protein named Yip1p (Matern et al., 2000). Via their C-terminal moiety, these two proteins form a tight complex in Golgi membranes, and both interact with the transport of GTPases Ypt1p and Ypt31p (Yang et al., 1998). Furthermore, deletion experiments, which resulted in yeast death and alteration in conditional mutants, highlighted the role of Yif1p in ER-to-Golgi protein trafficking and secretion. Indeed, Yif1p is localized in COPII vesicles that are responsible for the anterograde transport from ER to Golgi (Otte et al., 2001). It has also been shown that Yif1p interacts weakly with Yipt1, the yeast ortholog of rab1 (Calero et al., 2002). More recently, the Yip1p–Yif1p complex has been more precisely implicated in the fusion process between ER-derived vesicles and the Golgi apparatus (Barrowman et al., 2003).

In comparison with the data available in yeast, the functions of Yif1p mammalian orthologs are poorly documented. Few studies showed that Yif1A (also called Yif1 as the first described Yif1p ortholog) is an early secretory pathway protein cycling between ER and Golgi, with a Golgi localization depending on its interaction with Yip1A (Yip1p ortholog) (Breuzza et al., 2004; Jin et al., 2005). On the other hand, the only study mentioning a protein corresponding to Yif1B showed that it belongs, together with Yip1p and Yif1p, to a family of ER and Golgi transmembrane proteins. Indeed, Yif1A and Yif1B on one side and Yip1p, Yip4p, and Yip5p on the other side have been considered as members of the same protein family (FinGER) sharing a common structure with an N-terminal hydrophilic region, followed by five conserved transmembrane regions (Shakoori et al., 2003).

This is the first study demonstrating a role for Yif1B in mammals. Northern or Western blot analysis of Yif1B expression in several tissues showed that, although ubiquitous, Yif1B is notably expressed at higher levels in the brain, where it may play a specific role. Subcellular distribution patterns of recombinant Yif1B in different mammalian cell lines substantiate its involvement in the ER-to-Golgi trafficking, in mammals as well.

Yif1B interacts with the short C terminus of the 5-HT_{1A} receptor

Our data clearly show that Yif1B interacts with the short C terminus of the 5-HT_{1A} receptor in brain extracts and in transfected

mammalian cell lines. Yif1B represents the first partner protein identified for the 5-HT_{1A} receptor.

No protein interacting with the C terminus of class 1 serotonin receptors has been identified before. These receptors contain a short C terminus with no known binding consensus sequences, in contrast to class 2 (5-HT_{2A} and 5-HT_{2C}) serotonin receptors, which interact with several proteins through a PDZ ligand in their long C terminus domain. These receptors interact with a network including scaffolding proteins containing one or several PDZ domains, signaling proteins, and proteins of the cytoskeleton (Bécamel et al., 2002, 2004) involved in the regulation of receptor function (Gavarini et al., 2006).

Characterization of Yif1B as a routing protein interacting with the 5-HT_{1A} receptor C terminus can therefore be considered as a first step toward the molecular identification of 5-HT_{1A} receptor regulatory pathways. In addition, it was recently shown that genetic manipulation (down-regulation in knock-out mice or overexpression in transgenic mice) of a protein interacting with the 5-HT_{1B} serotonin receptor can modify the response to antidepressant agents (Svenningsson et al., 2006). Thus, it will be of interest to assess whether inhibition of Yif1B could influence 5-HT_{1A} receptor desensitization that follows administration of antidepressants as mentioned before.

Yif1B is implicated in 5-HT_{1A} trafficking in dendrites

Our results show that Yif1B plays a major role in the targeting of 5-HT_{1A} receptors to the neuronal dendrites. An 80% decrease of endogenous Yif1B protein content in cultured neurons by siRNA caused a marked impairment of 5-HT_{1A}R transport to the distal portion of dendrites. Under these conditions, 5-HT_{1A}R was restricted to the proximal dendrites, with no alteration in the general structure of the dendrites as estimated from tubulin labeling. A control experiment performed with a second siRNA sequence, siRNA(Yif1B-2), confirmed the specificity of siRNA inhibition on the 5-HT_{1A}R localization and excluded any off target resulting from siRNA inhibition (Alvarez et al., 2006). We used two controls to further assess the direct implication of the 5-HT_{1A}R C terminus in the interaction with Yif1B. The first one consisted of a truncated 5-HT_{1A}R, which remained confined in the soma of neurons, because it lacks the 5-HT_{1A}R C terminus. Another control performed with competitive overexpression of the 5-HT_{1A}R CT1A confirmed that a direct interaction between the 5-HT_{1A}R CT1A and Yif1B was necessary for the proper dendritic targeting of 5-HT_{1A}R.

This is the first report of a protein implicated in the specific transport of a serotonin receptor along the neuronal dendritic tree. Indeed, among the GPCR-interacting proteins that have been identified so far, several of them play a role in membrane localization or selective retention at presynaptic or postsynaptic

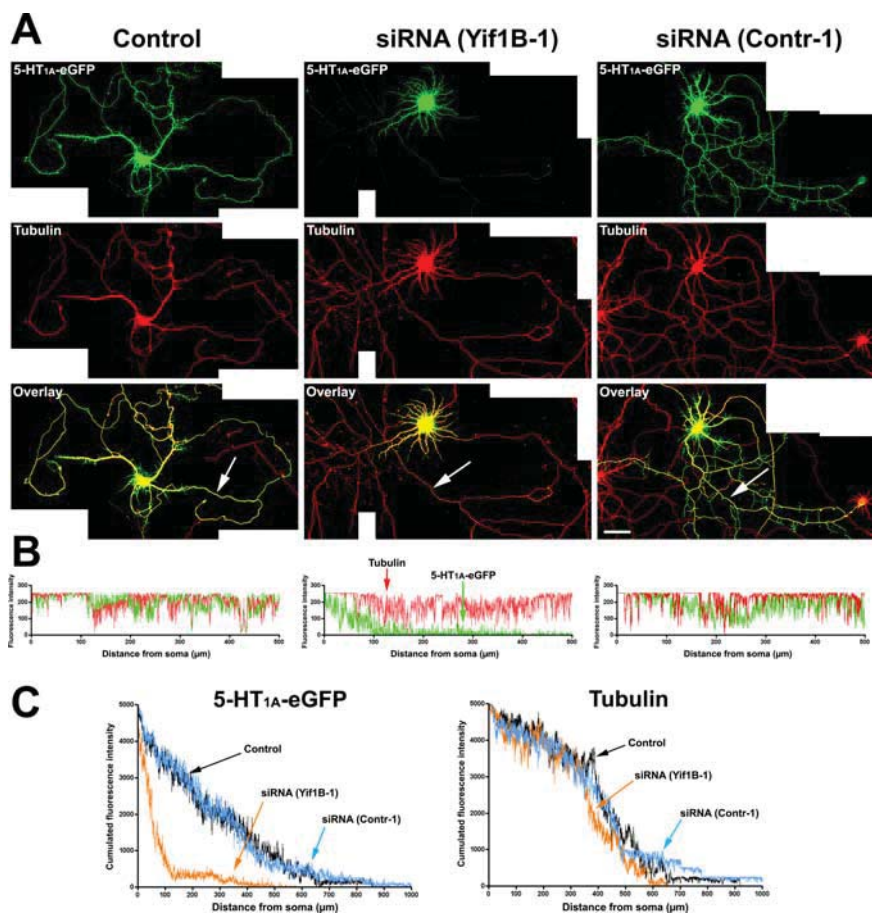


Figure 7. Altered 5-HT_{1A} receptor distribution in the distal part of dendrites after Yif1B RNA interference. **A**, Primary cultures of rat hippocampal neurons (7 DIV) were transfected with a plasmid encoding the 5-HT_{1A}-eGFP (Control, left), cotransfected with the 5-HT_{1A}-eGFP plus the siRNA(Yif1B-1) (middle), or cotransfected with the 5-HT_{1A}-eGFP plus the siRNA(contr-1) (right). Immunofluorescence was performed with anti-GFP antibody to enhance the GFP signal (green, top) or anti- α -tubulin antibody (red, middle). Bottom, Overlay. Note the drastic reduction of 5-HT_{1A}-eGFP fluorescence in the distal part of dendrites in siRNA(Yif1B-1)- but not in siRNA(Contr-1)-transfected neurons. **B**, 5-HT_{1A}-eGFP (green) and tubulin (red) fluorescence profiles along the longest dendrites (arrows) of the corresponding neurons. **C**, Cumulated fluorescence profiles for each group (60 neurons analyzed). siRNA(Yif1B-1) reduces 5-HT_{1A}-eGFP fluorescence in the distal part of dendrites without affecting their average length, as shown by the tubulin fluorescence distribution. Scale bar, 50 μ m.

sites. This is particularly the case for PICK1 (Xia et al., 1999), GRIP (Wyszynski et al., 1999), SHANK (Lim et al., 1999) and Homer (Brakeman et al., 1997; Ango et al., 2002), known to interact with glutamate receptors. On the other hand, some neurotransmitter receptors were shown to interact with intracellular trafficking proteins. For example, dopamine D₁ receptor has been shown to interact with Drip78, an ER protein, and with COP-1, a coatomer protein (Bermak et al., 2002). Overexpression or ER sequestration of Drip78 results in ER retention of the D₁ receptor. Yif1B is the first protein reported to be involved in intracellular trafficking of a GPCR and to mediate its targeting to distal dendrites. Also, this role seems to be receptor-specific, because inhibition of Yif1B expression did not alter the distribution of sst2 somatostatin, P2X₂ purinergic, or 5-HT_{3A} serotonin receptors.

A further question raised by this study is how Yif1B controls dendritic targeting of 5-HT_{1A}R. Yif1B is a transmembrane protein localized in vesicles of the IC, which can participate in the ER–Golgi trafficking as its yeast ortholog. Although widely distributed, Yif1B may assume specific functions in specialized cells such as neurons, in addition to a more general function common to all cell types. This specialized function could depend on Yif1B

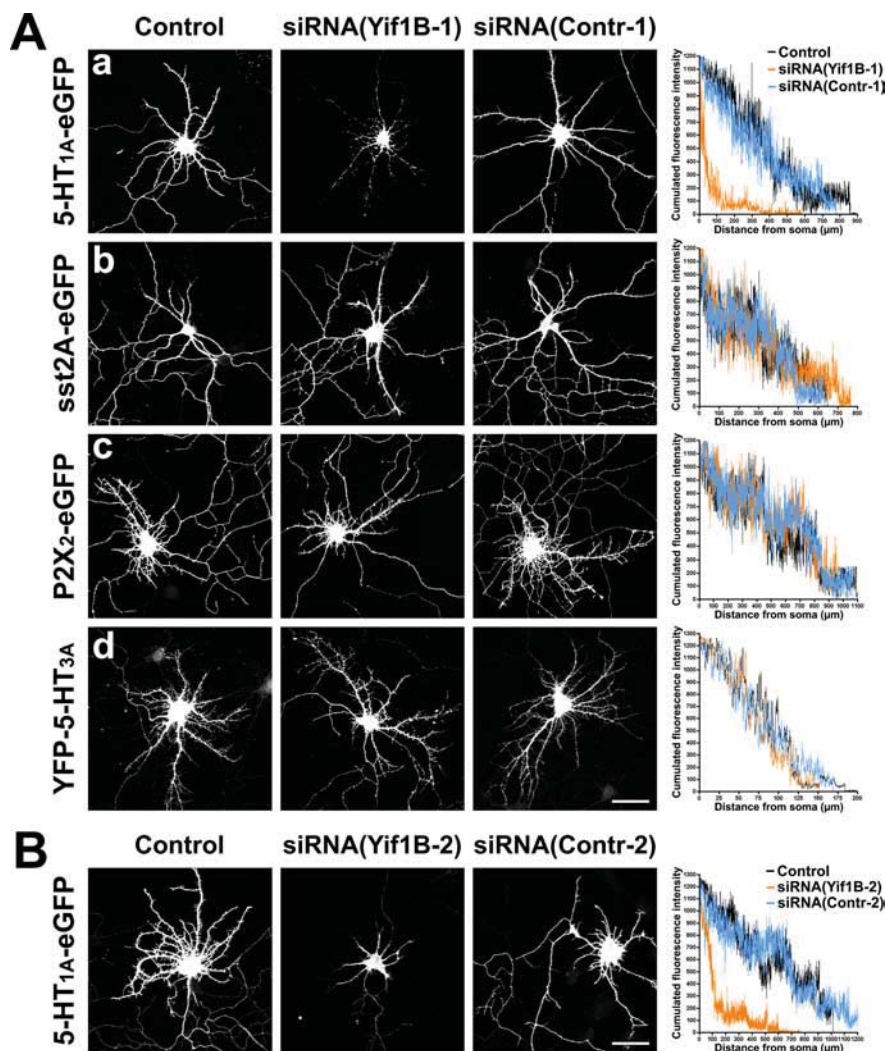


Figure 8. Yif1B RNA interference effect is specific for the 5-HT_{1A} receptor. **A**, No effect of Yif1B RNA interference on sst2A, P2X₂, and 5-HT_{3A} receptor distribution in the dendritic tree. Primary cultures of rat hippocampal neurons (7 DIV) were transfected with plasmids encoding the following receptors: 5-HT_{1A}-eGFP (**a**), sst2A-eGFP (**b**), P2X₂-eGFP (**c**), and YFP-5-HT_{3A} (**d**), and either transfected alone (left), cotransfected with siRNA(Yif1B-1) (middle), or cotransfected with siRNA(Contr-1) (middle right). Immunofluorescence was performed with anti-GFP antibodies to enhance the GFP signal. Cumulated fluorescence profiles along the longest dendrite for each group (15 neurons analyzed) are shown on the right. Note the drastic reduction of fluorescence induced by siRNA(Yif1B-1) in the distal part of dendrites in 5-HT_{1A}-eGFP-transfected neurons but not in sst2A-eGFP-, P2X₂-eGFP-, or YFP-5-HT_{3A}-transfected neurons. The higher variability in fluorescence intensities compared with Figure 7 is attributable to the lower number of neurons analyzed. Scale bar, 50 μ m. **B**, Inhibition of 5-HT_{1A}-eGFP receptor distribution in the dendritic tree by another siRNA specific to Yif1B (nucleotides 937–961). Neurons were transfected with a plasmid encoding 5-HT_{1A}-eGFP (left), cotransfected with the siRNA(Yif1B-2) (middle), or cotransfected with the control siRNA, siRNA(Contr-2) (middle right). As above, cumulated fluorescence profiles along the longest dendrite for each group (15 neurons analyzed) are shown on the right. Scale bar, 50 μ m.

level of expression and its interaction with surrounding proteins. Therefore, specific receptor targeting to neuronal dendrites could imply the interaction of Yif1B with dendrite-specific IC. In this context, another IC protein, Rab1, has also been implicated in the intracellular trafficking of some GPCRs to the plasma membrane. Experiments inhibiting rab1 expression led to the characterization of rab1-dependent and -independent pathways from the ER to the plasma membrane depending on the GPCR studied (Wu et al., 2003; Filipeanu et al., 2006). Similarly, concerning another family of receptors, the regulation of a nicotinic acetylcholine receptor subtype trafficking has been recently described in *Caenorhabditis elegans*, revealing that its traffic depended on UNC-50, an endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment

(ERGIC)-associated protein (Eimer et al., 2007). Furthermore, UNC-50 displays an organization and size similar to Yif1B, i.e., five transmembrane segments clustered in the C-terminal moiety, a long hydrophilic N-terminal domain within the cytoplasm, and the C terminus turned to the ER lumen. But no sequence homology could be found between Yif1B and UNC-50, confirming that they belong to different protein families exhibiting similarities: they are both ubiquitous ERGIC proteins that are also involved in the specific trafficking of one type of receptor, in a differentiated cell type.

Although these small proteins regulating the intracellular traffic are ubiquitous, they may play specific roles according to the cell type or the receptors that transit from the ER to the plasma membrane (Sivars et al., 2003). The existence in mammals of several proteins (Yif1A and Yif1B, or Yip1p, Yip4p, and Yip5p), as opposed to only one in yeast, may reflect the diversity of intracellular vesicular trafficking in differentiated cells (Shakoori et al., 2003). Such an idea is supported by differences in IC protein composition observed between soma and neurites of differentiated PC12 cells. Indeed, Rab1, P58, and COPI IC proteins mainly colocalize in the ER exit sites (ERESs) at the soma, whereas only Rab1 is present in dynamic vesicular-tubular structures at the neurites, suggesting the existence of neurite-specific ERESs (Sanerud et al., 2006).

In neurons, a secretory pathway has been identified in neuronal dendrites, as far as in dendritic spines (Pierce et al., 2000, 2001). Furthermore, the existence of dendritic ERESs may enable endogenous proteins to exit from the ER at different levels in the dendritic tree (Aridor et al., 2004). In addition, proteins of the secretory pathway, such as Sar1, affect dendritic growth both *in vivo* in *Drosophila* mutants, and *in vitro*, in the early differentiation of primary neuronal cultures (Ye et al., 2007). Yif1B would similarly participate in the dendritic differentiation, including the distal dendritic targeting of the receptor, but without affecting the dendritic neuronal morphology, because we have shown that inhibition of Yif1B does not change the length of the dendritic tree, nor the morphology of the Golgi apparatus.

Yif1B could belong to the pool of chaperone proteins involved in the exit from the ER (through IC vesicles) of proteins finally targeted to the dendritic cell membrane, such as 5-HT_{1A}R. Therefore, the identification of Yif1B as a 5-HT_{1A}R-specific dendritic targeting protein makes an initial ground for the discovery of other members of the intracellular machinery involved in the dendritic targeting of the 5-HT_{1A}R, and more generally of other GPCRs with a short C terminus.

References

- Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O (1990) Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J Biol Chem* 265:5825–5832.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2006) Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference. *J Neurosci* 26:7820–7825.
- Ango F, Robbe D, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin JP, Bockaert J, Fagni L (2002) Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons. *Mol Cell Neurosci* 20:323–329.
- Aridor M, Guzik AK, Bielli A, Fish KN (2004) Endoplasmic reticulum export site formation and function in dendrites. *J Neurosci* 24:3770–3776.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152.
- Barrowman J, Wang W, Zhang Y, Ferro-Novick S (2003) The Yip1p.Yif1p complex is required for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Biol Chem* 278:19878–19884.
- Bécamel C, Alonso G, Galéotti N, Demey E, Jouin P, Ullmer C, Dumuis A, Bockaert J, Marin P (2002) Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT_{2C} receptors: a proteomic approach. *EMBO J* 21:2332–2342.
- Bécamel C, Gavarini S, Chanrion B, Alonso G, Galéotti N, Dumuis A, Bockaert J, 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.
- Bermak JC, Li M, Bullock C, Weingarten P, Zhou QY (2002) Interaction of gamma-COP with a transport motif in the D1 receptor C-terminus. *Eur J Cell Biol* 81:77–85.
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103:203–221.
- Boué-Grabot E, Barajas-López C, Chakfé Y, Blais D, Bélanger D, Emerit MB, Séguéla P (2003) Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23:1246–1253.
- Boué-Grabot E, Emerit MB, Toulmé E, Séguéla P, Garret M (2004a) Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J Biol Chem* 279:6967–6975.
- Boué-Grabot E, Toulmé E, Emerit MB, Garret M (2004b) Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X₂ receptor channels. *J Biol Chem* 279:52517–52525.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Haganir RL, Worley PF (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:284–288.
- Breuzza L, Halbeisen R, Jenö P, Otte S, Barlowe C, Hong W, Hauri HP (2004) Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46. *J Biol Chem* 279:47242–47253.
- Brewer CB, Roth MG (1991) A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 114:413–421.
- Calero M, Winand NJ, Collins RN (2002) Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett* 515:89–98.
- Carrel D, Hamon M, Darmon M (2006) Role of the C-terminal di-leucine

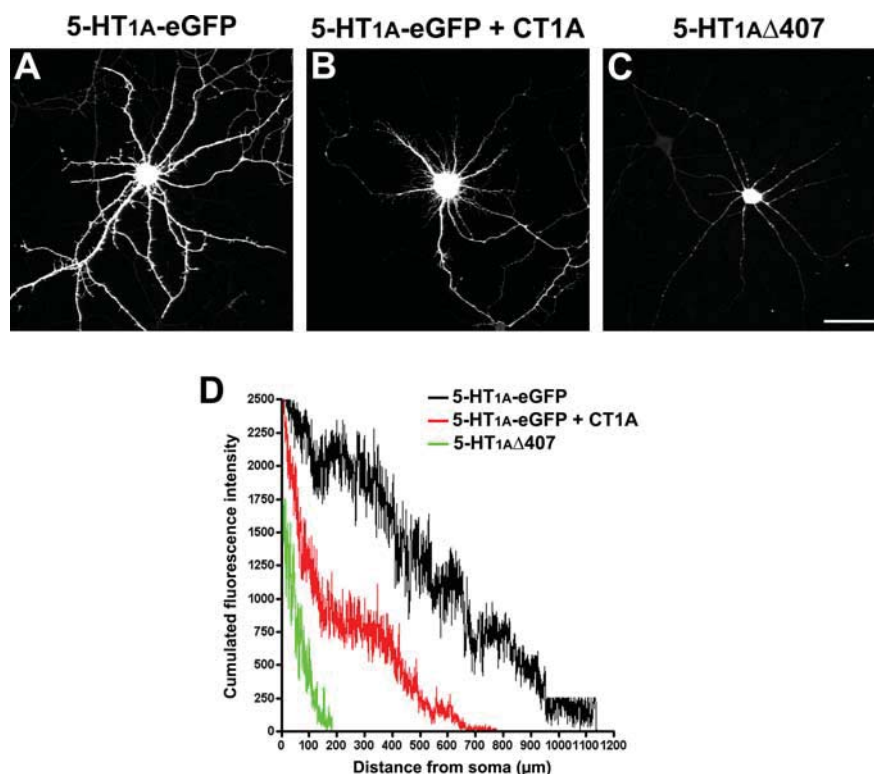


Figure 9. 5-HT_{1A} receptor distribution in the dendritic tree is dependent on the C-terminal segment. Primary cultures of rat hippocampal neurons (7 DIV) were transfected with the following plasmids: 5-HT_{1A}-eGFP (**A**), 5-HT_{1A}-eGFP plus CT1A (**B**), or 5-HT_{1A}Δ407 (**C**). Immunofluorescence was performed with anti-GFP antibodies to enhance the GFP signal (**A**, **B**) or with anti-5-HT_{1A} antibodies (**C**, **D**). Cumulated fluorescence profiles along the longest dendrite for each group (30 neurons analyzed). Note that cotransfection with an excess CT1A reduces the 5-HT_{1A}-eGFP fluorescence in distal dendrites (**B**), whereas the complete absence of the C-terminal segment virtually abolishes the presence of the mutant receptor in dendrites (**C**). Scale bar, 50 μm.

- motif of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} serotonin receptors in plasma membrane targeting. *J Cell Sci* 119:4276–4284.
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 86:3993–4003.
- Darmon M, Langlois X, Suffisseau L, Fattaccini CM, Hamon M (1998) Differential membrane targeting and pharmacological characterization of chimeras of rat serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors expressed in epithelial LLC-PK1 cells. *J Neurochem* 71:2294–2303.
- Doucet E, Hamon M, Emerit MB (1998) Immunolabelling of the rat intestinal tract with antibodies specific to the long form of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *Neuroscience* 87:691–707.
- Ehret M, Pevet P, Maitre M (1991) Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem* 57:1516–1521.
- Eimer S, Gottschalk A, Hengartner M, Horvitz HR, Richmond J, Schafer WR, Bessereau JL (2007) Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *EMBO J* 26:4313–4323.
- el Mestikawy S, Riad M, Laporte AM, Vergé D, Daval G, Gozlan H, Hamon M (1990) Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 118:189–192.
- Filipeanu CM, Zhou F, Fugetta EK, Wu G (2006) Differential regulation of the cell-surface targeting and function of beta- and alpha₁-adrenergic receptors by Rab1 GTPase in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 69:1571–1578.
- Formstecher E, Aresta S, Collura V, Hamburger A, Meil A, Trehin A, Reverdy C, Betin V, Maire S, Brun C, Jacq B, Arpin M, Bellaiche Y, Bellusci S, Benaroch P, Bornens M, Chanet R, Chavrier P, Delattre O, Doye V, et al. (2005) Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res* 15:376–384.
- Gavarini S, Bécamel C, Altier C, Lory P, Poncet J, Wijnholds J, Bockaert J, Marin P (2006) Opposite effects of PSD-95 and MPP3 PDZ proteins on serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor desensitization and membrane stability. *Mol Biol Cell* 17:4619–4631.

- Grailhe R, de Carvalho LP, Paas Y, Le Poupon C, Soudant M, Bregestovski P, Changeux JP, Corringier PJ (2004) Distinct subcellular targeting of fluorescent nicotinic alpha 3 beta 4 and serotonergic 5-HT_{3A} receptors in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 19:855–862.
- Haj-Dahmane S, Hamon M, Lanfumey L (1991) K⁺ channel and 5-hydroxytryptamine_{1A} autoreceptor interactions in the rat dorsal raphe nucleus: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 41:495–505.
- Jasmin BJ, Cartaud J, Bornens M, Changeux JP (1989) Golgi apparatus in chick skeletal muscle: changes in its distribution during end plate development and after denervation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7218–7222.
- Jin C, Zhang Y, Zhu H, Ahmed K, Fu C, Yao X (2005) Human Yip1A specifies the localization of Yif1 to the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 334:16–22.
- Jolimay N, Franck L, Langlois X, Hamon M, Darmon M (2000) Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT_{1B} receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* 20:9111–9118.
- Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Vergé D (1996) Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365:289–305.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–580.
- Kushwaha N, Harwood SC, Wilson AM, Berger M, Tecott LH, Roth BL, Albert PR (2006) Molecular determinants in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor for G-protein coupling. *Mol Pharmacol* 69:1518–1526.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lanfumey L, Hamon M (2004) 5-HT₁ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:1–10.
- Lelouvier B, Tamagno G, Kaindl AM, Roland A, Lelievre V, Le Verche V, Loudes C, Gressens P, Faivre-Baumann A, Lenkei Z, Dournaud P (2008) Dynamics of somatostatin type 2A receptor cargoes in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 28:4336–4349.
- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L (1995) Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:141–148.
- Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang JI, Suh PG, Sheng M, Kim E (1999) Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J Biol Chem* 274:29510–29518.
- Matern H, Yang X, Andrulis E, Sternglanz R, Trepte HH, Gallwitz D (2000) A novel Golgi membrane protein is part of a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting. *EMBO J* 19:4485–4492.
- Otte S, Belden WJ, Heidtman M, Liu J, Jensen ON, Barlowe C (2001) Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *J Cell Biol* 152:503–518.
- Pierce JP, van Leyen K, McCarthy JB (2000) Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:311–313.
- Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB (2001) Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol* 11:351–355.
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel E, Wojcik J, Schächter V, Chemama Y, Labigne A, Legrain P (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409:211–215.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181–194.
- Sannerud R, Marie M, Nizak C, Dale HA, Pernet-Gallay K, Perez F, Goud B, Saraste J (2006) Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Mol Biol Cell* 17:1514–1526.
- Shakoori A, Fujii G, Yoshimura S, Kitamura M, Nakayama K, Ito T, Ohno H, Nakamura N (2003) Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. *Biochem Biophys Res Commun* 312:850–857.
- Sivars U, Aivazian D, Pfeffer SR (2003) Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* 425:856–859.
- Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1990) Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci* 2:1144–1154.
- Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P (2006) Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311:77–80.
- Turner JH, Garnovskaya MN, Raymond JR (2007) Serotonin 5-HT_{1A} receptor stimulates c-Jun N-terminal kinase and induces apoptosis in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1773:391–399.
- Wojcik J, Boneca IG, Legrain P (2002) Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J Mol Biol* 323:763–770.
- Wu G, Zhao G, He Y (2003) Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface: Rab1-independent transport of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 278:47062–47069.
- Wyszynski M, Valtschanoff JG, Naisbitt S, Dunah AW, Kim E, Standaert DG, Weinberg R, Sheng M (1999) Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein *in vivo*. *J Neurosci* 19:6528–6537.
- Xia J, Zhang X, Staudinger J, Huganir RL (1999) Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 22:179–187.
- Yang X, Matern HT, Gallwitz D (1998) Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *EMBO J* 17:4954–4963.
- Ye B, Zhang Y, Song W, Younger SH, Jan LY, Jan YN (2007) Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* 130:717–729.

II. Yif1B est une protéine d'échafaudage recrutant les protéines Yip1A et Rab6 dans les vésicules cargos du récepteur 5-HT_{1A} essentielles pour son adressage le long des microtubules dendritiques : Identification d'une nouvelle voie d'adressage dendritique des RCPG (article 2)

II.1. Questions soulevées suite au premier article :

Yif1B n'étant pas impliquée dans l'adressage d'autres récepteurs dendritiques testés au laboratoire, nous avons proposé de rechercher les bases de la spécificité de l'interaction de Yif1B avec le récepteur 5-HT_{1A}. Une approche biochimique a été envisagée afin de déterminer précisément les motifs impliqués dans l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et sa protéine d'adressage Yif1B. De plus, pour comprendre le rôle de Yif1B dans le transport sélectif du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites, nous nous sommes proposés de combiner des techniques de protéomique et de biologie cellulaire afin d'identifier d'autres protéines partenaires du récepteur pouvant jouer un rôle dans le trafic intracellulaire, notamment dans les neurones. Ces partenaires pourraient être, tout comme Yif1B, des protéines impliquées dans l'adressage du récepteur. Les résultats obtenus pourraient également préciser le rôle exact de Yif1B dans la fonction d'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}.

II.1. Résultats de l'article 2 :

II.1.1. Identification des motifs impliqués dans l'interaction entre le récepteur

5-HT_{1A} et Yif1B

D'après la localisation subcellulaire et la topologie de Yif1B étudiées dans l'article précédent, cette protéine transmembranaire serait présente dans des vésicules intracellulaires et aurait une très longue extrémité N-terminale tournée vers le cytosol tout comme l'extrémité C-terminale du récepteur avec laquelle elle interagit (voir article 1).

Les résultats de GST Pull Down obtenus avec les nombreuses formes tronquées de Yif1B en N -ou en C-terminal, ont permis non seulement de déterminer le domaine

interagissant avec le récepteur 5-HT_{1A} mais également de montrer que les domaines transmembranaires fortement conservés à travers les espèces sont essentiels pour une bonne expression et/ou stabilité de Yif1B. La forme dépourvue des 50 premiers acides aminés de Yif1B perd son interaction avec le récepteur, suggérant que le motif d'interaction est présent dans ce domaine de l'extrémité N-terminale de Yif1B.

L'analyse bioinformatique de la séquence primaire de Yif1B montre que cette perte d'interaction n'est pas due à une modification de la structure tridimensionnelle de l'extrémité N-terminale de Yif1B suite à la délétion de ce domaine. En effet, aucune structure secondaire n'a été prédite dans les 70 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de Yif1B, la forte présence de prolines, acides aminés brisant les hélices, pouvant être à l'origine de cette irrégularité structurale.

Des techniques de mutagenèse dirigée et de GST pull-down ont été combinées et ont permis de démontrer que l'extrémité CT1A (GST-CT1A) du récepteur comporte 3 acides aminés basiques (chargés positivement) cruciaux pour l'interaction avec 3 acides aminés acides (chargés négativement) de l'extrémité N-terminale de Yif1B.

De plus, nous avons utilisé la technologie de Résonance Plasmonique de Surface (ou Biacore) permettant d'étudier les interactions intermoléculaires en temps réel et nécessitant la purification au préalable de protéines cytosoliques. Les expériences ont été effectuées avec l'extrémité N-terminale de Yif1B (His-Yif1B) purifiée au préalable grâce son étiquette His, puis greffée sur une puce sur laquelle nous avons injecté les nouveaux partenaires du récepteur 5-HT_{1A} purifiés également à l'aide de leur tag GST. Ainsi, nous avons pu d'une part confirmer les résultats obtenus en GST Pull-down, et d'autre part démontrer que l'interaction entre l'extrémité N-terminale de Yif1B et l'extrémité CT1A du récepteur est directe, avec un K_D de l'ordre de 37 nM révélateur d'une très forte affinité.

L'étude des mutants du récepteur par Biacore a permis de mesurer leur affinité pour Yif1B. Ainsi, les K_D obtenus ont révélé l'importance exacte de chaque résidu muté dans l'interaction entre le récepteur et sa protéine partenaire Yif1B. Le mutant nommé KdiR, dans lequel la lysine 405 et le motif di-arginine en position 421-422 ont été mutés en alanines, perd totalement l'interaction avec Yif1B. Ces trois acides aminés forment donc un motif tribasique dans l'extrémité C-terminale du récepteur et permettent ainsi son interaction avec sa protéine d'adressage.

Enfin, des mutants Yif1B ont permis de mettre en évidence la présence de trois aspartates en position 33,39 et 40 dans son extrémité N-terminale, importants pour son

interaction avec le récepteur 5-HT_{1A}. En effet, l'interaction avec le récepteur est fortement diminuée lorsque ces trois résidus acides sont mutés (mutant Yif1B-3DA), puisque la capacité de liaison au récepteur devient alors 10 fois plus faible qu'avec Yif1B WT et le K_D estimé passe de 37 nM à 193 nM.

II.1.2. Défaut d'adressage du récepteur muté 5-HT_{1A} KdiR

Le récepteur muté qui perd l'interaction avec Yif1B présente également un défaut d'adressage à la membrane plasmique au niveau du soma et des dendrites proximales. Des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat ont été transfectées avec les plasmides codant pour le récepteur 5-HT_{1A}-WT ou muté (KdiR) étiquetés avec un épitope Flag au niveau de leur extrémité N-terminale, permettant leur marquage extracellulaire. L'immunomarquage avec des anticorps anti-Flag, sans perméabilisation préalable des neurones, permet la visualisation des récepteurs présents à la surface cellulaire. Les résultats obtenus montrent une diminution du marquage de surface concernant le récepteur 5-HT_{1A}-KdiR en comparaison avec celui du récepteur 5-HT_{1A}-WT révélant ainsi une perturbation de l'adressage vers la membrane plasmique de ce récepteur muté incapable d'interagir avec Yif1B. De plus, le marquage total (surface et intracellulaire) du récepteur 5-HT_{1A} KdiR est également modifié par rapport au récepteur WT. Cette mutation empêche bien son transport vers les dendrites distales, et l'on constate effectivement une rétention dans le soma et les dendrites proximales. L'effet obtenu avec les expériences d'inhibition de l'expression de Yif1B présentés dans le premier article est donc mimé avec ce récepteur KdiR incapable de se lier à la protéine d'adressage de Yif1B.

II.1.3. Yip1A et Rab6, deux nouveaux partenaires du récepteur 5-HT_{1A}

Le second objectif de cette étude était l'identification de protéines d'adressage du complexe récepteur 5-HT_{1A}/Yif1B qui pourrait expliquer la spécificité de l'adressage somatodendritique du récepteur. Des expériences de GST pull-down utilisant comme appât l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}-WT (GST-CT1A) ont été réalisées sur des extraits totaux provenant de différentes structures du cerveau. Les protéines « piégées » interagissant avec la GST-CT1A ont été séparées sur gel dénaturant, colorées ensuite au Bleu Colloïdal. Ce colorant est plus sensible que le Bleu de Coomassie et, contrairement à la

coloration à l'argent, il est tout à fait compatible avec une analyse par spectrométrie de masse. Ensuite, les protéines colorées ont été prélevées et digérées à la trypsine et les peptides obtenus ont été analysés par LC-MS/MS. Enfin, les résultats obtenus ont été confirmés par Western Blot.

Grâce à cette approche protéomique, nous avons ainsi identifié Rab6 et la tubuline comme protéines partenaires du récepteur 5-HT_{1A}. Rab6 est une protéine jouant un rôle clé dans le trafic intracellulaire, notamment dans le transport RE-Golgi. Chez les mammifères, elle possède deux isoformes ubiquitaires, Rab6A et Rab6A' et un homologue neurone-spécifique, Rab6B. Les peptides identifiés par spectrométrie de masse sont communs à Rab6A et Rab6A'. Nous ne pouvons donc pas déterminer si l'interaction entre le récepteur et Rab6 est de nature isoforme-spécifique. En revanche, leur séquence est différente de celle de Rab6B. L'interaction entre l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}-WT et Rab6 a été confirmée par western blot, ce qui fait de Rab6 un partenaire intéressant susceptible de jouer un rôle dans le trafic du récepteur.

D'après la littérature, une deuxième protéine pouvait potentiellement être présente dans le complexe 5-HT_{1A}/Yif1B. Il s'agit de Yip1A, un autre membre de la famille Yip dont l'interaction a été démontrée avec Yif1A, l'homologue de Yif1B. De plus, l'interaction avec Yip1A est cruciale pour la localisation golgienne de Yif1A. Par analogie, il était tentant de penser que Yif1B pourrait interagir avec Yip1A et faire également partie du complexe 5-HT_{1A}/Yif1B. Grâce à l'anticorps anti-Yip1A produit par Fumi Kano de l'équipe du Dr Murata, nous avons effectivement montré, par des expériences de GST Pull Down, que Yip1A était bien détectée parmi les protéines interagissant avec l'extrémité C-terminale du 5-HT_{1A}-WT dans le cerveau de rat.

II.1.4. Yif1B, protéine d'échafaudage reliant le récepteur 5-HT_{1A} à ses nouveaux partenaires

Nos résultats ont également montré de façon très intéressante que le récepteur 5-HT_{1A} muté KdiR qui perd l'interaction avec Yif1B, perd également sa capacité à se lier à Rab6, Yip1A et la tubuline. Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse du rôle éventuel de Yif1B en tant que protéine adaptatrice permettant l'interaction du récepteur avec ses autres partenaires nouvellement identifiés.

Nous avons donc entrepris l'étude de l'interaction entre Yif1B et les nouveaux partenaires du récepteur 5-HT_{1A}.

L'extrémité N-terminale de Yip1A fusionnée à la GST nous a été donnée par l'équipe de Dr Hong afin de réaliser des GST Pull-down sur des extraits de cerveau. Nous avons ainsi démontré que le domaine N-terminal de Yip1A interagit avec Yif1B. De plus, les résultats de GST Pull Down obtenus avec les protéines de fusion GST-Rab6A et GST-Rab6A', produites à partir des constructions données par Stéphanie Miserey-Lenkei de l'équipe de Bruno Goud, nous ont permis de vérifier que l'interaction entre Rab6 et Yif1B n'est pas isoforme-spécifique. En effet, Yif1B a été « piégée » avec la GST-Rab6A mais également avec GST-Rab6A'.

Des expériences de Biacore montrent ; d'une part, une interaction directe entre les extrémités N-terminales (cytosoliques) de Yip1A (GST-Yip1A) et Yif1B, et d'autre part que Yif1B interagit directement avec les deux isoformes de Rab6. Les constantes d'affinité (K_D) de Yif1B ont été estimées à 1 μ M, 0,33 μ M et 2,4 μ M avec les GST-Yip1A, GST-Rab6A et GST-Rab6A' respectivement. Il semblerait donc que Yif1B interagisse préférentiellement avec Rab6A, l'affinité étant plus forte qu'avec Rab6A'. Il est important de noter que l'affinité de Yif1B pour le récepteur reste la plus forte avec, rappelons-le, une valeur de K_D estimée à 37 nM.

Ces résultats ont confirmé le rôle de Yif1B comme protéine d'échafaudage permettant la formation des complexes 5-HT_{1A}/Yip1A et 5-HT_{1A}/Rab6.

II.1.5. Co-localisation du complexe 5-HT_{1A}/Yif1B et de ses nouveaux partenaires

Les immunofluorescences réalisées sur les cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat transfectées, et analysées au microscope confocal, ont montré des colocalisations du complexe 5-HT_{1A}/Yif1B avec d'une part, Yip1A et d'autre part, Rab6. Ces protéines sont toutes les deux exprimées de façon endogène dans ces cultures et sont présentes dans des vésicules dont certaines sont immunopositives pour le complexe 5-HT_{1A}/Yif1B dans le soma mais également dans les dendrites. Ces résultats suggèrent que ces nouveaux partenaires pourraient, tout comme Yif1B, être impliqués dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}.

II.1.6. Mise en évidence d'un transport vésiculaire dynamique bidirectionnel du récepteur 5-HT_{1A} et de ses partenaires dans les dendrites

La dynamique du trafic du récepteur 5-HT_{1A} et de ses partenaires a été étudiée par une technique de microscopie confocale appelée « spinning disc » qui permet l'acquisition rapide d'images avec une haute résolution spatiale. En effet, ce microscope offre la possibilité de travailler en mode multi-couleurs, il permet d'effectuer un suivi dynamique précis des phénomènes cellulaires, tel que les mouvements de petites vésicules dans des neurones y compris dans les dendrites. Ce qui demande à la fois une forte sensibilité, une fréquence d'acquisition rapide et pendant des temps longs.

Des cultures primaires d'hippocampe de rat ont été transfectées avec des plasmides recombinants codant pour le récepteur et ses partenaires couplés à un fluorochrome (GFP ou Cherry excités respectivement au laser 488 nm ou 546 nm). Nous avons ainsi observé la présence du récepteur 5-HT_{1A} aussi bien à la membrane que dans des vésicules mobiles somatodendritiques. Ses partenaires Yif1B, Yip1A et Rab6 sont toutes également localisées dans des vésicules mobiles dans le soma et les dendrites, et qui montrent des caractéristiques communes entre elles et celles contenant le récepteur 5-HT_{1A}. Premièrement, de nombreuses vésicules sont caractérisées par un mouvement de type « stop and go », c'est-à-dire qu'elles bougent très rapidement, s'arrêtent subitement, puis reprennent leur route. Deuxièmement, certaines vésicules font des allers retours dans le soma et également dans les dendrites proximales suggérant ainsi la bidirectionnalité du transport. En effet, ce transport bidirectionnel a lieu également dans les dendrites distales où certaines vésicules s'éloignent du soma vers les dendrites distales (antérograde), alors que d'autres se dirigent vers le soma (rétrograde). Troisièmement, certaines de ces vésicules sortent du soma et se dirigent vers les dendrites proximales, voire continuent dans leur partie distale. C'est le cas de nombreuses vésicules mobiles, y compris celles contenant à la fois le récepteur 5-HT_{1A} et sa protéine partenaire Yif1B (ou Yip1A ou Rab6) confortant ainsi leur rôle dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites.

L'ensemble de ces résultats suggère, tout comme pour Yif1B, un rôle fonctionnel de Rab6 et de Yip1A dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A} transporté de façon bidirectionnel le long des microtubules.

II.1.7. Rôle des microtubules dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}

Par l'approche protéomique, nous avons également identifié la tubuline comme partenaire du récepteur 5-HT_{1A}. C'est l'unité élémentaire des microtubules, les rails intracellulaires permettant le transport de cargo notamment dans les dendrites des neurones.

Comme le récepteur muté 5-HT_{1A} KdiR qui n'interagit pas avec Yif1B perd également son interaction avec la tubuline, cela suggère que Yif1B est la protéine d'échafaudage entre le récepteur et les microtubules. Nous avons également montré que la tubuline interagit également avec Yip1A et Rab6 par GST Pull Down, suggérant que les microtubules pourraient interagir avec le complexe 5-HT_{1A}/Yif1B par l'intermédiaire de Yif1B ou bien de Yip1A ou Rab6.

Enfin, un traitement au nocodazole, drogue dépolymérisant les microtubules, conduit à une forte perturbation de la distribution dendritique du récepteur 5-HT_{1A}, prouvant ainsi le rôle crucial de ces « rails » dans le trafic du récepteur.

Le transport bidirectionnel du récepteur, observé dans les neurones vivants en vidéomicroscopie suggérait l'intervention de moteurs moléculaires dans le transport des vésicules cargos-5-HT_{1A}, se déplaçant dans des sens opposés le long des microtubules. Nous avons donc recherché quels moteurs moléculaires étaient présents dans le complexe interagissant avec le récepteur 5-HT_{1A}. Nos résultats préliminaires obtenus par GST Pull Down sur des extraits de cerveau de rat montrent une interaction du récepteur 5-HT_{1A}-WT avec la dynéine (se déplaçant vers les extrémités (-)), la sous-unité p150^{glued} de dynactine (cofacteur essentiel de la dynéine) et la kinésine KIF5B (se déplaçant vers les extrémités (+)). La forme mutée 5-HT_{1A}-KdiR qui perd sa capacité à interagir avec Yif1B perd également son interaction avec ces trois protéines.

Le transport du récepteur 5-HT_{1A} fait donc intervenir deux moteurs moléculaires différents se déplaçant dans des sens opposés le long des microtubules. Ceux-ci peuvent expliquer les mouvements bidirectionnels observés dans les dendrites distales.

II.1.8. Rôle fonctionnel des différents éléments du complexe Yif1B-dépendant dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}

Afin de déterminer le rôle fonctionnel de ces nouvelles protéines identifiées interagissant avec le récepteur 5-HT_{1A} par l'intermédiaire de Yif1B ; des expériences de siRNA inhibant l'expression de Yip1A, Rab6, dynéine et Kif5B ont été réalisées sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat.

Tout comme Yif1B, l'inhibition de l'expression de Rab6 ou de Yip1A conduit à la séquestration du récepteur dans le soma et les dendrites proximales démontrant ainsi leur rôle dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}.

Les premiers résultats des expériences d'inhibition de l'expression de la dynéine et Kif5B par les siRNA semblent confirmer le rôle de la dynéine et de Kif5B dans l'adressage dendritique du récepteur. Une fois terminées, ces expériences compléteront la description du complexe Yif1B-dépendant permettant l'adressage des vésicules cargos du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites et expliqueront également le transport bidirectionnel de ce complexe le long des microtubules.

N.B : La version de l'article 2 présentée dans ce manuscrit sera complétée par les résultats définitifs des expériences en cours concernant le rôle des moteurs moléculaires dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} avant sa soumission dans le journal Nature Cell Biology.

**Rab6 and Yip1A: two key partners in the vesicular Yif1B-scaffolding complex
for the 5-HT_{1A} receptor neuronal targeting**

Sana Al Awabdh, Tahar Bouceba, Stéphanie Miserey-Lenkei, Fumi Kano, Carine Marinach-
Patrice, Justine Masson, Michel Hamon, Michel Boris Emerit, Michèle Darmon.

Rab6 and Yip1A: two key partners in the vesicular Yif1B-scaffolding complex for the 5-HT_{1A} receptor neuronal targeting

Sana Al Awabdh^{1,2}, Tahar Bouceba³, Stéphanie Miserey-Lenkei⁴, Fumi Kano⁵, Carine Marinach-Patrice⁶, Justine Masson^{1,2,7}, Michel Hamon^{1,2}, Michel Boris Emerit^{1,2,7}, Michèle Darmon^{1,2,7}

¹ INSERM U894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris F-75014, France.

² Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France.

³ Institut de Biologie Intégrative, IFR83, Plateforme technique « Interactions biomoléculaires en temps réel », UPMC, Paris, France.

⁴ Institut Curie, CNRS UMR144, Mécanismes moléculaires du transport intracellulaire, Paris, France.

⁵ The University of Tokyo, Graduate School of Arts and Sciences, Tokyo 153-8902, Japan.

⁶ INSERM UMR S945, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service Parasitologie-Mycologie, Paris F-75013.

⁷ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité – Paris 5, UMR U894, Paris, F-75014, France.

* Address correspondence to: Michèle Darmon, CPN, INSERM U894, 91 boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France, Tel: +33 1 40 77 97 10, Fax: +33 1 40 77 97 90, E-mail: michele.darmon@inserm.fr

Running Head: 5-HT_{1A} receptor dendritic targeting

Key words: GPCR, serotonin 5-HT_{1A} receptor, targeting, scaffolding protein, Yip, Rab, dendrites, microtubules.

Abstract

Although essential for their neuronal function, the molecular mechanisms underlying the dendritic or axonal targeting of serotonin receptors are poorly understood. We previously found that the serotonin 5-HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}R) trafficking towards its dendritic localization was mediated by an interaction with Yif1B, a vesicular protein found between the ER and the Golgi. We describe here that this direct interaction involves a novel targeting tribasic motif within the C-tail of the 5-HT_{1A} receptor. Moreover, we identify Yip1A, Rab6 and tubulin as new protein partners of the receptor's trafficking scaffold. Intracellular mobility analysis of 5-HT_{1A}R, Yif1B, Yip1A and Rab6 further demonstrate that they exit the soma towards the dendritic tree in a vesicular pathway. We propose a model in which Yif1B is the scaffold protein linking the 5-HT_{1A} receptor to Yip1A and Rab6 in mobile vesicle trafficking along the microtubule network.

Introduction

Depression, one of the major public health problems in the world today, is mainly associated with perturbation of serotonin neurotransmission¹⁻³. The most commonly prescribed class of antidepressants (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) inhibits the serotonin transporter in order to increase the level of extracellular serotonin. But the therapeutic effect is reached only after two to three weeks treatment, which increases the risk of suicide in severely depressed patients, because the 5-HT_{1A}Rs initially counterbalance this action through its inhibitory control of serotonin release by raphe neurons. Desensitization of the 5-HT_{1A}Rs, that occurs two to three weeks later is concomitant to the therapeutic effect of SSRIs⁴. Thus, a way to accelerate the onset of antidepressant therapy could rely on acceleration of the slow desensitization of the 5-HT_{1A}R in raphe. The control of raphe neuron firing by the 5-HT_{1A}R is linked to its dendritic localization⁵. Therefore, identification of partner proteins implicated in its targeting may unveil new targets for inhibiting 5-HT_{1A}R function in an innovative therapy.

During our previous studies to understand the mechanisms of the 5-HT_{1A} receptor targeting to dendrites, we showed that its C-terminus was important for its dendritic localization^{6,7} and membrane targeting⁸. Numerous studies have also demonstrated the crucial role of receptor C-tails in the targeting of other G-protein coupled receptor (GPCR)^{9,10}. Whereas the trafficking of GPCRs presenting a PDZ interacting motif in their C-terminus tail is the most studied^{11,12}, less data is available on the intracellular trafficking and sorting of serotonin receptors¹³ which are devoid of this motif, as it is the case for the 5-HT_{1A}R, a receptor exhibiting a very short C-tail.

More recently, we identified Yif1B as a membrane-bound protein interacting with the C-tail of the 5-HT_{1A}R, and showed that this interaction is crucial for the distal dendritic targeting of this receptor in brain neurons¹⁴. Furthermore, we showed that Yif1B is subtype specific as it does not interact with the 5-HT_{1B}R which is homologous to the 5-HT_{1A}R but restricted to an axonal targeting⁷, or with three other typically somatodendritic receptors. Finally we characterized Yif1B as a ubiquitous protein highly expressed in the brain and localized in vesicles shuttling between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. Yif1B belongs to the Yip protein family whose first members have been characterized in Yeast as Ypt1p (Rab1) interactors and implicated in ER to Golgi vesicle docking and fusion^{15,16}. Members of this Yip family exhibit the same overall domain topology¹⁷ comprising a long hydrophilic N-tail followed by five transmembrane domains and a very short C-tail. They all have the ability to physically associate with another member of the Yip family^{18,15} and with a Rab protein^{19,20}; and are emerging as strong candidates for potential GDFs²¹.

In this study we address the molecular mechanisms underlying the Yif1B / 5-HT_{1A}R interaction that leads to the specific dendritic targeting of the 5-HT_{1A}R towards the distal dendrites, and visualize a new vesicular pathway that could be part of this sorting mechanism. We also identify Yip1A and Rab6 as new intracellular partner proteins interacting with the 5-HT_{1A}R / Yif1B complex, and we propose that Yif1B could play the role of a scaffold protein between the receptor and the intracellular machinery that clusters the receptor into vesicles transported along the microtubule network towards distal dendrites. These data provide new insights into the cellular and molecular mechanisms underlying 5-HT_{1A}R dendritic targeting and describe a new vesicular Yif1B-based transport pathway.

Materials and Methods

Antibodies

The following primary antibodies were used:

Rabbit anti-green fluorescent protein (GFP) antibody (Millipore Bioscience Research Reagents; 1:1000),

Mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (Abcam; 1:2000),

Rabbit anti-tubulin antibody (Novus Biologicals, 1:1000)

Rabbit anti-MAP2 antibody (Chemicon, 1:500)

Mouse monoclonal anti-Flag M2 antibody (Sigma; 1:2000),

Rabbit anti-Yif1B antibody was purified as described^{1,2} and used at 1:1000.

Rabbit anti-Rab6 antibody (C-19, Santa Cruz Biotechnology, 1:100)

Rabbit anti-Yip1A antibody was described previously by Kano and colleagues³ (1:100)

Rabbit polyclonal anti-uKHC (Kif5B) antibody (H-50, Santa Cruz Biotechnology, 1:500)

Mouse monoclonal anti-dynein (intermediate chain) antibody (Sigma-Aldrich, 1:500)

Mouse anti-p150^{GLUED} (BD transduction 1:500)

The secondary antibodies used were Alexa Fluor 405-, 488-, 568-conjugated antibodies from Invitrogen (1:250, 1:1000 and 1:500 respectively), and HRP conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies (Sigma; 1:10000).

Plasmid constructs and Directed site mutagenesis

The rat 5-HT_{1A}R-eGFP construct was previously described¹. The C-terminal fluorescent tagged proteins were cloned using the Infusion PCR Cloning System (Clontech) into the HindIII site of pEYFP-N1 vector, the pCherry-N1 vector or pGFP-N1 vector (Clontech).

The primers used were respectively:

forward primer 5'-TCTCGAGCTCAAGCTTCATGGATGTGTTTCAGTTTTGGC-3'

and reverse primer 5'-GCAGAATTCGAAGCTTTGATCGGCGGCAGAACTTGCA -3' for the rat 5-HT_{1A}R sequence (Albert et al., 1990),

forward primer 5'-TCTCGAGCTCAAGCTTATGCACGCGACAGGTTTG-3'

and reverse primer 5'-GCAGAATTCGAAGCTTTGACCGTACAAGGTGGAAGGT -3' for the rat Yif1B sequence

The rat Yip1A sequence (NM_001014150.3) was amplified on cDNA reverse transcribed from rat brain mRNA with the forward primer

ATGTCAGGCTTTGATAACTTAAACAGCGG (nucleotide 104-132 NM_001014150.3)

and reverse primer TCAAAGACGGAAATCAGGGCAAAG (nucleotide 853-877

NM_001014150.3) and cloned into TA cloning vector (Invitrogen). The Yip1Acherry plasmid was constructed after amplification with the forward primer

CCCAAGCTTCCACCATGTTTCAGGCTTTGATAACTTAAAC and the reverse primer

CGGGGTACCGTAAAGACGGAAATCAGGGCAAAG, digestion with HindIII and KpnI

and cloned into the HindIII KpnI linearized pCherryN1 vector.

The N-terminal truncated Yif1B proteins Tagged with a Flag epitope were generated by amplification with the following primers and inserted at the *Hind*III site of the pFlag-CMV-6a vector (Sigma):

Yif1B 1 fw Hind3 5' -GCGAAGCTTTTTATGCACGCGACAGGTTTG-3'

Flag-Yif1B(10) fw Hind3

5' -GCGAAGCTTTTGGGACGCCCCGGCTGCGTAAG-3'

Flag-Yif1B(18) fw Hind3

5' -GCGAAGCTTTTCCCTCAAAGCGGAGGGTCCC-3'

Flag-Yif1B(30) fw Hind3

5' -GCGAAGCTTTTTATGGCTGATCCCCACCAGTTT-3'

Flag-Yif1B(50) fw Hind3

5' -GCGAAGCTTTTTGGCCAGCCATCACCTGGTAGC-3'

Flag-Yif1B(55) fw Hind3

5' -GCGAAGCTTTTTATGGGTAGCCTGGGTTACCCCACC-3'

The C-terminal truncated Yif1B proteins were generated after amplification with the following oligos, the reverse primer containing a stop codon in italic, and inserted between the *Hind*III and the *Eco*RI sites of the pCB6 vector (Brewer and Roth, 1991) downstream of the CMV promoter:

Yif1B 1 fw Hind3

5' -GCGAAGCTTTTTATGCACGCGACAGGTTTG ,

Yif1B 311 rev *Eco*R1

5' -AGAATTCTCACCGTACAAGGTGGAAGGT-3'

Yif1B(152) rev *Eco*R1

5' -AGAATTCTCATGGAGCATTGATGTCAAAGCG-3'

Yif1B(186) rev *Eco*R1

5' -AGAATTCTCACTGTAGTCCCAGGAGGTCTGG-3'

Yif1B(220) rev *Eco*R1

5' -AGAATTCTCACACCAGGTCAATGGTGGTAA-3'

Yif1B(272) rev *Eco*R1

5' -AGAATTCTCATGCCTGGGCCAGGATCTTGAG-3'

The His-Yif1BNt plasmid corresponding to the N-terminal cytoplasmic domain (amino acids 1-152) of the rat Yif1B was generated after amplification with forward primer 5'-TGGGAATTCGAAGCTTTATGCACGCGACAGGTTTGGCG-3' and reverse primer 5'-CAAAACAGCCAAGCTTTCATGGAGCATTGATGTCAAAGCG-3' and cloned in the *Hind*III site of the pTrcHis-A vector (Invitrogen) using Infusion PCR Cloning System (Clontech), for N-termini His-tagged fusion protein production.

The QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) was used to generate mutants within the C-terminal cytoplasmic domain (amino acids 406–422) of the rat 5-HT_{1A}R (Albert et al., 1990) cloned in pGEX-6p1 for GST-tagged fusion protein production, or within the rat Flag5-HT_{1A}, the Flag YifB or the His-Yif1BNt (Carrel et al., 2008). Only the sense oligonucleotides are listed below, with the mutated nucleotides in bold letters.

K405A : GGCCGCACTAGCC**GC**AGACTTTCAAACGC
K412A : CAAAACGCTTTTT**GCG**AAGATAATCAAGTGC
R421A : GTGCAAGTTCTGCG**CCCG**ATGAGGATCC
R422A : GTGCAAGTTCTGCCG**GC**ATGAGGATCC
R421/422A : GTGCAAGTTCTGCG**CCGC**ATGAGGATCC
C417/420S: AAGATAATCAAG**AG**CAAGTTC**AG**CCGCCGATGAGAATTC,
I414/415A: CGCTTTTAAGAAG**GCAG**CCAAGTGCAAGTTCTGCCG
Q408 : GCCAAAGACTTT**GCAA**ACGCTTTTAAG

Flag K405A : TATGCTTATTTCAAC**GC**AGACTTTCAAACGCT
Flag R421/422 : GTGCAAGTTCTGCG**CCCG**ATGAGGATCC
D33A : GGGCATGGCTG**CT**CCCCACCAGTTT
D39/40AA : CTGATCCCCACCAGTTTTTT**GCCG**CACGAGTTCA

For the multiple substitutions, successive reactions were realized. All constructions were confirmed by sequencing the entire inserts.

RNA interference

For silencing Rab6 and Yip1A expression, we used stealth RNAs (Invitrogen) directed against human and rat Rab6A/A':

(GACAUCUUUGAUCACCAGA)(*CACCUAUCAGGCAACAAUU*),

Rat Yip1A (GGAUAUCUGUGGGCCGGAUUCAU),

and control siRNA (CCAGUACUUCGUACUCCAAUCGACA) (Carrel et al, 2008).

SiRNAs were transfected on hippocampal neurons with Lipofectamine 2000 (160 nM final concentration), or Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, 160 nM final concentration).

Cell culture and transfection

Neuronal cultures were prepared as described previously^{1, 4} with some modifications. Hippocampi of rat embryos were dissected at day 17-18. After trypsinization, tissue dissociation was achieved with a Pasteur pipette. Cells were counted and plated on poly-L-lysine-coated 15-mm diameter coverslips, at a density of 300-375 cells per square millimeter, in complete Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen), containing 0.5 mM L-glutamine, 10 U/mL penicillin G, and 10 mg/mL streptomycin. Three hours after plating, the medium was replaced by a conditioned medium obtained by incubating glial cultures (70-80% confluency) for 24 hours in the complete medium described above. Experiments were performed in agreement with the institutional guidelines for use of animals and their care, in compliance with national and international laws and policies (Council directives no. 87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions nos. 75-974 to M.D., 75-976 to M.B.E)

Hippocampal neurons were transfected on the 7-8th day in vitro as follows: for each coverslip, plasmid DNA (2.5 µg) was mixed with 50 µL of Neurobasal medium without B27 supplement. After 15 minutes at room temperature, 1.25 µL of Lipofectamine 2000

(Invitrogen) in 50 μ L of Neurobasal medium were added, and incubation continued for another 30 minutes. After the addition of 150 μ L of complete Neurobasal medium containing B27 supplement, the mix was applied onto the neuronal culture, and transfection lasted for 3 hours at 37°C. Typically, 5-10% of neurons expressed the receptors after transfection. For cotransfection experiments in the presence of siRNA, the plasmids (2 μ g) and the siRNA (2 μ l of a 20 μ M solution) were thoroughly mixed prior to the addition of Lipofectamine 2000 or Lipofectamine RNAiMAX (1,25 μ l / coverslip).

COS-7 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™ I (Invitrogen) supplemented with 1 g/L glucose, 10 % fetal bovine serum, 10 U/mL penicillin G, and 10 g/mL streptomycin. COS-7 cells (50 % confluent) were transfected using FuGENE (Roche, Meylan, France) according to the manufacturer protocol.

LLCPK1 cells expressing stably Yif1B were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™ I (Invitrogen) supplemented with 4.5 g/L, 10 % fetal bovine serum, 10 U/mL penicillin G, 10 g/mL streptomycin and 0,7 μ g/ μ l geneticin (G418).

Hela cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™ I (Invitrogen) supplemented with 4.5 g/L glucose, 10 % fetal bovine serum, 10 U/mL penicillin G, and 10 g/mL streptomycin. Hela cells (50 % confluent) were transfected using Lipofectamine2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer protocol. For both cell lines and hippocampal neurons, receptor expression was allowed in growth medium for 48 hours after Transfection. Protein expression for GST Pull Down experiments was allowed in growth medium 24 hours after transfection.

Indirect immunofluorescence

Cells on coverslips were washed with D-PBS+ (D-PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂) at 37°C, then fixed with paraformaldehyde (3 %) containing 4 % sucrose at 37°C in D-PBS-, and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in D-PBS-. After two 10 minute washes in D-PBS+, cells were incubated for 30 minutes in antibody buffer (3 % bovine serum albumin, 2 % normal goat serum, 2 % normal donkey serum in D-PBS-). Incubation with primary antibodies was then performed in antibody buffer for 1 hour at room temperature. After two 10 minute washes in D-PBS-, incubation with secondary antibodies proceeded for 1 hour. The secondary antibodies used were Alexa-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG. The coverslips were finally mounted in Fluoromount-G solution (Clinisciences, Montrouge, France).

Immunofluorescence images were generated using a Leica TCS SP2 AOBS laser scanning confocal microscope (63x oil-immersion lens). Background was lowered using Gaussian blur (radius 1 pixel) and contrast and brightness of images displayed in figures were modified using Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San Jose, CA) for clearer demonstration and do not correspond to the analysis conditions.

Quantification of dendrite fluorescence

Contrast and brightness of confocal images were chosen to ensure that all relevant pixels were within linear range and were maintained identical for all measurements. For double labeling experiments, pictures were generated using Adobe Photoshop CS2. Fluorescence profiles along dendrites were generated using the Lucia 4.71 software (Nikon). For the comparison of 5-HT_{1A}-eGFP distribution all neurons showing intact morphology along their longest dendrite, with unambiguous visual identification of the axon, were analyzed (one dendrite per neuron). The variability of distribution in individual neurons was eliminated by using the cumulated fluorescence profiles obtained for 20 neurons in each group.

Time-lapse fluorescence videomicroscopy.

Transfected hippocampal neurons grown on 35-mm glass base dishes (IWAKI) with culture medium supplemented with 20 mM HEPES. Time-lapse imaging was performed 48h after transfection at 37 °C using a spinning-disk microscope mounted on an inverted motorized confocal microscope (Leica TCS SP2) through a 100x 1.4NA PL-APO objective lens. The apparatus is composed of a *Yokogawa CSU-22* spinning disk head, a *Roper Scientific laser lounge*, a *Photometrics Coolsnap HQ2* CCD camera for image acquisition and *Metamorph* software (MDS) to control the setup. Acquisition parameters were 50-200 msec exposure for the GFP and Cherry channels. Laser was set to 30 % in each case. Movies shown in figures correspond to stacks resulting from a maximal intensity projection through the Z axis performed with the *Metamorph* software (NIH Image).

Trajectories of moving vesicles were tracked with the MTrackJ Plugin of ImageJ software developed by Erik Meijering at the Biomedical Imaging Group Rotterdam of the Erasmus MC - University Medical Center Rotterdam, in the Netherlands. Trajectories were classified as anterograde or retrograde according to their direction in dendrites or as somatic if the traffic occurred only in the soma. Mean and SEM values were calculated and plotted using GraphPad 4 Software.

GST pull down assay

GST-tagged fusion proteins were produced in the BL21DE3 strain of *Escherichia coli* (Stratagene). After induction at 28°C for 3h with 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, the bacterial pellet was sonicated in PBS (10 ml/250 ml culture), 0.1 % Triton X-100, and protease inhibitors (Sigma) and centrifuged at 14,000 x g for 15 min. Supernatants were incubated overnight with glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) at 4°C, then washed in PBS.

Extracts from Yif1B transfected stable LLC-PK1, and COS7 or HeLa cells expressing the different forms of truncated Yif1B or from hippocampus raphe and cerebellum dissected from Sprague Dawley rats were homogenized by sonication in buffer B (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5 % NP-40, protease inhibitors, 1 ml/100 mg tissue). After centrifugation at 15,000 x g for 10 min, 100–200µg of proteins from cell lysates or 1 mg of proteins from tissue homogenates were incubated with glutathione-Sepharose beads coupled

to the different GST fusion proteins in buffer B (BufferA containing 2.5 mg/ml bovine serum albumin), overnight at 4°C. After washing two times with buffer B, and one time with buffer A, the proteins retained on the beads were eluted in sample buffer (Laemmli, 1970) and loaded on SDS-PAGE gel, followed by blotting to PVDF membrane and incubation with Yif1B affinity-purified antiserum (1:2000).

For surface plasmon resonance analysis the proteins retained on the beads were eluted with buffer C (10 mM Glutathione reduced form (Sigma), 50 mM Tris-HCl pH8) and dialyzed in HBS-EP buffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Tween-20).

For proteomic analysis, the beads were washed two times with buffer B and three times with buffer A, the beads were incubated overnight with 10 units of PreScission Protease (GE Healthcare) at 4°C. After centrifugation at 106 x g for 5 min, the supernatant was cleared with Glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) at 4°C for 7 hours.

Purification of recombinant His-Yif1B

His-tagged fusion protein was produced in the BL21DE3 strain of *Escherichia coli* (Stratagene). After induction at 37°C for 3h with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, the bacterial pellet (10 ml/250 ml culture) was homogenized and incubated 30 min at 4°C in Buffer BW (20mM NaH₂PO₄, 50mM NaCl, 40mM Imidazole, 1 mg/ml of lysozyme (Eurobio), and protease inhibitors (Sigma) sonicated and centrifuged at 14,000 x g for 30 min. Supernatants were incubated 3h with Nickel-Sepharose beads (GE Healthcare) at room temperature.

After washing five times in Buffer BW, the proteins retained on the beads were eluted in buffer EB (20 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 50 mM EDTA and protease inhibitors). The eluates were dialyzed in HBS-EP (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Tween-20) buffer for surface plasmon resonance analysis.

Surface Plasmon Resonance Analysis (SPR)

Binding experiments and kinetic assays were performed at 25°C using Biacore 3000 SPR sensor (Intéractions biomoléculaires, IFR83, UPMC, Paris, France) with control software version 4.1 and Sensor Chip CM5 (carboxymethylated dextran surface). Proteins were immobilized via amine groups. To this end the chip surface was first activated according to the recommendations of the Biacore amine coupling kit by injecting 70 µl of a mixture (1:1, v/v) of 100 mM NHS (N-hydroxysuccinimide) and 400 mM EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide). Purified His-Yif1B proteins (mutated or not) concentration of 100µg/ml in 10mM sodium acetate pH 4 were then injected (flow rate: 10 ul/min, aim of immobilization) followed by a 7-min injection of 1 M ethanolamine, pH 8.5, to inactivate the residual active groups. Binding and kinetic analysis were performed by injecting the purified GST-CT1A proteins (mutated or not) at a flow rate of 5 µL/min for 5 min using HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.0005 % Polysorbate 2) as the running buffer, dissociation was observed for 10 min before the elution of analyte. Regeneration was carried out then by injection of 10 mM Glycine-HCl pH 2,0 at a flow rate of 30 µL/min with a contact time of 30 sec. GST alone was injected as a negative control in the same condition. Data were analyzed with BIA evaluation 4.1 software (BIAcore).

Proteomic analysis

The supernatant obtained after GST Pull Down were eluted in sample buffer (Laemmli, 1970) and separated in a one-dimension 12 % SDS-PAGE gel, followed by Colloidal Blue staining (Invitrogen). Gel plugs were washed twice with 25 mM ammonium bicarbonate in 50 % acetonitrile then dehydrated in 100 % acetonitrile, before being subjected to overnight in-gel trypsin digestion. Briefly, each spot was digested with a solution containing 50 mM ammonium bicarbonate, 10 % acetonitrile and 20 ng/ μ l trypsin (G-Biosciences, Maryland Heights, MO, USA) on ice during 1 hour, then overnight at 37° C. The supernatants were collected and gel plugs were incubated in 0.1 % TFA 50% acetonitrile in an ultrasonic bath during 10 minutes to extract residual peptides. The new supernatants were pooled to the former. Peptides were dried completely in a vacuum centrifuge then resuspended in 0.1% TFA 50% acetonitrile, to be analyzed by mass spectrometry (MS/MS) ^{5, 6}. MS/MS analysis was performed using the Ultimate 3000 nano LC system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) coupled to an Esquire HCTultra nESI-IT-MS (Bruker Daltonics). Gradient used and mass spectrometer parameters were described elsewhere (Escoffier et al, 2010). LCMS/MS experiments were processed with Data Analysis software (Bruker Daltonics) to create a single MASCOT generic file (MGF). MGF files were used to search against human protein database NCBI (downloaded on December 2007 from [ftp:// ftp/ncbi.nlm.nih.gov/](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/)) using MASCOT (Mascot Daemon, version 2.2, Matrix Science, London, U.K.). The search parameters were as follows: 1+, 2+ and 3+ charged peptides, one missed cleavage, mass tolerance of 0.5 Da for peptides and MS/MS, carbamidomethyl and methionine oxidation were permitted. Confident matches were defined by the MASCOT score and statistical significance ($p < 0.05$), the number of matching peptides and the percentage of total amino acid sequence covered by matching peptides.

1. Carrel, D. *et al.* Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J Neurosci* **28**, 8063-8073 (2008).
2. Doucet, E., Latremoliere, A., Darmon, M., Hamon, M. & Emerit, M.B. Immunolabelling of the 5-HT_{3B} receptor subunit in the central and peripheral nervous systems in rodents. *Eur J Neurosci* **26**, 355-366 (2007).
3. Kano, F. *et al.* Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER. *J Cell Sci* **122**, 2218-2227 (2009).
4. Goslin, K., Asmussen, H. & Banker, G. Rat hippocampal neurons in low-density culture, in *Culturing nerve cells*, Edn. 2nd. (eds. G. Banker & K. Goslin) 339-370 (MIT Press, Cambridge, MA; 1998).
5. Perrot, A. *et al.* A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, e1-e15.
6. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860 (2006).

Results

A tribasic motif in the C-tail of the 5-HT_{1A}R interacts directly with the N-tail of Yif1B

In our previous study¹⁴ we have shown that Yif1B interacts with the C-tail of the 5-HT_{1A} receptor to specify its dendritic localization. Here, we performed GST pull-down experiments with several truncated forms of Yif1B (Fig. 1A) to determine which domain of Yif1B interacts with the 5-HT_{1A}R. The 5-HT_{1A} C-tail tagged with GST (GST-CT1A) was used as a bait to pull down Yif1B truncated forms from transfected cell extracts (Fig S1A and S1B, inputs). The C-tail of Yif1B was not involved in the interaction with the 5-HT_{1A}R since Yif1B proteins truncated in their C-terminal part (1-152, 1-186, 1-220) still interacted with GST-CT1A but not with GST alone (Fig. 1A and S1A). In spite of its low expression, the N-tail of Yif1B (1-152) was found to be sufficient to interact with GST-CT1A (Fig. S1A) assigning the interaction domain to this segment. GST pull-down experiments with the different N-terminal truncated forms (10-311, 18-311, 30-311, 50-311, 55-311) indicated that the interaction was lost when the first 50 amino acids were deleted. Indeed, whereas Yif1B (10-311), Yif1B (18-311) and Yif1B (30-311) still interacted with the receptor, Yif1B (50-311) and Yif1B (55-311) totally lost their binding to the bait (Fig. 1A and S1B). The loss of affinity of these truncated forms for the GST-CT1A is probably not attributable to a general change of conformation induced by the absence of the first 50 amino acids since no secondary structure could be predicted in the first 70 amino acids of Yif1B, probably due to the presence of many proline residues (Fig. S2).

To characterize the interaction between the 5-HT_{1A}R and Yif1B and determine its affinity, we used surface plasmon resonance (SPR) and BIAcore analysis. Because purified hydrophilic proteins were required, we chose to immobilize on the sensor chip the N-tail of Yif1B tagged with a His-tag on its N-terminal end (His-Yif1B-NT) sufficient for the interaction with the receptor. The GST-CT1A was loaded in fluid phase over the sensorchip and the GST alone was used as a negative control (Fig. S1C). Binding analysis showed that the C-tail of the 5-HT_{1A}R interacted directly with Yif1B (Fig. 1D), whereas no binding was detected with GST alone. To obtain an estimation of the binding constant for this interaction, kinetic analysis with various concentrations of GST-CT1A was performed (Fig. 1B), association and dissociation rates were calculated, and yielded a K_D of 37 nM, revealing a very high affinity between the 5-HT_{1A}R and its partner Yif1B. In order to identify the motifs in the C-tail of the 5-HT_{1A}R that were involved in the interaction with Yif1B, we performed site-directed mutagenesis of amino acid residues within this segment with a particular focus on residues that were specific for the 5-HT_{1A}R with regards to the 5-HT_{1B} receptor. The rationale for this strategy was given by the previous observation that Yif1B interacted with the 5-HT_{1A}R, but not with the 5-HT_{1B}R¹⁴, despite a strong homology between the sequence of their C-tails. GST pull-down experiments were performed with the mutated GST-CT1A (Table 1) as baits on rat brain extracts expressing endogenous Yif1B. Whereas most of the mutants were able to interact with Yif1B, two mutated forms of

the fusion proteins: the K405/R421/R422A named also KdiR and K405/K412/R421/R422A (diKdiR) totally lost this capacity (Fig. 1C). Binding affinities estimated by SPR with GST-CT1A mutants were in agreement with GST Pull-down results (Table 1). The mutations R421A, R422A and K405A yielded a moderate shift of affinity, while the double mutation R421/422A resulted in a 100 fold decrease in affinity. An additional mutation of the third basic residue K405 in the R421/422A (KdiR), completely abolished the interaction with Yif1B. As the mutant K412diR exhibited an equivalent affinity than the double mutant R421/422A, we can suppose that the position of the third basic residue is important (Table 1). We concluded that the C-tail or the 5-HT_{1A}R contains a tribasic motif crucial for the interaction with Yif1B. This motif is composed of the lysine 405 and the two arginines in position 421-422. We used this KdiR mutant in most of the subsequent experiments. Interestingly, when this mutation was introduced into a full-length 5-HT_{1A}R, we observed that the mutant receptor was less targeted to the plasma membrane and to distal dendrites than the WT in transfected hippocampal neurons, comforting the role of this sequence in the targeting of the 5-HT_{1A}R through interaction with Yif1B (Fig S3). We then investigated which motif was important in the tail of Yif1B for its interaction with the 5-HT_{1A}R. Interestingly only three acidic residues are found in the first 50 amino acids of this sequence. We made the hypothesis that these could form the interacting motif facing the three basic residues of the 5-HT_{1A}R C-tail. We then performed GST pull-down experiments with WT and KdiR GST-CT1A as baits and cells extracts expressing Flag-Yif1B:WT, 1DA, 2DA and 3DA (Table 1, sequence). Whereas no decrease of binding was observed when the two aspartates were mutated, the 3DA Flag-Yif1B- was scarcely pulled-down (Fig.1E). This result was supported by SPR binding experiments with mutated His-Yif1B N-tail (1DA, 2DA and 3DA). We observed a reduction of the resonance unit intensity, increasing with the number of mutated acidic residues (Fig. 1E and 1F) and a 10 fold lower affinity for the 3DA His-Yif1B mutant (Table 1). We concluded that the 5-HT_{1A}R/Yif1B interaction involves at least three basic amino acid residues of the C-tail of the 5-HT_{1A}R that are facing three aspartic acid residues located between the 30th and 50th amino acids on the N-tail of Yif1B.

Yif1B is the scaffold protein between the 5-HT_{1A}R, Yip1A and Rab6

In order to understand how a ubiquitous protein as Yif1B could play a specific role in the dendritic targeting of the 5-HT_{1A}R, we characterized other proteins implicated in the trafficking of the receptor. We pulled down the proteins interacting with the C-tail of the 5-HT_{1A}R (GST-CT1A) from rat brain lysates, and identified by mass spectrometry among the bound proteins (Fig. 2A) Rab6 and tubulin. Rab6 is a Golgi-associated protein implicated in anterograde²² and retrograde traffic^{23, 24} of vesicles from the Golgi that has also been implicated in the membrane targeting of some GPCR^{25 26}. But to date no data are available on its implication in the neuronal traffic of receptors. When we identified Rab6 in our proteomic experiment, the peptides digested from Rab6 identified by mass spectrometry

were common to the two Rab6A isoforms (A and A') but different from Rab6B (Fig. S4). GST pull-down experiments followed by Western blot analysis with Rab6 and tubulin antibodies further confirmed the presence of these proteins in the 5-HT_{1A}R interacting complex using the WT GST-CT1A as a bait but not with control GST alone nor with the KdiR mutated GST-CT1A (Fig. 2B). In addition, Yip1A was also detected in the same complex with the GST-CT1A but not with the KdiR mutated GST-CT1A (Fig. 2B). These results suggested that the recruitment of Yip1A, Rab6 and tubulin within the receptor complex required the presence of Yif1B. Yip1A belongs to the same Yip family as Yif1B. Interaction between their ortholog Yip1p and Yif1p in yeast¹⁶, or Yip1A and Yif1A in human cell line²⁷ has been shown to play a role in vesicular docking to Golgi apparatus²⁸. But no data are available on the interaction between Yif1B and Yip1A. Using GST-Rab6 (Fig. 2C) and the GST-Yip1A N-tail (Fig. 2D), we pulled down Yif1B, comforting the hypothesis of a direct interaction with Yif1B. Because the same results were obtained with both Rab6A and Rab6A' (Fig S5), all the results with labeled Rab6 involved the Rab6A isoform. Direct interaction between Yif1B and Rab6 or between Yif1B and Yip1A was further confirmed using surface plasmon resonance analysis, with purified GST-Rab6 and GST-Yip1A N-tail proteins loaded over the sensor chip grafted with the WT His-Yif1B N-tail. Yif1B interacted directly with Rab6 and the Yip1A N-tail with estimated K_D values of about 0.33 μM (Fig. 2E) and 1μM (Fig. 2F) respectively. From these results, we hypothesized that Yif1B could cluster the 5-HT_{1A}R and other intracellular routing proteins like Yip1A and Rab6 in specialized transport vesicles carrying the receptor towards distal dendrites.

Vesicular co-localisation of the 5-HT_{1A}R with its partner proteins

Immunofluorescence experiments on transfected hippocampal neurons in culture were used to visualize whether the receptor could be detected during its targeting, in trafficking vesicles also labeled by the partner proteins (Fig. 3). We confirmed the major plasma membrane localization of the 5-HT_{1A}R in somas and dendrites together with some intracellular vesicular labeling. In contrast Yif1B, in agreement with our previous results was mainly localized in somatic and dendritic intracellular vesicles. To date no data are available on the neuronal localization of Yip1A protein. Here we show a clear somatic and dendritic vesicular localization of Yip1A (movieS4). Early description of Rab6 localization in neurons has shown a somatic Golgi localization, and some co-localization with synaptophysin in immature neurons²⁹. Here our results show that Rab6 vesicular labeling is detectable in axons which is agreement with its role described in secretion²², but also in dendrites (movie S3). When performing co-localization experiments, we visualized a clear labeling of the 5-HT_{1A}R (Fig.3, A1 and B1) in Yif1B positive-vesicles, as already described (Fig. 3, A2 and B2) but also in vesicles containing endogenous Rab6 (Fig. 3A3) or endogenous Yip1A (Fig. 3B3) in the soma of neurons. These vesicles were less numerous than the Yif1B-positive vesicles containing the 5-HT_{1A}R and not the other partners, comforting the role of Yif1B as scaffold protein. This phenomenon reveals the

tighter interaction between Yif1B and the receptor than with the other partners. Co-localization of the 5-HT_{1A}R (Fig. 3, C1 and D1) with Yif1B (Fig. 3, C2 and D2) and Rab6 (Fig 3C3) or Yip1A (Fig 3D3) was also observed in some dendritic vesicles, supporting our hypothesis that Yif1B could play the role of a scaffold protein in the complex targeting of the 5-HT_{1A}R towards the dendrites.

Dynamic traffic of the 5-HT_{1A}R and its partner proteins in live neurons.

We then visualized the vesicular traffic of the fluorescent-tagged 5-HT_{1A}R (Fig. 4A), Yif1B (Fig. 4B), Yip1A (Fig. 4C) and Rab6 (Fig. 4D) using live microscopy on primary cultures of hippocampal neurons. Live imaging confirmed that these proteins were clustered into somatic intracellular mobile vesicles that traffic and/or oscillate in the soma with a mean velocity of 0.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$. We visualized also the rapid traffic of smaller vesicles exhibiting a stop and go motion. Velocities of these rapidly moving vesicles were 0.4 to 0.8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ for 5 to 10sec, a motion usually followed by episodes with a lower speed : 0.1 to 0.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Vesicles that exited the soma towards the dendrites were visualized using 5-HT_{1A}R, Yif1B, Yip1A and Rab6 labels (Movies S1 to S4). In the dendrites, they all exhibited both anterograde and retrograde movements (Fig S6). The vesicles immunopositive for 5-HT_{1A}R and Yif1B moved at the same speed of about 0.4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ for both anterograde and retrograde movements (movie S5). This observation is compatible with a co-transport of these two proteins in the dendrites. Interestingly, neurons co-transfected with the 5-HT_{1A}R-cherry (Fig. 5A) and Yif1B-eGFP (Fig. 5B) exhibited co-labelled clusters in the soma resulting from their tight interaction. This clustering did not prevent either the membrane localization of the receptor, nor the traffic of small co-labelled vesicles exiting the soma towards the dendrites (Fig. 5 and Movie S6 and S7). The vesicles immunopositive for Yip1A and Rab6 moved slightly more rapidly in the dendrites, between 0.5 and 0.8 $\mu\text{m}/\text{sec}$, suggesting that they could carry other cargo than the 5-HT_{1A}R (FigS6). In conclusion, these movies demonstrated that the 5-HT_{1A}R and its partners exit the soma towards the dendritic tree in a vesicular pathway and that they all exhibit anterograde and retrograde motion in dendrites.

The 5-HT_{1A}R undergoes vesicular transport along microtubules within the dendrites.

On one hand, alpha and beta- tubulin were identified as proteins interacting with the C-tail of the 5-HT_{1A}R by a proteomic approach (figure 2A), and on the other hand, western blot analysis showed that, unlike its WT form, the mutated KdiR form of the 5-HT_{1A}R devoid of affinity for Yif1B (Fig. 2B), lost also the interaction with tubulin, suggesting that the presence of Yif1B is required for its interaction with the microtubules, as it is the case with Rab6 and Yip1A (Fig. 2B). Furthermore, tubulin was pulled down with GST-Rab6 (Fig. 2C, middle panel) and the N-tail of GST-Yip1A (Fig. 2D, middle panel), indicating that tubulin interacts with these partners and is involved in the 5-HT_{1A}R traffic. In immunofluorescence experiments, the vesicles containing the receptor (Fig. 6, A2, B2 and D2) colocalizing with Yif1B (Fig. 6A1), Rab6 (Fig. 6B1) or Yip1A (Fig. 6D1), were present along the

microtubule network. Thus, these vesicles were found along tubulin (Fig. 6, C3 and E3) or MAP2, a microtubule-associated protein specific to dendrites (Fig. 6, A3 and D3). Colocalization was also found between Yif1B (Fig. 6, C2 and E2) and Rab6 (Fig. 6C1) or Yip1A (Fig. 6E1) in intracellular vesicles transported along microtubules (Fig. 6A3-E3). Finally, nocodazole treatment of hippocampal cultures induced a disorganization of the dendritic distribution of 5-HT_{1A}Rs (Fig 6F) but also of all of its partners (data not shown). All these observations confirm the crucial role of the microtubule network in the dendritic trafficking of the 5-HT_{1A}R.

As we visualized a vesicular traffic in the dendrites together with a tight association with the microtubules, we searched for a molecular motor that could explain the bi-directional traffic of these vesicles. Using GST pull-down experiments, we found two molecular motors in the complex interacting with the C-tail of the 5-HT_{1A}R : the dynein intermediate chain, a minus end-directed microtubule motor and the plus end-directed kinesin Kif5B (fig S7). We also found the presence of p150^{glued}, a subunit of the dynactin complex that was shown to coordinate a bidirectional motion using opposite motors. All these proteins were not found when the GST pull-down experiment was performed with the mutated KdiR form of the 5-HT_{1A}R, devoid of affinity for Yif1B, suggesting again that Yif1B was necessary for the interaction with these molecular motors.

Yip1A and Rab6 play a crucial role in the distal dendritic targeting of the 5-HT_{1A}R

Then, we studied the role of these new partners in the dendritic targeting of the 5-HT_{1A}R by performing RNA interference experiments on primary cultures of hippocampal neurons. Inhibition of endogenous Rab6 (Fig. 7A1) and Yip1A (Fig. 7A2) expression with siRNA reached 50 % and 70 % respectively 48 hours after transfection, as assessed by western blot and quantification relative to α -tubulin. In neurons transfected with 5-HT_{1A}R-eGFP alone (Fig. 7B1) or with siRNA (control) (Fig. 7B4), immunofluorescence of the receptor was visualized in distal dendrites, where it overlapped α -tubulin labeling. With inhibition of Rab6 (Fig. 7B2) and Yip1A (Fig. 7B3) expression, the 5-HT_{1A}R-eGFP labeling was confined to the proximal portion of the dendrites. Representation of the cumulated fluorescence intensity for the 5-HT_{1A}R-eGFP and tubulin (Fig. 7C) along the longest dendrite in a series of unselected neurons versus the distance from the soma, in control conditions or with siRNA(Rab6) and siRNA(Yip1A), evidenced the effect of Rab6 and Yip1A inhibition on the traffic of the 5-HT_{1A}R-eGFP (Fig. 7C1). This effect was not due to changes in dendritic morphology, since the labeling of α -tubulin was not modified by siRNA(Rab6) or siRNA(Yip1A) (Fig. 7C2). We concluded that in addition to Yif1B¹⁴, Rab6 and Yip1A also play a crucial role in the distal dendritic targeting of the 5-HT_{1A}R.

Discussion

Although Yif1B is a relatively ubiquitous protein, it clearly plays a specific targeting role in the 5-HT_{1A}R trafficking towards the distal dendrites in neurons. Here, we describe the molecular mechanisms involved in the interaction between Yif1B and the 5-HT_{1A}R. In this purpose, we first determined the motifs involved in their direct interaction and then identified other proteins interacting with the 5-HT_{1A}R/Yif1B complex, namely Rab6, Yip1A and tubulin. We found them to be also implicated in the dendritic targeting of the receptor. Finally, we found that 5-HT_{1A}Rs are carried in vesicles containing also Yif1B, the scaffold protein between the receptor and the other partners. This cargo complex is transported along the microtubule network in hippocampal neurons (Fig. 8). These data not only provide new insights into the cellular and molecular mechanisms underlying 5-HT_{1A}R trafficking, but also describe a new vesicular Yif1B-based dendritic transport pathway.

A tribasic motif within the C-tail of the 5-HT_{1A}R is crucial for the interaction with Yif1B

In a previous study¹⁴ we have demonstrated that the interaction between Yif1B and the C-tail of the 5-HT_{1A}R is crucial for the dendritic targeting of the receptor. Here, with the surface plasmon resonance technology using purified proteins, we confirm that this interaction is direct (Fig. 1D) and characterized by a very high affinity (37 nM). Moreover, we demonstrate that three aspartates located in the region (30-40) of the N-tail of Yif1B interact with a tribasic motif within the C-tail of the 5-HT_{1A}R (Table 1) composed by one lysine in position 405 and a di-arginine motif in position 421-422 (corresponding to the K405diR mutant). Interestingly, in addition to the presence of three positive charges, the position of the lysine seems crucial for the interaction since we showed that the K412diR mutant did not lose the interaction with Yif1B (Fig. 1C, table1). Such a KdiR motif has not been described to date but a comparable tribasic motif RdiR exists in the proximal portion of the C-tail of the β 2 adrenergic receptor.

The 5-HT_{1A}R is targeted to the dendrites by a novel vesicular Yif1B-dependent transport pathway

Our results describe a novel pathway which involves Yif1B as a scaffold protein clustering the 5-HT_{1A}R, Rab6 and Yip1A in the same vesicles trafficking towards the distal dendrites in hippocampal neurons (Fig. 8). Four lines of evidence support this hypothesis : Firstly, GST pull-down results showed that the 5-HT_{1A}R interacts with Rab6 and Yip1A by the intermediate of Yif1B, since this interaction was lost with the mutant KdiR, devoid of affinity for Yif1B (Fig. 2B). Secondly, we demonstrated that Yif1B interacts directly with the 5-HT_{1A}R (Fig. 1E), Rab6 (Fig. 2E) and Yip1A (Fig. 2F) by surface plasmon resonance experiments. Thirdly, vesicles containing the 5-HT_{1A}R/Yif1B complex and endogenous Rab6 or Yip1A could be detected in somas and dendrites of fixed neurons (Fig.3). Finally, we found that 5-HT_{1A}R trafficking was also dependent on the expression of Rab6 and

Yip1A, since the depletion of these two proteins by siRNA interference induced the disruption of the dendritic targeting of the receptor (Fig. 7) in a similar way as inhibition of Yif1B expression¹⁴. Whereas Yip1A has never been described as being a targeting protein, Rab6 was already reported to be involved in the trafficking of several GPCRs like rhodopsin in photoreceptor cells³⁰, or the targeting to the plasma membrane of the β 2adrenergic or the Angiotensin1 receptors in HeLa cells²⁵ and also in exocytosis of neurotransmitters in axons²² but never as a dendritic targeting protein. This new pathway involves different proteins from those implicated in other routing mechanisms described for NMDA or AMPA receptors, using CASK, SAP97 or GRIP1^{31 25 32} which rely on motifs interacting with PDZ domain-containing proteins. Thus, these motifs are not found in the 5-HT_{1A}R. In contrast we identified a new tribasic interaction motif, and it cannot be excluded that this Yif1B-dependent dendritic transport including Rab6 and Yip1A, could also be used by other dendritic receptors. Indeed, the β 2 adrenergic receptor could be a good candidate for being a Yif1B-interacting receptor since it depends on Rab6 for its targeting to the plasma membrane of HeLa cells²⁵ and contains a RdiR tribasic motif in its C-tail.

Yif1B is the scaffold protein between Rab6 and Yip1A

Our results show for the first time a direct interaction between the mammalian Yif1B and Yip1A. This interaction was likely to occur since Yif1p in yeast, has been cloned by means of its interaction with the yeast Yip1p¹⁶. Here we show also that the cytoplasmic N-Tail of Yip1A directly interacts with the cytoplasmic N-Tail of Yif1B which is in agreement with what has been shown in yeast, where their interaction depends on a single amino acid in the cytoplasmic N-tail and on the last 18 amino acids of Yip1A¹⁸. We cannot exclude that the affinity between the full-length Yif1B and Yip1A could actually be higher than the value measured by SPR between the soluble portions of Yif1B and Yip1A (Fig. 2F) especially if, like in yeast, the last 18 aminoacids of Yip1A, play also a role in the interaction with Yif1B. In mammals the interaction between Yip1A and the other ortholog of Yif1p, Yif1A, has been already shown in HeLa cells, with an implication of Yip1A in the Golgi localization of Yif1A²⁷. The Golgi localizations of Yif1A and Yip1A are controversial since a co-localization with endoplasmic reticulum exit sites (ERES)³³ or endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) markers has also been shown^{34 35}. In cell lines, the subcellular localization of Yif1B has never been neither restricted to the Golgi nor to the endoplasmic reticulum but more probably to the intermediate compartment¹⁴. In primary cultures of hippocampal neurons, our results show that Yif1B (Fig. S3, A1 and B1) co-localizes scarcely with Rab6 (Fig. S3, A2) and partially with Yip1A (Fig. S3, B2), supporting also a localization in the intermediate compartment in the somas of neurons. Our experiments show that Rab6 is mainly in the somatic Golgi, in agreement with the results describing the subcellular localization of Rab6 in yeast, in cell lines^{36 37} and in hypothalamic neurons²⁹, but also in mobile dendritic vesicles in hippocampal neurons (Movie S3).

Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi to the ER in HeLa cells, and recruits Rab6 to the Golgi membrane but without any direct interaction³⁵. We pulled down endogenous Rab6 expressed in rat brain with the N-tail of GST-Yip1A (Fig. S4, A) and demonstrated that Yif1B directly interacts with Rab6 and Yip1A (Fig. 3E and 3F). The direct interaction that we visualize here between Yif1B and Yip1A on one side, and Rab6 on the other side, is consistent with a role of Yif1B as a scaffold protein between Yip1A and Rab6 (Fig. 8). Yif1B could act as a GDF (GDI displacement factor) to recruit Rab6 to the Golgi membrane. When we identified Rab6 in our proteomic experiment, the peptides of Rab6 identified by mass spectrometry were common to the two Rab6A isoforms (A and A') but different from Rab6B. In order to discriminate the A isoform implicated in the interaction, we performed GST pull-down experiments with GST-Rab6A and GST-Rab6A' (Fig. S4B, top panel) in three distinct forms: naked, GDP or GTP γ S bound states. Interestingly, Yif1B was pulled down by all these forms of Rab6A and Rab6A', so we concluded that Yif1B interacts with Rab6 in a non-isoform dependent manner and has no apparent preference for the nucleotide-bound state. This results is in agreement with the putative function of Yif1B as a GDF in the Golgi as was previously suggested for Rab9 and its GDF : Yip3 in the endosomes²⁰, a protein belonging also to the Yip family like Yif1B and Yip1A. The subcellular distribution of these proteins suggests that they regulate successive steps in the trafficking of the 5-HT_{1A}R.

Role of the microtubule network in the transport of the vesicles containing the Yif1B scaffolding protein complex

Because tubulin has been characterized as one of the proteins bound to the 5-HT_{1A}R/Yif1B multimolecular complex, it was likely that we were dealing here with a scaffold structure anchoring the 5-HT_{1A}R to the microtubule cytoskeleton (Fig. 8). Thus, as it has been widely described, Rab6 is transported along microtubules through an interaction with various molecular motors^{38 39 40} including the specific rabkinesin 6⁴¹.

Therefore our hypothesis was that 5-HT_{1A}R trafficking along the microtubules could result from an interaction between Rab6 and molecular motors. Indeed, in addition to the crucial role of Rab6 in the dendritic transport of the 5-HT_{1A}R (Fig. 7B2), we found that tubulin interacts with Rab6 in brain in a non-isoform dependent manner and no apparent preference for the nucleotide-bound state like Yif1B (Fig. S4B, bottom panel). Whereas Rab6 containing vesicles have been shown to traffic between the Golgi and the endoplasmic reticulum⁴² or between the Golgi and the plasma membrane⁴³ in cell lines, the role of Rab6 in neurons has been less investigated. It has been implicated in neuritogenesis⁴⁴ and in the regulation of the transport and targeting of exocytotic carriers²² towards axon terminals. Here, our data support an undescribed role for Rab6 in the Yif1B-dependent transport pathway crucial for the 5-HT_{1A}R trafficking towards the dendrites along microtubules (Fig. 8). In this scaffolding complex, Rab6 could therefore play the role of an intermediate adaptor with the molecular motors

allowing the traffic along microtubule tracks. Thus, we found two molecular motors in the complex interacting with the C-tail of the 5-HT_{1A}R. The dynein that steers to the minus-end microtubules, and Kif5B that steers to the plus-end of microtubules. Microtubules exhibit a mixed polarity in proximal dendrites whereas in distal dendrites they exhibit a minus to plus end polarity.

As Kif5B moves towards the plus end of microtubules, it could participate to the anterograde transport of the receptor. In that case, retrograde transport of the receptor in distal dendrites could rely on the dynein motor. We cannot exclude that dynein could play a role in the initial sorting in proximal dendrite microtubules as it was proposed for the initial sorting of dendritic cargo⁴⁵. The dynein/dynactin complex could interact with rab6 in the first part of the trafficking of the receptor, as it was described for the secretory vesicles transport⁴⁴. This would imply a change of molecular motor during the dendritic transport, which could rely on the presence of p150 in the complex. More work is needed to identify in what order these molecular motors are implicated in this traffic and in what part of the dendrites.

It remains to determine precisely the stages where the partners of the Yif1B scaffolding complex step in. It seems unlikely that these trafficking vesicles could travel through a mobile reticulum like it was described in neurons for NMDA receptors³¹. The trafficking kinetics and our videos confirm that the vesicles co-labelled with the receptor and Yif1B move out from the soma rapidly towards the dendrites.

In conclusion, this study describes the Yif1B scaffolding complex that clusters serotonin 5-HT_{1A} receptors with Yip1A and Rab6 in vesicles transported towards the distal dendrites along the microtubule network. This Yif1B-dependent trafficking pathway could be common with other GPCRs or other neuronal receptors.

Acknowledgements

This research has been supported by grants from INSERM, University Pierre et Marie Curie. Confocal imaging was performed at the Plateforme Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière. S.A. was a recipient of fellowships from the French Ministère de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale during performance of this work. We are grateful to Cedric Pionneau (Plateforme P3S Post-Génomique, Pitié-Salpêtrière) for his contribution in Mass Spec analysis, Charbel Maroun for his expertise in the bioinformatic analyses of the protein sequences, Jean-Michel Camadro for his advices in biacore strategy and Dr Hong for his gift of the GST-Yip1A plasmid. .

Author Contributions

S.A. and M.D. designed the experiments; S.A., T.B., S.M.L., M.B.E and M.D. did the experimental works; S.A., T.B. and M.D. analyzed the experiments; F.K. provided Yip1A antibody T.B., C.M.P., S.M.L, M.H., M.B.E and J.M participated in the data analysis; S.A and M.D. wrote the manuscript, S.M.L, M.H. and M.B.E participated in the manuscript writing, all authors read and edited the manuscript.

References

1. Artigas, F., Celada, P., Laruelle, M. & Adell, A. How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci* **22**, 224-228 (2001).
2. Szewczyk, B. *et al.* Decreased expression of Freud-1/CC2D1A, a transcriptional repressor of the 5-HT_{1A} receptor, in the prefrontal cortex of subjects with major depression. *Int J Neuropsychopharmacol* **13**, 1089-1101 (2010).
3. Stockmeier, C.A. *et al.* Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* **18**, 7394-7401 (1998).
4. Le Poul, E. *et al.* Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **352**, 141-148 (1995).
5. Riad, M. *et al.* Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* **417**, 181-194 (2000).
6. Darmon, M., Langlois, X., Suffisseau, L., Fattaccini, C.M. & Hamon, M. Differential membrane targeting and pharmacological characterization of chimeras of rat serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors expressed in epithelial LLC-PK1 cells. *J Neurochem* **71**, 2294-2303 (1998).
7. Jolimay, N., Franck, L., Langlois, X., Hamon, M. & Darmon, M. Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT_{1B} receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* **20**, 9111-9118 (2000).
8. Carrel, D., Hamon, M. & Darmon, M. Role of the C-terminal di-leucine motif of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} serotonin receptors in plasma membrane targeting. *J Cell Sci* **119**, 4276-4284 (2006).
9. Duvernay, M.T. *et al.* Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)6LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* **75**, 751-761 (2009).
10. Oksche, A., Dehe, M., Schulein, R., Wiesner, B. & Rosenthal, W. Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett* **424**, 57-62 (1998).
11. Bockaert, J., Perroy, J., Becamel, C., Marin, P. & Fagni, L. GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 89-109 (2010).
12. Prybylowski, K. *et al.* The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* **47**, 845-857 (2005).
13. Bjork, K., Sjogren, B. & Svenningsson, P. Regulation of serotonin receptor function in the nervous system by lipid rafts and adaptor proteins. *Exp Cell Res* **316**, 1351-1356 (2010).
14. Carrel, D. *et al.* Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J Neurosci* **28**, 8063-8073 (2008).
15. Yang, X., Matern, H.T. & Gallwitz, D. Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *Embo J* **17**, 4954-4963 (1998).
16. Matern, H. *et al.* A novel Golgi membrane protein is part of a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting. *Embo J* **19**, 4485-4492 (2000).

17. Shakoori, A. *et al.* Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 850-857 (2003).
18. Chen, C.Z. *et al.* Genetic analysis of yeast Yip1p function reveals a requirement for Golgi-localized rab proteins and rab-Guanine nucleotide dissociation inhibitor. *Genetics* **168**, 1827-1841 (2004).
19. Calero, M. *et al.* Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Mol Biol Cell* **14**, 1852-1867 (2003).
20. Sivars, U., Aivazian, D. & Pfeffer, S.R. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**, 856-859 (2003).
21. Pfeffer, S. & Aivazian, D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 886-896 (2004).
22. Grigoriev, I. *et al.* Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell* **13**, 305-314 (2007).
23. Del Nery, E. *et al.* Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* **7**, 394-407 (2006).
24. White, J. *et al.* Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* **147**, 743-760 (1999).
25. Dong, C. & Wu, G. Regulation of anterograde transport of adrenergic and angiotensin II receptors by Rab2 and Rab6 GTPases. *Cell Signal* **19**, 2388-2399 (2007).
26. Deretic, D. & Papermaster, D.S. Rab6 is associated with a compartment that transports rhodopsin from the trans-Golgi to the site of rod outer segment disk formation in frog retinal photoreceptors. *J Cell Sci* **106** (Pt 3), 803-813 (1993).
27. Jin, C. *et al.* Human Yip1A specifies the localization of Yif1 to the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 16-22 (2005).
28. Barrowman, J., Wang, W., Zhang, Y. & Ferro-Novick, S. The Yip1p.Yif1p complex is required for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Biol Chem* **278**, 19878-19884 (2003).
29. Tixier-Vidal, A. *et al.* The small GTP-binding protein, Rab6p, is associated with both Golgi and post-Golgi synaptophysin-containing membranes during synaptogenesis of hypothalamic neurons in culture. *J Cell Sci* **105** (Pt 4), 935-947 (1993).
30. Deretic, D. Rab proteins and post-Golgi trafficking of rhodopsin in photoreceptor cells. *Electrophoresis* **18**, 2537-2541 (1997).
31. Jeyifous, O. *et al.* SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nat Neurosci* **12**, 1011-1019 (2009).
32. Wyszynski, M. *et al.* Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein in vivo. *J Neurosci* **19**, 6528-6537 (1999).
33. Tang, B.L. *et al.* A membrane protein enriched in endoplasmic reticulum exit sites interacts with COPII. *J Biol Chem* **276**, 40008-40017 (2001).
34. Yoshida, Y. *et al.* YIPF5 and YIF1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure. *Exp Cell Res* **314**, 3427-3443 (2008).
35. Kano, F. *et al.* Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER. *J Cell Sci* **122**, 2218-2227 (2009).
36. Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A. & Saraste, J. Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**, 553-556 (1990).
37. Antony, C. *et al.* The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J Cell Sci* **103** (Pt 3), 785-796 (1992).

38. Miserey-Lenkei, S. *et al.* Rab and acto-myosin dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Revision Nature Cell Biology*. (2010).
39. Matanis, T. *et al.* Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol* **4**, 986-992 (2002).
40. Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R. & Barr, F.A. The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol* **12**, 1792-1795 (2002).
41. Echard, A. *et al.* Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**, 580-585 (1998).
42. Martinez, O. *et al.* GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1828-1833 (1997).
43. Valente, C., Polishchuk, R. & De Matteis, M.A. Rab6 and myosin II at the cutting edge of membrane fission. *Nat Cell Biol* **12**, 635-638 (2010).
44. Schlager, M.A. *et al.* Pericentrosomal targeting of Rab6 secretory vesicles by Bicaudal-D-related protein 1 (BICDR-1) regulates neuritogenesis. *Embo J* **29**, 1637-1651 (2010).
45. Kapitein, L.C. *et al.* Mixed microtubules steer dynein-driven cargo transport into dendrites. *Curr Biol* **20**, 290-299 (2010).

Protein names	Mutation positions	K _D (nM)	Chi2
A GST-CT1A WT or mutants			
GST-CT1A wt	405KDFQNAFKKIIKCKFCRR422	37	0,722
I414/415A	KDFQNAFKKAAKCKFCRR	44	1,43
Q408/I414/415A	KDFANAFKKAAKCKFCRR	21	1,63
C417/420A	KDFQNAFKKIIKSKFSRR	14	7,38
R421A	KDFQNAFKKIIKCKFCAR	77	0,187
R422A	KDFQNAFKKIIKCKFCRA	110	1,52
R421/422A	KDFQNAFKKIIKCKFCAA	2900	0,967
K405A	ADFQNAFKKIIKCKFCRR	200	1,81
K412A	KDFQNAFKAIKCKFCRR	71	0,184
K405/R421/422A or KdiR	ADFQNAFKKIIKCKFCAA	ND	ND
K412/R421/422A or K412diR	KDFQNAFKAIKCKFCAA	5600	0,304
K405/K412/R421/422A or diKdiR	ADFQNAFKAIKCKFCAA	ND	ND
B Yif1B-N-Tail WT or mutants			
Yif1B wt	28QPGMADPHQFFDDTSSAP44	37	0,722
1DA	QPGMAAPHQFFDDTSSAP	27	1,73
2DA	QPGMADPHQFFAATSSAP	20	1,13
3DA	QPGMAAPHQFFAATSSAP	193	0,495

Table 1 : BIAcore analysis: summary of kinetic data.

Binding experiments between the 5-HT_{1A}R (WT versus mutants) and Yif1B (WT versus mutants) by Surface Plasmon Resonance experiments (SPR). Estimates of the association and dissociation constants obtained from Kinetic analysis performed with the N-tail of His-Yif1B (wt or mutants) immobilized on the sensor chips and six serial concentrations of GST-CT1A (wt or mutants) passed on the chip in fluid phase. The parameters of K_D were calculated by BiaEval software by fitting the Biacore sensogram with the 1:1 Langmuir model with baseline. The KdiR and the diKdiR GST-CT1A mutants did not bind to Yif1B. Therefore, it was not possible to calculate affinity constants (ND, not determined).

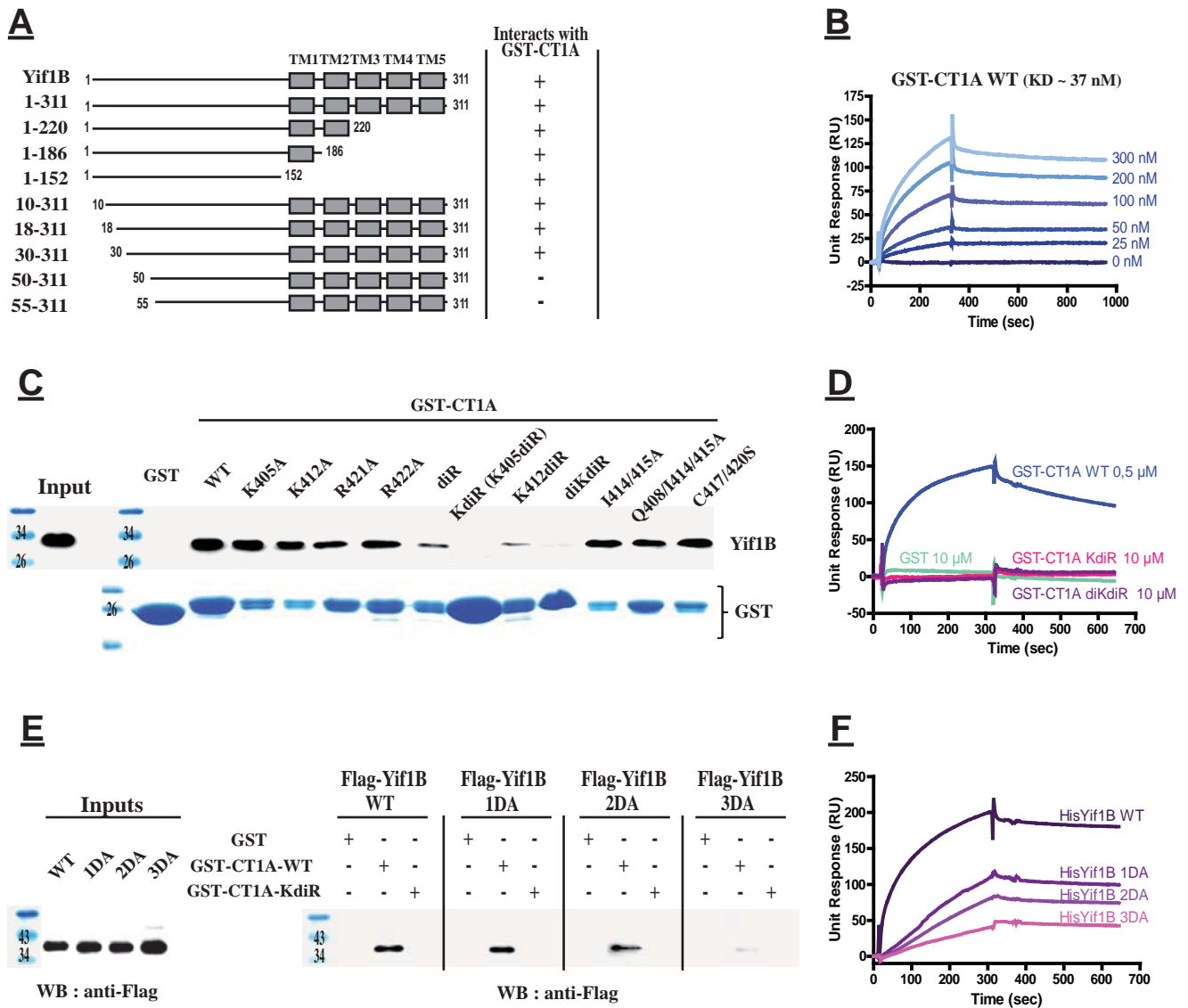


Figure 1: Characteristics of the 5-HT_{1A}R/Yif1B interaction.

(A) Schematic representation of the different Yif1B constructs used in this study. Boxes represent the transmembrane domains. Interaction with the C-tail of the 5-HT_{1A}R is indicated.

(B) Kinetic study for the SPR determination of the association and dissociation constants for the interaction between WT GST-CT1A and WT His-Yif1B. The concentration range of GST-CT1A was 0–300nM in six serial concentrations passed on His-Yif1B immobilized on a sensor chip. Data are presented as real-time graphs of RU against time and were analyzed using a 1:1 Langmuir binding model with baseline to determine the K_D value reported in Table 1.

(C, E) Purified GST-CT1A (WT, KdiR and other mutants) and GST alone (negative control) were incubated with rat brain lysates (C), or HeLa cell lysates expressing the different Flag-tagged mutated Yif1B (E). GST proteins were visualized using Coomassie Blue (bottom panel). Inputs represent a 2.5% load of the total lysates used in all conditions. GST Pull down was analyzed by Western blot with anti-Yif1B antibody (C) and anti-Flag antibody (E).

(D, F) Binding analyses by surface plasmon resonance (SPR). WT His-Yif1B (D, F) and mutated His-Yif1B (E) were each immobilized on a sensor chip. Binding assays with 500nM of WT GST-CT1A (D,F), 10 μ M of mutated GST-CT1A mutants KdiR or diKdiR (D), and 10 μ M of GST alone (D) used as a negative control were passed over the chip. Data are presented as real-time graphs of RU against time.

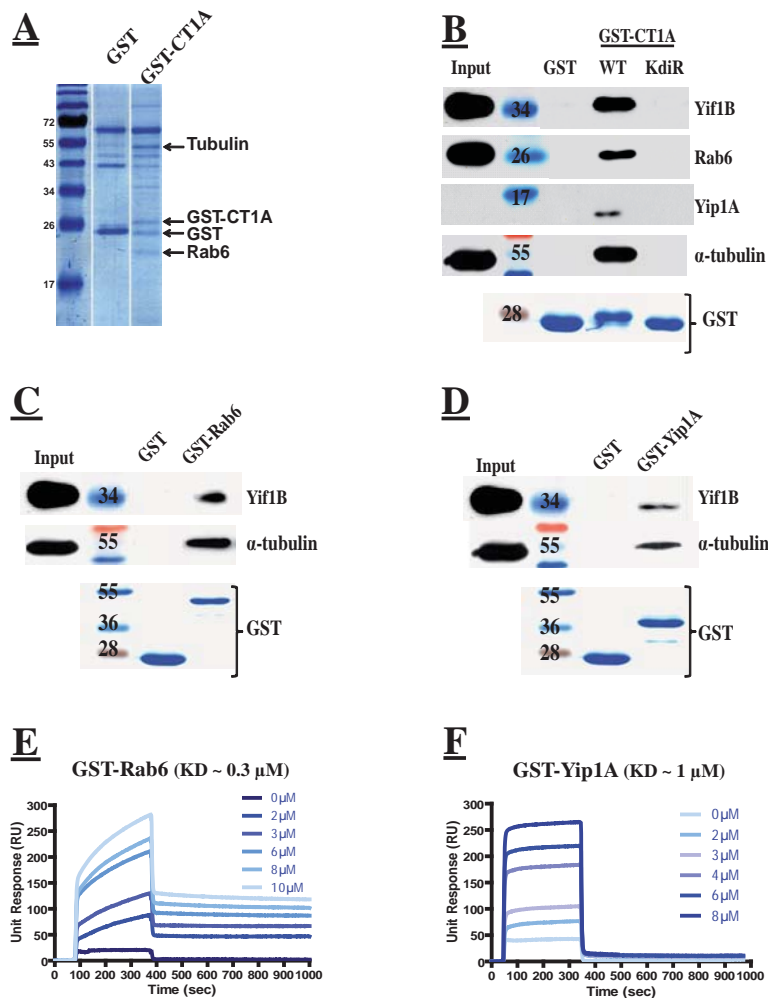


Figure 2: Rab6, Yip1A and tubulin interact with the 5-HT_{1A}R via Yif1B.

(A) GST Pull-Down experiments with the WT GST-CT1A and GST alone as a control on rat brain extracts separated by a one dimensional 12% SDS-PAGE stained by the Colloidal blue prior to identification by mass spectrometry.

(B, C, D) GST pull-down experiments performed on rat brain lysates with (B) purified WT or KdiR GST-CT1A (C) purified GST-Rab6 or (D) GST-Yip1A N-tail and GST alone (negative control). GST proteins were visualized using Coomassie Blue (bottom panel). Inputs represent a 2.5% load of the total lysates used in all conditions. Western blots (top panels) were revealed using anti-Yif1B (B, C, D), anti-Rab6 (B) and anti-Yip1A (B) and anti α -tubulin (B, C, D) antibodies. (E) and (F) Kinetic study of the interaction between GST-Rab6 (E) or the N-tail of GST-Yip1A (F) and WT His-Yif1B determined by surface plasmon resonance. The concentration range was (E) 0–10 μ M for GST-Rab6 and (F) 0–8 μ M for the N-tail of GST-Yip1A in six serial dilutions passed over His-Yif1B immobilized on a sensor chip. Data are presented as real-time graphs of RU against time and were analyzed using a 1:1 Langmuir binding model with baseline.

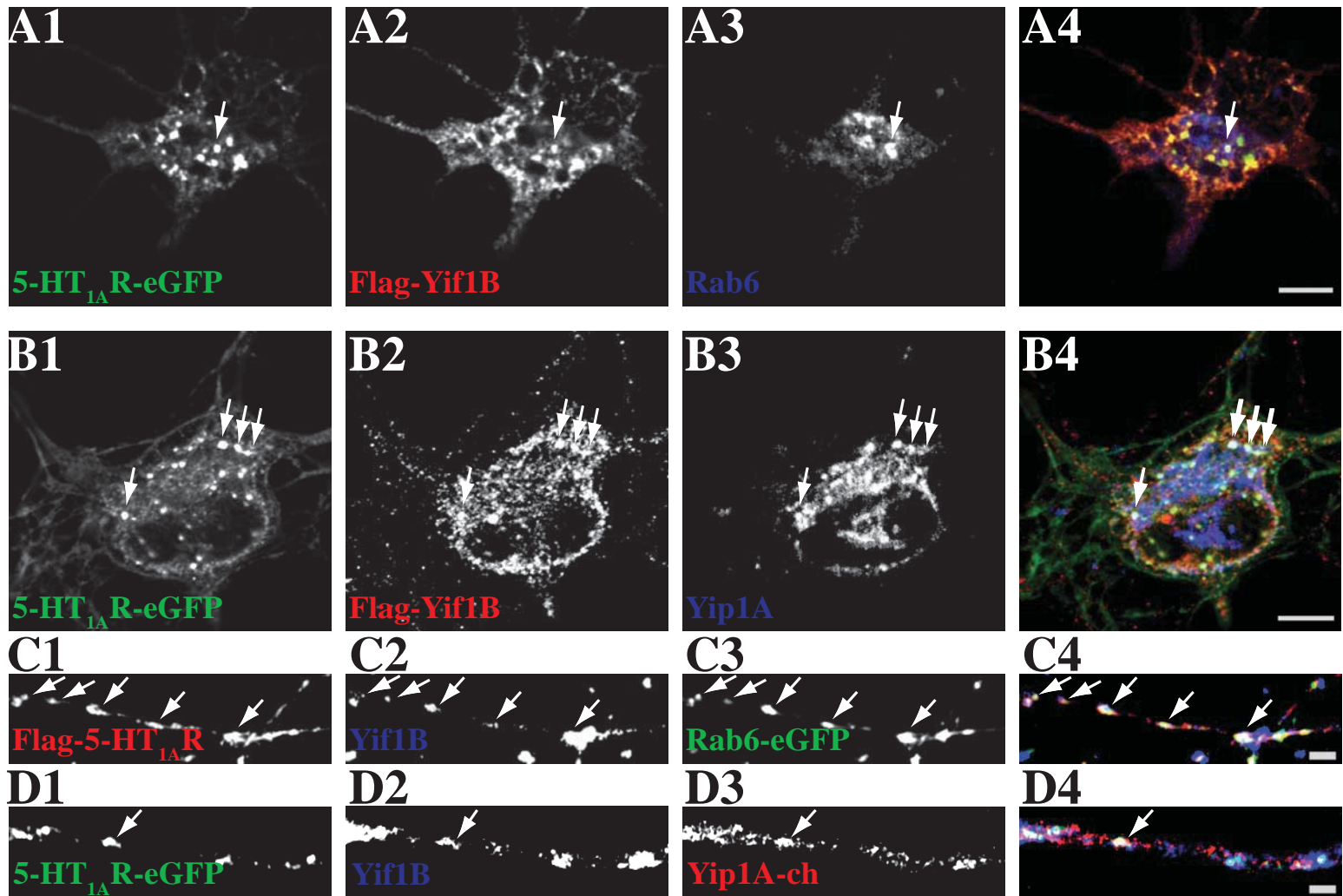


Figure 3 : The 5-HT_{1A}R/Yif1B complex colocalizes with Rab6 or Yip1A in somatic and dendritic vesicles.

Hippocampal neurons were co-transfected at DIV7 with (A, B, D) the 5-HT_{1A}R-eGFP receptor and (A, B) Flag-Yif1B and labelled 48h post-transfection with the anti-Flag antibody in red (A2, B2) and endogenous Rab6 (A3) or Yip1A (B3) in blue, with the Flag-5HT_{1A}R (C) labeled with anti-Flag antibody (C2) in red and Rab6-eGFP (C3) shown in green and endogenous Yif1B (C2) labeled with anti-Yif1B in blue (C2, D2), with Yip1A-Cherry in red (D3). Some punctate colocalizations are shown by arrows. A4, B4, C4, D4, Overlay. Scale bars, 10µm.

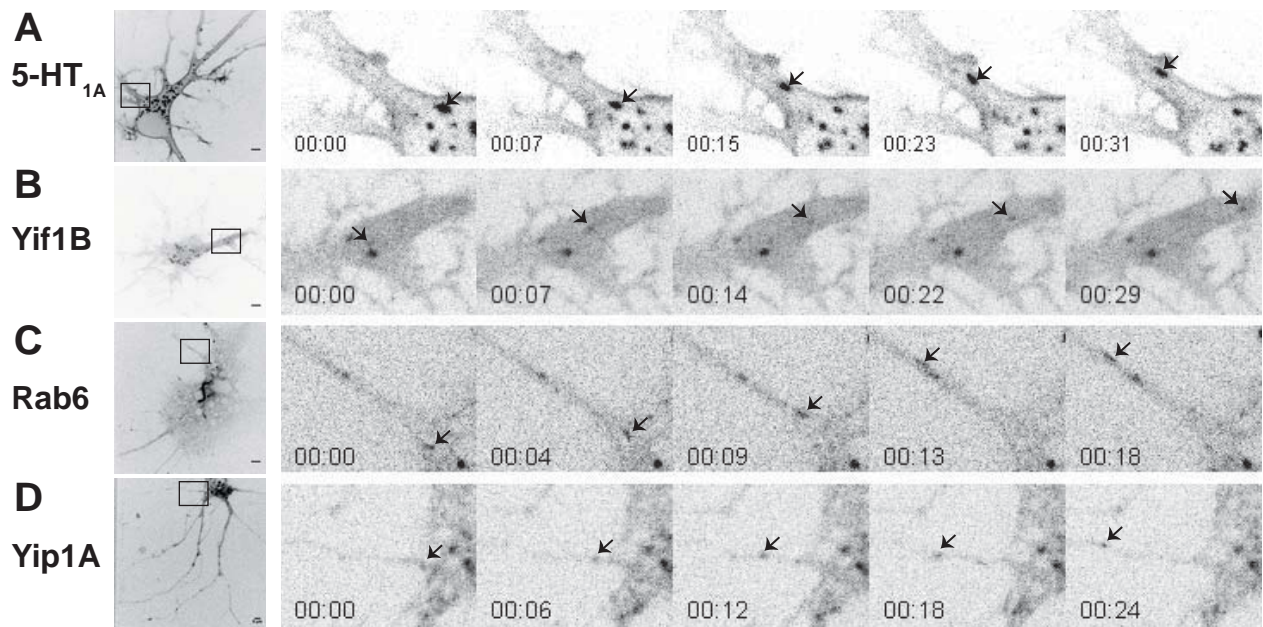


Figure 4 : The 5-HT_{1A}R and its targeting partners traffic in mobile vesicles exiting from the soma towards the dendrites.

Inverted monochrome images from time-lapse imaging of hippocampal neurons expressing the 5-HT_{1A}R-cherry from Movie S1 (A), Yif1B-eGFP from Movie S2 (B), Rab6-eGFP from Movie S3 (C) and Yip1A-cherry from Movie S4 (D). Right panels show the whole field, with a boxed area corresponding to the zoom on proximal dendrites. Arrows follow the particles during their anterograde dendritic transport. Scale bar, 5 μ m.

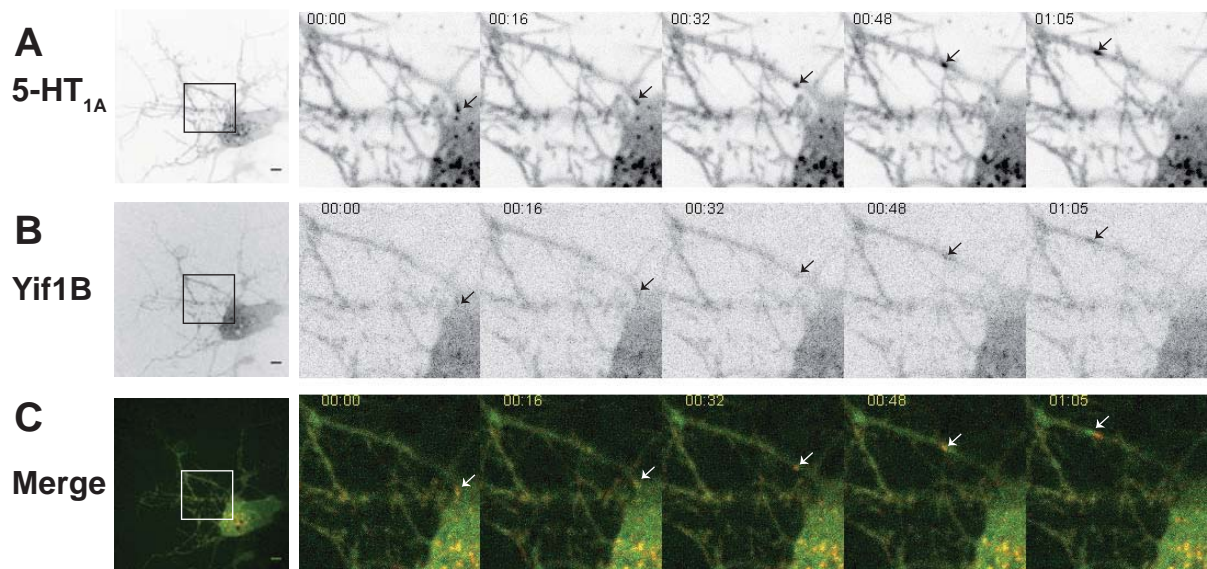


Figure 5 : Comigration of the 5-HT_{1A}R and Yif1B in mobile vesicles within dendrites.

Time-lapse imaging 2 days after the transfection of hippocampal neurons with the 5-HT_{1A}R-cherry and Yif1B-eGFP. Inverted monochrome images of the 5-HT_{1A}R (A) and Yif1B-eGFP (B). Comigrating puncta are visualized in the overlay (C). Right panels show the whole field, with a boxed area corresponding to the zoom on proximal dendrites. Arrows indicate the particles during their anterograde dendritic transport. Scale bar, 5µm.

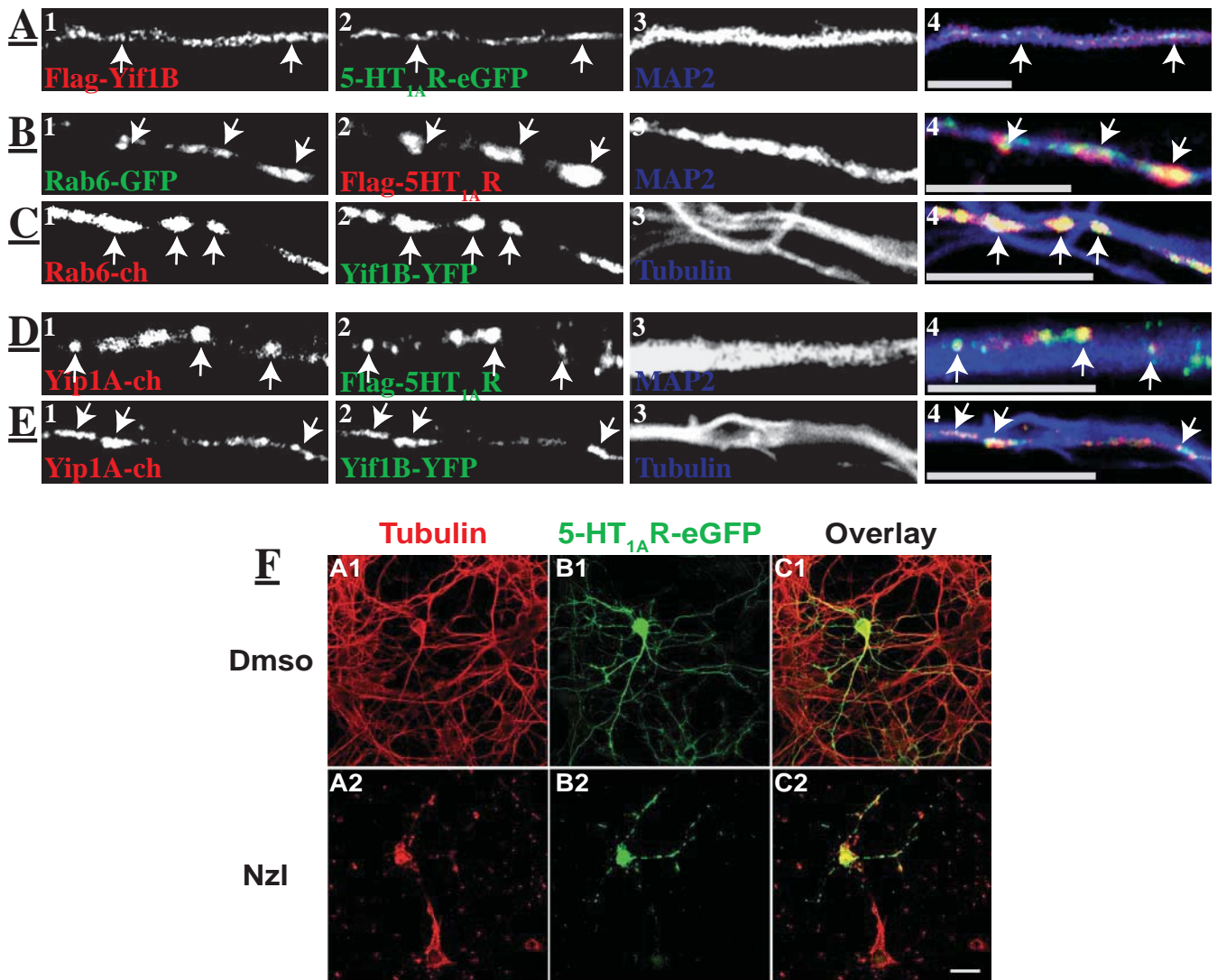


Figure 6: The Yif1B-scaffolding complex interacts with tubulin and the vesicles are transported along the microtubule network in dendrites.

(A-E) Primary cultures of hippocampal neurons were transfected at DIV7 and fixed at 48h post-transfection and stained with antibodies. (A) Hippocampal neurons were co-transfected with the 5-HT_{1A}R-eGFP receptor shown in green (A2) and Flag-Yif1B labelled with the anti-Flag antibody (A1) in red. (B, D) Cultures were co-transfected with Flag-5-HT_{1A}R labeled with anti-Flag antibody in red (B2) or in green (D2) and Rab6-eGFP (B1) shown in green or Yip1A-cherry (D1) shown in red. (C, E) Exogenously co-expression of Yif1B-YFP labeled with the anti-GFP antibody in green (C2, E2) and Rab6-cherry (C1) or Yip1A-cherry (E1) shown in red. (A-E) Endogenous MAP2 (A3, B3, D3) and endogenous tubulin (C3, E3) were labeled with their specific antibodies in blue. Some punctate colocalizations are shown by arrows. (A4-E4), overlay. Scale bars, 10μm.

(F) Confocal images of rat hippocampal neurons expressing the 5-HT_{1A}eGFP and treated 48 h post-transfection with 10μM of DMSO (top panel) or 10μM of Nocodazole (bottom panel) for one hour. The GFP signal was amplified with anti-GFP antibody shown in green (B1, B2) and α-tubulin was immunolabeled in red (A1, A2). (C1, C2), overlay. Scale bars, 50 μm.

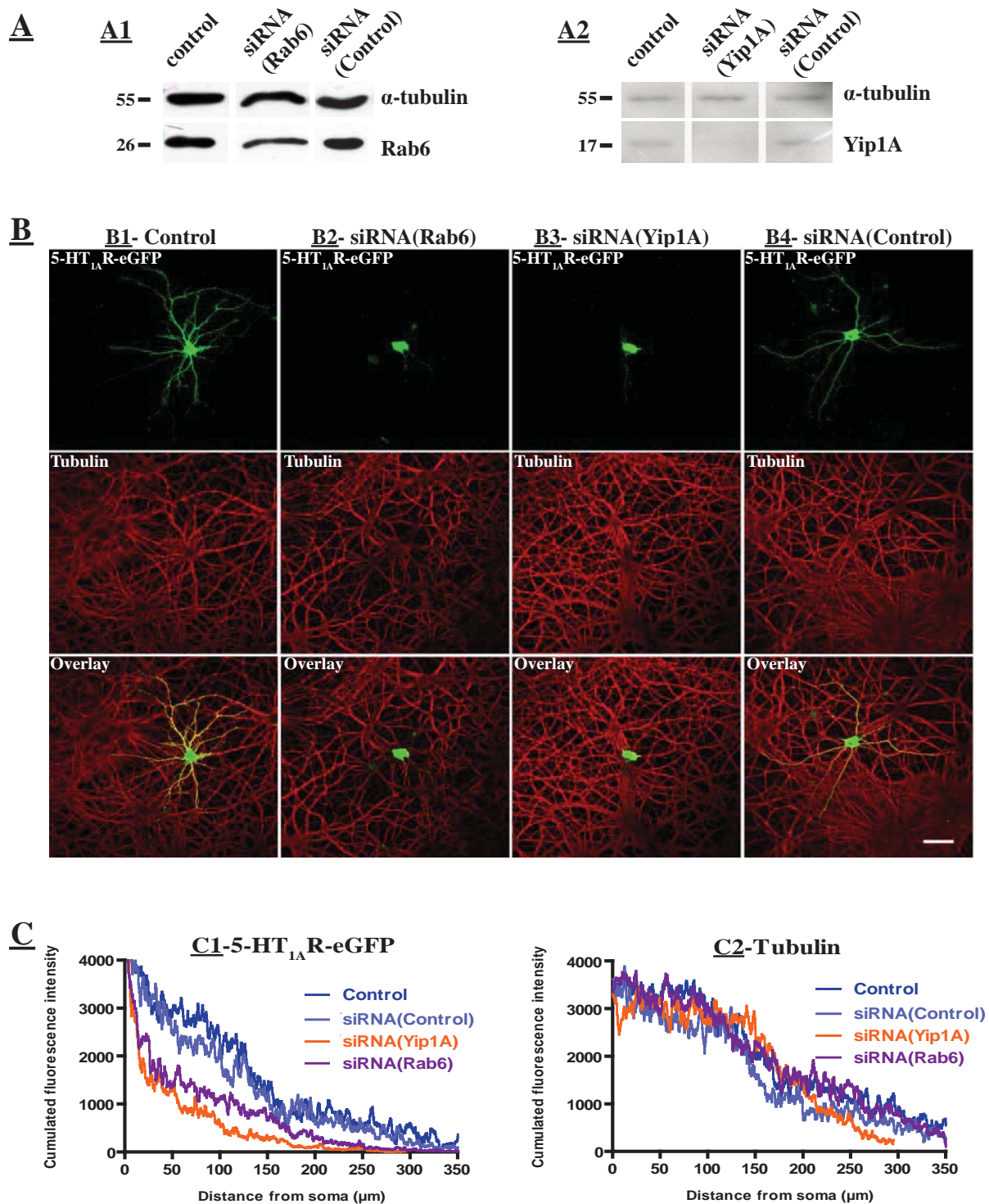


Figure 7 : Rab6 and Yip1A depletion disturbs 5-HT_{1A}R targeting towards distal dendrites.

(A) Downregulation of the Rab6 and Yip1A proteins by siRNA in primary cultures of rat hippocampal neurons 48h post-transfection of neurons at DIV7. Rab6 (A1) and Yip1A (A2) were detected by western blots of protein extracts, α -tubulin was detected in the same membrane to normalize the amount of extract. All neurons were co-transfected with 5-HT_{1A}R-eGFP alone (Control) or with 5-HT_{1A}R-eGFP plus siRNA directed against endogenous Rab6 or endogenous Yip1A or control siRNA.

(B) Immunofluorescence on neurons transfected with the 5-HT_{1A}R-eGFP alone (B1) or co-transfected with the 5-HT_{1A}R-eGFP plus siRNAs against endogenous Rab6 (B2) or endogenous Yip1A (B3) or control siRNA (B4) were performed with anti-GFP antibody to enhance the GFP signal (green, top) or anti- α -tubulin antibody (red, middle). Bottom, Overlay. (C) Cumulated fluorescence profiles along the longest dendrite labeled by 5-HT_{1A}R-eGFP (C1) and tubulin (C2) for each group (80 neurons analyzed). Scale bar, 50 μ m.

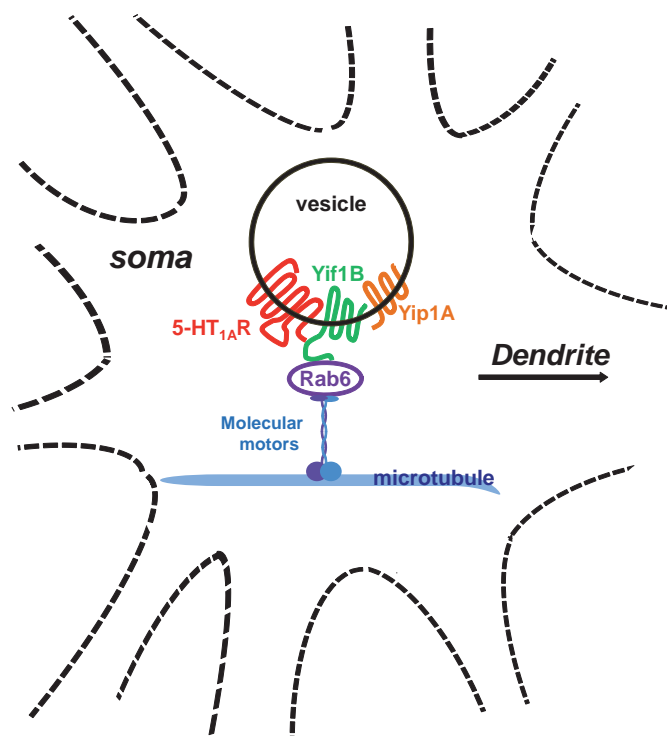


Figure 8: Schematic representation of the Yif1B-scaffolding complex involved in 5-HT_{1A}R trafficking towards the dendrites.

In our model, we propose a novel dendritic pathway involved in the trafficking of the 5-HT_{1A}R. The Yif1B-dependent transport involves Yif1B as the scaffold protein assembling the 5-HT_{1A}R, Yip1A and Rab6 in same vesicles trafficking along the microtubule network towards the dendrites. Rab6 could play a key role in the recruitment of the molecular motors involved in the specific 5-HT_{1A}R dendritic targeting towards the distal dendrites.

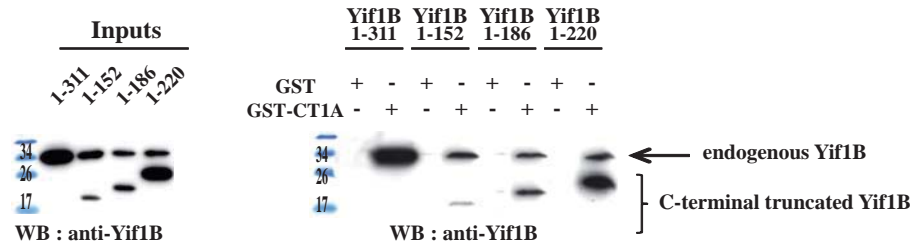
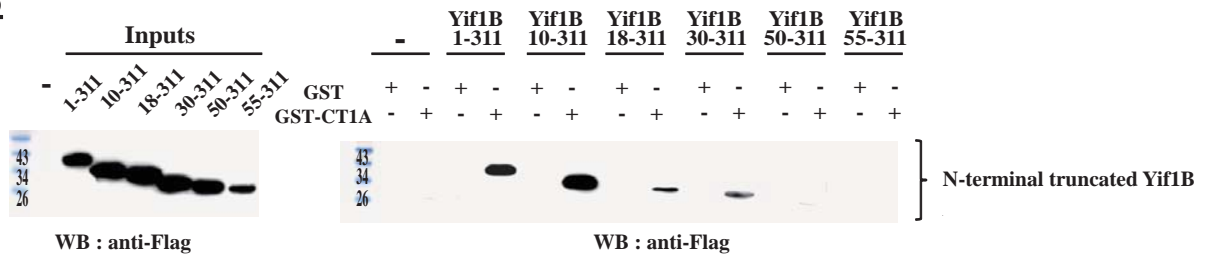
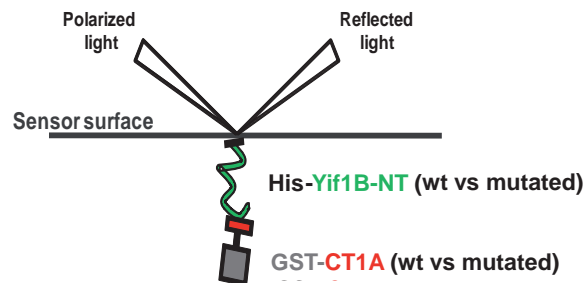
A**B****C**

Figure S1: The residues involved in the interaction with the 5-HT_{1A}R are present in the first 50th amino acids of the N-tail of Yif1B.

Purified WT GST-CT1A or GST alone (control) were incubated with HEK cell lysates expressing the different C-terminal truncated Yif1B forms (Inputs, left panels). GST pull-downs were analyzed by Western blot followed by ECL+ detection (right panels) using (A) anti-Yif1B antibody for the C-terminal truncated Yif1B forms or (B) with anti-Flag antibody for the Flag-tagged N-terminal truncated Yif1B.

(C) Schematic representation of the Resonance Plasmonic Surface strategy for the study of interaction between the 5-HT_{1A}R and Yif1B. Because purified hydrophilic proteins were required, we immobilized on the sensor chip the N-tail of Yif1B tagged with a His-tag on its N-terminal end or His-Yif1B-NT (WT or mutated forms) sufficient for the interaction with the receptor. The GST-CT1A (WT or mutated forms) was loaded in fluid phase over the sensorchip and the GST alone was used as a negative control.

ConSeq Results

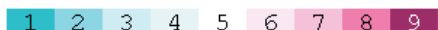
Yif1B *rattus norvegicus*

NP_942029



Legend:

The conservation scale:



Variable Average Conserved

e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.

b - A buried residue according to the neural-network algorithm.

f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).

s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).

X - Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

— Transmembrane domains predicted by PredictProtein server

— Non-regular secondary structure predicted by PredictProtein server

— Beta sheets predicted by JPred server

— Alpha-helices predicted by JPred server

Figure S2 : Primary structure analysis of Yif1B.

Identification of the functionally and structurally important residues in the protein sequence of the rat Yif1B (accession number: NP_942029) using the ConSeq server¹. The secondary structures were predicted using Predict Protein² and Jpred servers³. No secondary structures could be predicted in the first 70 amino acids.

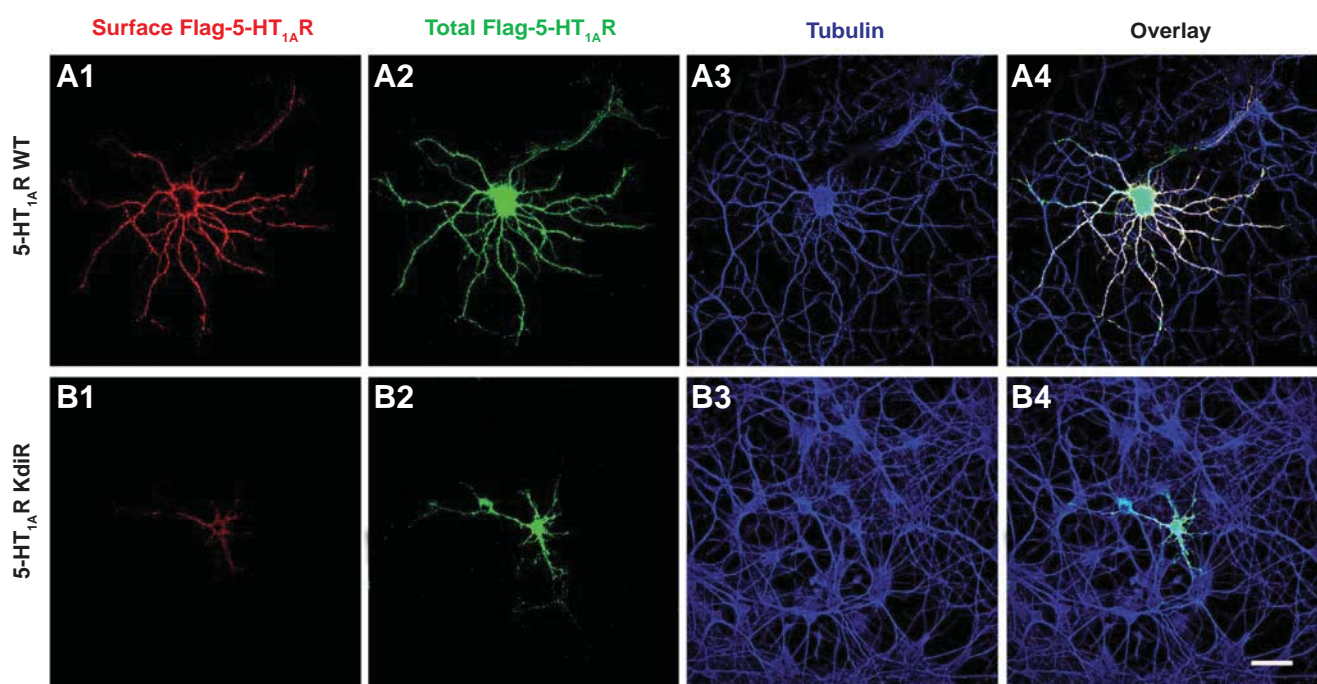


Figure S3: KdiR mutation alters the 5-HT_{1A}R localization in plasma membrane and in dendrites of hippocampal neurons.

(A-B) Confocal images of rat hippocampal neurons expressing the WT (top panel) and the KdiR (bottom panel) Flag-5-HT_{1A}R. 48 h after the transfection, surface staining with mouse monoclonal anti-Flag antibody and intracellular labeling with the rabbit anti-Flag after plasma membrane permeabilization are shown. The Flag-5-HT_{1A}R surface expression (A1 and B1) and the total (A2 and B2) permeabilisation. The α -tubulin was immunolabeled in blue (A3, B3). (A4, B4), overlay. Scale bars, 50 μ m.

```

RAB6A      MSAGGDFGNPLRKFKLVFLGEQSVGKTSLITRFMYDSFDNTYQATIGIDFLSKTMYLEDR 60
RAB6A '    MSAGGDFGNPLRKFKLVFLGEQSVGKTSLITRFMYDSFDNTYQATIGIDFLSKTMYLEDR 60
RAB6B      -----MYDSFDNTYQATIGIDFLSKTMYLEDR 27
                *****

RAB6A      TVRLQLWDTAGQERFRSLIPSYIRDS TVAVVVYDITNVNSFQQTTKWIDDVRTERGSDVI 120
RAB6A '    TIRLQLWDTAGQERFRSLIPSYIRDS AA AVVVYDITNVNSFQQTTKWIDDVRTERGSDVI 120
RAB6B      TVRLQLWDTAGQERFRSLIPSYIRDS TVAVVVYDITNLNSFQQT SKWIDDVRTERGSDVI 87
                * : ***** : * : ***** : ***** : ***** : *****

RAB6A      IMLVGNKTDLADKRQVSIEEGERKAKELNVMFIETSAKAGYNVKQLFRRVAAALPGMEST 180
RAB6A '    IMLVGNKTDLADKRQVSIEEGERKAKELNVMFIETSAKAGYNVKQLFRRVAAALPGMEST 180
RAB6B      IMLVGNKTDLADKRQITIEEGEQRAKEL SVMFIETSAKTGYNVKQLFRRVASALPGMENV 147
                ***** : * : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

RAB6A      QDRSREDMIDIKLEKPQEQPVNEGGCSC 208
RAB6A '    QDRSREDMIDIKLEKPQEQPVNEGGCSC 208
RAB6B      QEKSKEGMIDIKL DKPQEP PASEGGCSC 175
                * : * : * : ***** : ***** * : *****

```

Figure S4 : Comparison of the different Rab6 isoforms in *Rattus Norvegicus*.

The *Rattus Norvegicus* amino acid sequence of Rab6A (UniprotKB/Swiss reference: Q9WVB1), Rab6A' (accession number: NP_445818.1) and RAB6B (accession number: NP_001102245.1) were aligned using Clustal W2^{4,5}. Identical residues are labeled by a star (Bottom line).

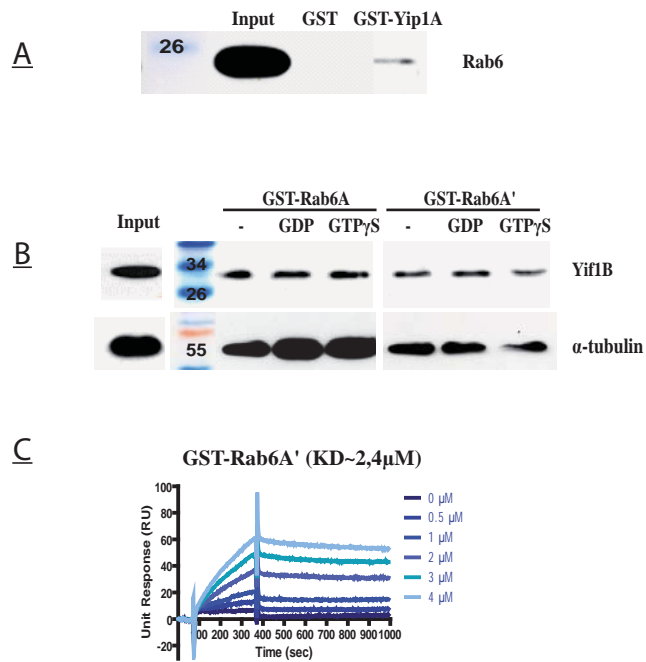


Figure S5 : The probable role of Yif1B as a Rab6 GDF.

GST pull-down experiments performed on rat brain lysates with (A) Purified GST-Yip1A N-tail or GST alone (negative control). Input represents a 2.5% load of the total lysates used in all conditions. Western blot were revealed using anti-Rab6 antibody (A). GST-Rab6A and GST-Rab6A' bound with GDP or GTP γ S were prepared as described previously⁶. Western blot was revealed with the anti-Yif1B antibody (B, top panel) and membrane was stripped and immunolabelled with anti-tubulin antibody (B, bottom panel). (C) Kinetic study of the interaction between GST-Rab6A' and WT His-NtYif1B determined by surface plasmon resonance. The concentration range of GST-Rab6A' was 0–4 μ M in six serial dilutions passed over WT His-NtYif1B immobilized on a sensor chip. Data are presented as real-time graphs of RU against time and were analyzed using a 1:1 Langmuir binding model with baseline.

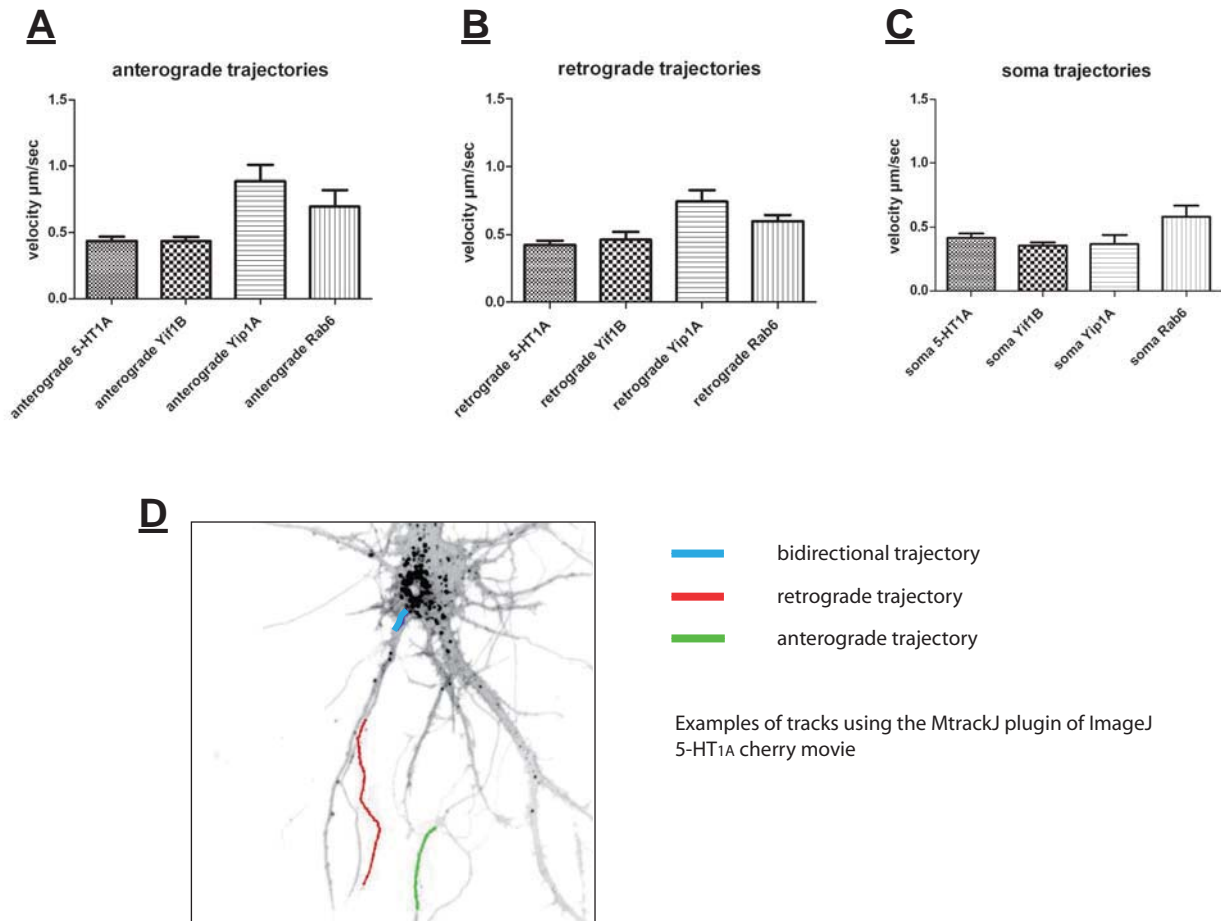


Figure S6 : Velocities of moving vesicles using trajectories tracking.

Trajectories of moving vesicles were tracked with the MTrackJ Plugin of ImageJ software. Trajectories were classified as anterograde (A) or retrograde (B) according to their direction in dendrites or as somatic (C) if the traffic occurred only in the soma. Mean and SEM values were calculated and plotted using GraphPad 4 Software. (D) shows an example of trajectories tracks highlighted with MTrackJ allowing to assign the movement directionality from Movie S5.

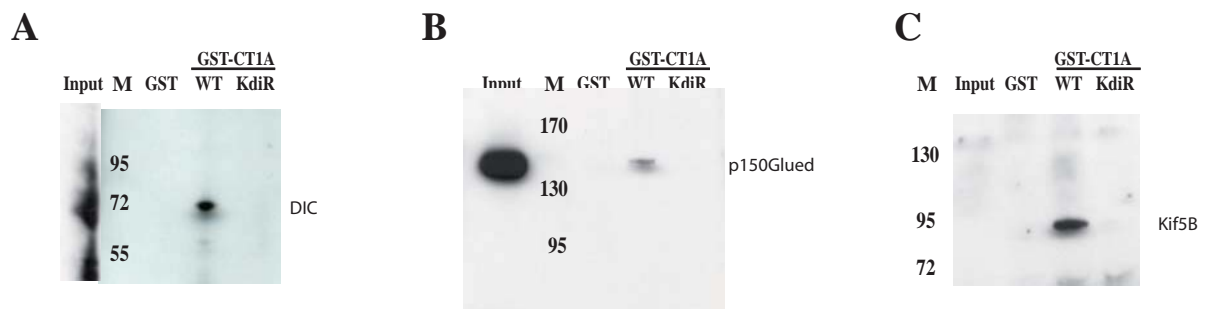


Figure S7: Two molecular motors are present in the complex interacting with the C-tail of the 5-HT_{1A}R.

Purified GST-CT1A (WT and KdiR mutant) and GST alone (negative control) were incubated with rat brain lysates. Inputs represent a 2.5% load of the total lysates used in all conditions. GST Pull down was analyzed by Western blot mouse anti-dynein intermediate chain (A), mouse anti-P150GLUED (B) and anti-Kif5B (C) antibodies.

Legends to movies

Movie S1 : Dendritic 5-HT_{1A}R vesicle.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, expressing 5-HT_{1A}R-cherry. The movie was taken with an image acquisition rate of 1 image/sec. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 150 ms. Representation in inverted monochrome.

Movie S2 : Dendritic Yif1B vesicle.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, expressing Yif1B-eGFP. The movie was taken with an image acquisition rate of 1 image/sec. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 50 ms. Representation in inverted monochrome.

Movie S3 : Dendritic Rab6A vesicle.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, expressing Rab6AeGFP. The movie was taken with an image acquisition rate of 1 image/sec. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 200 ms. Representation in inverted monochrome.

Movie S4 : Dendritic Yip1A vesicle.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, expressing Yip1A-cherry. The movie was taken with an image acquisition rate of 1 image/sec. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 100 ms. Representation in inverted monochrome.

Movie S5 : Bidirectional transport of 5-HT_{1A}R in dendrites.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, expressing 5-HT_{1A}R-cherry. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 100 ms. Representation in inverted monochrome. FigS6 (D) represents some trajectories tracked on this movie of anterograde, retrograde and bidirectional vesicles in dendrites.

Movie S6 : Co-trafficking of vesicles labeled with 5-HT_{1A}R-cherry and Yif1BeGFP.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, co-expressing 5-HT_{1A}R-cherry and Yif1BeGFP. The movie was taken with an image acquisition rate of 1 image/sec. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 100 ms.

Movie S7 : Vesicle co-labeled with 5-HT_{1A}R-cherry and Yif1BeGFP exits towards dendrite.

Time-lapse video microscopy using DIV 9 hippocampal neurons in culture, co-expressing 5-HT_{1A}R-cherry and Yif1BeGFP. The movie was taken with an image acquisition rate of 1 image/sec. Images represents a maximal projection of a z-stack acquired at each time point, with a time exposure of 100 ms.

DISCUSSION

III. Principaux résultats

Par une approche multidisciplinaire, nous avons identifié Yif1B, la première protéine partenaire du récepteur 5-HT_{1A} de la sérotonine jouant un rôle crucial dans son adressage vers les dendrites distales. Nous avons étudié l'adressage de trois autres récepteurs dendritiques et le rôle de Yif1B semblerait être spécifique pour le récepteur 5-HT_{1A}. Ce fait peut être expliqué par l'identification d'un motif tribasique exclusivement dans l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}. Ce motif est crucial pour l'interaction avec notamment trois acides aminés acides compris dans l'extrémité N-terminale de Yif1B. De plus, nous avons décrit une nouvelle voie d'adressage dendritique impliquant Yif1B comme protéine adaptatrice assemblant le récepteur 5-HT_{1A} et ses autres partenaires d'adressage dans des vésicules transportées le long des microtubules. Ces nouvelles protéines identifiées sont : Rab6, une petite GTPase monomérique, Yip1A, une protéine de la famille de Yif1B, et enfin la tubuline. Des expériences de vidéomicroscopie sur neurones vivants ont montré un transport bidirectionnel du récepteur et de ses partenaires suggérant le rôle de certains moteurs moléculaires dont l'identification est en cours.

IV. Identification des motifs d'interaction du complexe 5-HT_{1A}/Yif1B

En ce qui concerne le récepteur 5-HT_{1A}, il a été initialement modélisé par homologie de séquence avec la rhodopsine, le prototype des RCPG, le premier à avoir été modélisé par cristallographie. Cependant, d'autres RCPG, y compris le récepteur β_2 -adrénergique, ont depuis été cristallisés ce qui a permis d'affiner le modèle structural du récepteur 5-HT_{1A} en se basant sur sa forte homologie de séquence avec ce récepteur des catécholamines en particulier (Paila et al., 2010). D'ailleurs on peut rappeler que le récepteur 5-HT_{1A} a été cloné en criblant une banque génomique humaine justement avec une sonde β_2 -adrénergique. La courte extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A} formerait une petite hélice α , en accord avec la théorie de la huitième hélice des RCPG dans cette région (Yeagle et al., 1997; Palczewski et al., 2000). La huitième hélice de la rhodopsine a été décrite comme étant perpendiculaire aux sept segments transmembranaires (Palczewski et al., 2000). Celle du récepteur 5-HT_{1A} est composée de 18 acides aminés dont certains résidus hydrophobes sont tournés vers la membrane plasmique alors que des résidus basiques chargés positivement sont tournés vers le

cytoplasme et sont donc exposés et pourraient donc être impliqués dans l'interaction avec des partenaires protéiques. Cette hypothèse a été confirmée par l'identification du motif tribasique KdiR de l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}, jamais décrit auparavant, et crucial pour l'interaction avec Yif1B. Il est intéressant de noter que lorsque ces 3 acides aminés, la lysine en position 405 et le motif di-arginine en position 421-422 (K405diR) sont substitués par des résidus alanine, l'interaction avec Yif1B est totalement perdue. En revanche, lorsqu'à la place de la lysine K405 nous mutons la lysine en position 412 ainsi que le motif di-arginine (K412diR), l'interaction est moins forte, mais pas totalement perdue, avec un K_D de l'ordre de celui du mutant diR. Ce résultat montre que l'interaction avec Yif1B n'est pas due seulement à la présence de ces trois charges positives dans l'extrémité C-terminale mais également à leur position dans la structure tridimensionnelle du récepteur.

Des motifs tribasiques RdiR et RdiK sont présents dans l'extrémité C-terminale du récepteur β2-adrénergique et du récepteur de l'Angiotensine 2 de type 1 (AT1) suggérant que tout deux pourraient également interagir avec la protéine Yif1B. Il serait donc intéressant d'étudier leur adressage neuronal dans le but de tenter de généraliser le rôle de Yif1B dans le trafic des RCPG. D'ailleurs, comme celui du récepteur 5-HT_{1A}, l'adressage de ces deux récepteurs à la membrane plasmique est également Rab-dépendant (Wu et al., 2003) et même Rab6-dépendant pour AT1 (Dong and Wu, 2007).

La substitution des 3 résidus aspartate (D33, D39 et D40) par des résidus alanine dans l'extrémité N-terminale de Yif1B a pour conséquence une diminution, mais pas la perte complète, de l'affinité de ce partenaire pour le récepteur. La persistance d'une affinité résiduelle pourrait être expliquée par l'existence d'autres résidus de Yif1B impliqués dans l'interaction avec le récepteur. Les résultats obtenus par GST Pull Down, sur des protéines extraites de cellules transfectées avec les différentes formes tronquées de Yif1B, ont montré que la délétion des 18 premiers acides aminés conduit à une forte diminution de l'interaction avec le récepteur alors que la forme dépourvue du premier décapeptide interagit normalement avec le récepteur. Comme il est peu probable qu'un changement de conformation de cette forme tronquée puisse expliquer cette diminution d'affinité, puisqu'aucune structure secondaire n'est prédite dans ce domaine de la protéine, on peut penser qu'il existe probablement un acide aminé au moins entre le 11^{ème} et le 18^{ème} résidu qui joue un rôle dans l'interaction avec le récepteur. Nous n'avons pas pu faire des prédictions sur d'autres résidus qui pourraient également être impliqués dans l'interaction avec le récepteur 5-HT_{1A} parce que Yif1B ne présentant aucune homologie de séquence avec une protéine préalablement

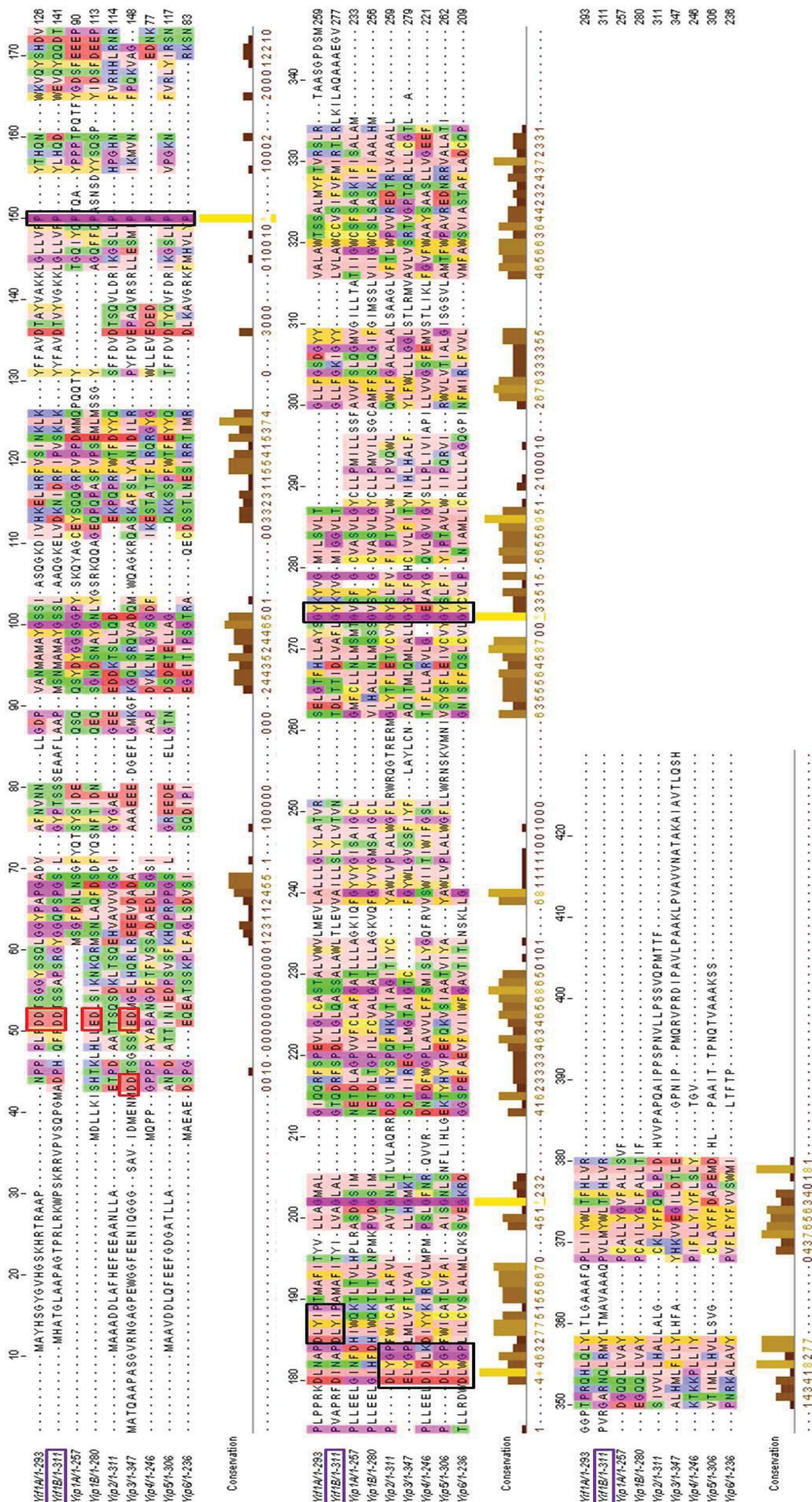


Figure 34 :
Comparaison des séquences protéiques des différents membres de la famille des Yip chez le rat

Alignements réalisés à l'aide du logiciel ClustalW2 et représenté sous le format Jalview 2 (Waterhouse et al., 2009).

Les numéros d'accension sont les suivants :

- Yif1A (NP_742014.2),
- Yif1B** (NP_942029.2),
- Yip1A (Q5XID0),
- Yip1B (Q8N8F6),
- Yip2 (Q5XIT3),
- Yip3 (Q6TUD4), Yip4 (Q5M7T4), Yip5 (Q6P6G5), Yip6 (Q4QQU5).

Les motifs conservés DLYGP suivi de GY et d'une proline en amont sont encadrés en noir et les motifs diacidiques (DD ou ED) sont encadrés en rouge.

modélisée, il n'a pas été possible d'effectuer une étude de « docking » ou de modélisation *in silico* du complexe 5-HT_{1A}/Yif1B.

Il est néanmoins intéressant de noter que les 3 résidus aspartate (en positions 33, 39 et 40) du motif triacide de Yif1B impliqué dans l'interaction avec le récepteur sont fortement conservés chez les mammifères (**Figure 1 de l'article 1**). De plus, 2 de ces trois aspartates (en positions 39 et 40) sont également retrouvés chez d'autres membres de la famille Yip, en l'occurrence Yif1A et Yip3 (**Figure 34**), suggérant un rôle majeur pour ce motif. Dans la littérature, le rôle de motifs diacidiques a déjà été décrit dans l'export du RE de certaines protéines du trafic intracellulaire (Abdul-Ghani et al., 2001; Miller et al., 2003) ainsi que de certains RCPG tels que le récepteur de l'Angiotensine 2 (Zhang et al., 2011). Par ailleurs, certains résidus acides de PRA1/Yip3 sont essentiels pour sa localisation dans le RE alors que ce sont des acides aminés basiques dans PRA2 qui sont indispensables pour sa localisation dans l'appareil de Golgi (Abdul-Ghani et al., 2001). Ici, nous démontrons que deux résidus acides sont importants dans l'interaction avec le récepteur 5-HT_{1A} et par conséquent pour l'adressage de ce récepteur vers les dendrites.

V. Interaction entre Yif1B et Yip1A

V.1. Interaction biochimique du complexe Yif1B/Yip1A

Nos résultats démontrent que l'extrémité N-terminale de Yip1A interagit avec l'extrémité N-terminale de Yif1B avec une affinité (K_D) de l'ordre de 1 μ M. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus antérieurement avec les orthologues respectifs chez la levure, Yip1p et Yif1p, dont l'interaction directe (Calero et al., 2002) implique en plus des 18 derniers résidus C-terminaux de Yip1p, un résidu chargé dans son extrémité N-terminale : un acide glutamique en position 70 (Chen et al., 2004). Nous pensons donc que l'affinité que nous avons mesurée pourrait être plus forte si nous avons pu utiliser des protéines « entières » au Biacore c'est-à-dire avec leurs domaines transmembranaires. En effet une étude montre que les domaines transmembranaires de Yip1A sont essentiels pour son interaction avec l'extrémité N-terminale de Yif1A, l'homologue de Yif1B. Enfin, comme la troncature des 65 premiers acides aminés de Yip1p ne conduit pas à la perte de son interaction avec Yif1p (Chen et al., 2004), il est possible que les 65 premiers acides aminés de l'extrémité

N-terminale de Yip1A ne soient pas non plus ceux qui interagissent avec l'extrémité cytosolique de Yif1B (**Figure 35**).

Pour conclure, d'après nos résultats, les extrémités cytosoliques de Yif1B et Yip1A sont suffisantes pour leur interaction contrairement à ce qui a été montré pour le complexe Yip1A/Yif1A, ce qui pourrait être expliqué par le fait que Yif1B fonctionnerait différemment de son homologue. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le rôle des domaines transmembranaires dans cette interaction. Enfin, rappelons que l'extrémité N-terminale de Yip1A se lie également aux protéines COPII Sec23/24 (Tang et al., 2001) (**Figure 35**).

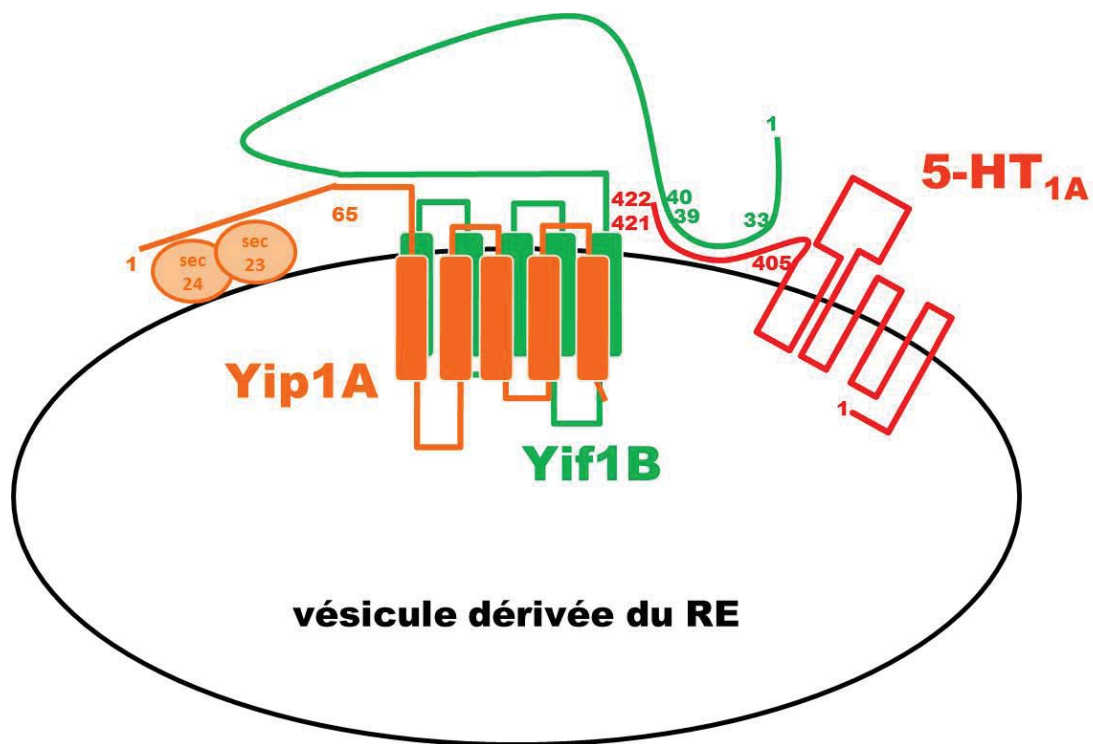


Figure 35 : Modélisation de l'interaction entre Yif1B et Yip1A dans une vésicule dérivée du RE transportant le récepteur 5-HT_{1A}

V.2. Rôle de l'interaction de Yif1B/Yip1A

Dans nos marquages immunofluorescents de neurones fixés, les vésicules où Yif1B et Yip1A « colocalisent » sont présentes dans le soma et les dendrites. Les deux anticorps étant produits chez le lapin, nous ne pouvions pas combiner la détection de leur expression endogène. Nous en avons donc surexprimé une et détecté l'expression endogène de l'autre.

En revanche, pour nos expériences de vidéomicroscopie sur neurones vivants, la surexpression de protéines recombinantes Yif1B et Yip1A fluorescentes était obligatoire. De façon surprenante, cela a abouti à leur séquestration dans un compartiment intracellulaire de type RE, sans pouvoir observer de mouvements vésiculaires. Ceci suggère l'implication de ces deux protéines dans une même voie de transport, probablement celle entre le RE et l'appareil de Golgi comme il a déjà été montré pour le complexe Yif1p/Yip1p (Matern et al., 2000; Heidtman et al., 2003).

Nos expériences de siRNA montrent que Yip1A, tout comme Yif1B, est cruciale pour l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}. Le rôle de Yip1A dans le trafic neuronal n'avait encore jamais été décrit. Mais par analogie avec ce qui a été rapporté dans la littérature, nous pouvons imaginer que l'extrémité N-terminale de Yif1B interagit avec Yip1A dans le RE, ce qui permet la formation du complexe stable Yip1A/Yif1B, indispensable pour la localisation golgienne de Yif1B et donc pour le trafic du récepteur entre le RE et l'appareil de Golgi.

VI. Interaction Yif1B/Rab6

VI.1. Interaction biochimique Yif1B/Rab6

L'extrémité N-terminale de Yif1B interagit directement avec Rab6A mais peut également interagir avec Rab6A', elle n'est donc pas isoforme-spécifique. Cependant les constantes d'affinités obtenues par Biacore révèlent une préférence de Yif1B pour Rab6A. Yif1B pourrait être impliquée dans une voie de trafic commune à Rab6. Chez la levure, l'interaction Yif1p/Ypt6 avait déjà été observée par la technique du double hybride, mais aucun rôle ne lui avait été attribué (Calero et al., 2002).

Or, nos expériences de vidéomicroscopie montrent que Yif1B ne co-migre pas avec Rab6 suggérant que ces deux protéines ne seraient pas impliquées dans les mêmes voies de transport, à l'exception toutefois de celle responsable de l'adressage du récepteur 5-HT_{1A}. De fait, dans nos expériences d'immunofluorescence sur neurones fixés, les rares vésicules montrant une colocalisation Yif1B/Rab6 contiennent également le récepteur 5-HT_{1A}.

VI.2. Rôle de Rab6 dans le trafic du récepteur 5-HT_{1A}

Les expériences de siRNA montrent que, tout comme Yif1B, Rab6 joue un rôle dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}. Le rôle de Rab6 dans l'adressage d'un RCPG dans les neurones n'avait jamais été montré auparavant. Cependant, Rab6A avait déjà été décrit comme jouant un rôle dans l'adressage à la membrane plasmique de cellules non polarisées de certains RCPG, tels que le récepteur β2-adrénergique et le récepteur AT1 de l'angiotensine 2 (Dong and Wu, 2007).

Notre étude est donc la première à montrer l'implication de Rab6 dans le transport antérograde de protéines vers les dendrites distales des neurones. Jusqu'à présent en effet, l'identification de Rab6 comme protéine jouant un rôle dans un transport post-golgien n'avait été rapportée que pour le transport de la rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (Deretic and Papermaster, 1993).

VI.3. Rôle probable de Yif1B en tant que Rab-GDF

Yip1A est une protéine qui interagit indirectement avec Rab6 et qui est essentielle pour le recrutement de Rab6 à la membrane du Golgi (Kano et al., 2009). Nos résultats ayant montré que Yif1B interagit directement avec Yip1A et Rab6, nous pouvons supposer que Yif1B était justement la protéine intermédiaire connectant ces deux dernières protéines.

D'ailleurs, nos résultats de GST Pull Down ont montré que Yif1B interagissait aussi bien avec Rab6-GDP qu'avec sa forme Rab6-GTP, suggérant qu'elle pouvait également jouer le rôle de Rab6-GDF permettant ainsi le recrutement de Rab6 au niveau des membranes du Golgi. En réalité, ceci expliquerait les résultats de Kano et al, 2009. Pour déterminer si Yif1B a une préférence pour l'une d'elles, son affinité pour les deux formes de Rab6 pourrait être mesurée à l'aide de la technologie du Biacore.

Nous avons émis l'hypothèse de ce rôle éventuel de Rab6 par analogie avec celui de GDF décrit pour Yip3 (section III.2.3.e) ainsi qu'avec les données concernant le complexe Yif1p/Yip1p chez la levure. En effet, Yif1p interagit avec la protéine Yip1p qui, elle, interagit avec Yip4p et Yip5p (Calero et al., 2002) ou encore avec les protéines Rab/Ypt, Ypt31 et Ypt1 (Yang et al., 1998). Les auteurs pensaient que Yip1p était le « lien » entre les différentes protéines Yip ou entre les protéines Yip et Rab. Or, une autre étude montre que Yip1p et Yif1p interagissent avec la forme GDP mais pas avec la forme GTP de Ypt1 (Matern et al., 2000). Le rôle du complexe Yip1p/Yif1p dans le recrutement de Ypt1 au niveau des membranes de l'appareil de Golgi avait toutefois été évoqué via la liaison de ce complexe avec seulement la forme Ypt1-GDP (par l'échange de GTP/GDP sous l'action d'un facteur membranaire immédiatement après le recrutement de Ypt1 à la membrane du RE) (Yang et al., 1998; Matern et al., 2000). Enfin, la déplétion de Yip1p ne perturbant pas le recrutement de Ypt1 (Rab1) à la membrane du RE (Barrowman et al., 2003), il a été proposé que Yif1p, en tant que membre du complexe Yip1p/Ypt1 (Matern et al., 2000), pourrait jouer un rôle dans le recrutement de Ypt1 à la membrane du RE.

D'après cette analyse des résultats décrits chez la levure, Yif1B pourrait exercer une fonction de type GDF non seulement pour Rab6 mais également pour Rab1.

VII. Quels moteurs moléculaires assurent le transport bidirectionnel du récepteur 5-HT_{1A} dans les dendrites ?

Nos résultats démontrent que Yif1B est la protéine d'échafaudage permettant l'interaction du récepteur 5-HT_{1A} avec la tubuline. De plus, l'effet du traitement des neurones en culture par le nocodazole montre le rôle essentiel des microtubules dans le trafic intracellulaire du récepteur 5-HT_{1A}. Enfin, l'analyse des mouvements de ces vésicules par vidéomicroscopie montre qu'elles présentent des mouvements relativement rapides dans le soma et les dendrites et que leur transport dans les dendrites est bidirectionnel (antérograde et rétrograde), y compris dans leur partie distale.

L'interaction se fait le plus souvent à travers une protéine adaptatrice appelée également protéine d'échafaudage. Dans le contexte de cargos transportés dans les neurones, plusieurs protéines adaptatrices ont d'ores et déjà été identifiées : la protéine GRIP1 pour les sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA (Setou et al., 2002), les protéines Lin pour les sous-unités NR2B des récepteurs NMDA (Setou et al., 2000), la syntabuline pour la syntaxine (Su

et al., 2004) ou encore la géphyrine pour le récepteur de la glycine (Maas et al., 2006) . Il est intéressant de noter que toutes ces protéines adaptatrices sont cytosoliques et ne contiennent pas de domaines transmembranaires contrairement à Yif1B.

Une seule étude a montré une interaction directe entre un récepteur et la tubuline. Il s'agit de celle de l'équipe du Dr Wu qui concerne le RCPG $\alpha 2$ -adrénergique (Duvernay et al., 2011).

Les observations non attendues concernant la bidirectionnalité du transport du récepteur 5-HT_{1A} nous ont incités à rechercher les moteurs moléculaires impliqués dans ce phénomène. Nos résultats préliminaires suggèrent fortement l'implication de la dynéine et de la kinésine Kif5B dans l'adressage du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites, mais révèlent également que la sous-unité p150_{glued} de la dynactine pour intervenir comme coordinateur de ces deux protéines motrices.

En revanche, nous n'avons pas obtenu de résultats impliquant Kif17 dans le trafic dendritique du récepteur 5-HT_{1A} que ce soit dans des expériences d'inhibition de l'expression par des ARN antisens (Guillaud et al., 2003; Yuen et al., 2005) ou de GST Pull Down.

Concernant notre modèle d'adressage, deux hypothèses sont possibles :

- Yif1B serait la protéine d'échafaudage reliant directement le récepteur à des moteurs moléculaires ;
- Yif1B jouerait plutôt un rôle indirect permettant l'assemblage des moteurs moléculaires au complexe d'adressage du récepteur 5-HT_{1A}. En effet, nos résultats montrant une interaction directe entre Rab6 et Yif1B, cette dernière recruterait la protéine Rab6 au niveau des vésicules cargo 5-HT_{1A}, qui à son tour interagirait avec ces protéines motrices, comme nous l'avons déjà évoqué dans la section II.2.4.e. La dynéine et Kif5B se déplaçant dans des directions opposées le long des microtubules permettraient le transport bidirectionnel du récepteur dans les dendrites proximales et distales. Cette dernière hypothèse nous semble la plus probable.

D'après les données de la littérature et l'organisation établie des microtubules dendritiques et axonaux, le « scénario » que nous proposons concernant le transport des vésicules cargos 5-HT_{1A} par les moteurs moléculaires dans les neurones est le suivant : le complexe dynéine/dynactine d'une part et Kif5B d'autre part seraient présents dans les mêmes vésicules cargos 5-HT_{1A}. La dynéine serait attachée aux microtubules permettant ainsi la sortie sélective vers les dendrites des vésicules cargo 5-HT_{1A} puis, un « switch »

s'effectueraient aux extrémités distales des dendrites proximales à l'aide de la dynactine qui inactiverait la dynéine en la décrochant des microtubules. KIF5B prendrait le relais en s'accrochant à son tour aux microtubules pour transporter le récepteur dans le sens antérograde loin vers la partie distale des dendrites. Enfin, les vésicules cargo arrivées au bout des dendrites distales seraient ramenées vers le soma par un transport rétrograde assuré à nouveau par la dynéine.

Il est intéressant de noter que nous observons également certaines vésicules contenant le récepteur qui restent dans la partie proximale des dendrites et reviennent dans le soma, ce mouvement pourrait avoir lieu grâce à la dynéine qui resterait active.

La comparaison des vitesses des vésicules cargos dans les dendrites proximales versus distales et dans le sens antérograde versus rétrograde permettraient de tester la validité de ce « scénario ».

VIII. L'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A} : voie conventionnelle ou Golgi Outposts-dépendante ?

VIII.1. Implication d'un ou plusieurs complexes multiprotéiques Yif1B-dépendants ?

Nos résultats montrent que Yif1B est la protéine d'échafaudage permettant l'interaction du récepteur 5-HT_{1A} avec Rab6 et Yip1A ainsi qu'avec les moteurs moléculaires. La question qui se pose à ce stade de notre analyse est celle du nombre de complexes impliqués dans le trafic du récepteur vers les dendrites. N'existe-t-il qu'un seul complexe présent tout au long du processus d'adressage du récepteur, qui serait composé du récepteur, de Yif1B, de Yip1A, de Rab6 ainsi que des moteurs moléculaires, ou bien en existe-t-il plusieurs ? Si oui, à quelle étape du trafic ces complexes sont-ils présents respectivement ?

VIII.2. Yif1B, chef d'orchestre du trafic du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites des neurones.

En combinant les données bibliographiques disponibles et nos résultats, nous proposons deux modèles possibles du trafic du récepteur 5-HT_{1A}, à partir du RE jusqu'à son

arrivée à la membrane plasmique dans le soma et les dendrites. Le récepteur passerait par le Golgi somatique dans notre premier modèle, alors que dans le second, il serait transporté dans les dendrites proximales par le RE mobile et traverserait des Golgi Outposts.

Nous avons quelques informations sur la localisation subcellulaire de Yif1B dans le cerveau de rat (cf article intégré dans les annexes du mémoire). En combinant les techniques d'hybridation in situ et également d'immunohistochimie sur coupes de cerveau de rat suivies de l'analyse aux microscopes confocal et électronique, nous montrons que le transcrite de Yif1B ainsi que la protéine qu'il code sont exprimés dans la plupart des structures cérébrales. La protéine Yif1B est localisée dans le RE, dans le Golgi et également dans des vésicules situées entre ces deux compartiments. Tout comme Yif1p, son orthologue chez la levure, Yif1B cyclerait entre le RE et l'appareil de Golgi. Enfin, Yif1B est retrouvée dans le soma et dans les dendrites, ce qui corrobore son rôle dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}.

VIII.3. Scénario éventuel du trafic du récepteur 5-HT_{1A} dans les neurones

Toutes les étapes du trafic du récepteur devraient être orchestrées par Yif1B, la protéine d'échafaudage permettant le recrutement de tous les autres acteurs du complexe d'adressage du récepteur identifiés dans cette étude. Les vésicules où le récepteur 5-HT_{1A} et Yif1B « colocalisent » sont beaucoup plus nombreuses que celles co-exprimant le récepteur et Yip1A ou Rab6. De plus, les vésicules coexprimant le récepteur et Yif1B co-migrent toutes dans le soma ainsi que dans les dendrites proximales. Toutes ces données confirment l'existence d'une interaction directe de très forte affinité du récepteur 5-HT_{1A} avec Yif1B, l'interaction du récepteur avec Yip1A et Rab6 n'étant qu'indirecte, par l'intermédiaire de Yif1B.

VIII.3.1. Entre le RE et l'appareil de Golgi

Au niveau des sites de sortie du RE (ERES), Yif1B et Yip1A formeraient un complexe stable permettant la sortie du RE du récepteur 5-HT_{1A} et son transport vers l'appareil de Golgi via des vésicules COPII, en passant probablement par l'ERGIC, le compartiment intermédiaire.

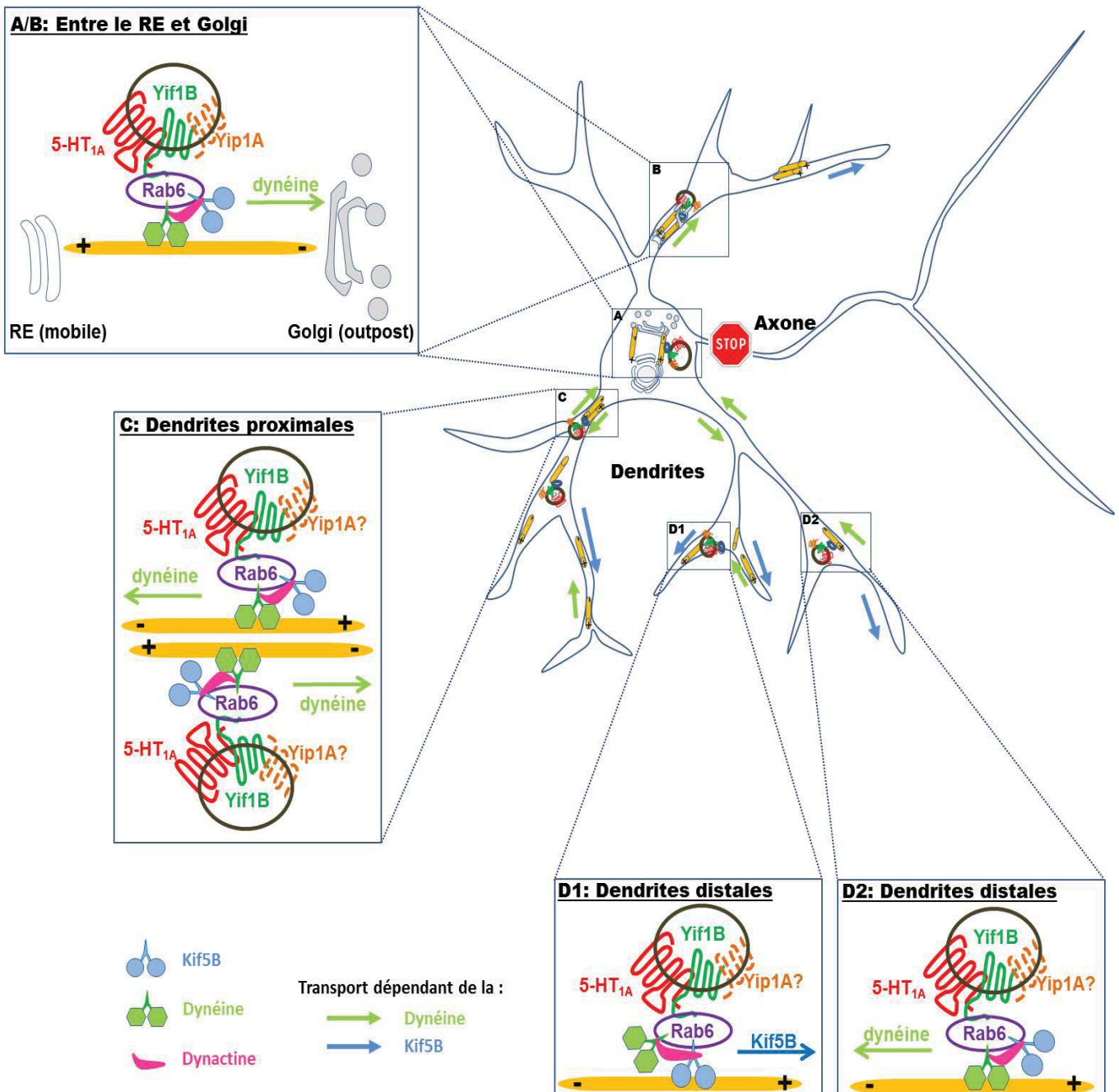


Figure 36 : Scénario possible du trafic du récepteur 5-HT_{1A} dans les neurones

En effet, Yip1A permettrait, via son interaction avec Yif1B, l'assemblage du complexe récepteur 5-HT_{1A}/Yif1B avec les protéines Sec23/24 du manteau des vésicules COPII (Heidtmann et al., 2003). De plus, des études montrent que Yip1A est localisée dans le RE, le Golgi et dans l'ERGIC. Enfin, tout comme pour Yif1A (Jin et al., 2005), Yip1A serait cruciale pour la localisation Golgienne de Yif1B et donc du récepteur 5-HT_{1A} également.

Rab6 pourrait, par l'intermédiaire ou non de la protéine Bicaudal, jouer le rôle de protéine adaptatrice permettant l'interaction du complexe 5-HT_{1A}/Yif1B/Yip1A avec le complexe dynéine/dynactine (Wanschers et al., 2007; Wanschers et al., 2008), ce dernier jouant un rôle crucial dans le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi (Burkhardt et al., 1997; Watson et al., 2005). De fait, les microtubules ont leur extrémité (+) au niveau du RE et donc par conséquent leur extrémité (-) près du Golgi.

Ce mécanisme de transport aurait lieu, selon dans le modèle 1, entre le RE et le Golgi somatique (**Figure 36A**). Dans le cadre du modèle 2, il pourrait intervenir entre le RE mobile et les Golgi Outposts présents dans les dendrites proximales (**Figure 36B**).

VIII.3.2. Au niveau de l'appareil de Golgi

Les vésicules cargos transportant le complexe récepteur 5-HT_{1A}/Yif1B/Yip1A arriveraient et fusionneraient avec les membranes du Golgi.

On peut alors envisager que Rab6 ne faisait pas déjà partie du complexe au stade RE et ne serait recrutée qu'au niveau des membranes de Golgi par Yif1B, celles-ci jouant le rôle de Rab6-GDF. Une autre possibilité serait que Rab6 serait recrutée directement au niveau de l'appareil de Golgi. Cependant, cette deuxième hypothèse est moins probable puisque se poserait alors le problème de savoir comment les vésicules cargos 5-HT_{1A} seraient transportées sans Rab6 le long des microtubules jusqu'à l'appareil de Golgi.

Pour le trafic intragolgien des vésicules cargos 5-HT_{1A}, le rôle de Rab6 à travers son interaction avec Yif1B est très probable étant donné son implication avérée dans la traversée des différentes citernes du Golgi (Goud et al., 1994; Martinez et al., 1994).

VIII.3.3. Entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique

Enfin, Rab6 est également connue pour être localisée dans le TGN (Roa et al., 1993); et pour assurer certaines fonctions telles que le transport postgolgien de la rhodopsine (Deretic and Papermaster, 1993), la fission de vésicules à partir du trans-Golgi (Miserey-Lenkei et al., 2010), l'exocytose de protéines sécrétées (Grigoriev et al., 2007) et enfin l'adressage à la membrane plasmique de certains RCPG (Dong and Wu, 2007). Nous envisageons donc un rôle crucial de Rab6 dans le transport du récepteur, du Golgi vers la membrane plasmique.

En revanche, dans cette étape, Yip1A ne serait plus présente dans le complexe, puisqu'aucune fonction ne lui a jusqu'à présent été attribuée ailleurs qu'entre le RE et l'appareil de Golgi.

Enfin, Kif5B pourrait jouer un rôle dans le transport Golgi-MP des vésicules cargos 5-HT_{1A} dans le soma des neurones selon le modèle 1, comme ceci a déjà été montré dans des cellules non neuronales (Grigoriev et al., 2007; Jaulin et al., 2007). A travers son interaction avec la protéine Rab6, qui, elle-même, est recrutée par Yif1B, Kif5B pourrait être la protéine motrice du complexe d'adressage permettant le transport vers les extrémités (+) proches de la membrane plasmique.

VIII.3.4. Trafic intracellulaire dendritique

VIII.3.4.a. Du soma vers les dendrites

Dans les deux modèles, l'hypothèse la plus probable est que la dynéine serait responsable du transport des vésicules cargos 5-HT_{1A} du soma spécifiquement vers les dendrites (Kapitein et al., 2010).

En effet, à cause de la polarité des microtubules neuronaux, la dynéine ne peut pas assurer le transport antérograde dans l'axone. Rappelons également qu'elle assure l'adressage spécifique des Golgi Outposts vers les dendrites proximales (Zheng et al., 2008) et qu'elle interagit avec la rhodopsine, un RCPG tout comme notre récepteur 5-HT_{1A} (Tai et al., 1999).

L'autre hypothèse d'une prise en charge par Kif5B à partir du soma n'expliquerait pas la spécificité d'adressage dendritique, puisque Kif5B peut assurer un transport antérograde également dans l'axone (Kapitein and Hoogenraad, 2010).

Dans le modèle 1, les vésicules cargos 5-HT_{1A}, avec ou sans Yip1A, bourgeonneraient du réseau transgolgien grâce à Rab6 puis seraient dirigées par les dynéines vers les dendrites exclusivement, tout comme pour la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA (Kapitein et al., 2010).

Dans le modèle 2, ces vésicules contenant Yip1A seraient également transportées par les dynéines dans le RE mobile ou les Golgi Outposts (Zheng et al., 2008) vers les dendrites proximales.

VIII.3.4.b. Dans les dendrites proximales

Dans les 2 modèles, les vésicules cargos 5-HT_{1A} feraient des allers-retours dans les dendrites proximales, comme nous l'avons observé en vidéomicroscopie. Ces mouvements seraient dus probablement à une activité continue de la dynéine le long des microtubules (**Figure 36C**).

VIII.3.4.c. Dans les dendrites distales

La protéine Rab6 étant exprimée de façon endogène dans les dendrites distales (Pierce et al., 2001), elle pourrait y jouer un rôle clé dans le trafic des vésicules cargos 5-HT_{1A} à travers son interaction avec le complexe dynéine/dynactine et Kif5B. Dans les deux modèles proposés ici, le transport antérograde des vésicules cargos 5-HT_{1A} dans les dendrites distales vers les extrémités (+) des microtubules serait assuré par Kif5B (**Figure 36 D1**) (Setou et al., 2002) et leur transport rétrograde vers le soma serait dépendant de la dynéine (**Figure 36 D2**) (Maas et al., 2006). Enfin, la p150^{glued}, grosse sous-unité de la dynactine, serait cruciale pour la régulation du mouvement bidirectionnel des vésicules en coordonnant l'activité des deux moteurs moléculaires (Gross et al., 2002).

Nous pouvons suggérer deux hypothèses concernant l'interaction de Rab6 avec les moteurs moléculaires :

1) Rab6 interagit directement avec la protéine Bicaudal (BICD1/2) comme ceci a déjà été montré en partie dans les neurones (cf. II.4.2.e.) qui, à son tour, recrute Kif5B et le

complexe dynéine-dynactine dans les cargos transportant le récepteur 5-HT_{1A}, la protéine d'échafaudage Yif1B permettant ainsi son adressage vers les dendrites et le transport bidirectionnel observé dans leur partie distale.

2) Rab6 interagit directement avec les moteurs moléculaires sans l'intervention de Bicaudal. En effet, une interaction directe entre Rab6 et la dynéine a déjà été montrée (Wanschers et al., 2008), mais pas entre Rab6 et Kif5B.

Des expériences de GST Pull Down pour rechercher la présence de Bicaudal pourraient permettre de trancher entre ces deux hypothèses. Des expériences d'ARN interference pour inhiber l'expression de Bicaudal seraient également intéressantes à cet égard.

PERSPECTIVES

Dans cette dernière partie du mémoire, sont présentées et discutées les principales perspectives ouvertes par mon travail de thèse.

IX. Détermination du rôle précis de Yif1B dans le trafic intracellulaire

Pour préciser le rôle exact de Yif1B dans le trafic intracellulaire, une approche multidisciplinaire peut être envisagée combinant les techniques de protéomique et de biologie cellulaire.

En effet, une analyse protéomique réalisée sur des extraits de cerveau et aussi sur des vésicules intracellulaires purifiées permettrait l'identification de protéines interagissant avec Yif1B, dont probablement beaucoup seraient déjà connues pour leur implication dans le trafic intracellulaire. Cette étude serait particulièrement utile pour préciser l'étape du trafic à laquelle Yif1B participe.

Les résultats rapportés dans l'article en annexe de ce manuscrit suggèrent que la protéine vésiculaire Yif1B fait le « va-et-vient » entre le RE et le cis-Golgi, en passant probablement par un compartiment intermédiaire. Plusieurs approches mériteraient d'être mises en œuvre pour vérifier ce point et donc préciser la localisation subcellulaire de Yif1B.

- En ce qui concerne les protéines du manteau COPII localisées dans les ERES, la surexpression d'un mutant de Sar1 constitutivement actif conduit à l'accumulation de ces protéines dans le Golgi (Nakano and Muramatsu, 1989; Dong et al., 2008); il serait intéressant de voir ce qu'il advient de Yif1B lorsque Sar1 est surexprimé.

- Quant aux protéines de l'ERGIC, un traitement au fluoroaluminate (AlF₄) provoque leur accumulation dans ce compartiment intermédiaire situé entre le RE et le Golgi. En effet, cette drogue inhibe non seulement le transport antérograde ERGIC-Golgi mais aussi le transport rétrograde ERGIC-RE, provoquant ainsi l'accumulation des protéines dans le compartiment intermédiaire (Yoshida et al., 2008). Qu'advient-il de Yif1B dans ces conditions ?

- Enfin, pour vérifier la localisation de Yif1B dans le Golgi, la bréfeldine A, qui désorganise l'appareil de Golgi et induit le transport rétrograde Golgi-RE (« relocalisant » ainsi les protéines golgiennes au niveau du RE) pourrait être utilisée. L'effet de la bréfeldine A présente l'avantage d'être réversible dès lors qu'on l'enlève du milieu (Lippincott-Schwartz et al., 1989). De plus, cette drogue n'a pas le même effet sur les protéines des cis-, médian- et

trans-Golgi, permettant ainsi la détermination précise du compartiment dans lequel est localisée la protéine étudiée (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Chege and Pfeffer, 1990).

En parallèle, afin de déterminer le rôle éventuel de Yif1B dans le trafic intracellulaire en général, il serait très intéressant d'étudier les effets de l'inhibition de Yif1B par des siRNA sur le transport antérograde de la glycoprotéine virale VSVG (Presley et al., 1997) d'une part, et sur le transport rétrograde (COPI indépendant) sur le transport de la Shiga Toxine d'autre part (Sandvig et al., 1992; Girod et al., 1999).

Ces expériences pourraient être réalisées sur des lignées cellulaires humaines immortalisées, telles que les Hela, ainsi que dans le modèle hautement polarisé que sont les neurones d'hippocampe (Cid-Arregui et al., 1995).

X. Généralisation du rôle de Yif1B dans l'adressage dendritique d'autres récepteurs

Le rôle de Yif1B dans le trafic de protéines pourrait être généralisé à d'autres récepteurs, neuronaux ou non.

Pour identifier les protéines membranaires, récepteurs (RCPG ou non) ou canaux, potentiellement capables d'interagir avec Yif1B, nous pourrions tout d'abord rechercher des motifs tribasiques de type KdiR dans les séquences des extrémités C-terminales des protéines déjà existantes dans les banques de données. Puis, grâce à la technique de Résonance Plasmonique de Surface (Biacore), nous pourrions envisager d'étudier l'interaction des extrémités C-terminales purifiées de ces protéines avec l'extrémité N-terminale de Yif1B greffée sur une puce. Enfin, pour les récepteurs interagissant avec Yif1B, leur adressage dans les neurones, et/ou dans des lignées cellulaires, pourrait être étudié suite à l'inhibition de l'expression de Yif1B, tout comme il a déjà été fait pour le récepteur 5-HT_{1A} (voir article 1).

XI. Perspectives pharmacologiques

XI.1. Transposition des résultats obtenus sur les autorécepteurs 5-HT_{1A}

Les autorécepteurs 5-HT_{1A} présents à la membrane somatodendritique des neurones sérotoninergiques du raphé jouent un rôle déterminant dans le délai d'action des

antidépresseurs inhibiteurs de recapture (ISRS) administrés en chronique (Le Poul et al., 1995). En effet, la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans les noyaux du raphé, qui permet l'activation de la neurotransmission sérotoninergique sous-tendant l'action thérapeutique des antidépresseurs (Delgado et al., 1990), intervient au bout de 2 à 3 semaines de traitement, ce qui correspond au temps nécessaire pour qu'apparaissent les premiers signes d'efficacité thérapeutique. D'ailleurs, des associations médicamenteuses visant à inactiver les autorécepteurs 5-HT_{1A} plus rapidement que lors du seul traitement antidépresseur permettent de raccourcir significativement le délai d'action thérapeutique des ISRS (Portella et al., 2011).

Une autre façon d'inactiver les autorécepteurs 5-HT_{1A} pourrait consister à interférer avec l'interaction 5-HT_{1A}/Yif1B nécessaire à son adressage fonctionnel dans les dendrites. Dans un premier temps, Il serait nécessaire de confirmer que les autorécepteurs suivent la même voie d'adressage que les hétérorécepteurs de l'hippocampe, voie que nous avons décrite dans l'article 2. En réalité, les données disponibles suggèrent fortement que les auto- et les hétérorécepteurs empruntent la même voie d'adressage. En effet, les résultats d'expériences de GST Pull Down obtenus sur les extraits de raphé montrent, tout comme dans l'hippocampe, une interaction entre le récepteur et ses différents partenaires (Yif1B, Yip1A, Rab6 et tubuline).

La transfection des neurones de raphé en culture étant très difficile, les expériences d'inhibition des différents partenaires par les siRNA ne sont pas vraiment envisageables. Cependant, depuis peu, l'infection des cultures de neurones du raphé a été mise au point au laboratoire par une méthode virale (Bouaziz et al., *en préparation*). Ainsi, le rôle de la voie d'adressage Yif1B-dépendante du récepteur 5-HT_{1A} vers les dendrites des neurones de raphé pourrait être confirmé, confortant l'idée que la protéine Yif1B pourrait constituer une nouvelle cible d'intérêt thérapeutique dans le traitement de la dépression.

XI.2. Applications in vivo

Deux stratégies sont envisagées au laboratoire. D'une part, l'injection, chez le rongeur, d'un peptide mimétique qui inhiberait spécifiquement l'interaction entre Yif1B et le récepteur 5-HT_{1A} et, d'autre part, l'étude de souris n'exprimant pas Yif1B. Avec ces deux approches pour perturber l'interaction Yif1B/5-HT_{1A}, nous devrions notamment modifier (inhiber) l'adressage dendritique de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans le raphé, et donc interférer avec ses caractéristiques fonctionnelles.

L'étude du comportement des souris KO Yif1B $-/-$ et des rongeurs (rat et souris) traités avec le peptide mimétique, seul ou en association avec des antidépresseurs (ISRS en particulier), dans divers modèles validés de dépression devrait permettre de s'assurer de la pertinence de ces approches.

XI.2.1. Intérêt thérapeutique d'un peptide mimétique, inhibiteur spécifique de l'interaction 5-HT_{1A}/Yif1B, dans des modèles comportementaux de dépression

Grâce à la caractérisation des motifs impliqués dans l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et la protéine Yif1B, la synthèse de deux peptides-TAT a d'ores et déjà été réalisée. L'un mime l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}, alors que l'autre mime la région 29-43 de l'extrémité N-terminale de Yif1B. La prochaine étape consistera à vérifier l'efficacité de chaque peptide mimétique à inhiber l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et sa protéine partenaire d'adressage Yif1B grâce à la technique du Biacore. Ensuite, le ou les peptides seront validés *in vitro* dans des cultures primaires d'hippocampe de rat (tests de toxicité, détermination de la dose efficace pour perturber l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}, etc). Selon les résultats, le peptide-TAT le plus efficace sera utilisé *in vivo* chez les rats et les souris. Les effets d'administrations systémiques (intra-péritonéales, ou par minipompe osmotique Alzet) subchroniques (7 jours) et chroniques (14-21 jours) ou encore par microinjections locales dans des régions cérébrales spécifiques, notamment le raphé et l'hippocampe, seront comparés aux effets d'un ISRS de référence. Suite à l'administration du peptide, des tests comportementaux de « dépression » (tests de la nage forcée, test de suspension par la queue, chronic mild stress) ou d' « anxiété » (open-field, labyrinthe en croix surélevée, boîte claire et obscure, interaction sociale) permettront d'évaluer son effet sur le comportement des rongeurs. Ces expériences pourront être réalisées en collaboration avec l'équipe de Laurence Lanfumey qui pratique ces tests en routine dans l'unité. Nous nous attendons à ce que le peptide mimétique empêche l'adressage de ce récepteur vers les dendrites distales au niveau du raphé notamment et qu'un déficit fonctionnel en résultera rapidement. L'injection in-vivo de ce peptide avec l'ISRS de référence devrait donc induire des réponses comportementales plus rapides qu'avec l'ISRS seul, dont le délai d'action dépend, au moins en partie, d'une inactivation fonctionnelle des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le raphé (Lanfumey and Hamon, 2006).

En conclusion, ce peptide devrait permettre de valoriser les résultats de notre recherche en biologie cellulaire par le développement d'un nouvel outil pharmacologique pour l'étude des processus neurobiologiques sous-tendant les comportements de type dépressif et/ou anxieux chez les rongeurs.

XI.2.2.Souris dont le gène Yif1B est invalidé constitutivement ou spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques

En parallèle, en collaboration avec l'ICS (Institut Clinique de la Souris), l'équipe a généré des souris dont le gène codant pour la protéine Yif1B est flanqué de part et d'autre de sites Cre-loxP afin de les croiser :

- soit avec des souris Cre-loxP, produisant la recombinaise Cre de façon constitutive. Le gène de Yif1B est alors invalidé de façon permanente et dans tous les tissus où l'expression de la Cre, qui reconnaît les sites loxP de part et d'autre du gène de Yif1B, conduit à son excision de l'ADN génomique.

- soit avec des souris Cre-5-HTT ou Cre-5-HT_{1A}, disponibles au laboratoire. Dans cette deuxième approche, l'invalidation du gène de Yif1B est tissu-spécifique et n'intervient respectivement que dans les cellules qui produisent le transporteur de la sérotonine (cad les neurones sérotoninergiques dans le SNC) ou le récepteur 5-HT_{1A}.

Pour évaluer les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs 5-HT_{1A} chez ces souris mutantes, des expériences de « binding » et d'autoradiographie quantitative avec des radioligands spécifiques et du [³⁵S]GTP-γ-S seront mises en oeuvre. De plus, un test simple consistant à mesurer l'hypothermie en réponse à l'administration systémique d'agonistes 5-HT_{1A} permettra de préciser l'état fonctionnel des autorécepteurs 5-HT_{1A} chez ces souris.

Enfin, les souris KO (constitutif ou conditionnel) seront également soumises à des tests validés pour apprécier leurs comportements dans des situations anxiogènes et/ou dépressiogènes (cf ci-dessus).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdul-Ghani M, Gougeon PY, Prosser DC, Da-Silva LF, Ngsee JK (2001) PRA isoforms are targeted to distinct membrane compartments. *J Biol Chem* 276:6225-6233.
- Adayev T, Ranasinghe B, Banerjee P (2005) Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Biosci Rep* 25:363-385.
- Adell A, Artigas F (1991) Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343:237-244.
- Adrien J, Lanfumey L, Gozlan H, Fattaccini CM, Hamon M (1989) Biochemical and electrophysiological evidence for an agonist action of CM 57493 at pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in brain. *J Pharmacol Exp Ther* 248:1222-1230.
- Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O (1990) Cloning, functional expression and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 265:5825-5832.
- Allan V (2000) Dynactin. *Curr Biol* 10:R432.
- Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA (2002) Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* 4:E236-242.
- Allen JA, Roth BL (2010) Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51:117-144.
- Amin AH, Crawford TB, Gaddum JH (1954) The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol* 126:596-618.
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA (1986) A G protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261-1265.
- Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 394:592-595.
- Antony C, Cibert C, Geraud G, Santa Maria A, Maro B, Mayau V, Goud B (1992) The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J Cell Sci* 103 (Pt 3):785-796.
- Appenzeller-Herzog C, Hauri HP (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119:2173-2183.
- Aridor M, Fish KN (2009) Selective targeting of ER exit sites supports axon development. *Traffic* 10:1669-1684.
- Aridor M, Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1995) Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol* 131:875-893.

- Aridor M, Guzik AK, Bielli A, Fish KN (2004) Endoplasmic reticulum export site formation and function in dendrites. *J Neurosci* 24:3770-3776.
- Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Menager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K (2009) Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev Cell* 16:675-686.
- Asbury CL, Fehr AN, Block SM (2003) Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism. *Science* 302:2130-2134.
- Aznavour N, Rbah L, Riad M, Reilhac A, Costes N, Descaries L, Zimmer L (2006a) A PET imaging study of 5-HT(1A) receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. *Neuroimage* 33:834-842.
- Aznavour N, Rbah L, Leger L, Buda C, Sastre JP, Imhof A, Charnay Y, Zimmer L (2006b) A comparison of in vivo and in vitro neuroimaging of 5-HT 1A receptor binding sites in the cat brain. *J Chem Neuroanat* 31:226-232.

B

- Baas PW, Black MM, Banker GA (1989) Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109:3085-3094.
- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8335-8339.
- Baez M, Kursar JD, Helton LA, Wainscott DB, Nelson DL (1995) Molecular biology of serotonin receptors. *Obes Res* 3:Suppl 4:441S-447S.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- Barrowman J, Wang W, Zhang Y, Ferro-Novick S (2003) The Yip1p.Yif1p complex is required for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Biol Chem* 278:19878-19884.
- Behnia R, Munro S (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438:597-604.
- Bel N, Artigas F (1993) Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* 15:243-245.
- Ben-Tekaya H, Miura K, Pepperkok R, Hauri HP (2005) Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J Cell Sci* 118:357-367.
- Birnbaumer L, Pohl SL, Rodbell M (1969) Adenyl cyclase in fat cells. 1. Properties and the effects of adrenocorticotropin and fluoride. *J Biol Chem* 244:3468-3476.

- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1031:163-224.
- Black MM, Baas PW (1989) The basis of polarity in neurons. *Trends Neurosci* 12:211-214.
- Bloom GS, Richards BW, Leopold PL, Ritchey DM, Brady ST (1993) GTP gamma S inhibits organelle transport along axonal microtubules. *J Cell Biol* 120:467-476.
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P (2004a) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103:203-221.
- Bockaert J, Roussignol G, Bécamel C, Gavarini S, Joubert L, Dumuis A, Fagni L, Marin P (2004b) GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem Soc Trans* 32:851-855.
- Boess FG, Martin IL (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33:275-317.
- Brady ST (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317:73-75.
- Breuzer L, Halbeisen R, Jenö P, Otte S, Barlowe C, Hong W, Hauri HP (2004) Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46. *J Biol Chem* 279:47242-47253.
- Brodie BB, Shore PA (1957) A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 66:631-642.
- Brownhill K, Wood L, Allan V (2009) Molecular motors and the Golgi complex: staying put and moving through. *Semin Cell Dev Biol* 20:784-792.
- Brüning G, Kaulen P, Schneider U, Baumgarten HG (1989) Quantitative autoradiographic distribution and pharmacological characterization of (³H)buspirone binding to sections from rat, bovine and marmoset brain. *J Neural Transm* 78:131-144.
- Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, Vallee RB (1997) Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* 139:469-484.

C

- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24:765-781.
- Calas A, Alonso G, Arnauld E, Vincent JD (1974) Demonstration of indolaminergic fibres in the media eminence of the duck, rat and monkey. *Nature* 250:241-243.

- Calero M, Winand NJ, Collins RN (2002) Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett* 515:89-98.
- Caro LG, Palade GE (1964) Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. An Autoradiographic Study. *J Cell Biol* 20:473-495.
- Carrel D, Hamon M, Darmon M (2006) Role of the C-terminal di-leucine motif of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} serotonin receptors in plasma membrane targeting. *J Cell Sci* 119:4276-4284.
- Case RB, Pierce DW, Hom-Booher N, Hart CL, Vale RD (1997) The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell* 90:959-966.
- Chalmers DT, Watson SJ (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined *in situ* hybridisation/*in vitro* receptor autoradiographic study. *Brain Res* 561:51-60.
- Chattopadhyay S, Roberts PM, Pearce DA (2003) The yeast model for Batten disease: a role for Btn2p in the trafficking of the Golgi-associated vesicular targeting protein, Yif1p. *Biochem Biophys Res Commun* 302:534-538.
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62:317-329.
- Chege NW, Pfeffer SR (1990) Compartmentation of the Golgi complex: brefeldin-A distinguishes trans-Golgi cisternae from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 111:893-899.
- Chen CZ, Collins RN (2005) Insights into biological functions across species: examining the role of Rab proteins in YIP1 family function. *Biochem Soc Trans* 33:614-618.
- Chen CZ, Calero M, DeRegis CJ, Heidtman M, Barlowe C, Collins RN (2004) Genetic analysis of yeast Yip1p function reveals a requirement for Golgi-localized rab proteins and rab-Guanine nucleotide dissociation inhibitor. *Genetics* 168:1827-1841.
- Chini B, Parenti M (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J Mol Endocrinol* 42:371-379.
- Chu PJ, Rivera JF, Arnold DB (2006) A role for Kif17 in transport of Kv4.2. *J Biol Chem* 281:365-373.
- Cid-Arregui A, Parton RG, Simons K, Dotti CG (1995) Nocodazole-dependent transport, and brefeldin A--sensitive processing and sorting, of newly synthesized membrane proteins in cultured neurons. *J Neurosci* 15:4259-4269.
- Clarke WP, De Vivo M, Beck SG, Maayani S, Goldfarb J (1987) Serotonin decreases population spike amplitude in hippocampal cells through a pertussis toxin substrate. *Brain Res* 410:357-361.

- Cloez-Tayarani I, Kayyali US, Fanburg BL, Cavaillon JM (2004) 5-HT activates ERK MAP kinase in cultured-human peripheral blood mononuclear cells via 5-HT1A receptors. *Life Sci* 76:429-443.
- Colman DR (1999) Neuronal polarity and the epithelial metaphor. *Neuron* 23:649-651.
- Corthesy-Theulaz I, Pauloin A, Pfeffer SR (1992) Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J Cell Biol* 118:1333-1345.
- Cote F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J, Vodjdani G (2003) Disruption of the nonneuronal *tph1* gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13525-13530.
- Coutelis JB, Ephrussi A (2007) Rab6 mediates membrane organization and determinant localization during *Drosophila* oogenesis. *Development* 134:1419-1430.
- Cowen DS, Johnson-Farley NN, Travkina T (2005) 5-HT receptors couple to activation of Akt, but not extracellular-regulated kinase (ERK), in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 93:910-917.
- Craig AM, Banker G (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Crane JW, Shimizu K, Carrasco GA, Garcia F, Jia C, Sullivan NR, D'Souza DN, Zhang Y, Van de Kar LD, Muma NA, Battaglia G (2007) 5-HT1A receptors mediate (+)8-OH-DPAT-stimulation of extracellular signal-regulated kinase (MAP kinase) in vivo in rat hypothalamus: time dependence and regional differences. *Brain Res* 1183:51-59.
- Cuif MH, Possmayer F, Zander H, Bordes N, Jollivet F, Couedel-Courteille A, Janoueix-Lerosey I, Langsley G, Bornens M, Goud B (1999) Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J* 18:1772-1782.

D

- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*:SUPPL 232:231-255.
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-399.
- Darmon M, Langlois X, Suffisseau L, Fattaccini CM, Hamon M (1998) Differential membrane targeting and pharmacological characterization of chimeras of rat serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors expressed in epithelial LLC-PK1 cells. *J Neurochem* 71:2294-2303.

- Darmon M, Guibert B, Leviel V, Ehret M, Maitre M, Mallet J (1988) Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *Journal of Neurochemistry* 51:312-316.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF (1999) The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397:359-363.
- De Vivo M, Maayani S (1986) Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1a} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 238:248-253.
- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 31:151-173.
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G (2006) Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52:293-305.
- Delcourt N, Bockaert J, Marin P (2007) GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* 28:602-607.
- Delgado PL, Charney DS, Price LH, Aghajanian GK, Landis H, Heninger GR (1990) Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Arch Gen Psychiatry* 47:411-418.
- Deretic D (1997) Rab proteins and post-Golgi trafficking of rhodopsin in photoreceptor cells. *Electrophoresis* 18:2537-2541.
- Deretic D (1998) Post-Golgi trafficking of rhodopsin in retinal photoreceptors. *Eye (Lond)* 12 (Pt 3b):526-530.
- Deretic D, Papermaster DS (1993) Rab6 is associated with a compartment that transports rhodopsin from the trans-Golgi to the site of rod outer segment disk formation in frog retinal photoreceptors. *J Cell Sci* 106 (Pt 3):803-813.
- Derry C, Benjamin C, Bladin P, le Bars D, Tochon-Danguy H, Berkovic SF, Zimmer L, Costes N, Mulligan R, Reutens D (2006) Increased serotonin receptor availability in human sleep: evidence from an [18F]MPPF PET study in narcolepsy. *Neuroimage* 30:341-348.
- Descarries L, Audet MA, Doucet G, Garcia S, Oleskevich S, Seguela P, Soghomonian JJ, Watkins KC (1990) Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships. *Ann N Y Acad Sci* 600:81-92.
- Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer SR (1997) Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J* 16:465-472.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG,

- Lefkowitz RJ, Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321:75-79.
- Dong C, Wu G (2007) Regulation of anterograde transport of adrenergic and angiotensin II receptors by Rab2 and Rab6 GTPases. *Cell Signal* 19:2388-2399.
- Dong C, Zhou F, Fugetta EK, Filipeanu CM, Wu G (2008) Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cell Signal* 20:1035-1043.
- Dong C, Yang L, Zhang X, Gu H, Lam ML, Claycomb WC, Xia H, Wu G (2010) Rab8 interacts with distinct motifs in alpha2B- and beta2-adrenergic receptors and differentially modulates their transport. *J Biol Chem* 285:20369-20380.
- Dorner C, Ciossek T, Muller S, Moller PH, Ullrich A, Lammers R (1998) Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273:20267-20275.
- Dotti CG, Parton RG, Simons K (1991) Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons. *Nature* 349:158-161.
- Doucet E, Pohl M, Fattaccini CM, Adrien J, Mestikawy SE, Hamon M (1995) *In situ* hybridization evidence for the synthesis of 5-HT_{1B} receptor in serotonergic neurons of anterior raphe nuclei in the rat brain. *Synapse* 19:18-28.
- Dugan JM, deWit C, McConlogue L, Maltese WA (1995) The Ras-related GTP-binding protein, Rab1B, regulates early steps in exocytic transport and processing of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 270:10982-10989.
- Duvernay MT, Wang H, Dong C, Guidry JJ, Sackett DL, Wu G (2011) Alpha2B-adrenergic receptor interaction with tubulin controls its transport from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 286:14080-14089.
- Dykstra KM, Pokusa JE, Suhan J, Lee TH (2010) Yip1A structures the mammalian endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 21:1556-1568.

E

- Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapere JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279:580-585.
- Echard A, Opdam FJ, de Leeuw HJ, Jollivet F, Savelkoul P, Hendriks W, Voorberg J, Goud B, Fransen JA (2000) Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Mol Biol Cell* 11:3819-3833.
- Ehrlich P (1913) Address in Pathology, ON CHEMIOOTHERAPY: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br Med J* 2:353-359.

- El Mestikawy S, Taussig D, Gozlan H, Emerit MB, Ponchant M, Hamon M (1989) Chromatographic analyses of the serotonin 5-HT_{1A} receptor solubilized from the rat hippocampus. *J Neurochem* 53:1555-1566.
- El Mestikawy S, Riad M, Laporte AM, Vergé D, Daval G, Gozlan H, Hamon M (1990) Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 118:189-192.
- Endow SA (1999) Determinants of molecular motor directionality. *Nat Cell Biol* 1:E163-167.
- Endow SA, Higuchi H (2000) A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature* 406:913-916.
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10993-10997.
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-801.

F

- Fabre V, Hamon M (2003) Mechanisms of action of antidepressants: new data from Escitalopram. *Encephale* 29:259-265.
- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 335:358-360.
- Fargin A, Raymond JR, Regan JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG (1989) Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. *J Biol Chem* 264:14848-14852.
- Farhan H, Reiterer V, Kriz A, Hauri HP, Pavelka M, Sitte HH, Freissmuth M (2008) Signal-dependent export of GABA transporter 1 from the ER-Golgi intermediate compartment is specified by a C-terminal motif. *J Cell Sci* 121:753-761.
- Fath KR, Trimbur GM, Burgess DR (1994) Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 126:661-675.
- Feiguin F, Ferreira A, Kosik KS, Caceres A (1994) Kinesin-mediated organelle translocation revealed by specific cellular manipulations. *J Cell Biol* 127:1021-1039.
- Feldam RS, Quenzer LF (1984) Serotonin . In *fundamentals of Neuropsychopharmacology*. In: (Sinauer, ed).
- Fichter KM, Flajolet M, Greengard P, Vu TQ (2010) Kinetics of G-protein-coupled receptor endosomal trafficking pathways revealed by single quantum dots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18658-18663.
- Figuroa C, Taylor J, Vojtek AB (2001) Prenylated Rab acceptor protein is a receptor for prenylated small GTPases. *J Biol Chem* 276:28219-28225.

- Filipeanu CM, Zhou F, Claycomb WC, Wu G (2004) Regulation of the cell surface expression and function of angiotensin II type 1 receptor by Rab1-mediated endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:41077-41084.
- Filipeanu CM, Zhou F, Fugetta EK, Wu G (2006) Differential regulation of the cell-surface targeting and function of beta- and alpha1-adrenergic receptors by Rab1 GTPase in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 69:1571-1578.
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57:279-288.
- Frankfurt M, Azmitia E (1983) The effect of intracerebral injections of 5,7-dihydroxytryptamine and 6-hydroxydopamine on the serotonin-immunoreactive cell bodies and fibers in the adult rat hypothalamus. *Brain Res* 261:91-99.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272.
- Fuhrmann JC, Kins S, Rostaing P, El Far O, Kirsch J, Sheng M, Triller A, Betz H, Kneussel M (2002) Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* 22:5393-5402.

G

- Garnovskaya MN, van Biesen T, Hawe B, Casanas Ramos S, Lefkowitz RJ, Raymond JR (1996) Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT_{1A} receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *Biochemistry* 35:13716-13722.
- Gérard C, Langlois X, Gingrich J, Doucet E, Vergé D, Kia HK, Raisman R, Gozlan H, El Mestikawy S, Hamon M (1994) Production and characterization of polyclonal antibodies recognizing the intracytoplasmic third loop of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor. *Neuroscience* 62:721-739.
- Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW (1991) Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 115:1639-1650.
- Girod A, Storrie B, Simpson JC, Johannes L, Goud B, Roberts LM, Lord JM, Nilsson T, Pepperkok R (1999) Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1:423-430.
- Glaser T, Traber J (1985) Binding of the putative anxiolytic TVX Q 7821 to hippocampal 5-hydroxytryptamine (5-HT) recognition sites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 329:211-215.

- Glick BS, Nakano A (2009) Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:113-132.
- Goud B, Zahraoui A, Tavitian A, Saraste J (1990) Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345:553-556.
- Goud B, Yang C, Roa M, Martinez O, Slepnev V (1994) Study of rab6, a ras-like GTP-binding protein associated with the Golgi complex. *Ann N Y Acad Sci* 733:340-343.
- Gougeon PY, Prosser DC, Da-Silva LF, Ngsee JK (2002) Disruption of Golgi morphology and trafficking in cells expressing mutant prenylated rab acceptor-1. *J Biol Chem* 277:36408-36414.
- Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M (1983) Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 305:140-142.
- Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M (1995) The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 288:173-186.
- Grabowski R, Gallwitz D (1997) High-affinity binding of the yeast cis-Golgi t-SNARE, Sed5p, to wild-type and mutant Sly1p, a modulator of transport vesicle docking. *FEBS Lett* 411:169-172.
- Grigoriev I, Splinter D, Keijzer N, Wulf PS, Demmers J, Ohtsuka T, Modesti M, Maly IV, Grosveld F, Hoogenraad CC, Akhmanova A (2007) Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell* 13:305-314.
- Grigoriev I, Yu KL, Martinez-Sanchez E, Serra-Marques A, Smal I, Meijering E, Demmers J, Peranen J, Pasterkamp RJ, van der Sluijs P, Hoogenraad CC, Akhmanova A (2011) Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr Biol* 21:967-974.
- Gross SP, Welte MA, Block SM, Wieschaus EF (2002) Coordination of opposite-polarity microtubule motors. *J Cell Biol* 156:715-724.
- Guillaud L, Setou M, Hirokawa N (2003) KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23:131-140.
- Gupta V, Palmer KJ, Spence P, Hudson A, Stephens DJ (2008) Kinesin-1 (uKHC/KIF5B) is required for bidirectional motility of ER exit sites and efficient ER-to-Golgi transport. *Traffic* 9:1850-1866.

H

- Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ (1999) Heptahelical Receptor Signaling: Beyond the G Protein Paradigm. *J Cell Biol* 145:927-932.
- Hamon M, Fattaccini CM, Adrien J, Gallissot MC, Martin P, Gozlan H (1988) Alterations of central serotonin and dopamine turnover in rats treated with ipsapirone and other 5-

- hydroxytryptamine_{1A} agonists with potential anxiolytic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 246:745-752.
- Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N (1998) Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 141:51-59.
- Hargrave PA, McDowell JH (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *Faseb J* 6:2323-2331.
- Hay DL, Poyner DR, Sexton PM (2006) GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 109:173-197.
- Hehnlly H, Sheff D, Stamnes M (2006) Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubule dynamics. *Mol Biol Cell* 17:4379-4389.
- Heidtman M, Chen CZ, Collins RN, Barlowe C (2003) A role for Yip1p in COPII vesicle biogenesis. *J Cell Biol* 163:57-69.
- Heidtman M, Chen CZ, Collins RN, Barlowe C (2005) Yos1p is a novel subunit of the Yip1p-Yif1p complex and is required for transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Mol Biol Cell* 16:1673-1683.
- Hill E, Clarke M, Barr FA (2000) The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J* 19:5711-5719.
- Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519-526.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201-214.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610-638.
- Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Yoshida T, Kawashima T (1990) Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 111:1027-1037.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:682-696.
- Hjorth S, Magnusson T (1988) The 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338:463-471.
- Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikstrom H, Arvidsson LE, Hacksell U, Nilsson JLG (1982) 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT-receptor stimulating activity. *J Neural Transm* 55:169-188.
- Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 254:579-580.

- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Howell SA, Dortland BR, De Zeeuw CI, Willemsen R, Visser P, Grosveld F, Galjart N (2001) Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J* 20:4041-4054.
- Horton AC, Ehlers MD (2003a) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40:277-295.
- Horton AC, Ehlers MD (2003b) Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J Neurosci* 23:6188-6199.
- Horton AC, Racz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, Ehlers MD (2005) Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* 48:757-771.
- Hsiung SC, Tamir H, Franke TF, Liu KP (2005) Roles of extracellular signal-regulated kinase and Akt signaling in coordinating nuclear transcription factor-kappaB-dependent cell survival after serotonin 1A receptor activation. *J Neurochem* 95:1653-1666.
- Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K (1993a) Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol* 123:35-45.
- Huber LA, de Hoop MJ, Dupree P, Zerial M, Simons K, Dotti C (1993b) Protein transport to the dendritic plasma membrane of cultured neurons is regulated by rab8p. *J Cell Biol* 123:47-55.
- Hutagalung AH, Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 91:119-149.
- Hutt DM, Da-Silva LF, Chang LH, Prosser DC, Ngsee JK (2000) PRA1 inhibits the extraction of membrane-bound rab GTPase by GDI1. *J Biol Chem* 275:18511-18519.
- Innis RB, Aghajanian GK (1987) Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABA_B receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 143:195-204.
- Innis RB, Nestler EJ, Aghajanian GK (1988) Evidence for G protein mediation of serotonin- and GABA_B-induced hyperpolarization of rat dorsal raphe neurons. *Brain Res* 459:27-36.

I

- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4569-4574.
- Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1143-1147.

J

- Jackson CL (2009) Mechanisms of transport through the Golgi complex. *J Cell Sci* 122:443-452.
- Jasmin BJ, Goud B, Camus G, Cartaud J (1992) The low molecular weight guanosine triphosphate-binding protein Rab6p associates with distinct post-Golgi vesicles in *Torpedo marmorata* electrocytes. *Neuroscience* 49:849-855.
- Jaulin F, Xue X, Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G (2007) Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev Cell* 13:511-522.
- Jedd G, Richardson C, Litt R, Segev N (1995) The Ypt1 GTPase is essential for the first two steps of the yeast secretory pathway. *J Cell Biol* 131:583-590.
- Jeyifous O, Waites CL, Specht CG, Fujisawa S, Schubert M, Lin EI, Marshall J, Aoki C, de Silva T, Montgomery JM, Garner CC, Green WN (2009) SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nat Neurosci* 12:1011-1019.
- Jin C, Zhang Y, Zhu H, Ahmed K, Fu C, Yao X (2005) Human Yip1A specifies the localization of Yif1 to the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 334:16-22.
- Jolas T, Haj-Dahmane S, Kidd EJ, Langlois X, Lanfumey L, Fattaccini CM, Vantalon V, Laporte AM, Adrien J, Gozlan H, et al. (1994) Central pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1432-1443.
- Jolimay N, Louis F, Langlois X, Hamon M, Darmon M (2000) Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT_{1B} receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* 20:9111-9118.

K

- Kama R, Robinson M, Gerst JE (2007) Btn2, a Hook1 ortholog and potential Batten disease-related protein, mediates late endosome-Golgi protein sorting in yeast. *Mol Cell Biol* 27:605-621.
- Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N (2000) KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci* 20:6374-6384.
- Kanneganti V, Kama R, Gerst JE (2011) Btn3 is a negative regulator of Btn2-mediated endosomal protein trafficking and prion curing in yeast. *Mol Biol Cell* 22:1648-1663.
- Kano F, Tanaka AR, Yamauchi S, Kondo H, Murata M (2004) Cdc2 kinase-dependent disassembly of endoplasmic reticulum (ER) exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis. *Mol Biol Cell* 15:4289-4298.

- Kano F, Yamauchi S, Yoshida Y, Watanabe-Takahashi M, Nishikawa K, Nakamura N, Murata M (2009) Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER. *J Cell Sci* 122:2218-2227.
- Kapitein LC, Hoogenraad CC (2010) Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci* 46:9-20.
- Kapitein LC, Schlager MA, Kuijpers M, Wulf PS, van Spronsen M, MacKintosh FC, Hoogenraad CC (2010) Mixed microtubules steer dynein-driven cargo transport into dendrites. *Curr Biol* 20:290-299.
- Kayadjanian N, Lee HS, Pina-Crespo J, Heinemann SF (2007) Localization of glutamate receptors to distal dendrites depends on subunit composition and the kinesin motor protein KIF17. *Mol Cell Neurosci* 34:219-230.
- Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Vergé D (1996) Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365:289-305.
- Kim Y, Chattopadhyay S, Locke S, Pearce DA (2005) Interaction among Btn1p, Btn2p, and Ist2p reveals potential interplay among the vacuole, amino acid levels, and ion homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4:281-288.
- King SJ, Schroer TA (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2:20-24.
- Kobayashi N, Reiser J, Kriz W, Kuriyama R, Mundel P (1998) Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J Cell Biol* 143:1961-1970.
- Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U, Lefkowitz RJ, Caron MG (1987) An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329:75-79.
- Kreitzer G, Marmorstein A, Okamoto P, Vallee R, Rodriguez-Boulan E (2000) Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* 2:125-127.
- Krijnse-Locker J, Parton RG, Fuller SD, Griffiths G, Dotti CG (1995) The organization of the endoplasmic reticulum and the intermediate compartment in cultured rat hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 6:1315-1332.
- Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103:21-80.

L

- Lalli G, Schiavo G (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75^{NTR}. *J Cell Biol* 156:233-239.
- Lalli G, Gschmeissner S, Schiavo G (2003) Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons. *J Cell Sci* 116:4639-4650.
- Lanfumey L, Hamon M, eds (2006) Pharmacology of antidepressants today. In : A new pharmacological approach to the treatment of major depression. Paris: Elsevier.
- Langley JN (1908) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part II. *J Physiol* 37:165-212.
- Langlois X, El Mestikawy S, Arpin M, Triller A, Hamon M, Darmon M (1996) Differential addressing of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in transfected LLC-PK1 epithelial cells: a model of receptor targeting in neurons. *Neuroscience* 74:297-302.
- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L (1995) Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 352:141-148.
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87-123.
- Ligon LA, Tokito M, Finklestein JM, Grossman FE, Holzbaur EL (2004) A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J Biol Chem* 279:19201-19208.
- Lin J, Liang Z, Zhang Z, Li G (2001) Membrane topography and topogenesis of prenylated Rab acceptor (PRA1). *J Biol Chem* 276:41733-41741.
- Lin SX, Collins CA (1992) Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in cultured cells. *J Cell Sci* 101 (Pt 1):125-137.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56:801-813.
- Lippincott-Schwartz J, Cole NB, Marotta A, Conrad PA, Bloom GS (1995) Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J Cell Biol* 128:293-306.
- Liu YF, Albert PR (1991) Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J Biol Chem* 266:23689-23697.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell (2005) *Biologie Moléculaire de la Cellule*. In: Editions de boeck Université.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465.

M

Maas C, Tagnaouti N, Loebrich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, Kneussel M (2006) Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol* 172:441-451.

Maehle AH (2009) A binding question: the evolution of the receptor concept. *Endeavour* 33:135-140.

Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, Hong W, Goud B, Johannes L (2002) Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* 156:653-664.

Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L (2006) Regional differences in the coupling of 5-HT_{1A} receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* 70:1013-1021.

Marcinkiewicz M, Vergé D, Gozlan H, Pichat L, Hamon M (1984) Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain. *Brain Res* 291:159-163.

Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432-437.

Martin M, Iyadurai SJ, Gassman A, Gindhart JG, Jr., Hays TS, Saxton WM (1999) Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 10:3717-3728.

Martincic I, Peralta ME, Ngsee JK (1997) Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor. *J Biol Chem* 272:26991-26998.

Martinez O, Schmidt A, Salamero J, Hoflack B, Roa M, Goud B (1994) The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J Cell Biol* 127:1575-1588.

Martinez O, Antony C, Pehau-Arnaudet G, Berger EG, Salamero J, Goud B (1997) GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1828-1833.

Masson J, Emerit MB, Hamon M, Darmon M (2011) Serotonergic signalling: multiple effectors and pleiotropic effects. submitted to

Matanis T, Akhmanova A, Wulf P, Del Nery E, Weide T, Stepanova T, Galjart N, Grosveld F, Goud B, De Zeeuw CI, Barnekow A, Hoogenraad CC (2002) Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol* 4:986-992.

- Matern H, Yang X, Andrulis E, Sternglanz R, Trepte HH, Gallwitz D (2000) A novel Golgi membrane protein is part of a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting. *EMBO J* 19:4485-4492.
- Maurel D (2006) Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G : deux ou plus? Application des technologies de FRET en temps résolu au cas du récepteur GABA_B. In: Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier 1.
- Mayer T, Touchot N, Elazar Z (1996) Transport between cis and medial Golgi cisternae requires the function of the Ras-related protein Rab6. *J Biol Chem* 271:16097-16103.
- Meltzer HY, Arora RC (1986) Platelet markers of suicidality. *Ann N Y Acad Sci* 487:271-280.
- Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7004-7011.
- Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2003) Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* 114:497-509.
- Miquel MC, Doucet E, Boni C, El Mestikawy S, Matthiessen L, Daval G, Verge D, Hamon M (1991) Central serotonin_{1A} receptors: respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by *in situ* hybridization histochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem Int* 19:453-465.
- Miserey-Lenkei S, Chalancon G, Bardin S, Formstecher E, Goud B, A. Echard A (2010) Rab and acto-myosin dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Revision Nature Cell Biology*.
- Moises T, Dreier A, Flohr S, Esser M, Brauers E, Reiss K, Merken D, Weis J, Kruttgen A (2007) Tracking TrkA's trafficking: NGF receptor trafficking controls NGF receptor signaling. *Mol Neurobiol* 35:151-159.
- Moyer BD, Allan BB, Balch WE (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering. *Traffic* 2:268-276.
- Mukherjee C, Caron MG, Coverstone M, Lefkowitz RJ (1975) Identification of adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors in frog erythrocytes with (minus)-[3-H] alprenolol. *J Biol Chem* 250:4869-4876.

N

- Nakajima K, Takei Y, Tanaka Y, Nakagawa T, Nakata T, Noda Y, Setou M, Hirokawa N (2002) Molecular motor KIF1C is not essential for mouse survival and motor-dependent retrograde Golgi apparatus-to-endoplasmic reticulum transport. *Mol Cell Biol* 22:866-873.

- Nakano A, Muramatsu M (1989) A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 109:2677-2691.
- Nathans J, Hogness DS (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34:807-814.
- Nathans J, Hogness DS (1984) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4851-4855.
- Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, Kopajtich R, Nigg EA, Mayer TU, Barr FA (2003) Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* 162:863-875.
- Northup JK, Sternweis PC, Smigel MD, Schleifer LS, Ross EM, Gilman AG (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6516-6520.
- Nuoffer C, Davidson HW, Matteson J, Meinkoth J, Balch WE (1994) A GDP-bound form of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J Cell Biol* 125:225-237.

Q

- Oleskevich S (1995) G alpha o1 decapeptide modulates the hippocampal 5-HT_{1A} potassium current. *J Neurophysiol* 74:2189-2193.
- Osborne N, Hamon M (1988) Neuronal serotonin. In: (Sons JW, ed). Chichester.
- Otte S, Belden WJ, Heidtman M, Liu J, Jensen ON, Barlowe C (2001) Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *J Cell Biol* 152:503-518.

P

- Paila YD, Tiwari S, Sengupta D, Chattopadhyay A (2010) Molecular modeling of the human serotonin(1A) receptor: role of membrane cholesterol in ligand binding of the receptor. *Mol Biosyst* 7:224-234.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.
- Papoucheva E, Dumuis A, Sebben M, Richter DW, Ponimaskin EG (2004) The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with G_i protein. *J Biol Chem* 279:3280-3291.

- Peng R, Gallwitz D (2004) Multiple SNARE interactions of an SM protein: Sed5p/Sly1p binding is dispensable for transport. *EMBO J* 23:3939-3949.
- Pennington NJ, Kelly JS (1990) Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron. *Neuron* 4:751-758.
- Pereira-Leal JB (2008) The Ypt/Rab family and the evolution of trafficking in fungi. *Traffic* 9:27-38.
- Peter F, Nuoffer C, Pind SN, Balch WE (1994) Guanine nucleotide dissociation inhibitor is essential for Rab1 function in budding from the endoplasmic reticulum and transport through the Golgi stack. *J Cell Biol* 126:1393-1406.
- Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:886-896.
- Pfister KK, Fisher EM, Gibbons IR, Hays TS, Holzbaur EL, McIntosh JR, Porter ME, Schroer TA, Vaughan KT, Witman GB, King SM, Vallee RB (2005) Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* 171:411-413.
- Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB (2001) Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol* 11:351-355.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.
- Pilling AD, Horiuchi D, Lively CM, Saxton WM (2006) Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* 17:2057-2068.
- Pin JP, Galvez T, Prezeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98:325-354.
- Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, Kniazeff J, Rondard P, Prezeau L (2009) G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *J Physiol* 587:5337-5344.
- Plutner H, Cox AD, Pind S, Khosravi-Far R, Bourne JR, Schwaninger R, Der CJ, Balch WE (1991) Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J Cell Biol* 115:31-43.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12:440-453.
- Portella MJ, de Diego-Adelino J, Ballesteros J, Puigdemont D, Oller S, Santos B, Alvarez E, Artigas F, Pérez V (2011) Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? A randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression. *J. Clin. Psychiatry* 72:962-969.
- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-85.

- Prisco S, Cagnotto A, Talone D, De Blasi A, Mennini T, Esposito E (1993) Tertatolol, a new beta-blocker, is a serotonin (5-hydroxytryptamine_{1A}) receptor antagonist in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 265:739-744.
- Propsting MJ, Kanapin H, Jacob R, Naim HY (2005) A phenylalanine-based folding determinant in intestinal sucrase-isomaltase that functions in the context of a quality control mechanism beyond the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 118:2775-2784.
- Puthanveetil SV, Monje FJ, Miniaci MC, Choi YB, Karl KA, Khandros E, Gawinowicz MA, Sheetz MP, Kandel ER (2008) A new component in synaptic plasticity: upregulation of kinesin in the neurons of the gill-withdrawal reflex. *Cell* 135:960-973.

R

- Ramakrishna A, Giridhar P, Ravishankar GA (2011) Phytoserotonin: a review. *Plant Signal Behav* 6.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Crystalline Serotonin. *Science* 108:329-330.
- Raymond JR (1991) Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} receptor. *J Biol Chem* 266:14747-14753.
- Raymond JR, Olsen CL, Gettys TW (1993) Cell-specific physical and functional coupling of human 5-HT_{1A} receptors to inhibitory G protein alpha-subunits and lack of coupling to Gs alpha. *Biochemistry* 32:11064-11073.
- Reiterer V, Maier S, Sitte HH, Kriz A, Ruegg MA, Hauri HP, Freissmuth M, Farhan H (2008) Sec24- and ARFGAP1-dependent trafficking of GABA transporter-1 is a prerequisite for correct axonal targeting. *J Neurosci* 28:12453-12464.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-1630.
- Riad M, Mestikawy SE, Verge D, Gozlan H, Hamon M (1991) Visualization and quantification of central 5-HT_{1A} receptors with specific antibodies. *Neurochem Int* 19:413-423.
- Riad M, Zimmer L, Rbah L, Watkins KC, Hamon M, Descarries L (2004) Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J Neurosci* 24:5420-5426.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, El Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000a) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181-194.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, El Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000b) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal

localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 417:181-194.

Roa M, Cornet V, Yang CZ, Goud B (1993) The small GTP-binding protein rab6p is redistributed in the cytosol by brefeldin A. *J Cell Sci* 106 (Pt 3):789-802.

Robison GA, Butcher RW, Sutherland EW (1967) Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann N Y Acad Sci* 139:703-723.

Rodriguez-Boulan E, Powell SK (1992) Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol* 8:395-427.

Russo GJ, Louie K, Wellington A, Macleod GT, Hu F, Panchumarthi S, Zinsmaier KE (2009) *Drosophila* Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci* 29:5443-5455.

S

Saito N, Okada Y, Noda Y, Kinoshita Y, Kondo S, Hirokawa N (1997) KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* 18:425-438.

Sakmar TP (2002) Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Curr Opin Cell Biol* 14:189-195.

Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH, van Deurs B (1992) Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 358:510-512.

Sannerud R, Marie M, Nizak C, Dale HA, Pernet-Gallay K, Perez F, Goud B, Saraste J (2006) Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Mol Biol Cell* 17:1514-1526.

Saraste J, Lahtinen U, Goud B (1995) Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. *J Cell Sci* 108 (Pt 4):1541-1552.

Sari Y, Lefèvre K, Bancila M, Quignon M, Miquel MC, Langlois X, Hamon M, Vergé D (1997) Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT_{1B} receptors in the rat brain. *Brain Research* 760:281-286.

Schroer TA, Sheetz MP (1991) Functions of microtubule-based motors. *Annu Rev Physiol* 53:629-652.

Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJ, Cole N, Moreira JE, Terasaki M, Siggia E, Lippincott-Schwartz J (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 139:1137-1155.

Segev N (2001) Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE* 2001:re11.

- Segev N, Mulholland J, Botstein D (1988) The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* 52:915-924.
- Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288:1796-1802.
- Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M, Hirokawa N (2002) Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417:83-87.
- Shakoori A, Fujii G, Yoshimura S, Kitamura M, Nakayama K, Ito T, Ohno H, Nakamura N (2003) Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. *Biochem Biophys Res Commun* 312:850-857.
- Sharp DJ, Kuriyama R, Baas PW (1996) Expression of a kinesin-related motor protein induces Sf9 cells to form dendrite-like processes with nonuniform microtubule polarity orientation. *J Neurosci* 16:4370-4375.
- Sharp DJ, Yu W, Ferhat L, Kuriyama R, Rueger DC, Baas PW (1997) Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol* 138:833-843.
- Short B, Haas A, Barr FA (2005) Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1744:383-395.
- Short B, Preisinger C, Schaletzky J, Kopajtich R, Barr FA (2002) The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol* 12:1792-1795.
- Sivars U, Aivazian D, Pfeffer SR (2003) Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* 425:856-859.
- Song AH, Wang D, Chen G, Li Y, Luo J, Duan S, Poo MM (2009) A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* 136:1148-1160.
- Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1990) Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci* 2:1144-1154.
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1986) (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT_{1A} selective agonists. *Eur J Pharmacol* 128:295-298.
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1:3-9.
- Stauber T, Simpson JC, Pepperkok R, Vernos I (2006) A role for kinesin-2 in COPI-dependent recycling between the ER and the Golgi complex. *Curr Biol* 16:2245-2251.
- Steffen W, Karki S, Vaughan KT, Vallee RB, Holzbaur EL, Weiss DG, Kuznetsov SA (1997) The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 8:2077-2088.

- Steinbusch HW, Nieuwenhuys R (1981) Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. *Adv Exp Med Biol* 133:7-35.
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-525.
- Stenmark H, Olkkonen VM (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2:REVIEWS3007.
- Su Q, Cai Q, Gerwin C, Smith CL, Sheng ZH (2004) Syntabulin is a microtubule-associated protein implicated in syntaxin transport in neurons. *Nat Cell Biol* 6:941-953.
- Sullivan NR, Crane JW, Damjanoska KJ, Carrasco GA, D'Souza DN, Garcia F, Van de Kar LD (2005) Tandospirone activates neuroendocrine and ERK (MAP kinase) signaling pathways specifically through 5-HT_{1A} receptor mechanisms in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:18-26.

T

- Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH (1999) Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97:877-887.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 520:97-101.
- Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, Hirokawa N (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93:1147-1158.
- Tang BL, Ong YS, Huang B, Wei S, Wong ET, Qi R, Horstmann H, Hong W (2001) A membrane protein enriched in endoplasmic reticulum exit sites interacts with COPII. *J Biol Chem* 276:40008-40017.
- Thiebot MH (1986) Are serotonergic neurons involved in the control of anxiety and in the anxiolytic activity of benzodiazepines? *Pharmacol Biochem Behav* 24:1471-1477.
- Tilney LG, Bryan J, Bush DJ, Fujiwara K, Mooseker MS, Murphy DB, Snyder DH (1973) Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol* 59:267-275.
- Tisdale EJ (1999) A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates. *Mol Biol Cell* 10:1837-1849.
- Tisdale EJ, Balch WE (1996) Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *J Biol Chem* 271:29372-29379.
- Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ, Balch WE (1992) GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* 119:749-761.

- Tixier-Vidal A, Barret A, Picart R, Mayau V, Vogt D, Wiedenmann B, Goud B (1993) The small GTP-binding protein, Rab6p, is associated with both Golgi and post-Golgi synaptophysin-containing membranes during synaptogenesis of hypothalamic neurons in culture. *J Cell Sci* 105 (Pt 4):935-947.
- Tomas M, Martinez-Alonso E, Ballesta J, Martinez-Menarguez JA (2010) Regulation of ER-Golgi intermediate compartment tubulation and mobility by COPI coats, motor proteins and microtubules. *Traffic* 11:616-625.
- Traber J, Glaser T (1987) 5-HT_{1A} receptor-related anxiolytics. *Trends Pharmacol Sci* 8:432-437.
- Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175:157-161.
- Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, Humbert S, Triller A, Saudou F, Yan Z, Kittler JT Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65:53-65.

V

- Vaisberg EA, Grissom PM, McIntosh JR (1996) Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. *J Cell Biol* 133:831-842.
- Vale RD, Milligan RA (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288:88-95.
- Vale RD, Reese TS, Sheetz MP (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.
- Valente C, Polishchuk R, De Matteis MA (2010) Rab6 and myosin II at the cutting edge of membrane fission. *Nat Cell Biol* 12:635-638.
- Vaniotis G, Del Duca D, Trieu P, Rohlicek CV, Hebert TE, Allen BG (2011) Nuclear beta-adrenergic receptors modulate gene expression in adult rat heart. *Cell Signal* 23:89-98.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4903-4908.
- Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1986) Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 6:3474-3482.
- Vollert CS, Uetz P (2004) The phox homology (PX) domain protein interaction network in yeast. *Mol Cell Proteomics* 3:1053-1064.

W

- Wanschers B, van de Vorstenbosch R, Wijers M, Wieringa B, King SM, Fransen J (2008) Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:183-196.
- Wanschers BF, van de Vorstenbosch R, Schlager MA, Splinter D, Akhmanova A, Hoogenraad CC, Wieringa B, Fransen JA (2007) A role for the Rab6B Bicaudal-D1 interaction in retrograde transport in neuronal cells. *Exp Cell Res* 313:3408-3420.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189-1191.
- Waterman-Storer CM, Karki SB, Kuznetsov SA, Tabb JS, Weiss DG, Langford GM, Holzbaaur EL (1997) The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12180-12185.
- Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ (2005) Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat Cell Biol* 7:48-55.
- Weiss S, Sebben M, Kemp DE, Bockaert J (1986) Serotonin 5-HT₁ receptors mediate inhibition of cyclic AMP production in neurons. *Eur J Pharmacol* 120:227-230.
- Wheatley M, Hawtin SR (1999) Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Hum Reprod Update* 5:356-364.
- White J, Johannes L, Mallard F, Girod A, Grill S, Reinsch S, Keller P, Tzschaschel B, Echard A, Goud B, Stelzer EH (1999) Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147:743-760.
- Wong RW, Setou M, Teng J, Takei Y, Hirokawa N (2002) Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14500-14505.
- Wu G, Zhao G, He Y (2003) Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface: Rab1-independent transport of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 278:47062-47069.

X

- Xiao S, Jan LY (2009) A gate keeper for axonal transport. *Cell* 136:996-998.
- Xu M, Gu Y, Barry J, Gu C (2010) Kinesin I transports tetramerized Kv3 channels through the axon initial segment via direct binding. *J Neurosci* 30:15987-16001.

Xu Y, Takeda S, Nakata T, Noda Y, Tanaka Y, Hirokawa N (2002) Role of KIFC3 motor protein in Golgi positioning and integration. *J Cell Biol* 158:293-303.

Y

Yamada M, Toba S, Takitoh T, Yoshida Y, Mori D, Nakamura T, Iwane AH, Yanagida T, Imai H, Yu-Lee LY, Schroer T, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S (2010) mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *EMBO J* 29:517-531.

Yang X, Matern HT, Gallwitz D (1998) Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *Embo J* 17:4954-4963.

Ye B, Zhang Y, Song W, Younger SH, Jan LY, Jan YN (2007) Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* 130:717-729.

Yeagle PL, Alderfer JL, Albert AD (1997) Three-dimensional structure of the cytoplasmic face of the G protein receptor rhodopsin. *Biochemistry* 36:9649-9654.

Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR, Balch WE (2002) Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277:11401-11409.

Yoshida Y, Suzuki K, Yamamoto A, Sakai N, Bando M, Tanimoto K, Yamaguchi Y, Sakaguchi T, Akhter H, Fujii G, Yoshimura S, Ogata S, Sohda M, Misumi Y, Nakamura N (2008) YIPF5 and YIF1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure. *Exp Cell Res* 314:3427-3443.

Yu W, Sharp DJ, Kuriyama R, Mallik P, Baas PW (1997) Inhibition of a mitotic motor compromises the formation of dendrite-like processes from neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 136:659-668.

Yuen EY, Jiang Q, Chen P, Gu Z, Feng J, Yan Z (2005) Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurosci* 25:5488-5501.

Z

Zhang X, Dong C, Wu QJ, Balch WE, Wu G (2011) Di-acidic Motifs in the Membrane-distal C Termini Modulate the Transport of Angiotensin II Receptors from the Endoplasmic Reticulum to the Cell Surface. *J Biol Chem* 286:20525-20535.

Zheng Y, Wildonger J, Ye B, Zhang Y, Kita A, Younger SH, Zimmerman S, Jan LY, Jan YN (2008) Dynein is required for polarized dendritic transport and uniform microtubule orientation in axons. *Nat Cell Biol* 10:1172-1180.

ANNEXES

**Cellular and subcellular localization of Yif1B, a protein involved in dendritic receptor
targeting in the rat central nervous system**

Justine Masson, Jeanne Lainé, Sana Al Awabdh, Aurélien Dauphin, Michel Hamon, Michel
Boris Emerit, Michèle Darmon.

(Soumis à European Journal of Neuroscience)



Cellular and subcellular localization of Yif1B, a protein involved in dendritic receptor targeting in the rat central nervous system.



Journal:	<i>European Journal of Neuroscience</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Masson, Justine; INSERM U894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences; Université Paris Descartes – Paris 5, UMR U894; Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S677</p> <p>Laine, Jeanne; Université Pierre et Marie Curie- Paris 6, Département de Physiologie</p> <p>Al Awabdh, Sana; Université Paris Descartes – Paris 5, UMR U894; Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S677</p> <p>Dauphin, Aurélien; INSERM/CNRS/ Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Plate-forme Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière</p> <p>Hamon, Michel; INSERM U894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences; Université Paris Descartes – Paris 5, UMR U894; Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S677</p> <p>Emerit, Michel; INSERM U894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences; Université Paris Descartes – Paris 5, UMR U894; Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S677</p> <p>Darmon, Michèle; Université Paris Descartes – Paris 5, UMR U894; Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S677</p>
Key Words:	intermediate compartment, Golgi apparatus, Targeting, Yif1B, 5-HT1A receptor

SCHOLARONE™
Manuscripts

Molecular and Developmental Neuroscience

Associate Editor: Masahiko Watanabe

Cellular and subcellular localization of Yif1B, a protein involved in dendritic receptor targeting in the rat central nervous system.

Justine Masson^{1,2,3,*}, Jeanne Lainé⁴, Sana Al Awabdh^{1,2,3}, Aurélien Dauphin⁵, Michel Hamon^{1,2,3}, Michel Boris Emerit^{1,2,3} and Michèle Darmon^{1,2,3}.

¹ INSERM U894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris F-75014, France. ²

Université Paris Descartes – Paris 5, UMR U894, Paris, F-75014, France. ³Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, UMR S677, Paris F-75013, France. ⁴ Université Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Département de Physiologie, Paris F-75013, France. ⁵ INSERM/CNRS/ Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Plate-forme Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France.

* Address correspondence to: Justine Masson, INSERM U894, 91 boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France, Tel: +33 1 40 77 97 10, Fax: +33 1 40 77 97 90, E-mail: justine.masson@upmc.fr

Running title: Cellular and subcellular localization of Yif1B

Total number of pages: 26

Total number of figures: 10

Total number of tables: 1

Total number of words in the whole manuscript: 7011

Total number of words in the abstract: 252

Total number in the introduction: 478

Keywords : neuron, intermediate compartment, Golgi apparatus, targeting, Yif1B, 5-HT_{1A} receptor

ABSTRACT

Yif1B, a member of the five-pass transmembrane protein (FinGER or Yip) family, is the *Rattus* ortholog of Yif1p, a COPII associated protein shown to be essential for secretion in *S. cerevisiae*. A previous study showed the functional role of Yif1B in the dendritic targeting of the serotonin 5-HT_{1A} receptor in brain neurons. Blockade of Yif1B expression specifically impairs the ability of 5-HT_{1A} receptors to be expressed distally along dendrites in neurons in culture (Carrel et al. 2008).

To give further insights into Yif1B functional role in neurons, we investigated its expression pattern in the rat brain, in particular its subcellular localization. At the cellular level, Yif1B is expressed throughout the brain in somas and dendrites of various neuronal types. In most of them, Yif1B is localized in a “dotty” compartment that partially overlaps with the endoplasmic reticulum (ER). In scattered neurons, Yif1B is also expressed in the somatic cis-Golgi apparatus and in the vesiculo-tubular compartment surrounding Golgi apparatus saccules. Such subcellular localizations suggest that Yif1B could cycle through the intermediate compartment between the ER and the Golgi apparatus with an ability to be either retained in the somatic Golgi apparatus, or expressed in an ER sub-compartment. The Yif1B “dotty” expression in dendrites is consistent with its role in the dendritic targeting of the 5-HT_{1A} receptor, probably through the routing of mobile vesicles in dendritic domains. Yif1B can therefore be considered as a novel marker of an intracellular subcompartment involved in vesicular traffic between the ER and the Golgi apparatus in somas and dendrites.

INTRODUCTION

Yif1B belongs to a family of proteins named Yip (Ypt Interacting Protein) or FinGER (Five-span transmembrane proteins localized in the Golgi apparatus and some in the ER) that has emerged a few years ago as Ypt1/rab1-interacting proteins. The first member, Yip1p, identified in *S. cerevisiae*, interacts with most of the Ypt/rab proteins, with a higher affinity for Ypt1 and Ypt31 (Yang et al., 1998). *S. cerevisiae* Yip members are named Yip1-5 (Calero et al., 2002; Shakoori et al., 2003) and Yif1p (for Yip1p interacting factor). Yif1p directly interacts with Yip1p and only these two Yip members are essential for the secretion function (Matern et al., 2000). Accordingly, Yip1p and Yif1p are proposed to be involved in secretory pathways, whereas other Yips belong to endocytosis pathways that are not essential in *S. cerevisiae* (Yang et al., 1998; Matern et al., 2000). The Yif1p-Yip1p heteromeric integral membrane complex may act at the latest stage of vesicle budding in *S. cerevisiae*, more likely after assembly of the COPII coat, or serve a receptor function for the Golgi apparatus Ypt/rab (Heidtman et al., 2005). In line with such functional roles, convergent studies showed that Yif1p proteins are located in the ER and the Golgi apparatus (Matern et al., 2000; Barrowman et al., 2003; Shakoori et al., 2003; Chen et al., 2004).

Phylogenic tree analysis reveals that the Yip family is highly conserved throughout evolution with a segregation of genes in eucaryotes. In human, Yip proteins are expressed in numerous tissues. However brain levels are especially high, suggesting some specific function(s) for Yip proteins in the central nervous system (CNS) (Pfeffer and Aivazian 2004). Among mammalian Yip proteins, Yip1A and Yif1A were shown to interact with each other (Jin et al., 2005) and their shared localization in endoplasmic reticulum exit sites (ERES), intermediate compartment (IC), and cis Golgi apparatus, suggests that in non neuronal cell models they could recycle between the ER and the Golgi apparatus and contribute to the maintenance of the Golgi structure (Breuza et al., 2004; Yoshida et al., 2008).

We previously showed that Yif1B is expressed in numerous tissues (Carrel et al., 2008). In brain neurons, Yif1B has been demonstrated to play a key role in the transport of 5-HT_{1A} receptor to distal dendrites, without interfering with the targeting of other receptors (somatostatin sst2A, purinergic P2X₂ and serotonin 5-HT_{3A} receptors), the morphology of the dendritic tree or the integrity of Golgi apparatus (Carrel et al., 2008). In order to give further insight into the implication of Yif1B in the intracellular trafficking of specific proteins in neurons, we thoroughly investigated its cellular and subcellular localizations in the rat brain. Our results provide further support to the idea that Yif1B can be considered as a marker of an intracellular sub-compartment involved in the trafficking between the ER and the Golgi in somas and in a post-ER compartment in dendrites, in brain neurons.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male Sprague–Dawley rats (250-300 g body weight) were housed under controlled conditions (12-h light/dark cycle, 21±1 °C ambient temperature, 60% relative humidity) with food and water ad libitum. All efforts were made to minimize the number of animals used in the course of experiments and their suffering. Experiments were performed in agreement with the institutional guidelines for use of animals and their care, in compliance with national and international laws and policies (Council directive no. 87-848, October 19, 1987, French Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permission no. 75-805 to J.M.).

In situ hybridization

The cDNA of Yif1B (Carrel et al., 2008) was used as a template for generating probes. The Yif1B probe corresponding to the C-terminal half of the cDNA was amplified with forward primer 5'-AAGCATGCACGCGACAGGTTTG-3' (nt 37–58 of NM_198734) and reverse primer

5'-TGTCCTGTTGGTACTGGACCTC-3' (nt 454-475 of NM_198734) and cloned into TA cloning vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), allowing transcription with T7 or SP6 RNA polymerase using the MaxiScript T3 or SP6 kits (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with [³⁵S]UTP (GE Healthcare). Labeled sections were exposed to MP Hyperfilm (Amersham-Pharmacia, Orsay, France) for one week and autoradiograms were scanned using an Epson scanner.

Antibodies

The following primary antibodies were used: rabbit anti-rat Yif1B polyclonal antibody (for dilutions, see following sections), mouse anti-rat mGluR2 monoclonal antibody (1:1000, Abcam, Paris, France), mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1:500, Millipore, Molsheim, France), rat anti-serotonin monoclonal antibody (1:100 Chemicon, Guyancourt, France), mouse anti-tyrosine hydroxylase (1:20000, Sigma-Aldrich, Lyon France), mouse anti-MAP2 monoclonal antibody (1:2000, Chemicon); ER and Golgi apparatus labeling was performed using mouse anti-calnexin monoclonal antibody (1:50; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA), mouse anti-CTR433 monoclonal antibody (1:100; medial Golgi apparatus; Jasmin et al. 1989), mouse anti-GM130 monoclonal antibody (1:10000; cis Golgi apparatus; Abcam) and mouse anti-TGN38 monoclonal antibody (1:2000; trans Golgi apparatus; BD Biosciences). Secondary antibodies were Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG, Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG, and Cy3-conjugated donkey anti-rat IgG (1:1600; Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, UK), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG, (1:1600; Molecular Probes, Cergy Pontoise, France).

Western blot experiments

Experimental conditions were adapted from the protocol used in Carrel et al. (2008) to eliminate an unspecific band observed at ≈ 45 KDa. These modifications were concerning sample preparation (denaturation and storage), amount of total proteins loaded in SDS-PAGE gel and dilution of primary antibody. Rats were decapitated and brain and spinal cord were rapidly removed on ice. Dissected brain regions (striatum, cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, brainstem), the cerebellum and the spinal cord were homogenized by sonication in 10 vol (v/w) of Laemmli buffer without Bromophenol Blue. Homogenates were assayed for their protein contents (BCA Protein Assay kit-reducing agent compatible, Pierce, Rockford, IL, USA), then immediately adjusted to 0.1 mg protein/mL in Laemmli buffer with Bromophenol Blue, incubated at 37°C for 15 min, aliquoted and stored at -20°C until use. Proteins (0.5 μ g) were analyzed by SDS-PAGE (12 % acryl-bisacrylamide slab gel) followed by blotting to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (PolyScreen, Perkin-Elmer, Monza, Italy). The PVDF membrane was incubated with rabbit anti-Yif1B antibody (1:2000) and goat anti-rabbit secondary antibody linked to horseradish peroxidase (1:1000). Detection was performed using the ECL plus chemiluminescence system (Amersham-Pharmacia), membrane exposure to film was 20 sec. For normalization, the PVDF membrane was reprobated with an anti- α -tubulin monoclonal antibody (1:1000; GE Healthcare, Saclay, France).

Immunofluorescence

Rats were deeply anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M phosphate buffered saline (pH 7.4) (PBS). Brains were removed and postfixed in PFA fixative for 24 h. Brain samples were obtained from at least 3 rats and 6 to 10 coronal brain sections (30 μ m) for each structure were cut using a vibratome. After washes in PBS, sections were incubated in a blocking solution (2% normal goat serum, 3% bovine serum, 0.2% triton X-100 in PBS) for 1 h at room temperature. Then, sections were incubated in blocking solution containing antibodies overnight at 4°C, then

rinsed 3 X 10 min with PBS and incubated with fluorescent secondary antibodies. After four washes in PBS, sections were mounted on microscope slides, overlaid with coverslips with Fluoromount-G solution (Clinisciences, Montrouge, France). Immunofluorescence images were generated using a TCS SP2 AOBS laser scanning confocal microscope (Leica, 63X oil immersion lens) adjusting acquisition parameters in order to detect in the linear range the signal of interest. Images were the product of 8-fold line averages. Leica pictures were saved as TIFF images and panels were assembled using Adobe Photoshop 7.0. In figures representing only one immunolabeling, images were presented in inverted gray lookup table. For double immunofluorescence panels, image contrast was enhanced with similar levels for each labeling and merged. Each panel corresponded to one focal plane (200 nm thick), except for vesicular Yif1B-calnexin colocalization, 20 individual focal planes were summed for a z projection.

Image analysis

Quantification of fluorescence data was performed using ImageJ software (US National Institutes of Health), applied to three independent immunofluorescent experiments.

Somatic Golgi localization was assayed in one focal plane using fluorescence signal for a Golgi marker (GM130, CTR433 or TGN38). Analysis was performed on 6 raw unsaturated acquisitions for each marker. Signals for Golgi apparatus markers or Yif1B were in the 400-1000 nm ranges (over the resolution distance of the confocal microscope). They were median filtered (radius = 1 pixel) and colocalization was studied by analysis of merged plot profiles for individual Golgi markers and Yif1B. We measured the overlapping of the full width at half maximum intensities of both signals and checked if the overlapping distance was over the resolution distance of the confocal microscope (200 nm with X60 plan apo objective N.A. 1.4) (Bolte and Cordelières, 2006).

Analysis of vesicular immunopositive element colocalization was performed using JACoP plugin because the diameter of Yif1B and calnexin immunoreactive vesicles ranged between

200 and 300 nm and 200 and 500 nm respectively (Bolte and Cordelières, 2006). Colocalization was analyzed in 20 individual focal planes for each labeled neuron. The signal for calnexin was median filtered to remove impulsive noise, signals for Yif1B and calnexin were then thresholded and colocalization based on centres of mass-particle coincidence was analyzed. Statistical analysis was performed on 20 neurons.

Immunogold electron microscopy

Deeply pentobarbital-anaesthetized rats were transcardially perfused with 4% PFA + 0.1% glutaraldehyde in cold 0.1M phosphate buffered. The dissected cerebellum was further post-fixed in 4% PFA + 15% sucrose for 2 hours at 4°C. Its vermal part was cut in 100 µm thick parasagittal sections with a vibratome. Standard free-floating immunocytochemical procedure was then applied, using PBS as diluent and rinsing liquids, added with 0.05% Triton X-100 only for primary antibody incubation. Briefly, aldehyde quenching in 0.1 M glycine was followed by preincubation for 1 hour in 5% normal goat serum and overnight incubation at 4°C with rabbit anti-Yif1B antibody (1:15000). A 4 hour incubation with ultra-small gold-conjugated F(ab')₂-fragments of goat anti-rabbit IgG (1:200; Aurion, Wageningen, The Netherlands) was followed by extensive washings and 10 min post-fixation in 2% glutaraldehyde. The 0.7 nm gold beads were then silver enhanced (HQ silver; Nanoprobes, Stony Brook, USA) and submitted to a gold-toning procedure to protect silver deposits from osmium displacement. After 2 % OsO₄ post-fixation and 2% uranyl acetate *en bloc* staining, sections were dehydrated in graded acetone and finally embedded in Durcupan (Fluka, Buchs, Switzerland) resin. Ultrathin sections were examined with a Philips CM120 electron microscope, operated at 80 kV and imaged with a SIS Morada digital camera.

Quantification of subcellular Yif1B expression

Quantitative evaluations of subcellular Yif1B immunogold labeling were performed in cerebellar Golgi and Purkinje cells structures (Golgi and vesiculo-tubular structures, RER,

nucleus and cytosol). Electron micrographs were imaged with a SIS Morada digital camera at a magnification of X 33000 and enlarged for analysis with the associated iTEM software. Silver enhanced gold particles (20-50 nm in diameter) were counted as labeling specific compartment when they were over or in contact with the endomembrane. Background labeling was assessed by counting silver enhanced gold particles located on the nucleus or scattered in the cytosol except for the particles surrounding (distance < 100 nm) rough endoplasmic reticulum where their high density likely indicated a specific labeling. Statistical analysis of gold particles/ μm^2 was performed by t-test or one-way analysis of variance and Dunnett's multiple comparison test.

RESULTS

Regional Yif1B expression in rat brain.

Previous Northern blot analyses of the 1.4 kb Yif1B transcript had revealed a rather ubiquitous expression in rat tissues, but the highest levels were found in brain (Carrel et al., 2008). *In situ* hybridization experiments confirmed that Yif1B mRNA was relatively abundant in the rat brain (Fig.1). Some regions were homogeneously and strongly labeled such as the molecular and granular layers of hippocampus, the anterodorsal thalamic nucleus, the paraventricular and the arcuate hypothalamic nuclei, the median mamillary nucleus and the red nucleus. Other regions exhibited a strong but more scattered expression of Yif1B mRNA such as the primary olfactory cortex, olfactory tubercle, the ventrolateral, the anteroventral and the ventroposterior thalamic nuclei, the superior colliculi, the periaqueductal grey matter, the facial nucleus, the vestibular nuclei and the cerebellar granular layer (see squared box in Fig.1). In the neocortex, the septum and the substantia nigra, Yif1B mRNA was also detected, but at much lower levels (Fig.1).

Western blot experiments showed that the protein Yif1B was expressed in all brain regions examined (striatum, cerebral cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, midbrain), in

the cerebellum and the spinal cord, at a rather homogeneous levels (compared to those of tubulin, used as ubiquitous reference) (Fig.2). Only one band corresponding to the protein Yif1B (at the expected molecular weight of 35 kDa) was observed under our improved western blot conditions (see Material and Methods) which allowed us to get rid of the Yif1B-like interfering band at 45 kDa described in our previous report (Carrel et al., 2008). The homogenous level of expression observed in western blot experiments did not predict different patterns of expression that were actually observed in different brain regions (in situ hybridization and immunofluorescence experiments).

Immunofluorescence experiments showed that Yif1B expression displayed different patterns from one brain area to another. Yif1B immunolabeling was present as cytoplasmic dots that we refer to as “dotty” pattern in the following paragraphs (Fig.3, arrows). However, Yif1B labeling was detected in a perinuclear tubular structure in neurons with Yif1B immunolabeling extending in proximal dendrites (Fig.3, double arrows). For example, a Yif1B “dotty” expression pattern was detectable in numerous cells of the caudate putamen (Fig. 3A) and in pyramidal neurons of the CA1 layer in the hippocampus (Fig.3D), whereas in the granular layer of the cerebellum (Fig.3I), Yif1B positive neurons were scattered and exhibited a perinuclear tubular immunostaining. In the ventral pallidum (Fig.3B), the neocortex (Fig.3C), thalamic or hypothalamic nuclei (Fig. 3E, 3F), the superior colliculus (Fig. 3G) and the pontine nucleus (Fig. 3H), Yif1B-immunopositive neurons were detectable with both expression patterns (perinuclear and “dotty”).

Neurochemical phenotypic characterization of some Yif1B expressing neurons

Comparison of in situ hybridization signal with a Yif1B riboprobe and immunostaining with a Yif1B antibody suggested that Yif1B is expressed in neurons. We confirmed the neuronal localization of Yif1B by dual labelling in immunofluorescence experiments performed with anti-Yif1B and anti-NeuN antibodies. Yif1B antibodies labelled neuronal somas (identified by anti-NeuN antibodies) in several brain regions as shown in neocortex (Fig.4).

We explored the neurochemical phenotype of Yif1B immunopositive neurons in several brain regions. In hippocampus, Yif1B expression was detectable in all pyramidal layers of Ammon's horn (CA1-CA4) and granular cells in dentate gyrus suggesting that some Yif1B expressing neurons were glutamatergic (Fig.3 and not shown). In midbrain, Yif1B immunoreactive neurons were detectable in the ventral tegmental area (VTA) (Fig. 5B) and substantia nigra (SN) (Fig. 5A). In the SN, Yif1B immunolabeling (Fig.5A1) never superimposed with tyrosine hydroxylase immunolabeling (Fig. 5A2) showing that Yif1B expressing neurons were not dopaminergic (Fig.5A3), whereas in VTA, some neurons were dopaminergic (Fig. 5B3, arrows). Concerning Yif1B expression in the brainstem, whereas noradrenergic neurons in locus coeruleus (LC, Fig.5C2) were never Yif1B immunoreactive (Fig. 5C3), most of serotonergic neurons in raphe (Fig.5D2) were expressing Yif1B (Fig. 5D3, arrows). In the granular layer of the cerebellum, distribution, size and shape of Yif1B immunoreactive neuronal somas suggested that these neurons were GABAergic Golgi cells described as specifically expressing the glutamatergic metabotropic receptor mGluR2 (Neki et al., 1996). Indeed, double immunofluorescence experiments with anti-Yif1B polyclonal antibody (Fig.5E1) and anti-mGluR2 monoclonal antibody (Fig.5E2) confirmed that these mGluR2 positive neurons were also immunoreactive for Yif1B (Fig.5E3).

Subcellular expression of Yif1B.

As the perinuclear staining suggested an expression of Yif1B protein in the Golgi apparatus, we performed double immunofluorescence labeling experiments with GM130, a Golgi marker, in hippocampus (Fig.6A2) and cerebral cortex (Fig.6B2). In neurons exhibiting a perinuclear immunostaining, Yif1B colocalized with GM130 (Fig.6B3, double arrow), whereas "dotty" Yif1B immunolabeling never overlapped with the Golgi apparatus marker in hippocampus and cortex (Fig.6B3, arrow).

As Yif1B immunoreactive vesicles never colocalized with the Golgi compartment (Fig.6), we tried to define the cellular compartment where Yif1B was expressed with the "dotty" pattern. We focused our investigations on hippocampal pyramidal neurons whose Golgi apparatus

does not express Yif1B. Double immunofluorescence experiments using anti-Yif1B and anti-calnexin (an ER marker) antibodies showed that 19.5 ± 1.6 % of Yif1B positive vesicles were calnexin immunoreactive and 5.4 ± 0.9 % of calnexin positive vesicles were Yif1B immunoreactive. To further investigate the subcellular expression of Yif1B, immunogold electron microscopy was performed in the cerebellum where Golgi cells exhibited a strong Yif1B-immunoreactivity in their Golgi apparatus (Fig.8A) whereas Purkinje cells were devoid of Yif1B immunoreactivity (see Fig.5E1). In Golgi cell somas, Yif1B immunostaining was located in segregated saccules restricted to a sub-compartment of the Golgi apparatus (Fig.8A, B, arrow), and in the rough endoplasmic reticulum (RER) or close to it (Fig.8A, C, arrow). Occasionally, silver-enhanced gold labeled Yif1B particles were detected between the ER and the Golgi apparatus (Fig.8B, white arrow). To confirm the specificity of Yif1B expression in these compartments, the immunogold background labeling was monitored in Purkinje cell somas which do not express Yif1B. Nucleus and cytosol numbers of silver-gold particles were not different in Golgi cells and Purkinje cells (t-test analysis) and thus can be taken as background labeling. In Golgi cells, marked differences were noted between numbers of silver-gold particles in nucleus and cytosol and numbers in other compartments: RER, Golgi apparatus and VTC (Table 1). In the vicinity of RER saccules (distance <100 nm), Yif1B immunoreactive gold particles were also significantly more abundant in Golgi cells (Table 1).

Complementary immunofluorescence experiments using antibodies against specific markers for cis-, medial- or trans-Golgi apparatus (respectively GM130, CTR433 and TGN38) showed that Yif1B and GM130 labelings overlapped, suggesting that Yif1B was expressed in the cis-Golgi apparatus in cerebellar Golgi cells (Fig.9A1-4). In contrast, in double immunofluorescence with medial- (Fig.9B1-4) and trans- (Fig.9C1-4) Golgi markers showed only juxtaposed labelings. Further computer image analyses of the respective immunolabelings of Golgi markers and Yif1B confirmed the colocalization of Yif1B exclusively with the cis Golgi apparatus marker GM130 (not shown).

Immunofluorescence experiments conducted with the anti-Yif1B antibody suggested that Yif1B could be expressed in neurites. We further explored this expression pattern in the cerebellum where Yif1B exhibited a typical somatic perinuclear labelling as well as a “dotty” labeling in the granular layer (Fig.10A1, arrows). Double immunofluorescence with anti-MAP-2 (Fig.10A2) and anti-Yif1B antibodies pointed out “dotty” Yif1B expression in MAP-2 positive structures (Fig.10A3, arrows). In the particular example shown in Fig.10, a Yif1B immunopositive neuron within the granular layer, extends a dendrite into the molecular layer whereas Yif1B labeling has a typical perinuclear pattern in the soma.

DISCUSSION

Extensive studies of the cellular distribution and subcellular localization of Yif1B reported herein show that Yif1B is expressed in sub-populations of neurons that belong to several neurochemical phenotypic populations. Yif1B exhibits two main subcellular distribution patterns in somas: in some neurons, an exclusive “dotty” expression partially overlapping with the ER, and in other neurons, an expression in the cis-Golgi apparatus in addition to the “dotty” expression. In neuronal proximal dendrites, the “dotty” pattern of expression of Yif1B is clearly found along cytoskeletal elements.

Double immunofluorescence labeling showed that Yif1B expressing vesicles are partially identified as belonging to the ER, and electron microscopy data further indicated that Yif1B is located on RER cisternae membranes and their immediate surroundings. On the other hand, Yif1B is concentrated in one part of the Golgi apparatus, as observed in some neurons by electron microscopy, and this observation is consistent with what has been described in HeLa cells for Yif1A, the product of the other mammalian Yif1 gene (Yoshida, 2008). Here, we show that its expression is restricted to the cis Golgi subcompartment where tethering of vesicles coming from the ER occurs. This observation suggests that Yif1B is cycling between

the ER and the Golgi apparatus. However, in some Yif1B immunopositive neurons in brain sections, Yif1B is not detected in the cis Golgi apparatus subcompartment suggesting that its targeting to the somatic Golgi apparatus or its ability to be retained in this compartment is either transient or cell dependent. In *S. cerevisiae*, the Yif1p-Yip1p complex includes Yos1p as a partner protein and morphological phenotypes of *S. cerevisiae* mutants indicate that Yif1p and Yos1p may exert a critical function within the Golgi complex (Heidtman et al., 2005). Whether partner protein homologous to Yip1p or/and Yos1p in *S. cerevisiae* are specifically expressed in neurons endowed with Yif1B in the cis Golgi apparatus subcompartment is another key question to be addressed in future investigations.

The localization of neuronal Yif1B in a post-ER compartment strongly suggests that Yif1B is trafficking between the ER and the Golgi apparatus. This hypothesis is supported by the localization of Yif1B within the Golgi apparatus in some neurons: Yif1B is located on discrete structures in the Golgi apparatus ribbon that could be tubulovesicular clusters. Furthermore, during phylogenesis, the unique gene encoding Yif1p in *S. cerevisiae* segregates in two orthologs in mammals, Yif1A and Yif1B. The localization and the function identified for Yif1p in *S. cerevisiae* and for the mammalian Yif1A demonstrated their roles in ER-Golgi apparatus traffic. In particular, data obtained in cell culture clearly showed that Yif1A is expressed in ERES, ERGIC and in the cis-Golgi at steady state (Yoshida et al., 2008) and interacts with Yip1A in a molecular complex involved in ER to Golgi apparatus transport (Jin et al., 2005).

Our morphological data show that Yif1B is expressed not only in a vesicular compartment in somas, but also in vesicles along microtubules in dendrites. Electron microscopy analysis in dendrites would have given us more informations on the dendritic subcellular localization. Unfortunately, detecting Yif1B in dendrites by this technique was unsuccessful so far. However, video microscopy experiments performed on hippocampal neurons overexpressing Yif1B clearly show Yif1B expression in vesicles moving in dendrites (Sana Al Awabdh, personal data). Previous studies showed that Yif1B is a key protein for the targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor in the dendritic tree of neurons in culture. Thus, siRNA-mediated

inhibition of endogenous Yif1B expression in hippocampal cultured neurons impairs the targeting of 5-HT_{1A} serotonin receptors in distal dendrites (Carrel et al., 2008).

Interestingly, NMDA (NR1 and NR2B) receptors transfected in neurons in culture are also targeted in dendrites using a vesicular compartment pathway identified as ER-derived vesicle trafficking between somatic ER and dendritic Golgi apparatus. ER-derived vesicles appeared to be highly dynamic organelles probably transported along dendritic microtubules through the associated KIF17 molecular motor (Setou et al, 2000; Jeyifous et al., 2009). These data support the idea that the post-ER compartment plays a key role in receptor targeting in dendrites. Because Yif1B is expressed not only in vesicular structures that are labeled by ER markers, but also in a post-ER compartment, some similarities between NMDA and 5-HT_{1A} receptor trafficking in dendrites might be suspected.

Anterograde traffic of vesicles allows proteins to be transported from the ER to the Golgi apparatus in different subdomains of the IC. COPII vesicles bud at ERES and form tubulo-vesicular clusters of ERGIC. Then, from the ERGIC, proteins are transported to the Golgi apparatus in COPI vesicles (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006). Whereas the organization of these traffics is deeply documented and numerous molecular markers have been identified in cell culture, in brain less data is available. In neurons of the ventromedial horn of the rat spinal cord, ER, IC and cis Golgi markers were found to extend over the whole length of some dendrites, which lead Gardiol et al. (1999) to propose that the dendritic cellular machinery could be involved in local protein synthesis during plasticity. Moreover, in neurons, Golgi-like cisternal stacks have been described in dendrites (for a review, see Tang, 2007, and Jan and Jan, 2010). These structures named Golgi outposts were initially involved in dendritic growth, but the question of their role in receptor targeting in dendrites emerged from investigations on the post-ER dendritic sorting of receptors. Concerning the IC in dendrites of cultured neurons or neurites of neuron-like cells, some discrepancies exist in the literature. For example, in cultured neurons, rab1 and ERGIC53/p58, are expressed not only in the cell body, but also in dendrites (Krijnse-Locker et al., 1995; Pierce et al., 2001). In differentiated PC12 cells, IC comprises two subdomains (globular and tubular) that express specifically

rab1 or ERGIC-53/p58. These subdomains are clearly distinct with ERGIC-53/p58-containing globular subdomain restricted to the cell body and rab1-containing IC tubules moving to neurites (Sannerud et al., 2006). Interestingly, rab1 a key protein for IC vesicle trafficking, is involved in the targeting of some receptors. In particular, experiments with siRNA or dominant-negative mutants to inhibit the expression of rab1, showed that α_{2A} adrenergic receptors are targeted to the cell membrane through a rab1-dependent mechanism. In contrast, membrane targeting of α_{2B} receptors is rab1-independent (Wu et al. 2003). Rab1 has also been shown to play a key role in the trafficking of angiotensin II type 2 receptor (Zhang et al., 2009) and Kv4 potassium channels (Flowerdew and Burgoyne, 2009) to the cell surface. These data suggest that proteins initially identified as key actors in general traffic in cell lines, such as rab proteins, also participate in the membrane targeting of specific receptor subtypes. As the *S. cerevisiae* ortholog of rab1 (Ypt1p) interacts with the yeast Yif1p, we can suppose that in mammals, Yif1B could also play its dendritic targeting function through interaction with rab1. In this context, it can be assumed that Yif1B, a chaperone protein for the 5-HT_{1A} receptor dendritic targeting, might be involved in membrane targeting of other receptors types.

Altogether, our data support the idea that Yif1B could be a marker for a post-ER sub-compartment not yet identified by other markers, that is involved in the trafficking of proteins to distal dendritic membranes. Further work is needed to identify Yif1B partner proteins, in particular proteins belonging to the IC compartment (COPI, COPII and ERGIC) that could be part of the receptor targeting machinery. Moreover, whereas Yif1B is broadly expressed in brain, numerous neurons were devoid of Yif1B immunostaining suggesting that Yif1B is not an ubiquitous neuronal protein. Although Yif1B has previously been shown to interact with the 5-HT_{1A} serotonin receptor (Carrel et al., 2008), neurons that do not express this receptor such as Golgi cells in the cerebellum were shown to contain Yif1B, suggesting that this protein might interact with other receptor types. In particular, whether the somatodendritic

mGluR2 receptor directly interacts with Yif1B in cerebellar Golgi cells is an interesting question to be addressed in future studies.

Aknowledgements

This research has been supported by grants from INSERM, University Pierre et Marie Curie and FPEC program ("Newmood", LSHM-CT-2803-503474). Justine Masson is supported by CNRS. Confocal imaging was performed at the Plate-forme Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière. We warmly thank Claude-Marie Bachelet for her expert technical help. We are grateful to Dr. Michel Bornens (UMR 144 CNRS/Institut Curie, Paris, France) for his kind gift of anti CTR-433 antibody, Damien Carrel for anti-Yif1B antibody production and purification, and Dalila Laboid for reliable technical help.

Abbreviations list: CNS, central nervous system; COP, coat protein; ER, endoplasmic reticulum; ERES, endoplasmic reticulum exit site; ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment; FinGER, Five-span transmembrane protein localized in the Golgi apparatus and some in the endoplasmic reticulum; IC, intermediate compartment between ER and Golgi apparatus; MAP, microtubule-associated protein; rab, mammalian small GTPase; RER, rough endoplasmic reticulum; VTC, vesiculo-tubular compartment; Yif1, Yip-interacting factor 1; Yip, Ypt -interacting protein; Ypt, *S. cerevisiae* small GTPase; 5-HT_{1A}, type 1A serotonin receptor.

REFERENCES

Appenzeller-Herzog C. and Hauri H.P. (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* **119**, 2173-2183.

Barrowman J., Wang W., Zhang Y. and Ferro-Novick S. (2003) The Yip1p.Yif1p complex is required for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Biol. Chem.* **278**, 19878-19884.

Bolte S. and Cordelières FP. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *J. Microsc.* **224**, 213-232.

Breuzza L., Halbeisen R., Jenö P., Otte S., Barlowe C., Hong W. and Hauri H. P. (2004) Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46. *J. Biol. Chem.* **279**, 47242-47253.

Calero M., Winand N. J. and Collins R. N. (2002) Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett.* **515**, 89-98.

Carrel D., Masson J., Al Awabdh S., Capra C., Lenkei Z., Hamon M., Emerit M. and Darmon M. (2008) Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J. Neurosci.* **28**, 8063-8073.

Chen C. Z., Calero M., DeRegis C. J., Heidtman M., Barlowe C. and Collins R. N. (2004) Genetic analysis of yeast Yip1p function reveals a requirement for Golgi-localized rab proteins and rab-Guanine nucleotide dissociation inhibitor. *Genetics* **168**, 1827-1841.

Flowerdew S.E. and Burgoyne R.D. (2009). A VAMP7/Vti1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels. *Biochem J.*, **418**, 529-540.

Gardiol A., Racca C. and Triller A. (1999) Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J. Neurosci.* **19**, 168-179.

Heidtman M., Chen C.Z., Collins R.N. and Barlowe C. (2005) Yos1p is a novel subunit of the Yip1p-Yif1p complex and is required for transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1673-1683.

Jan Y.N. and Jan L.Y. (2010) Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 316-328.

Jasmin B. J., Cartaud J., Bornens M. and Changeux J. P. (1989) Golgi apparatus in chick skeletal muscle: changes in its distribution during end plate development and after denervation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 7218-7222.

Jeyifous O., Waites C.L., Specht C.G., Fujisawa S., Schubert M., Lin E.I., Marshall J., Aoki C., de Silva T., Montgomery J.M., Garner C.C. and Green W.N. (2009) SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nat. Neurosci.* **12**, 1011-1019.

Jin C., Zhang Y., Zhu H., Ahmed K., Fu C. and Yao X. (2005) Human Yip1A specifies the localization of Yif1 to the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 16-22.

Krijnse-Locker J., Parton R.G., Fuller S.D., Griffiths G. and Dotti C.G. (1995) The organization of the endoplasmic reticulum and the intermediate compartment in cultured rat hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1315-1332.

Matern H., Yang X., Andrulis E., Sternglanz R., Trepte H. H. and Gallwitz D. (2000) A novel Golgi membrane protein is part of a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting. *EMBO J.* **19**, 4485-4492.

Neki A., Ohishi H., Kaneko T., Shigemoto R., Nakanishi S. and Mizuno N. (1996) Metabotropic glutamate receptors mGluR2 and mGluR5 are expressed in two non-overlapping populations of Golgi cells in the rat cerebellum. *Neuroscience* **75**, 815-826.

Pfeffer S. and Aivazian D. (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 886-896.

Pierce J.P., Mayer T. and McCarthy J.B. (2001) Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr. Biol.* **11**, 351-355.

Sannerud R., Marie M., Nizak C., Dale H. A., Pernet-Gallay K., Perez F., Goud B. and Saraste J. (2006) Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1514-1526.

Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H. and Hirokawa, N. (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796–1802.

Shakoori A., Fujii G., Yoshimura S., Kitamura M., Nakayama K., Ito T., Ohno H. and Nakamura N. (2003) Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 850-857.

Tang BL. (2007) Emerging aspects of membrane traffic in neuronal dendrite growth.

Biochim. Biophys. Acta. **1783**, 169-176.

Wu G., Zhao G. and He Y. (2003) Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface: Rab1-independent transport of a G protein-coupled receptor. *J.Biol. Chem.* **278**, 47062-47069.

Yang X., Matern H. T. and Gallwitz D. (1998) Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *EMBO J.* **17**, 4954-4963.

Yoshida Y., Suzuki K., Yamamoto A., Sakai N., Bando M., Tanimoto K., Yamaguchi Y., Sakaguchi T., Akhter H., Fujii G., Yoshimura S., Ogata S., Sohda M., Misumi Y. and Nakamura N. (2008) YIPF5 and YIF1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure. *Exp. Cell Res.* **314**, 3427-3443.

Zhang X., Wang G., Dupré D.J., Feng Y., Robitaille M., Lazartigues E., Feng Y.H., Hébert T.E. and Wu G. (2009) Rab1 GTPase and dimerization in the cell surface expression of angiotensin II type 2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 09-117.

Table 1.

	Number of gold particles/ μm^2 of surface compartment
Nucleus and cytosol	0.34 ± 0.08
Golgi apparatus and vesiculo-tubular compartment	7.16 ± 1.04 ***
Rough endoplasmic reticulum (RER)	5.71 ± 1.03 ***
In the proximity (<100 nm) of RER	3.09 ± 1.45 **

Legends to Figures and Table

Figure 1. Expression of Yif1B mRNA in the rat brain.

Yif1B mRNA expression is visualized by in situ hybridization performed with Yif1B-antisense [³⁵S]cRNA probe on coronal brain sections at various antero-posterior levels [anterio-posterior distances from bregma according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson : +1.2 mm, -1.8 mm, -4.6 mm, -5.7 mm and -10.8 mm]. Brain atlas plates are presented with names of structures labelled with Yif1B probe : the neocortex (cx), the striatum (st), the septum (S), the primary olfactory cortex (PO) and the olfactory tubercle (Tu) at +1.2 mm; the hippocampus (hip), the thalamus (thal), the hypothalamus (hyp) at -1.8 mm and at -4.6 mm; the superior colliculi (SP), the periaqueductal grey (CG), the red nucleus (R) and the substantia nigra (SN) at -5.7 mm; the cerebellum (cb) and the brainstem at -10.8 mm. Area within the rectangle in the cerebellum is enlarged in the bottom right panel. GL, granular layer. Scale bar, 400 μm.

Figure 2. Regional distribution of Yif1B in the rat CNS.

Brain regions, cerebellum and spinal cord were dissected and tissues processed for western blot experiment with purified anti-Yif1B antibody (1:2000). Immunolabeled proteins were detected by chemiluminescence. Anti-Yif1B antibody recognizes a unique protein of 34 Kda (= calculated molecular weight of Yif1B protein) with improved experimental procedure compared to Carrel et al. (2008) (see "*Materials and methods. Western blot experiments*"). Yif1B is detected in all CNS tissues. Each lane represents 0.5 μg of total protein. Western blot was reprobated with anti-tubulin antibody as control (bottom lane).

Figure 3. Cellular distribution of Yif1B in rat brain.

The protein Yif1B was detected by immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies on coronal brain sections. Images were converted in inverted gray. In some regions such as the caudate putamen (A) or CA1 of the Ammon's horn of the hippocampus (D), Yif1B labeling is observed as puncta mainly in neuronal somas (arrows). In regions such as the ventral pallidum (B), the neocortex (C), the medio dorsal thalamic nucleus (E), the arcuate hypothalamic nucleus (F), the superior colliculus (G) and the pontine nucleus (H), Yif1B immunostaining is detected as puncta (arrows) or strong perinuclear staining (double arrows) in somas and proximal dendrites. In the cerebellum (I), Yif1B appears concentrated in few cells in a juxta nuclear compartment in the granular layer (GL). In all regions, punctate Yif1B immunolabeling is also observed in neurites. Abbreviations, S, striosome, 3V, third ventricle, p, pyramidal cell layer, so, stratum oriens, sr, stratum radiatum, GL, granular layer, ML, molecular layer. Scale bar, 40 μm .

Figure 4. Neuronal distribution of Yif1B in rat neocortex.

Double immunofluorescence using anti-Yif1B (A) and anti-NeuN antibodies (B) shows that Yif1B immunostaining is present as dots or perinuclear staining in neurons (labeled with the nuclear markers NeuN) (C). Scale bar, 20 μm .

Figure 5. Expression pattern of Yif1B in midbrain, brainstem and cerebellum.

Yif1B is detected by immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies (A1, B1, C1, D1, E1) and its distribution compared with dopaminergic (A2, B2), noradrenergic (C2), serotonergic (D2) and mGluR2 positive neurons (E2) respectively in the substantia nigra (A) and the ventral tegmental area (B), locus coeruleus (C), dorsal raphe nucleus (D) and cerebellum (E). Yif1B immunofluorescence is detected in red in the substantia nigra (A1, SN), the ventral tegmental area (A2, VTA) and the locus coeruleus (A3, LC) whereas tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons are in green. In the median raphe nucleus (D1) and the cerebellum (E1), Yif1B expressing neurons are in green labeling and red fluorescence shows respectively serotonin (5-HT) in raphe (D2) and mGluR2 in cerebellum (E2). Merged pictures

show that if some of the Yif1B expressing neurons are dopaminergic in the VTA (B3, arrows for double immunostaining and arrowheads for Yif1B staining only, inset corresponds to enlargement (x3) of a double-labeled cell) most of them are respectively serotonergic in the median raphe nucleus (D3, arrows) and expressing mGluR2 in the cerebellum (E3, arrows). In substantia nigra (A3) and locus coeruleus (C3), neither dopaminergic nor noradrenergic neurons were expressing Yif1B. Scale bar, 40 μm .

Figure 6. Expression patterns of Yif1B in the hippocampus and the cerebral cortex.

Yif1B was detected by immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies (A1, B1) and its distribution compared with the Golgi compartment marker GM130 (A2, B2). A1-A3: In the pyramidal layer (CA1) of the Ammon's horn in the hippocampus, Yif1B labeling appears as dots in the cell soma (A1), and does not superimpose (A3) with GM130 (Golgi labeling, A2). B1-B3: In the cortex, Yif1B (B1) and GM130 (B2) labelings superimpose in some cells (see double-arrow in B3), suggesting that Yif1B is expressed in the Golgi compartment, whereas in other cells, no superimposition is observed and Yif1B immunolabeling exhibits the same "dotty" pattern (see arrow in B3) as in the hippocampus. Scale bar, 10 μm .

Figure 7. Localization of Yif1B in the endoplasmic reticulum.

Double immunofluorescence labeling of Yif1B (A) and calnexin (endoplasmic reticulum marker, B) in the CA1 layer of the Ammon's horn in the hippocampus on a summed (z projection) picture of 20 confocal planes. Although the size of vesicles endowed with Yif1B and calnexin immunolabelings in CA1 pyramidal cells are similar, superimposition of labelings reveals only a partial colocalization (C, merge of pictures A and B). At higher magnification (right panels: enlargement of boxes in C), some Yif1B immunopositive staining colocalized with the ER (arrows) but most of Yif1B immunopositive vesicles are present in another compartment (arrowheads). Scale bars, 10 μm (A) and 1 μm (right panels: enlargement of boxes in C).

Figure 8. Subcellular expression of Yif1B detected by immunogold electron microscopy.

Yif1B immunostaining is restricted to a sub-compartment of the Golgi apparatus: in saccules (A left-B, black arrows), in vesiculo-tubular structures (A right, black arrows) and in vesicles between the Golgi apparatus and the ER (B, white arrow). It is also present on ER cisternae (C, black arrows) or close to them (C, double arrow). Scale bars: 0.4 μm (A), 0.5 μm (B, C).

Figure 9. Yif1B expression in a sub-compartment of the Golgi apparatus.

Double immunofluorescence labeling of cerebellum sections, experiments with anti-Yif1B antibodies and antibodies against specific markers of the Golgi apparatus sub-compartments. Green labeling corresponds to Yif1B (A1, B1, C1), labelings of markers for cis-, medial- and trans-Golgi, respectively GM130 (A2), CTR433 (B2) and TGN38 (C2), are in red. Superimposition is shown at a low magnification (A3, B3, C3; scale bar, 10 μm) and squared boxes are enlarged in right panels (A4, B4, C4; scale bar, 2.5 μm). At low magnification, Yif1B seems to colocalize with all Golgi markers, however at high magnification, Yif1B colocalizes completely with the cis-Golgi marker (GM130, A4), but it is only juxtaposed to the medial- and trans-Golgi markers (B4, C4).

Figure 10. Yif1B expression in dendrites in cerebellar Golgi cells.

Double immunofluorescence labeling was performed on cerebellar cortex sections (A) using antibodies against Yif1B (A) and the dendritic marker MAP2 (B). The picture was taken at the junction between the granular and the molecular layers where neurons within the granular layer extend a proximal dendrite throughout the molecular layer. Yif1B and MAP-2 labelings are superimposed (C). Yif1B immunoreactive vesicles are localized on dendrites of neurons crossing the presented focal plane (arrows) or on the proximal dendrite of the Golgi cell (double arrows). GL, granular layer, ML, molecular layer. Scale bar, 5 μm .

Table 1. Quantification of Yif1B immunoreactive gold particles in subcellular compartments of cerebellar Golgi cells.

Immunogold particles were quantified in the nucleus, cytosol, Golgi apparatus and vesiculo-tubular structures (VTC), rough endoplasmic reticulum (RER) and in the region surrounding the RER. Numbers of immunogold particles are expressed per μm^2 of respective compartment surface. Yif1B expression is significantly enriched in the Golgi apparatus and VTC and within and around the RER compared to nucleus and cytosol (** $P < 0.001$ and ** $P < 0.005$ as determined by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test). $n = 6$.

For Peer Review

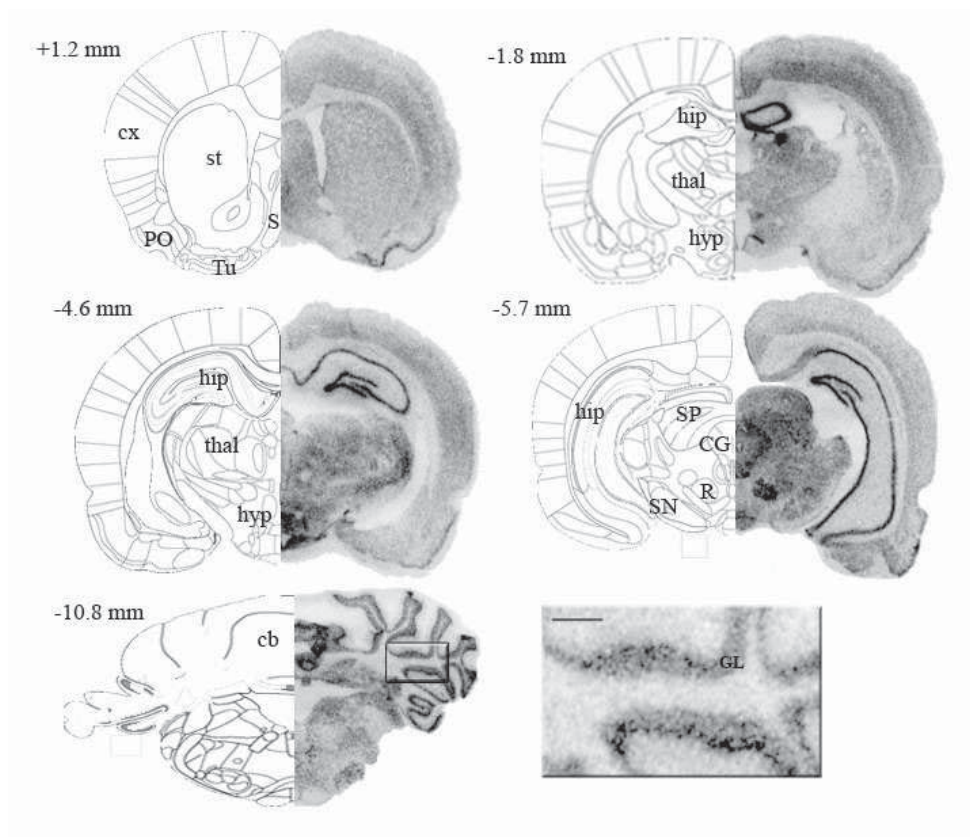


Figure 1. Expression of Yif1B mRNA in the rat brain.

Yif1B mRNA expression is visualized by in situ hybridization performed with Yif1B-antisense [³⁵S]cRNA probe on coronal brain sections at various antero-posterior levels [anterio-posterior distances from bregma according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson : +1.2 mm, -1.8 mm, -4.6 mm, -5.7 mm and -10.8 mm]. Brain atlas plates are presented with names of structures labelled with Yif1B probe : the neocortex (cx), the striatum (st), the septum (S), the primary olfactory cortex (PO) and the olfactory tubercle (Tu) at +1.2 mm; the hippocampus (hip), the thalamus (thal), the hypothalamus (hyp) at -1.8 mm and at -4.6 mm; the superior colliculi (SP), the periaqueductal grey (CG), the red nucleus (R) and the substantia nigra (SN) at -5.7 mm; the cerebellum (cb) and the brainstem at -10.8 mm.

Area within the rectangle in the cerebellum is enlarged in the bottom right panel. GL, granular layer.

Scale bar, 400 μ m.

119x101mm (153 x 153 DPI)

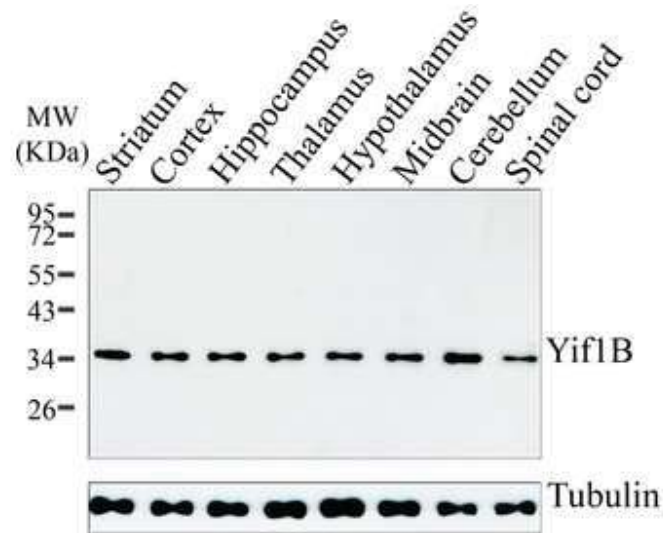


Figure 2. Regional distribution of Yif1B in the rat CNS.

Brain regions, cerebellum and spinal cord were dissected and tissues processed for western blot experiment with purified anti-Yif1B antibody (1:2000). Immunolabeled proteins were detected by chemiluminescence. Yif1B antibody recognizes a unique protein of 34 Kda (= calculated molecular weight of Yif1B protein) with improved experimental procedure compared to Carrel et al. (2008) (see "Materials and method. Western blot experiments"). Yif1B is detected in all CNS tissues. Each lane represents 0.5 μ g of total protein. Western blot was reprobed with tubulin antibody as control (bottom lane).

31x27mm (300 x 300 DPI)

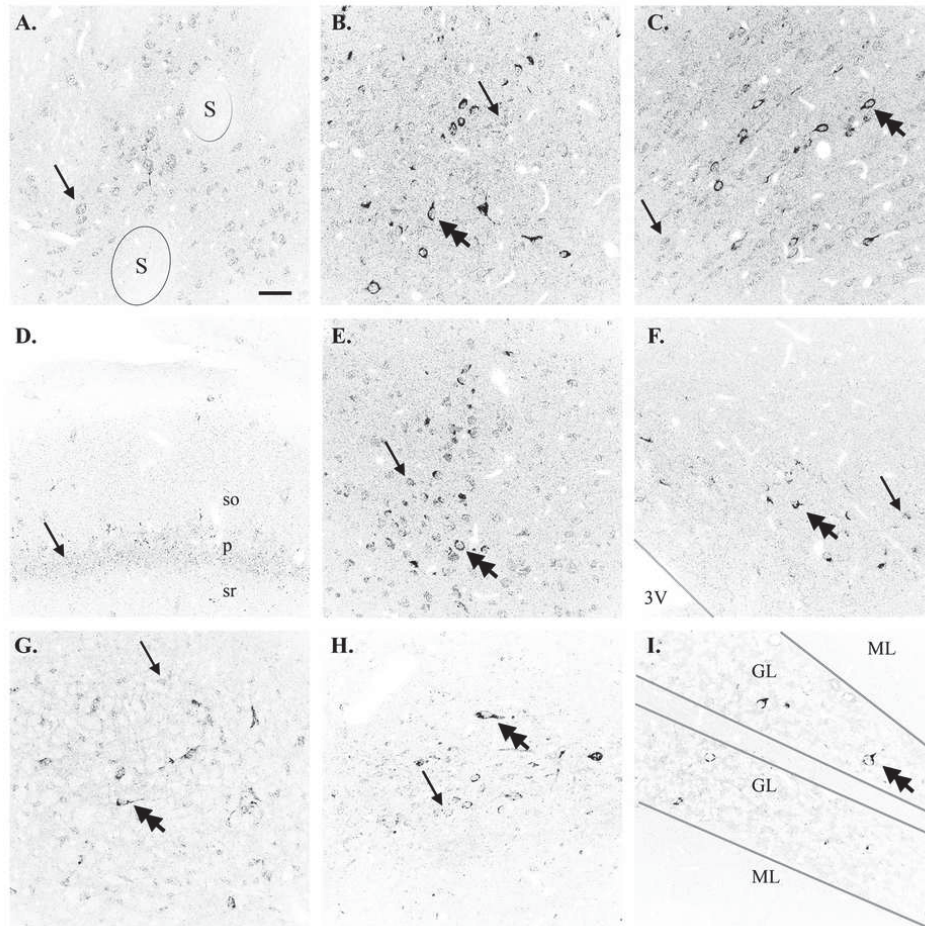


Figure 3. Cellular distribution of Yif1B in rat brain.

The protein Yif1B was detected by immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies on coronal brain sections. Images were converted in inverted gray. In some regions such as the caudate putamen (A) or CA1 of the Ammon's horn of the hippocampus (D), Yif1B labeling is observed as puncta mainly in neuronal somas (arrows). In regions such as the ventral pallidum (B), the neocortex (C), the medio dorsal thalamic nucleus (E), the arcuate hypothalamic nucleus (F), the superior colliculus (G) and the pontine nucleus (H), Yif1B immunostaining is detected as puncta (arrows) or strong perinuclear staining (double arrows) in somas and proximal dendrites. In the cerebellum (I), Yif1B appears concentrated in few cells in a juxta nuclear compartment in the granular layer (GL). In all regions, punctated Yif1B immunolabeling is also observed in neurites. Abbreviations, S, striosome, 3V, third ventricle, p, pyramidal cell layer, so, stratum oriens, sr, stratum radiatum, GL, granular layer, ML, molecular layer. Scale bar, 40 μ m.

81x81mm (300 x 300 DPI)

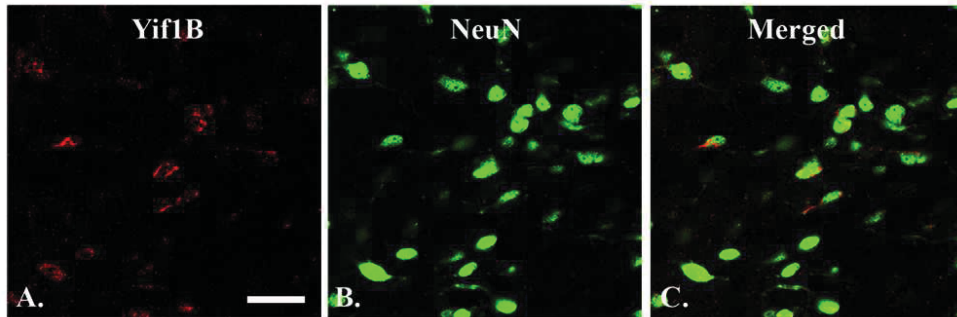


Figure 4. Neuronal distribution of Yif1B in rat neocortex. Double immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies (A) and an anti-NeuN antibody (B) shows that Yif1B immunostaining is present as dots or perinuclear staining in neurons (labelled with the nuclear markers NeuN) (C) Scale bar, 20 μ m.
84x29mm (300 x 300 DPI)

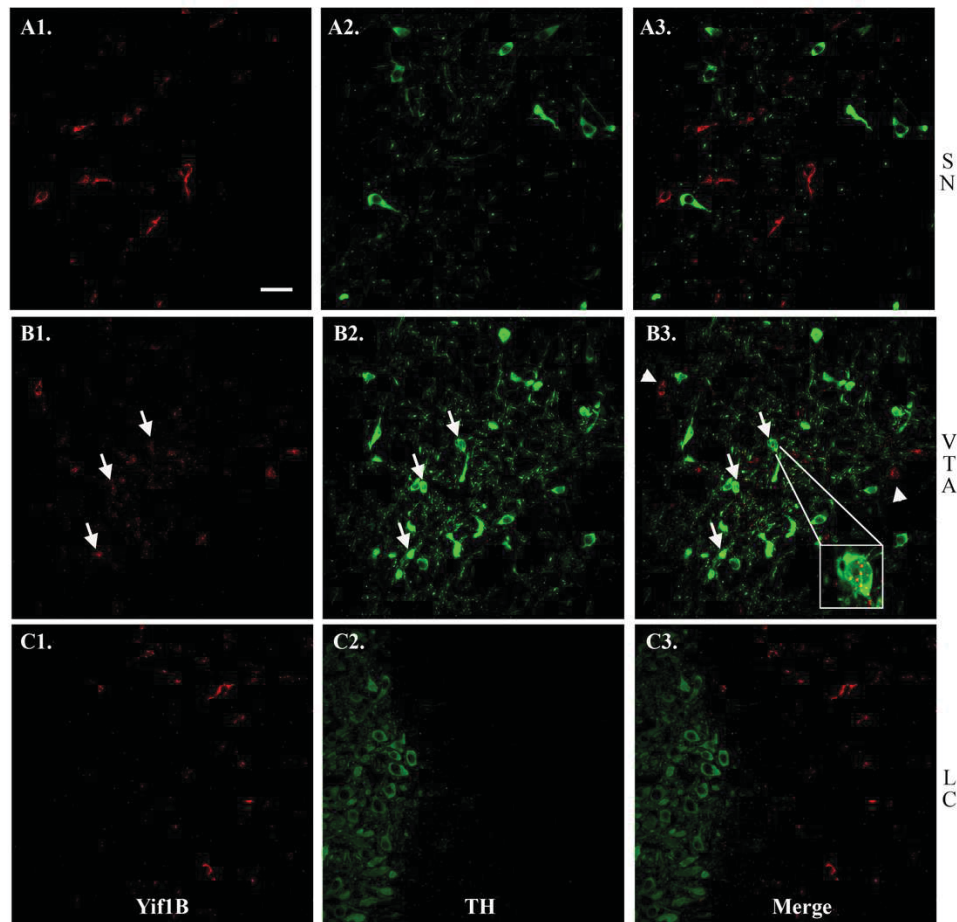


Figure 5. Expression pattern of Yif1B in midbrain, brainstem and cerebellum. Yif1B is detected by immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies (A1, B1, C1, D1, E1) and its distribution compared with dopaminergic (A2, B2), noradrenergic (C2), serotonergic (D2) and mGluR2 positive neurons (E2) respectively in the substantia nigra (A) and the ventral tegmental area (B), locus coeruleus (C), dorsal raphe nucleus (D) and cerebellum (E). Yif1B immunofluorescence is detected in red in the substantia nigra (A1, SN), the ventral tegmental area (A2, VTA) and the locus coeruleus (A3, LC) whereas tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons are in green. In the median raphe nucleus (D1) and the cerebellum (E1), Yif1B expressing neurons are in green labeling and red fluorescence shows respectively serotonin (5-HT) in raphe (D2) and mGluR2 in cerebellum (E2). Merged pictures show that if some of the Yif1B expressing neurons are dopaminergic in the VTA (B3, arrows for double immunostaining and arrowheads for Yif1B staining only, inset corresponds to enlargement (x3) of a double-labeled cell) most of them are respectively serotonergic in the median raphe nucleus (D3, arrows) and expressing mGluR2 in the cerebellum (E3, arrows). In substantia nigra (A3) and locus coeruleus (C3), neither dopaminergic nor noradrenergic neurons were expressing Yif1B. Scale bar, 40 μ m.
94x91mm (300 x 300 DPI)

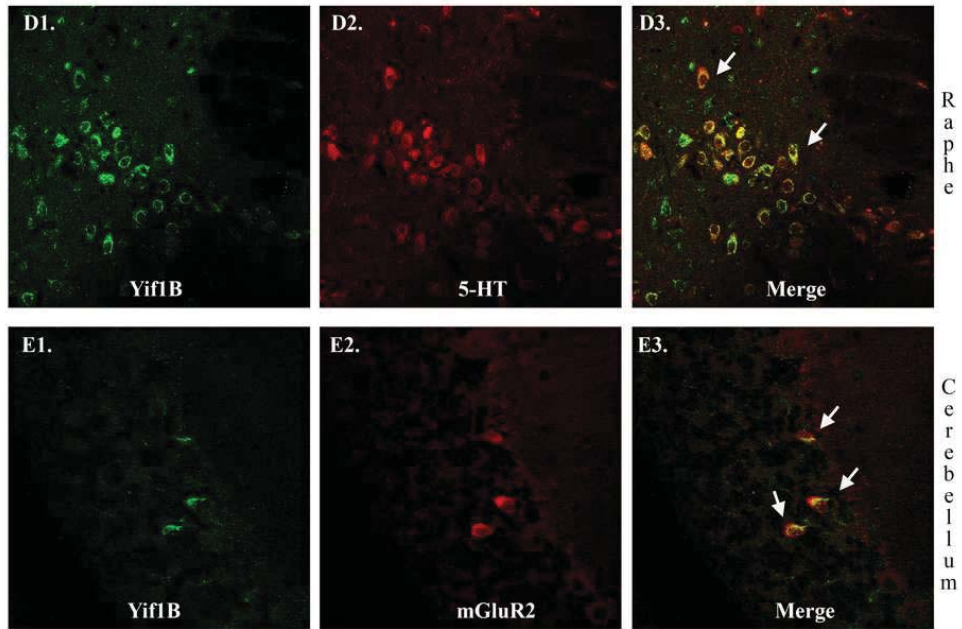


Figure 5 continued.
77x52mm (300 x 300 DPI)

Review

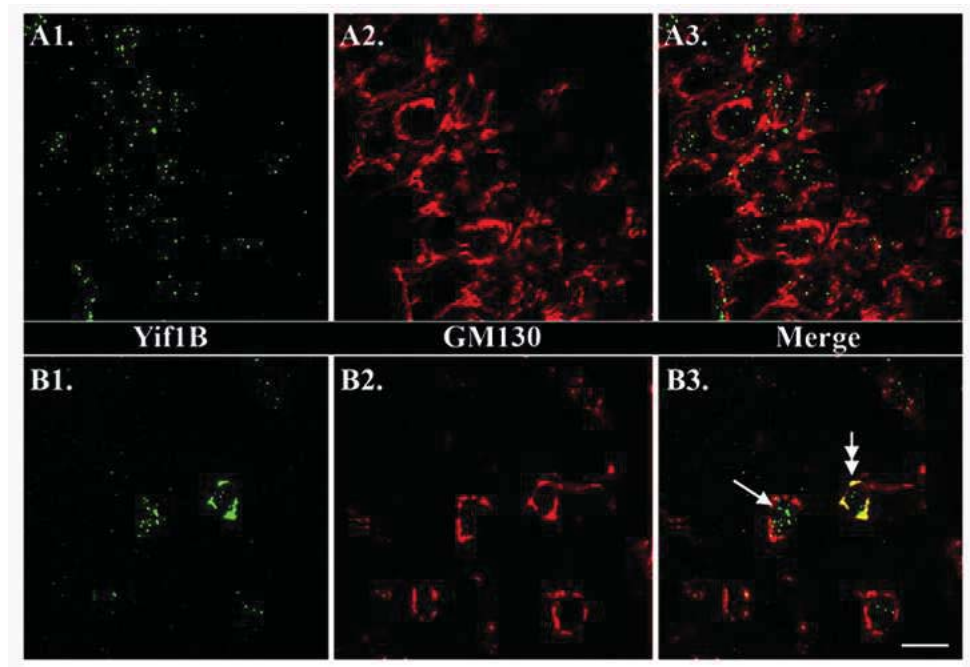


Figure 6. Expression patterns of Yif1B in the hippocampus and the cerebral cortex. Yif1B was detected by immunofluorescence using anti-Yif1B antibodies (A1, B1) and its distribution compared with the Golgi compartment marker GM130 (A2, B2). A1-A3: In the pyramidal layer (CA1) of the Ammon's horn in the hippocampus, Yif1B labeling appears as dots in the cell soma (A1), and does not superimpose (A3) with GM130 Golgi labeling (A2). B1-B3: In the cortex, Yif1B (B1) and GM130 (B2) labelings superimpose in some cells (see double-arrow in B3), suggesting that Yif1B is expressed in the Golgi compartment, whereas in other cells, no superimposition is observed and Yif1B immunolabeling exhibits the same "dotty" pattern (see arrow in B3) as in the hippocampus. Scale bar, 10 μ m.
61x42mm (300 x 300 DPI)

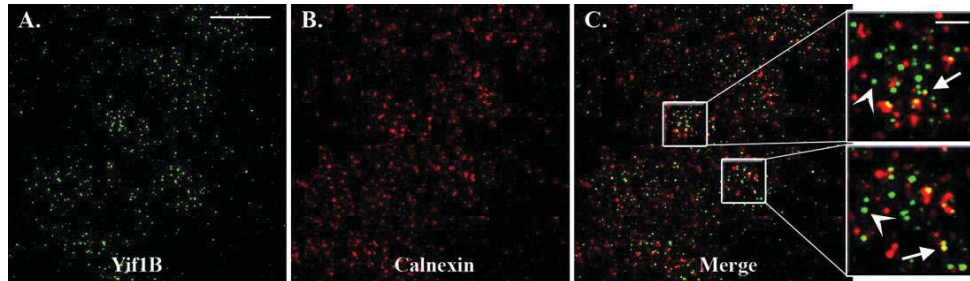


Figure 7. Localization of Yif1B in the endoplasmic reticulum.

Double immunofluorescence labeling of Yif1B (A) and calnexin (endoplasmic reticulum marker, B) in the CA1 layer of the Ammon's horn in the hippocampus on a summed (z projection) picture of 20 confocal planes. Although the size of vesicles endowed with Yif1B and calnexin immunolabelings in CA1 pyramidal cells are similar, superimposition of labelings reveals only a partial colocalization (C, merge of pictures A and B). At higher magnification (right panels: enlargement of boxes in C), some Yif1B immunopositive staining colocalized with the ER (arrows) but most of Yif1B immunopositive vesicles are present in another compartment (arrowheads). Scale bars, 10 μm (A) and 1 μm (right panels: enlargement of boxes in C).

134x38mm (208 x 208 DPI)

Peer Review

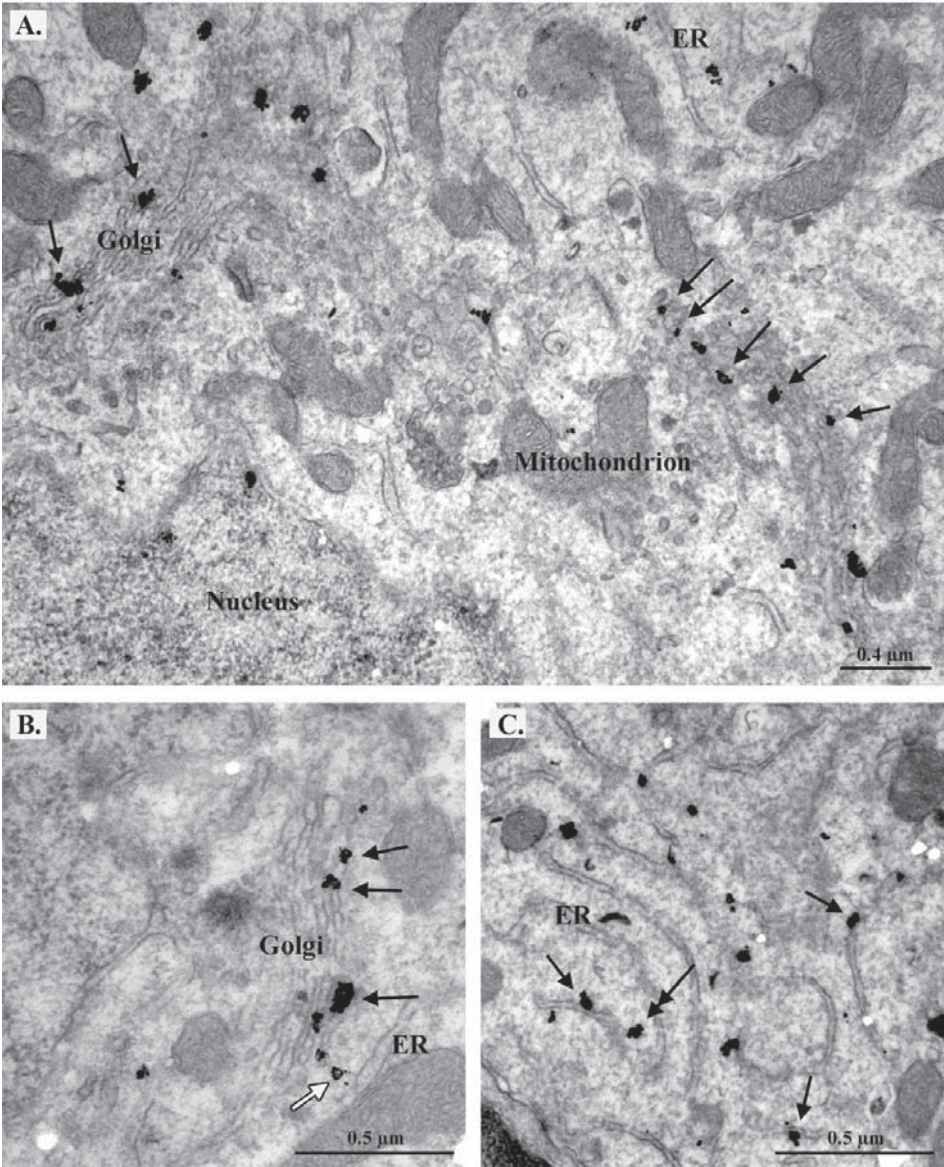


Figure 8. Subcellular expression of Yif1B detected by immunogold electron microscopy. 141x175mm (215 x 215 DPI)

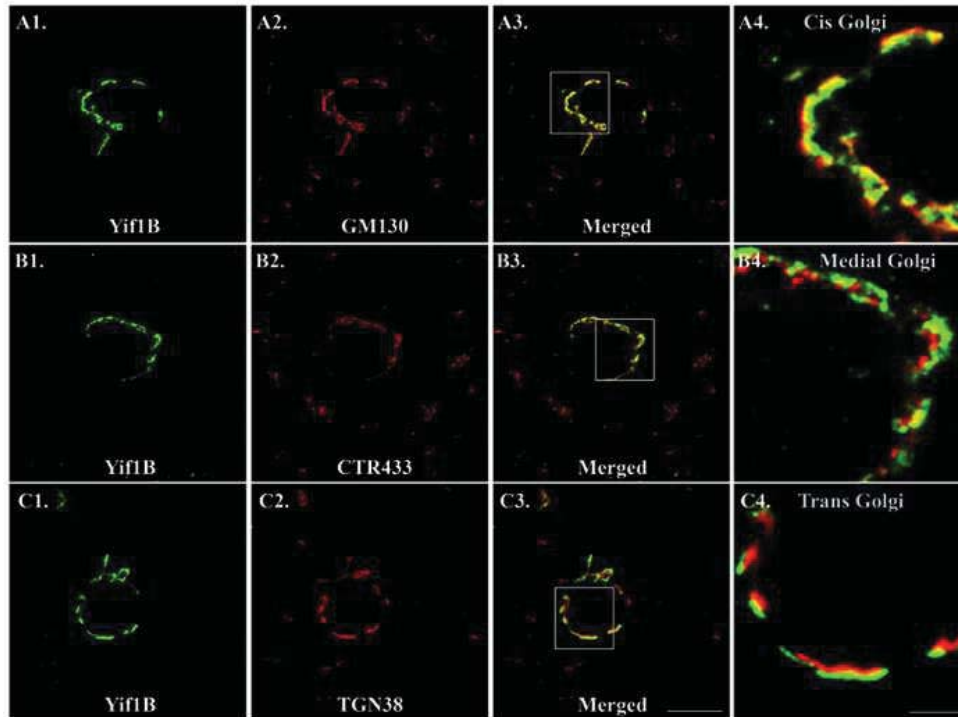


Figure 9. Yif1B expression in a sub-compartment of the Golgi apparatus. Double immunofluorescence labeling of cerebellum sections, experiments with anti-Yif1B antibodies and antibodies against specific markers of the Golgi apparatus sub-compartments. Green labeling corresponds to Yif1B (A1, B1, C1), labelings of markers for cis-, medial- and trans-Golgi, respectively GM130 (A2), CTR433 (B2) and TGN38 (C2), are in red. Superimposition is shown at a low magnification (A3, B3, C3; scale bar, 10 μ m) and squared boxes are enlarged in right panels (A4, B4, C4; scale bar, 2.5 μ m). At low magnification, Yif1B seems to colocalize with all Golgi makers, however at high magnification, Yif1B colocalizes completely with the cis-Golgi marker (GM130, A4), but it is only juxtaposed to the medial- and trans-Golgi markers (B4, C4).

59x44mm (300 x 300 DPI)

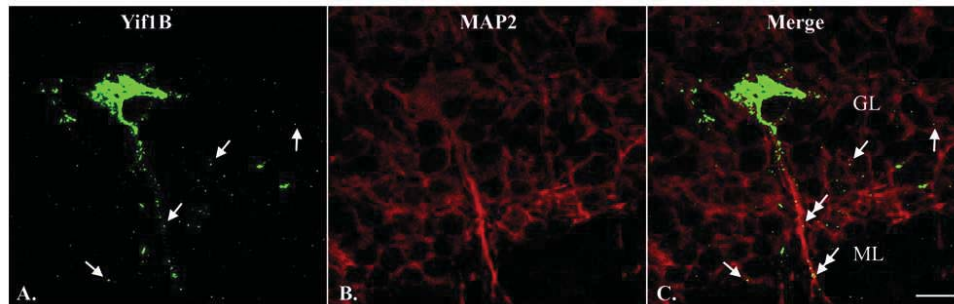


Figure 10. Yif1B expression in dendrites in cerebellar Golgi cells.

Double immunofluorescence labeling was performed on cerebellar cortex sections (A) using antibodies against Yif1B (A) and the dendritic marker MAP2 (B). The picture was taken at the junction between the granular and the molecular layers where neurons within the granular layer extend a proximal dendrite throughout the molecular layer. Yif1B and MAP-2 labelings are superimposed (C). Yif1B immunoreactive vesicles are localized on dendrites of neurons crossing the presented focal plane (arrows) or on the proximal dendrite of the Golgi cell (double arrows). GL, granular layer, ML, molecular layer. Scale bar, 5 μ m.

91x29mm (279 x 279 DPI)

Peer Review

Table 1.

	Number of gold particles/ μm^2 of surface compartment
Nucleus and cytosol	0.34 ± 0.08
Golgi apparatus and vesiculo-tubular compartment	7.16 ± 1.04 ***
Rough endoplasmic reticulum (RER)	5.71 ± 1.03 ***
In the proximity (<100 nm) of RER	3.09 ± 1.45 **

RESUME

Les autorécepteurs 5-HT_{1A} présents à la membrane somatodendritique des neurones du raphé jouent un rôle clé dans le délai d'action des antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) administrés en chronique. Ils constituent donc une cible en vue d'accélérer l'efficacité thérapeutique de ces psychotropes. A cette fin, je me suis appliquée à identifier et caractériser les protéines partenaires impliquées dans l'adressage membranaire dendritique du récepteur 5-HT_{1A} et sur lesquelles il devrait être possible d'agir pour moduler son activité. Des études antérieures menées au laboratoire ont montré le rôle de l'extrémité C-terminale cytosolique du récepteur 5-HT_{1A} dans son adressage polarisé et ont permis, par la technique de double hybride chez la levure, l'identification de Yif1B, première protéine interagissant avec cette extrémité.

Mon travail de thèse a comporté deux volets : le premier a abouti à la caractérisation de l'interaction entre le récepteur 5-HT_{1A} et sa protéine partenaire Yif1B. En combinant des approches de mutagenèse dirigée et de biochimie : GST-Pull Down et technologie de résonance plasmonique de surface (ou Biacore), j'ai pu mettre en évidence, dans l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{1A}, un motif tribasique en interaction directe avec trois résidus aspartate de l'extrémité N-terminale cytosolique de Yif1B. En parallèle, des résultats de l'équipe ont démontré le rôle déterminant de cette protéine Yif1B dans l'adressage dendritique du récepteur 5-HT_{1A}. Pour le deuxième volet de mon travail, je me suis appliquée à tenter d'élucider les mécanismes de ce routage spécifique. Ainsi, par une approche multidisciplinaire mêlant protéomique et biochimie, analyses topologiques sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe et vidéomicroscopie sur des neurones vivants, j'ai pu identifier une nouvelle voie d'adressage dendritique dans laquelle Yif1B est la protéine d'échafaudage qui assemble le récepteur 5-HT_{1A} avec Yip1A et Rab6, les autres partenaires du complexe cargo vésiculaire qui transporte le récepteur le long des microtubules dendritiques. L'identification des moteurs moléculaires impliqués dans le transport bidirectionnel du récepteur 5-HT_{1A} dans les dendrites distales constitue le dernier objectif de mon travail de thèse.

Les perspectives ouvertes par ce travail concernent d'une part la généralisation éventuelle du rôle de Yif1B dans le trafic intracellulaire d'autres récepteurs, et d'autre part la conception d'un peptide mimétique inhibant spécifiquement l'interaction « récepteur 5-HT_{1A}/Yif1B ». Un tel peptide pourrait, en réalité, être un premier outil pharmacologique pour affecter l'activité du récepteur 5-HT_{1A} via une perturbation de son adressage.