



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 092**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03767876 .0**
96 Fecha de presentación : **31.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1556489**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Composición farmacéutica para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva o con la obesidad.**

30 Prioridad: **31.10.2002 FR 02 13725**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2011

73 Titular/es: **Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

72 Inventor/es: **Compan, Valérie**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 362 092 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva o con la obesidad

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento y de la prevención de las enfermedades relacionadas con conductas obsesivas tales como la anorexia, la bulimia y la adicción a los fármacos de abuso, asociadas o no con el estrés así como al campo del tratamiento y de la prevención de la obesidad. La presente invención se refiere, de una manera más particular a la utilización de un ligando del receptor 5-HT₄ para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de dichas enfermedades tales como la bulimia, la anorexia, la adicción a los fármacos de abuso y/o la obesidad.

10 Los trastornos alimentarios coexisten con la ansiedad y con la depresión y representan una inquietud creciente de los países desarrollados (Garrow, 1991; Kuczmarski et al., 1994). Como ocurre en la mayor parte de las patologías neuropsiquiátricas, la combinación de la influencia de los factores del medio ambiente y de una predisposición genética parece ser la responsable de estas deficiencias del comportamiento (Fairburn et al., 1998; Lilenfeld et al., 1998; Barsh et al., 2000). Las madres del 75 % de las mujeres anoréxicas sufren depresión o son alcohólicas, un
15 año antes de la expresión de los síntomas de su hija. De igual modo, el síndrome anoréxico es detectado de una manera más frecuente en una misma familia que en la población general sin que haya sido definido un gen relacionado con esta patología. Las conductas bulímicas, que son frecuentemente concomitantes de la anorexia en el caso de un mismo individuo, están caracterizadas por fases impulsivas y repetidas de ingestión de una cantidad elevada de alimentos.

20 De este modo, la bulimia está clasificada entre las conductas relacionadas con la adicción (Definiciones Internacionales de Psiquiatría, DSM). El alimento puede ser considerado como una recompensa, cuya obtención reposa en la voluntad (« wanting »: motivación apetito/incentivo) y está motivada por una componente relacionada con el hedonismo (« Liking: pleasure/palatability ») (Hoebel, 1997; Salamone et al., 1997; Strataford and Kelley, 1997; Strataford and Kelley, 1999). El exceso o la ausencia de ingesta de alimentos no está limitado únicamente a
25 las deficiencias metabólicas y/o endocrinas, sino que depende también del estrés (Donohoe, 1984; Morley et al., 1983; Vergoni and Bertolini, 2000), de la ansiedad (Godart et al., 2000) y de la depresión (Viessalman and Roig, 1985; Casper, 1998).

El hipotálamo, la amígdala y el hipocampo están implicados en la regulación del consumo de alimentos. Por otra parte, la actividad de las neuronas del núcleo accumbens es modificada durante la anticipación o después de la
30 obtención de una recompensa clásica como el alimento o los fármacos de abuso (Di Chiara, 1995; Hoebel, 1997; Koob and Nestler, 1997; Salamone et al., 1997).

Aún cuando una emergencia de descubrimientos muestra las implicaciones de numerosos péptidos en la regulación de los comportamientos alimentarios (Leptina, Orexinas/hipocretinas, CART, NPY, POMC, CRH, TRH), las influencias de los neurotransmisores clásicos como la serotonina (5-HT) y la dopamina (DA) siguen siendo
35 imprescindibles. De igual modo, deben ser tenidos en consideración el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato (Taber and Fibiger, 1997; Kelley and Swanson, 1997; Strataford and Kelley, 1997; Strataford et al., 1998).

Los sistemas dopaminérgicos del núcleo accumbens están implicados en la anticipación de una recompensa (fármacos de abuso, alimentos). Una administración crónica de clozapina, antagonista de los receptores de la dopamina postsináptica (DA), induce una hiperfagia (Ackerman and Nolan, 1998; Allison et al., 1999). La cocaína y
40 la anfetamina, conocidas por aumentar la transmisión de la DA, son anoréxicas (Foltin and Evans, 1999).

Sin embargo, los sistemas serotoninérgicos siguen siendo un eslabón inevitable que controla la ingesta alimentaria (Barnes and Sharp, 1999) debido a la utilización de la fenfluramina, que es un inhibidor de la captura de la serotonina en el caso de los pacientes obesos (Guy - Grand B, 1995).

45 En resumen, parece ser que las deficiencias de las combinaciones de interacciones entre factores del medio ambiente (estrés) y factores genéticos (genes que codifican receptores que están presentes en el cerebro) son responsables de los trastornos del comportamiento como la bulimia, la anorexia o la adicción a los fármacos de abuso. Estas patologías, y de manera mas evidente, la bulimia es considerada en la actualidad como una conducta toxicómana.

50 En el plano neurobiológico, el estado de nuestros conocimientos favorece la intervención combinada de varios sistemas neuronales para regular los comportamientos alimentarios. Los más conocidos son los sistemas serotoninérgicos que expresan el mensajero cerebral (neurotransmisor) que es el 5-HT. Las áreas cerebrales en las que se manifiestan sus acciones son principalmente el hipotálamo, la amígdala y el núcleo accumbens.

La relación exacta entre los efectos del estrés y el 5-HT se ha revelado compleja como consecuencia de las influencias recíprocas entre las actividades de los sistemas serotoninérgicos y del eje hipotálamo-hipofisario (Chaouloff F., 2000). Por el contrario, la aplicación de un estrés provoca aumentos de la transmisión serotoninérgica.

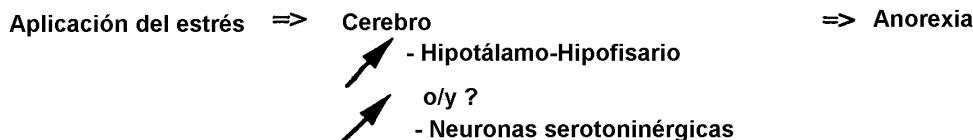
5 El estrés provoca elevaciones de la transmisión serotoninérgica. Los paradigmas experimentales en los que el estrés está asociado con una temor condicionado, que provoca un aumento del metabolismo y de la liberación del 5-HT en el cortex prefrontal mediano (Adell et al., 1997; Inoue et al., 1994), el núcleo accumbens (Inoue et al., 1994; Ge et al., 1997), la amígdala (Amat et al., 1998) y el hipocampo dorsal (Ge et al., 1997; Joseph and Kennett, 1983). En particular, el estrés de coacción (inmovilización forzada) aumenta la renovación del 5-HT en el hipotálamo y la amígdala de la rata y del ratón (Konstandi et al., 2000). De la misma manera, la acción del « Corticotropin Releasing hormone or Factor » (CRF) sobre las neuronas serotoninérgicas del sistema corticomesolímbico podría modificar las 10 tasas del 5-HT (Lowry et al., 2000; Price and Lucki, 2001). Por otra parte, las alteraciones del funcionamiento de los receptores de los glucocorticoides provocan variaciones de la concentración del 5-HT en el núcleo accumbens (Sillaber et al., 1998). De la misma manera, la inyección repetida de corticosterona aumenta la activación de las neuronas del hipocampo (CA1) inducida por un agonista del receptor 5-HT₄ (Zahorodna et al., 2000). Por último, 15 numerosos estudios suponen que el factor de liberación de la corticotrofina CRF es responsable del efecto anorexígeno de un estrés. En particular, la inyección intracerebroventricular de CRF induce una disminución de la ingesta alimentaria en el caso del ratón (Momose et al., 1999).

20 La serotonina inhibe la ingesta alimentaria. Los aspectos farmacológicos combinados con las estrategias de la transgénesis indican que los receptores 5-HT_{1A/1B} y 5-HT_{2A/2C} están implicados en la regulación de la ingesta alimentaria y, por otra parte, del estrés (Bonasera y Tecott, 2000; Bouwknecht et al., 2001; Dourish et al., 1986; Heisler et al., 1998; Lucas et al., 1998; Samanin y Garatini, 1996). Se supone, entonces, que la anorexia relacionada con el estrés da como resultado el aumento de la actividad de las neuronas serotoninérgicas. Numerosos estudios atribuyen el efecto anorexígeno de la fenfluramina a la activación del receptor 5-HT_{1B} mientras que la del receptor 5-HT_{1A} (autorreceptor), inhibidora de la liberación de 5-HT, induce una elevación de la ingesta 25 alimentaria. La inestabilidad de los ratones desprovistos del receptor 5-HT_{1B} a la inyección de la fenfluramina confirma su implicación en la regulación de la ingesta alimentaria (Lucas et al., 1998). De la misma manera, los receptores 5-HT_{2C} intervienen en el consumo de alimentos puesto que los ratones, que carecen de los mismos, se han revelado obesos (Heisler et al., 1998). La leptina es conocida para disminuir la ingesta alimentaria, pero no está asociada con esta obesidad (Nonogaki et al., 1998).

30 Un estudio reciente muestra que los receptores 5-HT_{2C} también son responsables del efecto anorexígeno de la fenfluramina (Vickers et al., 2001). Por último, la administración del tropisetron, antagonista de los receptores 5-HT₃ y 5-HT₄, aumenta la ingesta alimentaria de un régimen modificado por un solo aminoácido (Ereclus et al., 1996) pero este efecto ha sido atribuido al receptor 5-HT₃ (Jiang and Gietzen, 1994). Por lo tanto, en la actualidad no se dispone de cualquier dato sobre la contribución del receptor 5-HT₄ en la ingesta alimentaria.

35 En resumen, la hipótesis corriente para explicar que un estrés disminuye la ingesta alimentaria se basa en dos series de estudios paralelos. El primero describe que el estrés aumenta la actividad del eje hipotálamo-hipofisario ("estrés axis") y de las neuronas serotoninérgicas. Por otra parte, la hiperactividad del eje hipotálamo-hipofisario provoca el aumento de las tasas de hormonas como el CRF, la urocortina y, en una última etapa, de la corticosterona. La segunda serie de análisis muestra que las hormonas del eje del estrés y el 5-HT inhiben la ingesta 40 alimentaria.

Como consecuencia, numerosos autores proponen la secuencia de acontecimientos siguiente:



45 El conjunto de los receptores del 5-HT está emparejado con las proteínas G con excepción del receptor 5-HT₃ que es un canal iónico (Saudou and Hen, 1994). Los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, y 5-HT_{1F} están emparejados negativamente con la adenilato ciclasa y presentan una fuerte afinidad para el 5-HT. La activación de los receptores 5-HT₂ estimula la actividad de la fosfolipasa C (5-HT_{2A/2C}). Los otros receptores del 5-HT están

positivamente emparejados con la adenilato ciclasa e incluyen el 5-HT₄, 5-HT_{droi} en el caso de la drosophile, y los receptores 5-HT₆ y 5-HT₇ en el caso de los mamíferos. El receptor 5-HT₄ ha sido descrito por primera vez en los colículos (Dumuis et al., 1988) y su estimulación provoca una elevación de las tasas de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico AMPc en el hipocampo, en el cortex cerebral, en el atrio y en el esófago. En el caso de los seres humanos, nueve subtipos de receptores 5-HT₄ denominados 5-HT_{4A}, 5-HT_{4B}, 5-HT_{4C}, 5-HT_{4D}, 5-HT_{4E}, 5-HT_{4F}, 5-HT_{4G}, 5-HT_{4BH} y 5-HT_{4N} se diferencian en su extremidad C-terminal (Bockaert et al., 2003, en prensa, para revisión). El sistema de transducción de los receptores 5-HT_{5A} está asociado positivamente con la adenilato ciclasa. En del 5-HT_{5B} no ha sido definido todavía.

Las influencias funcionales de los receptores 5-HT₄ han sido muy estudiadas en el tracto gastrointestinal, pero se dispone de pocos datos sobre su contribución en el cerebro. En el conjunto de las estructuras del encéfalo de los roedores y de los seres humanos, han sido detectadas las densidades más fuertes del receptor 5-HT₄ en el sistema límbico (Waeber et al., 1994). En particular, su concentración es tres veces mayor en la corteza « shell » que en el núcleo « core » del núcleo accumbens (Compan et al., 1996). En el cerebro de los roedores, su tasa varía durante el desarrollo y únicamente alcanza su nivel adulto el 21º día después del nacimiento (Waeber et al., 1994). Las tasas más elevadas en el encéfalo de rata de los ARNm, que codifican el receptor 5-HT₄, se encuentran en el sistema olfativo, en el striatum, en el núcleo accumbens, en la habénula y en el hipocampo (Gerald et al., 1995; Ulmer et al., 1996; Vilaro et al., 1996).

Los agonistas de los receptores 5-HT₄ provocan una disminución de las deficiencias de memorización y mejoran el aprendizaje por medio de la puesta en juego de la transmisión de la acetilcolina (Bockaert J et al., 1998). Se tiende a suponer que el receptor 5-HT₄ puede tomar parte en los mecanismos neuronales del núcleo accumbens relacionados con el aprendizaje alimentario. Cuatro estudios farmacológicos han puesto de manifiesto una baja contribución del receptor 5-HT₄ en el estado de « ansiedad » de la rata y del ratón (Cheng et al., 1994; Silvestre et al., 1996; Kennett et al., 1997; Costall and Naylor, 1997). La inhibición del receptor 5-HT₄ provoca disminuciones de la actividad locomotriz en el caso de la rata en condiciones basales (Fontana et al., 1997), en el caso del ratón joven con una edad comprendida entre 20 y 27 días (Semenova and Ticku, 1992) y puede atenuar la hiperlocomoción inducida por la cocaína (Mc Mahon and Cunningham, 1999).

Se ha descrito el control serotoninérgico de las tasas de la dopamina DA extracelular por la activación del receptor 5-HT₄ En el striatum, a la vez como excitador o como inhibidor

(Bonhomme et al., 1995; Steward et al., 1996; Deurwaerdere et al., 1997).

Por último, la estimulación del receptor 5-HT₄ induce un cierre de los canales iónicos del potasio (Bockaert et al., 1998), lo cual es susceptible de mantener la excitabilidad de las neuronas y de aumentar la liberación de los neurotransmisores. De conformidad con este dato, la estimulación de los receptores 5-HT₄ conduce a una elevación de las tasas de 5-HT extracelular en el hipocampo.

En resumen, en el plano neurobiológico, se sabe que los receptores 5-HT₄ intervienen en el aprendizaje y en la memoria. Su posible contribución en los comportamientos motores y en el estado de ansiedad ha sido actualmente descrita como moderada y se ha revelado poco estudiada. Solamente un estudio indica que este receptor puede intervenir en el efecto de la cocaína sobre la actividad locomotriz.

Por otra parte, la solicitud de patente internacional publicada bajo el número WO 97/29739 describe la utilización de antagonistas del receptor 5-HT₄ para la preparación de un medicamento destinado a evitar, a aligerar, a suprimir o a reprimir los efectos gastrointestinales provocados por un inhibidor selectivo de la reasimilación de la serotonina. La solicitud de patente internacional publicada bajo el número WO 02/11766 describe la utilización de antagonistas del receptor 5-HT₄ en la profilaxis o en el tratamiento de ciertas condiciones dado cardiovasculares.

El documento de los autores Bockaert y al (2003) "New view on the ligando-receptor interacción" European Neuropsychopharmacology, vol 13, no. Suplemento 4, septiembre 2003, describe que los receptor 5HT-4 están caracterizados por la existencia de 9 variantes de empalme. De igual modo, este documento describe la identificación y el ensayo de diferentes ligandos capaces de enlazarse con el receptor y sus efectos sobre la señalización celular.

La publicación de la solicitud internacional WO 00/64441 describe la utilización como medicamento de los compuestos que tienen una actividad agonista sobre el receptor 5-HT₄ y la utilización dichos compuestos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de la broncoconstricción.

La publicación de la solicitud internacional WO 00/77199 describe una molécula de aislamiento de ácido nucleico que codifica el receptor 5-HT₄ humano y vectores de expresión que incorporan dicho ácido nucleico para la preparación de un fármaco.

De manera sorprendente, el inventor ha mostrado que la ausencia del gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina a partir del período embrionario ha convertido a los ratones adultos menos sensibles a un estrés anorexígeno que los animales silvestres. En otros términos, algunos tipos de estrés disminuyen la ingesta alimentaria en el caso de de los ratones silvestres, pero son menos eficaces en el caso de de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄. Por lo tanto, en ausencia de este receptor, los ratones consumen más alimentos que los congéneres no genéticamente modificados.

Puesto que el estrés contribuye a la aparición de la anorexia, acompañada por la bulimia y que acrecienta la sensibilidad a los fármacos de abuso, el inventor ha propuesto que los ligandos del receptor 5-HT₄ pueden atenuar la manifestación de estas patologías (Anorexia, Bulimia, Adicción a los fármacos de abuso asociadas o no con el estrés).

En la presente invención, se entiende por « receptor 5-HT₄ » uno cualquiera de los subtipos (o variantes de empalme) del receptor 5-HT₄ tales como los receptores 5-HT_{4A}, 5-HT_{4B}, 5-HT_{4C}, 5-HT_{4D}, 5-HT_{4E}, 5-HT_{4F}, 5-HT_{4G}, 5-HT_{4BH} y 5-HT_{4N}.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a la utilización de un agonista del receptor 5-HT₄ elegido entre las 6 clases químicas que son los indoles, las benzamidas, el benzoato, las aril-cetonas, las bencimidazolonas y las 1,8-naftilamidas o un sal farmacéuticamente aceptable de este agonista para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la bulimia y/o la obesidad, o de un antagonista elegido entre las 6 clases químicas que son los carboxilatos de indol, las imidazolonas, las aril-cetonas, las bencimidazolonas y las 1,8-naftilamidas o agonista inverso del receptor 5-HT₄ o de un sal farmacéuticamente aceptable de estos para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la anorexia o la adicción a los fármacos de abuso.

Se entiende por « una patología relacionada con una conducta obsesiva », aquellas patologías que implican trastornos alimentarios y, de una manera muy particular, la anorexia, la bulimia y la adicción a los fármacos de abuso, que están relacionadas o no con el estrés.

El ligando del receptor 5-HT₄ que es utilizado en el ámbito de la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva y/o la obesidad no es, de manera preferente, un ligando del receptor 5-HT₃ y es un ligando específico del receptor 5-HT₄.

Tal como el inventor ha puesto en evidencia que el receptor 5-HT₄ está implicado en el efecto anorexígeno del estrés, puede ser comprendido fácilmente por el técnico en la materia, que la utilización de un agonista de este receptor permitirá llevar a cabo la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la bulimia, mientras que un antagonista o incluso, un agonista inverso de este receptor servirá para llevar a cabo la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva elegida del grupo que está constituido por la anorexia y por la adicción a los fármacos de abuso.

En el ámbito de la presente, se entiende por:

- Agonista: cualquier molécula capaz de engendrar por medio de su enlace con sus receptores, una respuesta biológica semejante a un mediador endógeno.
- Antagonista: cualquier molécula capaz de bloquear la acción de los agonistas.
- Agonista inverso: cualquier molécula capaz de inhibir la actividad intrínseca (o basal) del receptor.

Los autores Bockaert et al. (1997) han descrito la estructura química de los agonistas y de los antagonistas del receptor 5-HT₄. Los agonistas descritos pertenecen a 6 clases químicas que son los indoles, las benzamidas, el benzoato, las aril-cetonas, las bencimidazolonas y las 1,8-naftilamidas. Los antagonistas descritos pertenecen a 5 clases químicas que son los carboxilatos de indol, la imidazolpiridina, los benzoatos, las aril-cetonas, las bencimidazolonas y las 1,8-naftilamidas. Estos agonistas y antagonistas son utilizados en el ámbito de la presente invención. De igual modo, pueden ser utilizados en el ámbito de la presente invención los agonistas inversos descritos en la publicación de los autores Caliesen et al., (2001) y en la publicación de los autores Joubert et al. (2002).

Por otra parte, las solicitudes de patente internacionales publicadas bajo los números WO 97/29739 y WO 02/11766 y la solicitud de patente internacional publicada bajo el número WO 02/36113 describen, respectivamente, antagonistas y agonistas del receptor 5-HT₄ que pueden ser utilizados, de igual modo, en el ámbito de la presente invención.

- Los agonistas que pueden ser utilizados en el ámbito de la presente invención son elegidos en el grupo que comprende la metoclopramida, el HTF919 (hidrógenomaleato de 3-(5-metoxi-1*H*-indol-3-ilmetileno)-*N*-pentilcarbrazimida-amida), el LS650155, el BRL 20627, el BRL 24682, el BRL 24924, la cisaprida (Carlsson et al., 1997), el ML 1035 (el hidrocloreto de la 4-amino-5-cloro-2-[2-(metilsulfonil)-etoxi]-*N*-[2-(diethylamino)etil]-benzamida), la mosaprida (Carlsson et al., 1997), el R076186, la renzaprida, el RS 67506 (hidrocloreto de 1-(4-amino-5-cloro-2-metoxifenil)-3-[1-(2-metil sulfonilamino)etil-4-piperidinil]-1-propanona), la cinitaprida, el SB 205149, el SC 49518 (N-[exo-(hexahidro-1*H*-pirrolizina-1-il)metil]-2-metoxi-4-amino-5-clorobenzamida HCl), el SC 52491, el SC 53116 (4-amino-5-cloro-*N*-[(hexahidro-1*H*-pirrolizina-1-il)metil]2-metoxibenzamida), el SDZ 216454, el TKS 159 (4-amino-5-cloro-2-metoxi-*N*-[(2*S*,4*S*)-1-etil-2-hidroximetil-4-pirrolidinil] benzamida), el Y 34959, el YM 09151 (N-(1-bencil-2-metilpirrolidina-3-il)-5-cloro-2-metoxi-4-metilaminobenzamida), el YM 47813, la zacoprida (4-amino-5-cloro-2-metoxi-*N*-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzamida), el ML 10302 (2-piperidinoetil 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato), el RS 57639, el SR 59768 (2-[(3*S*)-3-hidroxi-piperidino]etil 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato), el ADR 932, la prucaloprida (R093877; monohidrocloreto de la 4-amino-5-cloro-2,3-dihidro-*N*-[1-(3-metoxi propil)-4-piperidinil]-7-benzofuranocarboxamida), el SK 951, el RS 67333 (1-(4-amino-5-cloro-2-metoxifenil)-3-(1-*n*-butil-4-piperidinil)-1-propanona), el RS 17017, el RS 56532, el YM 53389, el BIMU1 (3-etil-2,3-dihidro-*N*-[endo-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il]-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-carboxamida), el BIMU8 (endo-*N*-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,3-dehido-2-oxo-3-(prop-2-il)-1*H*-benzimidazol-1-carboxamida), el DAU 6215 (cloruro de (3- α -tropanil)1*H*-benzimidazolona-3-carboxamida), el DAU 6236, la 5-metoxitriptamina, la 2-metilserotonina y la 5-hidroxi-*N*,*N*-dimetiltriptamina y la 5-carboxamidotriptamina.
- Los antagonistas que pueden ser utilizados en el ámbito de la presente invención son elegidos, de manera ventajosa, en el grupo que comprende el tropisetron (ICS 205 930; [éster de (3*a* tropanilo) del ácido 1*H*-indol-3-carboxílico]), el RS 100235 (1-(8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxan-5-il)-3-[[3,4-dimetoxifenil]prop-1-il]piperidin-4-il]propan-1-ona), el RS 39606, el A-85380 (3-(2*S*)-azetidilmetoxi)piridina), el GR 113808 (1-metil-1*H*-indol-3-carboxilato de 1-[2-[(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil]metilo), el GR 125487 (5-fluoro-2-metoxi-1*H*-indol-3-carboxilato de 1-[(2-[(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil]metilo), el GR 138897 ([2-(3-metil-1,2,4-oxadiazol-5-il)fenil]carbamato de [1-[2-[(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil]metilo), el SB 203186 (1*H*-indol 3-carboxilato de 1-piperidinil)etilo), el SDZ 205-557 éster de 2-(diethylamino) etil del ácido 2-metoxi-4-amino-5-clorobenzoico, hidrocloreto, el LY 353433 (1,(1-metiletil)-*N*-(2-(4-((tricyclo[2-(3.3.1.1^{3,7})dec-1-ilcarbonil)amino)-1-piperidinil)etil)-1*H*-indazol-3-carboxamida), el LY 297582, el RS 23597 (hidrocloreto de propil-4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de 3-(piperidina-1-ilo), el SB 204070 (8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxan-5-carboxilato 1-butil-4-piperidil)metilo), el DAU 6285 (hidrocloreto de 2,3-dihidro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-carboxilato de (*endo*-6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo [3.2.1] oct 3-ilo)), el SC 53606 (hidrocloreto de 1-*S*,8-*S*)-*N*-[(hexahidro-1*H*-pirrolizina-1-il)metil]-6-cloroimidazol[1,2-*a*]piridina-8-carboxamida), el SC 56184, el RS 67532 (1-(4-amino-5-cloro-2-(3,5-dimetoxi benciloxifenil)-5-(1-piperidinil)-1-pentanona), el GR 125487 (hidrocloreto de 5-fluoro-2-metoxi-1*H*-indol-3-carboxilato de 1-[2(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperidinil] metilo), el SB 207058, el SB 207266 (N-[(1-ⁿbutil-4-piperidinil)metil]-3,4-dihidro-2*H*-[1,3]oxazino[3,2-*a*]indol-10-carboxamida), el LY 297582, el RS 39604 (1-[4-amino-5-cloro-2-(3,5-dimetoxifenil)metiloxi]-3-[1[2-metilsulfonilamino]etil]piperidina-4-il]propan-1-ona), el RS 1003002 (N-(2-(4-(3-(8-amino-7-cloro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-5-il)-3-oxopropil)piperidin-1-il)etil)-metanosulfonamida), el ML 10375 (4-amino-5-cloro-2 metoxibenzoato de 2-(*cis*-3,5-dimetilpiperidino) etilo), el SB 207710 (8-amino-7-yodo-1,4-benzodioxan-5-carboxilato de 1-butil-4-piperidinil)metilo), el SB 205800 (N-(1-butil-4-piperidil)metil-8-amino-7-cloro-1,4-benzodioxan-5-carboxamida), el N 3389, el FK 1052 y el R 50595.

Los agonistas inversos que pueden ser utilizados en el ámbito de la presente invención son elegidos en el grupo que comprende el RO 116-2617, el RO 116-0086 y el RO 116-1148.

- La cantidad de ligando del receptor 5-HT₄ o de un sal farmacéuticamente aceptable de este ligando eficaz en el tratamiento y/o en la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva y/o la obesidad dependerá de la naturaleza de este desorden y podrá ser determinada por medio de técnicas experimentales y clínicas normalizadas. Por otra parte, pueden ser empleados, de forma opcional, ensayos *in vitro* con objeto o de permitir llevar a cabo la identificación de los intervalos de las dosis óptimas. Las dosis s eficaces pueden ser extrapoladas a partir de curvas de dosis-respuesta, que se obtienen con sistemas de ensayo *in vitro* o con modelo animal.
- Las composiciones farmacéuticas destinadas a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva y/o la obesidad, que comprenden un ligando del receptor 5-HT₄, son preparadas de conformidad con las prácticas farmacéuticas normalizadas. Estas composiciones farmacéuticas se presentan bajo una forma apropiada para una administración por vía parenteral, por vía oral, por vía rectal, por vía nasal, por vía transdérmica, por vía pulmonar, por vía central o por vía sistémica.
- Estas composiciones farmacéuticas contienen, además del ligando del receptor 5-HT₄ o de la sal farmacéuticamente aceptable de este ligando, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable elegido en función de la vía de administración y de la forma de administración.

De igual modo se ha descrito en la restitución, en áreas destinatarias del cerebro de un receptor 5-HT₄ « silvestre » para llevar a cabo el tratamiento o para prevenir las patologías relacionadas con conductas obsesivas y/o de la

obesidad y, de una manera más particular, las patologías relacionadas con conductas obsesivas, en la hipótesis de que estas patologías fuesen provocadas por una o por varias mutaciones en el gen que codifica el receptor 5-HT₄.

5 Por lo tanto, la presente describe la utilización de un ácido nucleico que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva.

Se entiende por « receptor 5-HT₄ funcional», un receptor 5-HT₄ silvestre, que presente propiedades farmacológicas normales.

10 Se entiende por "receptor funcionalmente equivalente", un receptor cuya secuencia de aminoácidos sea parecida a la del receptor 5-HT₄ (al menos idéntica en un 90% y, de manera preferente, al menos idéntica en un 95%) y que es activado por los mismos agonistas y con la misma intensidad que el receptor 5-HT₄ silvestre.

La molécula de ácido nucleico que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente es, de forma ventajosa, una molécula que codifica un receptor 5-HT₄ de mamíferos y, de una manera muy particular, es una molécula que codifica un receptor 5-HT₄ humano. Estas secuencias pueden ser obtenidas en el banco de genes bajo los números:

- 15 - para los seres humanos : Y09586 (5-HT_{4A}), Y10437 (5-HT_{4B}) Y12506 (5-HT_{4C}), Y15507 (5-HT_{4D}), AJ011371 (5-HT_{4G}) ;
- para el ratón : Y09587 (5-HT_{4A}), Y09585 (5-HT_{4B}), Y09588 (5-HT_{4E}) AJ011370 (5-HT_{4F}) ;
- para la rata : U20906 (5-HT_{4A}), 020907 (5-HT_{4B}) y AJ011371 (5-HT_{4E}) ;
- para el conejo de Indias: Y13585 (5-HT_{4H}).

20 Debido a la degenerescencia del código genético, pueden ser utilizadas en el ámbito de la presente invención otras secuencias de ácido nucleico, que codifiquen substancialmente los mismos aminoácidos. Estas secuencias son, a título de ejemplo y de forma no exhaustiva, secuencias nucleotídicas que comprende la totalidad o una parte del ácido nucleico, que codifica un receptor 5-HT₄, modificadas al nivel de uno o de varios codones con el fin de producir una mutación silenciosa. Las secuencias de ácido nucleico, que pueden ser utilizadas, pueden ser obtenidas según

25 diferentes métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, por intermedio del ADNc obtenido a partir del ARNm del receptor 5-HT₄ después de una transcripción inversa.

30 De forma ventajosa, el núcleo accumbens, la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo son las estructuras cerebrales en las que se planea restaurar, a la vez, la expresión del gen que codifica el receptor 5-HT₄ y suprimir las deficiencias sobre la regulación de la ingesta alimentaria relacionadas con su ausencia. Únicamente una restauración simultánea de las deficiencias moleculares y celulares (tasas de las monoaminas endógenas, actividad de las neuronas serotoninérgicas, por ejemplo) y del comportamiento en consecuencia de un reestablecimiento de la expresión de este gen permite validar un enlace causal entre el fenotipo molecular y comportamental.

35 Con objeto o de expresar un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente de manera ventajosa en el núcleo accumbens, en la amígdala, en el hipocampo y en el hipotálamo, puede tomarse en consideración la utilización de vectores de transferencia, tales como vectores no-víricos o víricos, que contengan molécula de ácido nucleico que codifique un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente.

40 Entre los vectores víricos, que pueden ser utilizados, podemos citar los virus asociados con los adenovirus de tipo 2, los vectores resultantes del lentivirus con diferentes pseudotipos, los vectores resultantes de los virus de la inmunodeficiencia felina y los vectores resultantes del "Foamy virus". Los vectores víricos utilizados están desprovistos de cualquier efecto patógeno y/o tóxico.

45 La expresión de la molécula de ácido nucleico, que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente contenido en dichos vectores está colocada, de manera ventajosa, bajo el control de promotores adecuados, en función del tejido destinatario. Para la expresión de un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente en el núcleo accumbens, en la amígdala, en el hipocampo y/o en el hipotálamo, un promotor utilizado de manera ventajosa puede ser el promotor del gen que codifica el transportador de captura de la dopamina para el núcleo accumbens.

En una segunda forma de realización, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto biológicamente activo susceptible de ser utilizado en el tratamiento y/o en la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva y/o de la obesidad y, de una manera más particular, se refiere a un

compuesto biológicamente activo para el tratamiento y/o para la prevención de una patología relacionada con una conducta obsesiva caracterizado porque dicho método comprende las etapas siguientes :

- a) la puesta en contacto del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente con dicho compuesto biológicamente activo, y
- 5 b) determinar si dicho compuesto biológicamente activo es capaz de modular la actividad basal del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente.

Se entiende por "compuesto biológicamente activo", cualquier compuesto químico natural o sintético capaz de atenuar los síntomas de una patología relacionada con conductas obsesivas después de su administración.

10 La etapa (a) del método, que constituye el objeto de la presente invención puede comprender, en primer lugar, las etapas siguientes:

- i) el cultivo de células que expresan un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente, y
- ii) la incubación de dichas células con dicho compuesto biológicamente activo.

Los términos "receptor 5-HT₄ funcional" y "un receptor funcionalmente equivalente" son tales como los que han sido definidos más arriba.

15 De manera ventajosa, las células cultivadas en la etapa (i) del método, que constituye el objeto de la presente invención, son células que sobre-expresan en su superficie un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente. En el ámbito de la presente invención puede ser utilizada cualquier célula capaz de sobre-expresar en su superficie un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente. A título de ejemplo y de forma no exhaustiva, pueden ser citadas las células embrionarias HEK 293 humanas.

20 Para llevar a cabo la transformación de las células, que sobre-expresan un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente, puede ser utilizada una molécula de ácido nucleico, que codifique un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente o un vector.

25 El vector, que puede ser utilizado en el ámbito de la presente invención, para llevar a cabo la transformación de las células, que sobre-expresan un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente, comprende al menos, una molécula de ácido nucleico, que codifique un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente tal como se ha descrito más arriba, de manera ventajosa asociada con secuencias de control adaptadas al procedimiento de expresión o de producción de dichos receptores en un huésped celular. El vector utilizado es elegido en función del huésped (células cultivadas) al que debe ser transferido; puede tratarse de cualquier vector tal como un plásmido. La preparación de estos vectores así como la producción o la expresión de un receptor en un huésped celular pueden ser realizadas según cualquiera de las técnicas de la biología molecular y de la ingeniería genética, que son perfectamente conocidas por parte del técnico en la materia.

30 Un compuesto capaz de modular la actividad de base de un receptor et o bien un agonista, o bien es un agonista inverso, o bien es un antagonista de dicho receptor. El enlace de un agonista, de un agonista inverso o de un antagonista con un receptor provoca cambios en la conformación de este receptor y se observa, en el seno de la célula, una transducción de la señal por intermedio de segundos mensajeros. Por lo tanto, el inicio de la etapa (b) del método, que constituye el objeto de la presente invención, consiste en medir, por cualquier medio adaptado, la afinidad entre el receptor y el compuesto biológicamente activo, después de su puesta en contacto.

35 De forma ventajosa, la modulación de la actividad basal del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente puede ser medida a través de la activación (para un agonista) o de la inhibición (para un antagonista o para un antagonista inverso) de la transducción de la señal a partir del receptor 5-HT₄. El técnico en la materia, que conozca la cascada de acontecimientos, que es inducida durante la transducción de la señal a partir de este receptor, será capaz de determinar métodos adecuados y condiciones adecuadas para llevar a cabo la medición de la activación o de la inhibición de la transducción de la señal a partir del receptor 5-HT₄, por ejemplo, llevándose a cabo la medición de la cantidad de AMPc antes y después de la puesta en contacto con el compuesto funcionalmente activo.

40 En una segunda forma de realización del método, que constituye el objeto de la presente invención, las etapas (a) y (b) pueden ser realizadas por medio de la fijación de uno o de varios receptores 5-HT₄ o receptores funcionalmente equivalentes sobre una o sobre varias membranas. De igual modo, los receptores 5-HT₄ o los receptores funcionalmente equivalentes pueden ser integrados en un biosensor. En un sistema de este tipo, es posible visualizar en tiempo real las interacciones entre el compuesto que debe ser ensayado y el receptor. Uno de los componentes del par receptor/ligando es fijado sobre una interfase, que puede contener una matriz cubierta con

5 cadenas alifáticas. Esta matriz hidrófuga puede ser recubierta fácilmente con una capa lipídica por fusión espontánea de liposomas inyectados por su contacto. Los receptores 5-HT₄ o los receptores funcionalmente equivalentes insertados en los liposomas pueden ser integrados entonces en los biosensores. El compuesto biológicamente activo es analizado entonces con relación a uno o a varios receptores 5-HT₄ o receptores funcionalmente equivalentes. De manera adicional, la técnica del biosensor permite llevar a cabo la medición de la afinidad de enlace.

10 Un método para llevar a cabo el tratamiento y/o para prevenir una patología relacionada con una conducta obsesiva consiste en administrar una cantidad eficaz de un ligando de los receptores 5-HT₄ tal como se ha definido más arriba o de un ácido nucleico que codifique un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente tal como se ha definido también más arriba.

15 Los resultados obtenidos por la Solicitante han permitido poner de manifiesto que los receptores 5-HT₄ controlan las tasas de leptina y de este modo pueden intervenir en el control de la obesidad. En efecto, los trabajos aquí expuestos han demostrado que la ausencia de los receptores 5-HT₄ induce una disminución de las tasas de leptina. Esta implicación en la obesidad es posible, puesto que se ha observado una obesidad en el caso de de los ratones mutantes privados del receptor 5-HT₄ con una edad de más de 6 meses y por lo tanto de mayor edad que los que han sido utilizados en la parte experimental dada más adelante.

20 Por lo tanto, se ha descrito la utilización de un ligando del receptor 5-HT₄ tal como se ha definido más arriba y, de una manera más particular, de un agonista del receptor 5-HT₄ tal como se ha definido más arriba para la preparación de una composición farmacéutica destinada a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la obesidad. Todas las formas de realización consideradas para las composiciones farmacéuticas destinadas a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de las conductas obsesivas se aplican al tratamiento y/o a la prevención de la obesidad.

25 Se describe la restitución, en áreas destinatarias del cerebro de un receptor 5-HT₄ « silvestre » para llevar a cabo el tratamiento o para prevenir la obesidad, en la hipótesis de que esta patología estuviese provocada por una o por varias mutaciones en el gen que codifica el receptor 5-HT₄.

30 Por lo tanto, en la presente se describe la utilización de un ácido nucleico, que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente para llevar a cabo la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la obesidad. Las diversas formas de realización, que han sido consideradas más arriba, (receptor 5-HT₄ de mamíferos, receptor 5-HT₄ humano, vector de transferencia viral o no-viral, etc ...) se aplican de igual modo al tratamiento et/o la prevención de la obesidad.

De este modo, se describe una método para llevar a cabo el tratamiento y/o para prevenir la obesidad consiste en administrar una cantidad eficaz de un ligando y, de una manera muy particular, de un agonista de los receptores 5-HT₄ tal como se ha definido más arriba o de un ácido nucleico, que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente, tal como se ha definido más arriba.

35 La presente invención se refiere a una método para llevar a cabo la identificación de un compuesto biológicamente activo susceptible de ser utilizado en el tratamiento de la obesidad y, de una manera más particular, se refiere a un compuesto biológicamente activo para el tratamiento de la obesidad caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 40 a) la puesta en contacto del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente con dicho compuesto biológicamente activo, y
- b) la determinación de si dicho compuesto biológicamente activo es capaz de modular la actividad basal del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente.

45 Las realizaciones descritas en el ámbito de la identificación de una molécula biológicamente activa en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad relacionada con una conducta obsesiva son aplicadas mutatis mutandis a la identificación de una molécula biológicamente activa en el tratamiento y/o la prevención de la obesidad. Teniendo en consideración los resultados obtenidos por la solicitante, es evidente para el técnico en la materia que una molécula activa en el tratamiento y/o en la prevención de la obesidad deberá comportarse como un agonista del receptor 5-HT₄.

50 Otras ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto por medio de los ejemplos que siguen relativos al estudio comparativo de ratones invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina y de ratones silvestres, y en los que se hará referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una representación esquemática de los objetivos de los sectores técnicos aplicados para llevar a cabo la obtención de los ratones transgénicos.

La figura 2 representa la invalidación del gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina. La figura 2A es una representación esquemática del fragmento de ADN (6,5 kb) que codifica los dominios transmembranales II y III del receptor 5-HT₄ de la serotonina (exon III). La secuencia de ADN (P) representa la sonda externa para llevar a cabo la hibridación de un fragmento de ADN Ase I de 4 kb en el caso de los ratones silvestres. La figura 2B es una representación esquemática del vector de clonación. La expresión del gen que codifica la neomicina fosfotransferasa (Néó) se encuentra bajo el control de un promotor (« phosphoglyceratae kinase I promoter - fosfoglicerato cinasa I promotor -: pGK »). Este ha sido insertado en un locus de restricción enzimática Xba en la secuencia de ADN, que codifica el dominio transmembranal III del receptor 5-HT₄. El tamaño del fragmento de ADN Ase I, que puede ser sometido entonces a una hibridación por la sonda externa, es de 3,5 kb y, permite efectuar la identificación del ADN mutado. La figura 2C es un cromatograma en gel « Southern blot » del ADN genómico, de las células madre embrionarias, que ha sido sometido previamente a una digestión por medio de la utilización del enzima Ase I y a una hibridación por la sonda externa (P).

La figura 3 muestra que los ratones, invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, presentan una ganancia de peso ligeramente aumentada durante un corto período de su desarrollo. La ganancia de peso es la diferencia entre los pesos medidos un día dado del desarrollo (21 a 56) y el peso el 20º día después del nacimiento. Los datos son los valores medios ± e.s.m. (error estándar de medición) de las variaciones de la ganancia de peso expresadas en g. por día. El peso ha sido medido a partir de grupos que están constituidos por un número medio de 21 silvestres (+/+) y 15 mutantes (-/-) para cada día, nacidos en un año, entre el 20º día, que precede al destete y, el 56º día de la adquisición de su fertilidad desde su nacimiento. El análisis estadístico ha indicado que las ganancias de peso de los ratones mutantes eran de una manera significativa mayores que las de los animales silvestres únicamente los días: 27 (+16%, F_{1,72} = 6,54; n = 40 +/+, n = 34 -/-), 28 (+12%, F_{1,67} = 4,73 ; n = 42 +/+, n = 27 -/-), 29 (+30%, F_{1,72} = 6,54 ; n = 23 +/+, n = 18 -/-), 30 (+21%, F_{1,72} = 6,54 ; n = 20 +/+, n = 19 -/-), 36 (+12%, F_{1,40} = 4,06 ; n = 22 +/+, n = 20 -/-) y 37 (+13%, F_{1,40} = 6,18 ; n = 25 +/+, n = 17 -/). No se ha detectado una diferencia significativa entre los dos genotipos para los otros días. Las diferencias significativas entre los genotipos están marcadas con * p < 0,05, *** p < 0,001.

La figura 4 muestra que los ratones, invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, presentan reacciones de ingesta alimentaria y de ganancia de peso anormales después del estrés de coacción o de una inmovilización forzada. Las figuras 4a y 4b muestran la ingesta alimentaria cotidiana en el caso de los ratones silvestres (Fig. 4a) y mutantes (Fig. 4b). La ingesta alimentaria cotidiana es la diferencia entre la cantidad de comida evaluada durante dos días consecutivos. Los datos son evaluados durante un período de habituación (8 días) y de recuperación (10 días). El estrés agudo de coacción de 110 minutos es aplicado el 8º día (flecha). Esta inmovilización forzada ha inducido una disminución de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres durante dos días del período de recuperación (Fig. 4a). Esta capacidad anorexígena es menos eficaz en el caso de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ (Fig. 4b). Las figuras 4c y 4d muestran las variaciones cotidianas de la ganancia de peso de los ratones silvestres (Fig. 4c) y de los mutantes (Fig. 4d) a partir del primer día de aislamiento (9:00 de la parte iluminada del ciclo) del período de habituación. El estrés de coacción ha provocado importantes disminuciones de la ganancia de peso de los ratones silvestres (c) pero mucho menos o nada en el caso de los ratones mutantes (d). Los datos son los valores medios ± e.s.m. (g./día) de grupos de ratones silvestres no estresados (n = 14) o coaccionados (n = 18) y de animales mutantes sin estrés (n = 17) o inmovilizados (n = 16). Las diferencias significativas entre los animales estresados o no son anotadas con §§§ p < 0,0001; §§ p < 0,001; § p < 0,05. Las diferencias significativas entre los dos genotipos están marcadas con * p < 0,05 y las interacciones genotipo x estrés significativas con # p < 0,05.

La figura 5 muestra que los ratones, invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, consumen mayor cantidad de alimentos que los animales silvestres después de un estrés anorexígeno de intensidad creciente. En otros términos, un paradigma experimental en el que la situación es progresivamente estresante ha inducido a una disminución de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres, mientras que el efecto anorexígeno se ha reducido en ausencia del gen, que codifica el receptor 5-HT₄. Los datos representan el valor medio ± e.s.m. de la ingesta alimentaria (g.) en contextos experimentales nuevos y/o aversivos para los roedores (*Procedimiento 1*: Aislamiento durante 3 h, *Procedimiento 2*: Laberinto en forma de cruces realizadas (EPM, 5 minutos) y aislamiento durante 3 h, *Procedimiento 3*: Aislamiento durante 96 h, pequeña incisión en la cola, inyección de NaCl y, EPM). Las diferencias significativas entre los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ y, los animales silvestres están marcadas con * p < 0,05. Las diferencias significativas entre cada uno de los Procedimientos están anotadas con § p < 0,05; §§ p < 0,01.

La figura 6 muestra que los ratones, invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, se han revelado menos sensibles a los efectos anorexígenos del MDMA o « Éxtasis » 24 tras la privación de la comida. Esta resistencia al estrés anorexígeno del « Éxtasis » es reproducida si es administrada conjuntamente con un antagonista selectivo del receptor 5-HT₄ de la serotonina (RS 39604). En otros términos, la fuerte atenuación de la motivación a consumir alimentos, que está inducida por la inyección de « Éxtasis », a pesar de una privación de

comida de 24 h, está contrarrestada por la ausencia o por la inhibición del receptor 5-HT₄. Los datos representan el valor medio ± e.s.m. de la reanudación de la ingesta alimentaria (g.) medida 30 minutos (Fig. 6A), 1 h (Fig. 6B) y 3 h (Fig. 6C) después de la inyección de NaCl, MDMA (10 mg/kg) y/o de RS39604 (0,5 mg/kg) en el caso de los ratones silvestres (+/+) o privados del receptor 5-HT₄ (-/-). *p < 0,05 efecto significativo del genotipo después de un análisis de varianza según el ensayo F de Scheffé. § p < 0,05; §§§ p < 0,001; §§§§ p < 0,0001 efecto significativo del tratamiento por comparación con los animales del mismo genotipo tratados con el NaCl (Anova, Ensayo F de Scheffé). # p < 0,05; ## p < 0,01 efecto significativo del tratamiento por comparación con los animales silvestres tratados con el MDMA (Anova, Ensayo F de Scheffé).

La figura 7 muestra que los ratones, invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, presentan deficiencias de locomoción y/o de adaptación a un medio ambiente nuevo, en este caso el « open-field ». Los datos representan el valor medio de la distancia recorrida (cm) por los ratones silvestres (+/+, n = 7) y mutantes (-/-, n = 7) sobre la superficie total (Fig. 7a y 7b) o en el centro (Fig. 7c y 7d) del « open-field » durante 30 minutos y durante tres días consecutivos (Día 1 a 3). Los datos de la Fig. 7e representan el tiempo medio que permanece en el centro del « open-field » durante tres días consecutivos. La Fig. 7f representa los datos del valor medio de la actividad vertical durante tres días consecutivos. Las diferencias significativas entre los genotipos están marcadas con * p < 0,05 y, entre los diferentes días de exposición con §§ p < 0,01 y § p < 0,05.

La figura 8 muestra que los ratones, invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, son menos reactivos al laberinto en forma de cruces realizadas (EPM) (Fig. 8a) mientras que, en un contexto de estrés sobreañadido, los ratones mutantes se han revelado más ansiosos (Fig. 8b). En el EPM sin otro estrés añadido, los ratones permanecen un tiempo menor en los brazos abiertos (Fig. 8a) y, han sido menos reactivos que los animales controlados puesto que el número de entradas en el conjunto de los compartimentos del EPM es significativamente menor en su conjunto en ausencia del receptor 5-HT₄ (valor medio ± e.s.m., n = 8-9 por genotipo, reproducido tres veces en laboratorios diferentes). En un contexto de estrés sobreañadido, los ratones mutantes han comenzado a reaccionar al nuevo medio ambiente y han mostrado un comportamiento más ansioso que sus congéneres silvestres, puesto que estos han permanecido quietos y han entrado con menor frecuencia en los brazos abiertos (valor medio ± e.s.m., n = 18-19 por genotipo). Las diferencias significativas entre los genotipos están marcadas con *p < 0,05 (Anova).

La figura 9 muestra que la ausencia del gen, que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina, ha inducido una disminución de las tasas de leptina. Los datos representan el valor medio ± e.s.m. de las tasas de leptina del plasma expresadas en ng/mL después de la administración de NaCl (0,9 %) o de MDMA (10 mg/kg) en el caso de los ratones (n = 8) silvestres (+/+) o invalidados (-/-) para el gen que codifica el receptor 5HT₄, con edades comprendidas entre 6 y 10 meses en promedio. **p < 0,01 es el efecto significativo del genotipo después de un análisis de varianza (ANOVA) después del cual se realiza un ensayo F de Scheffé.

I. Materiales y Métodos.

I.1. Generación de ratones invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de la serotonina.

a. Principio.

La transgénesis es un principio general y consiste en la modificación de la expresión de un gen de interés en un organismo vivo. En el caso del ratón, estas modificaciones necesitan tres etapas sucesivas (Fig. 1). La primera necesita la utilización de un gran número de técnicas de la Biología Molecular. Dicha etapa consiste en la obtención de una construcción genómica, que resulta de la eliminación o de la inserción del gen de interés, o incluso de la modificación por mutagénesis dirigida de algunas bases nitrogenadas. La segunda requiere la transfección de células embrionarias por la transfección de la construcción genómica en células murinas embrionarias totipotentes (« - células madre embrionarias - embryonic stem cells » o ES). La inserción del gen mutado en su genoma se lleva a cabo por recombinación homóloga al azar, y de manera estable. Los clones recombinantes son seleccionados entonces por medio de la utilización de un antibiótico (G418 o neomicina) puesto que un gen de resistencia es previamente insertado durante la realización de la construcción genómica. La última etapa consiste en la inyección de los clones positivos en blastocistos (Fig. 2).

b. Verificación de la ausencia de los receptores 5-HT₄ en el caso de los ratones mutantes.

Para verificar la ausencia de los receptores 5-HT₄ en el caso de los ratones mutantes, ha sido utilizada la técnica de radiografía como se ha descrito más arriba (Compan et al., 1996), a partir de cortes cerebrales de los animales silvestres, heterocigotos y mutantes. Los loci de enlace del receptor 5-HT₄ han sido marcados por un radioligando selectivo, el [³H]GR113808 (Amersham), antagonista del receptor 5-HT₄.

En el caso de los ratones silvestres, se ha observado una distribución heterogénea de los loci de enlace, marcados por el [³H]GR113808 en los gangliones de la base, el sistema límbico o la formación del hipocampo como ya se ha

observado en el caso del rata (Waeber et al., 1994, Compan et al., 1996). No se ha detectado cualquier marcaje específico en el caso de los ratones mutantes. La densidad de los loci de enlace marcados ha sido disminuida en el conjunto de las estructuras cerebrales analizadas en el caso de los ratones heterocigotos en comparación con los ratones silvestres (Tabla 1).

- 5 Tabla 1 : Densidad de los loci de enlace del receptor 5-HT₄ marcado con el [³H]GR113808 (0,1 nM) en el caso de de los ratones adultos de genotipo silvestre y heterocigoto.

Regiones	B_{max} (valor medio \pm e.s.m.) en fmol/mg de proteína	
	Silvestres	Heterocigotos
Tubérculos olfativos	201 \pm 34	66 \pm 16 (67%)
Pallidum Ventral	171 \pm 37	53 \pm 21 (70%)
Núcleo accumbens	116 \pm 28	36 \pm 16 (68%)
Striatum Rostral	115 \pm 15	48 \pm 11 (48%)
Striatum Caudal	142 \pm 25	18 \pm 10 (85%)
Globus Pallidus	90 \pm 20	14 \pm 8 (85%)
Hipocampo	104 \pm 11	9 \pm 8 (91%)
* Considerando una concentración de 1 mg de proteína/10 mg de tejido cerebral.		

- 10 El genotipo de los ratones previamente identificado, ha sido verificado, también, por medio de la utilización de la técnica de polimerización en reacción en cadena (« Touch down protocol PCR »). Todos los animales ensayados son descendientes de parejas heterocigotos y con una edad comprendida entre 4 y 6 meses. Nosotros hemos obtenido un 18 % de ratones mutantes a lo largo de un período de tres años. Todavía no tenemos una explicación para el valor de esta relación, que no sigue las leyes de Mendel (Tabla 2).

Tabla 2 : Relaciones mendelianas obtenidas después del crecimiento de los ratones heterocigotos.

Silvestres	Heterocigotos	Homocigotos
36% (414)	46% (532)	18% (209)

- 15 Los ratones privados del receptor 5-HT₄ se desarrollan sin trastornos aparentes con excepción de un ganancia de peso, que es de una manera significativa mayor que la de los ratones silvestres a lo largo de un corto período de su desarrollo (Fig. 3). No ha sido detectada cualquier diferencia significativa del peso en el caso de de los ratones con edades comprendidas entre los 4 y los 6 meses (no ilustrado). Se ha formulado por parte del inventor la hipótesis
20 según la cual un contexto inhabitual podría inducir trastornos del consumo de alimentos durante su período adulto, puesto que pueden sobrevenir mecanismos clásicos de adaptación de los sistemas neuronales en el transcurso del desarrollo.

I.2. Ensayos del comportamiento.

Por lo tanto, se han medido el consumo de alimentos y la ganancia de peso de los ratones mutantes en comparación con los animales silvestres después de la utilización del ensayo de coacción (inmovilización forzada) que es conocido por constituir un estrés anorexígeno. De la misma manera, la ingesta alimentaria ha sido evaluada después de la utilización de ensayos de conflictos: el Laberinto en forma de cruces realizadas, y el « open-field ». En estos dos ensayos experimentales, los roedores son confrontados con un conflicto entre la motivación a explorar un medio ambiente nuevo y el temor de espacios abiertos y/o realizados.

a. Animales.

Los animales silvestres y mutantes proceden de la línea Sv 129/Ter (Phillips et al., 1999) y son descendientes de cruzamientos de ratones heterocigotos (+/-) para la mutación del gen que codifica el receptor 5-HT₄ para conservar la misma predisposición genética entre los dos genotipos. Los animales son cuidados y manipulados en condiciones de iluminación estándar, a la temperatura y con los grados de higrometría, controlados y constantes de 22 °C y de 55 % de humedad relativa. Se ha mantenido artificialmente un ciclo día/noche (12/12 h). La comida tiene la forma de croquetas cilíndricas (23 % de proteínas; 3,5 % de materias grasas brutas; 3 % de celulosa bruta; 7,5 % de cenizas brutas; 12 % de humedad). El genotipo de los ratones es identificado por medio de la utilización de la técnica de la Reacción de Polimerización en Cadena ("Polymerase Chain Reacción" o PCR). Todas las experiencias han sido realizadas con animales con una edad media comprendida entre 4 y 6 meses.

b. Evaluación de la Ingesta alimentaria.

Después del ensayo de coacción. Cada una de nuestras experiencias ha sido dividida en tres fases: un período de habituación (7 días), el día del estrés de coacción (inmovilización durante 110 minutos) y una etapa de recuperación (10 días). Los ratones son divididos en un grupo testigo y de coacción. El día del estrés, los ratones silvestres e invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ reciben una inyección de NaCl 9 %, 1 mg/kg del RS 39604, antagonista del receptor 5-HT₄. Paralelamente, un grupo de ratones no recibe tratamiento de ninguna clase y son pesadas e inmovilizados como los ratones precedentes, en caso dado, 10 minutos Después del inicio de su manipulación. Entonces se mide el consumo de alimentos 2 h 30 minutos, 3 y 5 h y cada día durante la período de recuperación.

Después de *un aislamiento durante 3 h (Procedimiento 1)*. Los animales son aislados en una jaula en presencia de comida y de agua ad libitum. Se lleva a cabo la evaluación del peso de la comida y del animal antes y 3 h después del aislamiento. La diferencia entre dos pesadas sucesivas revela la cantidad de comida ingerida por el ratón. El suelo de la jaula tenía forma de rejilla, con lo cual nos ha sido posible evaluar la cantidad de comida desperdiciada por cada animal.

Después del laberinto en forma de cruces realizadas (Procedimiento 2: estrés moderado). Los mismos animales son reagrupados en número de cuatro por jaula durante una semana en sala de alojamiento. El día de la experimentación, después de un período de 30 minutos, los animales son colocados en el laberinto en forma de cruces realizadas y a continuación son aislados con el fin de evaluar su consumo de comida 3 h después del inicio del ensayo.

Después del laberinto en forma de cruces realizadas precedido por una incisión (Procedimiento 3: fuerte estrés). Durante un período de habituación, cada ratón es aislado durante cuatro días (96 horas) en presencia de comida y de agua suministrados *ad libitum*. Se miden diariamente los pesos de los ratones y des alimentos consumidos a la misma hora para establecer una línea de base. El cuarto día, se efectúa una pequeña incisión en la cola. A continuación se lleva a cabo una extracción de sangre durante 10 minutos para llevar a cabo el análisis de las tasas plasmáticas de corticosterona antes de la inyección y del ensayo de conflicto. De igual modo, el laberinto en forma de cruces realizadas representa un inductor de estrés, puesto que induce un aumento de las tasas de corticosterona (Rodgers et al., 1999). La incisión es efectuada en una pieza diferente la sala del ensayo, habiendo sido tomadas todas la precauciones útiles para evitar cualquier estrés, que no sea la incisión de la cola y la inmovilización, antes de esta operación. Las muestras de sangre obtenidas son centrifugadas durante 10 minutos a 10 000 vueltas/minuto y el plasma es almacenado a continuación a -80°C hasta las dosificaciones ulteriores. La corticosterona es dosificada por medio de la utilización de la técnica de radio-inmunoensayo (ICN Clinisciences). Una vez concluida la extracción, son colocados los animales en la sala de experimentación.

El quinto día, los animales han recibido una inyección intraperitoneal (i.p.) de NaCl a 9. Las inyecciones se llevan a cabo 10 minutos antes de colocar a los ratones en el laberinto en forma de cruces realizadas. Los animales son divididos en dos grupos experimentales de ratones silvestres tratados con el NaCl (n = 8) y, mutantes que también reciben una inyección de NaCl (n = 12). Los ratones son colocados en el centro del laberinto en forma de cruces

realizadas 10 minutos después de la inyección. Se practica de nuevo una pequeña incisión en la cola, 30 minutos después del ensayo, cuando las tasas de corticosterona alcanzan su máximo y siguen siendo cuidados durante cuatro horas (Natelson et al., 1987). Después del ensayo, se llevan a cabo dos evaluaciones sucesivas de la ingesta alimentaria 3 h después del inicio del ensayo.

- 5 *Después del « open-field ».* Hemos procedido de la misma manera que en el caso del procedimiento 2 para llevar a cabo la evaluación de la ingesta alimentaria 3 h después del inicio de la confrontación con el campo abierto « open - field ». Por otra parte, hemos evaluado la actividad motriz de los ratones un mes después de los procedimientos 2 y 3.

10 Después de *la administración de los fármacos.* Cada fármaco, utilizado para llevar a cabo el tratamiento los ratones silvestres e invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ ha sido diluido de manera extemporánea en una solución salina de NaCl (0,9 %) y ha sido inyectado de manera sistémica (i.p.). El volumen de inyección de cada tratamiento es de 200 µL para 30 g. Los ratones silvestres o invalidados para el receptor 5-HT₄ (n = 35) han recibido los tratamientos siguientes: NaCl, MDMA (o « Éxtasis » o 3,4-N-métilenodioximetamfetamina, SIGMA, 10 mg/kg), RS 39604, RS 102221/MDMA.

15 Se han administrado el MDMA (10 mg/kg, Sigma, autorización de utilización 9900431 S, V. Compan) y el RS 39604 (0,5 mg/kg), antagonista del receptor 5-HT₄, de manera individual o en tratamiento combinado en el caso de los ratones silvestres o privados del receptor 5-HT₄ (n = 12-17 por genotipo y productos farmacológicos). Se ha seleccionado la dosis de 0,5 mg/kg para el RS 39604, puesto que su administración ha inducido a una aumento de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres alimentados *ad libitum* y, no tiene efecto en el caso de los animales mutantes para el receptores 5-HT₄ en comparación de los ratones tratados con el NaCl o con diferentes dosis s de RS 39604 (0,01; 0,1; 1 y 10 mg/kg; no ilustrado).

20 Se ha llevado a cabo la evaluación de la ingesta alimentaria de los ratones silvestres y de los ratones invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ de conformidad con el protocolo experimental que ha sido descrito por los autores Lucas et al., 1998. Los diferentes ratones son aislados durante un período de habituación de tres días en presencia de comida y de agua proporcionados *ad libitum* en el transcurso del cual son medidos a diario, a la misma hora, los pesos de los ratones y des alimentos consumidos. El cuarto día, los ratones son privados de su comida durante 24 horas. Los fármacos son inyectados, como el NaCl, después del período de privación de comida con objeto de llevar a cabo la determinación del efecto de los diferentes tratamientos sobre la ingesta alimentaria. La comida es reintroducida en cada jaula después de un intervalo de 10 minutos para los otros tratamientos. A continuación se llevan a cabo tres pesadas sucesivas de la comida 30 minutos, 1 h y 3 h después de la reintroducción de la comida.

c. Ensayos de conflictos.

35 *El Laberinto en forma de cruces realizadas* está constituido por dos áreas rectangulares (L : 57 cm, 1 : 5 cm) que están fijadas según un ángulo recto (90°). Una de las dos áreas tiene paredes de 15 cm de altura y se denomina « brazos cerrados ». El otro área, que está desprovista de paredes, se denomina « brazos abiertos ». Este dispositivo es colocado sobre un zócalo a una altura de 30 cm por encima del suelo. Después de un período de habituación de 30 minutos en la sala de experimentación, cada animal es colocado en la intersección de las dos áreas y es filmado durante 5 minutos sin que los experimentadores estén presentes. El análisis de los datos consiste en la evaluación del número de entradas y del tiempo que permanece el ratón en los brazos abiertos o cerrados, el tiempo que permanece en el centro y, el número de veces que el animal inclina su cabeza hacia el suelo cuando se encuentra en los brazos abiertos (« head-dips »). Cuando los ratones son colocados en el ensayo, estos se enfrentan a un conflicto entre la exploración de un nuevo medio ambiente y el temor a los espacios abiertos y a la altura. Los análisis factoriales ponen en evidencia dos tipos de comportamiento: uno de ellos relacionado con la ansiedad y el otro asociado a la actividad motriz (Brunner et al., 1999). Por regla general, se admite que los animales con ansiedad vuelvan a entrar con mayor frecuencia y que permanecen durante un tiempo más prolongado en los brazos cerrados y, a la inversa para los brazos abiertos, puesto que los ratones son animales nocturnos.

50 El « *open-field* » es un área de 43,2 x 43,2 cm cuyas paredes tienen una altura de 30 cm. Sobre los cuatro lados están dispuestos captadores de infrarrojos separados entre sí a una distancia de 1,5 cm, adaptados de este modo al tamaño de los ratones. El registro de la distancia recorrida se efectúa por medio de un sistema lógico (MED, Associates Activity Monitor) durante 30 minutos, a partir del momento en que el animal es colocado en el centro del dispositivo experimental. Este protocolo se repite durante los tres días siguientes. De este modo es posible llevar a cabo la evaluación de la capacidad de habituación de los ratones a este nuevo medio ambiente. Los experimentadores no están presentes en la sala de experimentación durante el registro. El cuadrículado infrarrojo permite hacer un análisis fino de varias variables.

II. Resultados.

II.1. Hiposensibilidad de los ratones privados del receptor 5-HT₄ a un estrés anorexígeno : el estrés de coacción o la inmovilización forzada.

El estrés de coacción, propuesto como un modelo experimental de estudio de la anorexia (Rybkin et al., 1997, Harris et al., 2002) ha sido utilizado para ensayar los límites de resistencia de los ratones invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄ a no consumir alimentos después de estrés. Se han medido la ingesta alimentaria y las variaciones de la ganancia de peso durante una período de habituación de 8 días y de recuperación de 10 días (Fig. 4).

Durante un período de aislamiento de 8 días (período de habituación), la ingesta alimentaria de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ no era diferente de la de los ratones silvestres. Las variaciones de su ganancia de peso durante el período de habituación han sido más bajas que las de los animales silvestres, como indica la interacción significativa entre el genotipo y el tiempo ($F_{1,360} = 2,45$; $p < 0,05$). En otros términos, no ha sido detectada cualquier variación significativa de la ganancia de peso de los ratones mutantes ($F_{39,186} = 0,94$) mientras que ha sido aumentada en el caso de los ratones silvestres ($F_{29,174} = 4,45$; $p < 0,001$). La ingesta alimentaria o los cambios de ganancia de peso entre los dos grupos de animales, del mismo genotipo, programados para ser inmovilizados o no el 8º día no eran de una manera significativa diferentes (Fig. 4 a,b)

Después del estrés de coacción, el análisis estadístico (Anova medidas repetidas) ha indicado un efecto significativo del estrés sobre la ingesta alimentaria en el transcurso del tiempo ($F_{9,567} = 13,99$; $p < 0,0001$) y una interacción genotipo x tiempo significativa ($F_{9,549} = 2,2$; $p < 0,05$). El análisis (« Two-way » Anova) ha revelado, de igual modo, que la capacidad del estrés de coacción para inducir una disminución de la ingesta alimentaria depende del genotipo en las primeras 24 h que siguen al estrés ($F_{1,61} = 6,73$; $p < 0,05$). El consumo de alimentos ha disminuido de una forma significativa en el caso de los ratones silvestres (-36,4 %, Fig. 4a) y, en una menor amplitud, en el caso de los ratones mutantes (-19,6 %, Fig. 4b), en comparación con los ratones del mismo genotipo no-estresados. Un análisis más detallado ha indicado que los ratones privados del receptor 5-HT₄ han consumido de una manera significativa más alimentos que los ratones silvestres 24 h después de la inmovilización (+24 %, $p < 0,05$). Al cabo de 48 h, únicamente los ratones silvestres consumen incluso menos alimentos en relación con los animales de control (-16,4 %, Fig. 4a). Al cabo de 48-h después de la inmovilización forzada no ha sido detectado cualquier efecto significativo del estrés sobre la ingesta alimentaria de los ratones mutantes (Fig. 4b).

Paralelamente, el análisis estadístico (Anova, medidas repetidas) ha indicado un efecto significativo del estrés sobre las variaciones de la ganancia de peso en el transcurso del tiempo ($F_{9,522} = 11,33$; $p < 0,0001$) y una interacción genotipo x tiempo significativa ($F_{9,522} = 2,38$; $p < 0,05$). El análisis estadístico (Anova, medidas repetidas) ha revelado que el estrés de coacción ha inducido a una disminución significativa de la ganancia de peso en el caso de los ratones silvestres ($F_{1,252} = 5,76$; $p < 0,05$, Fig. 4c), pero no así en el caso de los ratones invalidados para el gen que codifica el receptor ($F_{1,270} = 0,014$, Fig. 4d). Un análisis estadístico detallado indica que el estrés ha provocado disminuciones de ganancia de peso en el caso de los ratones silvestres los 4 primeros días del período de recuperación, en comparación con los ratones de control (Fig. 4c). Por el contrario, el estrés de coacción ha tenido una menor eficacia en ausencia del receptor 5-HT₄ puesto que su ganancia de peso ha permanecido estable y, es más baja en comparación con sus congéneres estresados durante 24 h después de la inmovilización (Fig. 4d).

De igual modo, los resultados de la Solicitante indican que si el estrés de coacción va precedido por una inyección de RS39604, antagonista del receptor 5-HT₄, después de la inmovilización forzada de hembras silvestres, la ingesta alimentaria de los ratones silvestres no queda modificada (non ilustrado). Dicho de otra manera, la inactivación farmacológica del receptor 5-HT₄, ha suprimido el efecto anorexígeno del estrés de coacción. Paralelamente, la administración de RS39604 ha reducido las pérdidas de pesos de los ratones silvestres, en comparación con los animales tratados con el NaCl (non ilustrado) (Compan et al., 2003).

II.2. Hiposensibilidad de los ratones privados del receptor 5-HT₄ a un estrés anorexígeno de intensidad creciente.

Los resultados aquí expuestos indican que los ratones adultos privados del receptor 5-HT₄ han mostrado menos sensibilidad a los efectos anorexígenos de un medio ambiente nuevo (Fig. 5). El análisis estadístico ha mostrado un efecto significativo del genotipo ($F_{1,47} = 5,57$; $p < 0,05$) y de los procedimientos utilizados ($F_{1,47} = 18,55$; $p < 0,0001$).

La simple transferencia de los ratones desde su jaula habitual hasta las jaulas de evaluación de la ingesta alimentaria no ha modificado el consumo de alimento de los ratones silvestres y mutantes (*Procedimiento 1*, Fig. 5). El *estrés moderado* (*Procedimiento 2*), una sola exposición en el laberinto en forma de cruces realizadas durante 5 minutos, conocido por aumentar la actividad del eje hipotálamo-hipofisario, ha inducido una disminución significativa de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres (-33,4 % ; $p < 0,05$; $n = 7$). Esto no ocurren el caso de

los ratones mutantes (Fig. 5, n = 9). El consumo de alimentos de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ ha sido significativamente más elevado que en el caso de los animales silvestres después del *estrés moderado* (+48,4 %; $F_{1,15} = 7,97$; $p < 0,05$; n = 10; Fig. 5). Cuando se utilizan otras series de animales, nuestros resultados indican que un *estrés intenso* (*Procedimiento 3*) ha entrañado una disminución mayor de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres en comparación con los ratones tratados con el *Procedimiento 2* (-78 %; $F_{2,19} = 16,11$ $p < 0,0001$; n = 8; Fig. 5). Aún cuando la ingesta alimentaria disminuye también en ausencia del receptor 5-HT₄, los ratones mutantes consumen una mayor cantidad de alimentos que los animales silvestres después de un *fuerte estrés* (+132 %; $F_{1,22} = 6,7$; $p = 0,0042$; Fig. 5; n = 10).

10 II.3. La ausencia o la inactivación del receptor 5-HT₄ contrarresta la inhibición de la motivación a consumir alimentos, inducida por la administración de MDMA o « Éxtasis ».

El análisis estadístico global de la ingesta alimentaria revela un efecto genotipo ($F_{1,105} = 4,86$; $p < 0,05$), tratamiento ($F_{1,105} = 7,24$; $p < 0,001$) y tiempo ($F_{3,315} = 390,12$; $p < 0,0001$) significativos. Las interacciones entre el genotipo y el tratamiento ($F_{3,105} = 2,76$; $p < 0,05$) y entre los factores tiempo y tratamiento ($F_{9,315} = 29,30$; $p < 0,0001$) también son significativas.

15 En el caso del MDMA, el análisis estadístico muestra los efectos del genotipo ($F_{1,59} = 11,93$; $p < 0,001$) y del tratamiento ($F_{1,59} = 15,78$; $p < 0,001$) significativos que varían en el transcurso del tiempo ($F_{3,177} = 3,97$; $p < 0,01$) y ($F_{3,177} = 53,12$; $p < 0,0001$) respectivamente. Nuestros resultados indican que la administración de MDMA ha inducido una disminución significativa de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres, en comparación con los roedores del mismo genotipo tratados con el NaCl (Fig. 6). Este efecto es observado al cabo de 30 minutos (-95,38 %, Fig. 6A) y al cabo 1 h (-88,56 %, Fig. 6B) después de su administración y está ausente al cabo de 3 h (Fig. 6C). En el caso de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄, comparados con los roedores mutantes tratados con el NaCl, la MDMA también induce una disminución significativa de la ingesta alimentaria al cabo 30 minutos (-69,07 %, Fig. 6A) y 1 al cabo de h (-68,49 %, Fig. 6B) después de su administración. Este efecto ya no se observa al cabo de 3 h después del tratamiento de los ratones (Fig. 6C). De igual modo, el consumo de alimentos en el caso de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ es significativamente mayor al cabo de 1 h (+645,56 %; $p < 0,001$, Fig. 6B), y al cabo de 3 h (+244,23 %; $p < 0,05$, Fig. 6C) después de la administración de MDMA, en comparación con los animales silvestres que han recibido el mismo tratamiento.

30 Para el RS 39604, antagonista del receptor 5-HT₄, el análisis estadístico no revela efecto genotipo ($F_{1,63} = 1,37$), ni del tratamiento ($F_{1,63} = 3,93$), ni una interacción entre los factores genotipo y tratamiento significativos ($F_{1,63} = 3,93$) (Fig. 6).

35 En el caso de la MDMA combinado au RS 39604, antagonista selectivo del receptor 5-HT₄, el análisis estadístico muestra un efecto del tratamiento ($F_{1,55} = 7,10$; $p < 0,05$) significativo en el transcurso del tiempo ($F_{3,165} = 68,87$; $p < 0,0001$). Nuestros resultados indican que la administración combinada de MDMA y del RS 39604 ha inducido a una disminución significativa de la ingesta alimentaria en el caso de los ratones silvestres, en comparación con los roedores de mismo genotipo tratados con el NaCl. Este efecto es observado al cabo de 30 minutos (-83,72 %, Fig. 6A), y al cabo de 1 h (-64,89 %, Fig. 6B) después de la administración de MDMA/RS 39604. No se ha observado cualquier variación del consumo de alimentos al cabo de 3 h después del tratamiento de los animales (Fig. 6C). Nuestros resultados son similares en el caso de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄. La administración de MDMA/RS 39604 disminuye de una manera significativa su consumo de alimentos al cabo de 30 minutos (-82,19 %, Fig. 6A), y al cabo de 1 h (-72,88 %, Fig. 6B) después de la inyección de MDMA/RS 39604 y no tiene efecto al cabo de 3 h (Fig. 6C), en comparación con los ratones del mismo genotipo. De igual manera, nuestros resultados revelan que la ingesta alimentaria de los ratones silvestres es significativamente mayor al cabo de 1 h (+206,82 %, Fig. 6B) y al cabo de 3 h (+51,18 %, Fig. 6C) después de la administración de MDMA/RS 39604, que de la los animales silvestres, que han recibido únicamente el MDMA. Este efecto no se ha revelado en el caso de los ratones mutantes para el receptor 5-HT₄.

45 II.4. Reacción a la novedad de los ratones mutantes para el receptor 5-HT₄ en el « open-field ».

Los resultados mostrados en la Fig. 7 muestran que los ratones mutantes recorren una distancia significativamente menor en el « open-field » que los animales silvestres únicamente el primer día de su exposición ($F_{1,14} = 6,76$, $p < 0,05$). No se ha detectado cualquier diferencia significativa entre los dos genotipos el segundo día ni el tercer día de exposición. De igual modo, los ratones privados de receptores 5-HT₄ permanecen un tiempo significativamente menor en el centro en comparación con sus congéneres silvestres el primer día ($F_{1,14} = 5,50$; $p < 0,05$) y el segundo día ($F_{1,14} = 4,50$; $p < 0,05$) de exposición en el « open-field » lo que sugiere un mayor nivel de ansiedad en el caso de los ratones mutantes (Fig. 7e). No se ha detectado cualquier diferencia significativa entre los dos genotipos con respecto a la actividad vertical (Fig. 7f), lo que indica que los ratones mutantes no presentarían deficiencias de actividad exploratoria.

Estos datos demuestran una disminución de la reactividad a la novedad y/o de la actividad locomotriz de los ratones privados del receptor 5-HT₄ en comparación con los ratones silvestres (Fig. 7).

II.5 Estudio del nivel de ansiedad de los ratones privados del receptor 5-HT₄.

A pesar de una analogía arriesgada, el inventor ha tenido en cuenta la coexistencia de las variaciones de la ansiedad y de los trastornos alimentarios en el caso de los pacientes bulímicos. Por lo tanto, el inventor ha analizado si las variaciones del estado de « ansiedad » de los ratones privados del receptor 5-HT₄ podrían ser relacionadas con su persistencia a consumir alimentos a pesar de la aplicación de un estrés anorexígeno.

Con esta finalidad, el inventor ha utilizado el laberinto en forma de cruces realzadas, que está constituido por áreas o por brazos cerrados y abiertos. Cuanto mayor sea la frecuencia con la que los roedores pasan y entran en los brazos cerrados, tanto más son considerados como « ansiosos ». El principal resultado indica que el procedimiento 3 (fuerte estrés) ha inducido una elevación significativa del tiempo que permanece o del número de entradas en los brazos cerrados, en comparación con el procedimiento 2 (estrés moderado) (Fig. 8). Tan solo disminuye de una manera significativa el número de « head-dips », que es un índice de la actividad exploratoria, después del procedimiento 3 en comparación con el procedimiento 2 en el caso de los ratones silvestres (Fig. 8). Estos resultados sugieren que los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ presentan un nivel de « ansiedad » mayor en una situación aversiva (Procedimiento 3) con relación a los ratones silvestres.

Por otra parte, la disminución significativa del número total de entradas en los brazos abiertos y cerrados de los ratones mutantes en el caso del procedimiento 2 (Laberinto solo) con relación a los ratones silvestres sugiere una disminución de su actividad locomotriz y/o de una deficiencia de adaptación a la novedad.

Parecía que no podía ser considerado el estudio de los comportamientos alimentarios bajo la influencia del estrés sin tener en cuenta la influencia de la actividad locomotriz. De manera evidente, su aumento puede ser asociado con necesidades energéticas más elevadas, y por consiguiente con un consumo de alimentos más fuerte y, a la inversa.

Los datos obtenidos durante el estudio de la reacción a la novedad (II.4. más arriba), asociados con los que han sido obtenidos por medio de la utilización del laberinto en forma de cruces realzadas, sugieren que la estimulación del receptor 5-HT₄ está asociada con aumentos de la actividad locomotriz y/o con un aumento inadecuado de su reactividad frente a un medio ambiente nuevo. Esta hipótesis refuerza la de la posible implicación del receptor 5-HT₄ en las adicciones.

III. Debate.

Tres tipos de mecanismos moleculares son susceptibles de conferir una resistencia a los tipos de estrés anorexígenos para los ratones privados del receptor 5-HT₄.

III.1. Incapacidad de los sistemas serotoninérgicos para adaptarse al estrés con el fin de inhibir suficientemente la ingesta alimentaria en el caso de los ratones mutantes.

El inventor ha privilegiado entonces la hipótesis de una deficiencia de la transmisión serotoninérgica después de la aplicación de un estrés en ausencia del receptor 5-HT₄. La inmovilización forzada ha provocado una elevación de las tasas del ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) extracelular únicamente en el caso de los ratones silvestres. Dicho de otro modo, las tasas del metabolito principal del 5-HT permanecen inalteradas en ausencia del receptor 5-HT₄.

La hiposensibilidad de los ratones mutantes a un estrés anorexígeno podría estar basada, por lo tanto, en la ausencia de modificación de las tasas del 5-HIAA extracelular (Fig. 9).

III.2. Aumento de la expresión de los ARNm que codifican el péptido CART en el caso de los ratones mutantes.

El aumento de la expresión de los ARNm que codifican el péptido CART (« transcritos relacionados con la cocaína - anfetamina », Paradigma experimental MDMA) observado en el caso de los ratones mutantes en los núcleos accumbens y/o hipotalámicos en comparación con los ratones silvestres (non ilustrado) permite formular la hipótesis siguiente: el conjunto de los ligandos del receptor 5-HT₄ es susceptible de controlar el consumo de alimentos debido a que controlada la expresión del péptido CART.

La administración de este péptido puede inducir efectos anorexígenos y orexígenos de conformidad con su administración respectiva en los ventrículos laterales o en los núcleos del hipotálamo.

III.3. Disminuciones de las tasas de leptina detectadas en el caso de los ratones mutantes.

Disminuciones de las tasas de leptina detectadas en el caso de los ratones invalidados para el receptor 5-HT₄ (Fig. 9, Paradigmas experimentales MDMA) que permiten proponer que los ligandos de los receptores 5-HT₄ por medio de su control de las tasas de leptina pueden regular las variaciones de consumo de alimentos y de pesos.

El análisis estadístico de las variaciones de las tasas de leptina no ha revelado efecto significativo del tratamiento con el MDMA ($p = 0,95$). Estos resultados indican que una sola administración de MDMA no modifica las tasas de leptina en el caso de los ratones silvestres o mutantes (Fig. 9).

- 5 En ausencia del gen que codifica el receptor 5-HT₄, el análisis estadístico de las variaciones de las tasas de leptina revela un efecto significativo genotipo ($F_{1,27} = 10,42$; $p < 0,01$). Estos resultados demuestran que las tasas de leptina son significativamente menores, de una manera significativa, en el caso de de los ratones invalidados para el gen que codifica el receptor 5-HT₄, en comparación con de los animales silvestres (-21 %) como también lo indica la utilización del ensayo F de Scheffé ($p < 0,01$) (Fig. 9).

III.4. Conclusión.

- 10 El efecto anorexígeno del estrés reposaría sobre una cascada de acontecimientos, cuyo primer eslabón es un aumento de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario. Esta va seguido por una elevación de la transmisión de las monoaminas (5-HT y DA) que inhibe la ingesta alimentaria. En el estado actual de conocimientos, no se ha mostrado ninguno de los receptores del 5-HT como representante de un elemento molecular responsable del efecto anorexígeno del estrés con excepción de un solo estudio farmacológico sobre el receptor 5-HT_{2A/2C} (Grignaschi et al., 1993). Se ha expuesto muy recientemente que el peso de los ratones mutantes para el receptor 5-HT_{2C} disminuye de manera comparable a la de los ratones silvestres como resultado de la aplicación repetida del estrés de coacción (Clifton et al., 2003).

- 20 Los resultados del comportamiento ponen en evidencia una hiposensibilidad de los ratones desprovistos del receptor 5-HT₄ a un estrés anorexígeno, que confirma el control inhibitorio del 5-HT sobre el consumo de alimentos. Estos resultados afianzan la hipótesis de la contribución del 5-HT en el efecto anorexígeno de un estrés cuyo receptor 5-HT₄ es uno de los mediadores. Teniendo en consideración las modificaciones de los parámetros serotoninérgicos en el NAc y en el hipotálamo en ausencia del receptor 5-HT₄, es posible entonces que el estrés no aumente la liberación de 5-HT en una proporción suficiente como para disminuir la ingesta alimentaria de los ratones mutantes, después de estrés.

- 25 Los datos son favorables a un control positivo de la liberación del 5-HT como resultado de la activación del receptor 5-HT₄. La estimulación del receptor 5-HT₄ induce un cierre de los canales iónicos del potasio (Bockaert et al., 1998), lo que es susceptible de mantener la excitabilidad de las neuronas y de aumentar la liberación de los neurotransmisores. De conformidad con este dato, la estimulación del receptor 5-HT₄ conduce a una elevación de las tasas de 5-HT extracelular en el hipocampo (Ge & Barnes, 1997). En condiciones de base (sin estrés), los datos aquí expuestos indican una elevación de la relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo y el NAc, lo que sugiere una alteración del metabolismo del 5-HT en ausencia del receptor 5-HT₄. Por otra parte, estos resultados sugieren que la posible disminución de las tasas del 5-HT, en el hipotálamo, después de estrés, no estaría compensada en el caso de los ratones privados del receptor 5-HT₄ aun cuando la densidad del transportador membrana del 5-HT marcado con el citalopram tritiado sea más fuerte en el NRD.

- 35 De manera interesante, la leptina, cuya invalidación genética vuelve obesos a los ratones, puede aumentar la tasa de renovación del 5-HT en el hipotálamo (Calapai et al., 1999; Hastings et al., 2002) así como, la concentración del transportador de captura del 5-HT en el cortex frontal (Charnay et al., 1999). De igual modo, la invalidación del gen que codifica la leptina induce una disminución de las tasas de ARNm que codifica el transportador membranal del 5-HT en el NRD (Collin et al., 2000). La localización de los receptores de la leptina sobre las neuronas serotoninérgicas del NRD y del núcleo del rafe medio del ratón (Finn et al., 2001) representa un argumento suplementario en favor de una interacción entre la leptina y las neuronas serotoninérgicas. En el mismo paradigma experimental de utilización del MDMA, los resultados aquí expuestos indican que las tasas de leptina son disminuidas en el caso de los ratones mutantes. Por otra parte, la inyección de MDMA no induce variación de la leptinemia. Estos datos sugieren un control positivo de las tasas de leptina como resultado de la activación del receptor 5-HT₄ después de una ayuno durante 24 h, de conformidad con los aumentos de leptina inducidos por la administración de 5-hidroxitriptofano (Yamada et al., 1999). Sin embargo, las tasas de leptina no son modificadas en el caso de los ratones mutantes para el receptor 5-HT_{1B} (Bouwknicht et al., 2001) o 5-HT_{2C} (Nonogaki et al., 1998). Los datos aquí expuestos indican que la leptinemia es menor en el caso de los ratones privados del receptores 5-HT₄ antes y después del estrés de coacción, en comparación con los ratones silvestres. Puesto que una elevación de las tasas de leptina acompaña a la de la corticosterona (Guerre-Millo, 1997), los resultados aquí expuestos sugieren que los efectos de un estrés de privación de comida sobre la leptinemia se vuelven ineficaces en ausencia del receptor 5-HT₄; lo que daría como resultado una mayor resistencia de los ratones invalidados para el receptor 5-HT₄ a los estrés anorexígenos.

- 55 Puesto que la leptina activa la expresión del péptido CART en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Kristensen et al., 1998), están siendo analizadas las posibles variaciones del péptido CART en el hipotálamo de los ratones invalidados para el receptor 5-HT₄, en comparación con los ratones silvestres. Su implicación en la regulación del consumo de alimentos es variable de conformidad con el locus de su inyección. De este modo, la administración intracerebroventricular del péptido CART da como resultado en una anorexia (Kristensen et al., 1998) mientras que

una administración intratisular en el hipotálamo provoca una hiperfagia (Abbott et al., 2001). El efecto orexígeno de una inyección del péptido CART en el núcleo paraventricular del hipotálamo descrito por Abbott et al. (2001) se contradice con las observaciones de Stanley et al. (2001). los resultados del inventar indican que la inyección del péptido CART en la « shell » del NAc ha reducido el apetito en el mismo paradigma experimental de utilización del MDMA. Por lo tanto, el conjunto de los resultados sugiere que el MDMA inhibe el apetito como resultado de la activación del receptor 5-HT₄ que entraña una regulación positiva de la expresión del péptido CART y su liberación. Diversos datos constituyen argumentos en favor de un mecanismo de este tipo (1) el receptor 5-HT₄ está localizado sobre neuronas que contienen GABA (Compan et al., 1996), (2) el péptido CART está colocalizado con el GABA en las neuronas del NAc (Scearce-Levie et al., 1999, Scearce-Levie et al., 2001) ; (3) los resultados aquí expuestos sugieren una colocalización regional de la expresión de los ARNm y de las proteínas péptido CART/ receptor 5-HT₄ en la « shell » del NAc. Sin embargo, quedan por establecer la colocalización celular y la estimación de la concentración del péptido en el NAc después de cada uno de estos tratamientos.

REFERENCIAS

- Abbott CR. Rossi M. Wren AM. Murphy KG. Kennedy AR. Stanley SA. Zollner AN. Morgan DG. Morgan I. Ghatei MA. Small CJ. Bloom SR. (2001) *Endocrinology*, 142, 3457-63.
- Ackerman S. Nolan LJ. (1998) *CNS Drugs.*, 9, 135-51.
- Adell A. Casanovas JM. Artigas F. (1997) *Neuropharmacology*, 36, 735-741.
- Allison DB. Mentore JL. Heo M. Chandler LP. Cappelleri JC. Infante MC. Weiden PJ. (1999) *J. Psychiatry*, 156, 1686-96.
- Amat J. Matus-Amat P. Watkins LR. Maier SF. (1998) *Brain Res.*, 812, 113-120.
- Barnes NM. & Sharp T. (1999) *Neuropharmacology*, 38, 1083-152.
- Barsh GS. Farroq IS. O'Rahilly S. (2000) *Nature*, 404, 644-51.
- Bockaert et al. (1997) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 129. Serotonergic Neurons and 5-HT receptors in the CNS. Eds. H.G. Baumgarten and M. Göthert. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 439-474.
- Bockaert J. Ansanay H. Letty S. Marchetti-Gauthier E. Roman F. Rondouin G. Fagni L. Soumireu-Mourat B. Dumuis A. (1998) *C R Acad Sci III.*, 321(2-3), 217-21.
- Bockaert J. Claeysen S. Sebben M. Dumuis A. (1998) *Ann N Y Acad-Sci.*, 861, 1-15.
- Bockaert J. Claeysen S. Compan V. Dumuis A. (Revue, 2003, en prensa) 5-HT₄ receptor in CNS functions : are they potential therapeutical targets ? *Drug Target*.
- Bonasera SJ. Tecott LH. (2000) *Pharmacol Ther.*, 88 (2): 133-42.
- Bonhomme N. De Deurwaërdere P. Le Moal M. Spampinato U. (1995) *Neuropharmacology*, 3, 4269-279.
- Bouwknicht JA. Van der Gugten J. Hijzen TH. Maes RA. Hen R. Olivier B. (2001) *Psychopharmacology*, 153(4), 484-90.
- Brunner D. Buhot, M-C. Hen R. Hofer M. (1999) *Behav Neurosci.*, 113, 587-601.
- Calapai G. Corica F. Corsonello A. Sautebin L. Di Rosa M. Campo GM. Buemi M. Mauro VN. Caputi AP. (1999) *J Clin Invest.*, 104, 975-82.
- Carlsson L. Amos GJ. Andersson B. Drews L. Duker G. Wadstedt G. (1997) *J Pharmacol Exp Ther.*, 282, 220-7.
- Casper RC. (1998) *Depress Anxiety*, 8, 96-104.
- Chaouloff F. (2000) *J. Psychopharmacol.*, 14, 139-151.
- Charnay Y. Cusin I. Vallet PG. Muzzin P. Rohner-Jeanrenaud F. Bouras C. (2000) *Neurosci Lett.*, 283, 89-92.

- Claeysen S. Sebben M. Becamel C. Parmentier M-L. Dumuis A. Bockaert J. (2001) *EMBO reports*, 21, 61-67.
- Clifton PG. Lee MD. Somerville EM. Kennett GA. Dourish CT. (2003) *Eur J Neurosci.*, 17, 185-90.
- Collin M. Hakansson-Ovesjo M. Misane I. Ogren SO. Meister B. (2000) *Brain Res Mol Brain Res.*, 81, 51-61.
- Compan V. Charnay Y. Daszuta A. Hen R. Bockaert J. (2003) *Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris.*
- 5 Cheng CHK. Costall B. Kelly M. Naylor RJ. (1994) *Eur J Pharmacol.*, 255, 39-49.
- Compan V. Daszuta A. Salin P. Sebben M. Bockaert J. Dumuis A. (1996) *Eur J Neurosci.*, 8, 2591-2598.
- Compan V. Dusticier N. Nieoullon A. Daszuta A. (1996) *Synapse*, 24, 87-96.
- Costall B. & Naylor RJ. (1997) *Br J Pharamcol.*, 122, 1105-1118.
- 10 De Deurwaerdère P. L'Hirondel M. Bonhomme N. Lucas G. Cheramy A. Spampinato U. (1997) *J Neurochem.*, 68, 195-203.
- Di Chiara G. (1995) *Drug Alcohol Depend*, 38, 95-137.
- Donohoe TP. (1984) *Life Science*, 34(3), 203-218.
- Dourish CT. Hutson PH. Kennett GA. Curzon G. (1986) *Appetite*, 7 Suppl, 127-40.
- Dumuis A. Bouhelal R. Sebben M. Cory R. Bockaert J. (1988) *Mol. Pharmacol.*, 34, 880-887.
- 15 Erecius LF. Dixon KD. Jiang JC. Gietsen DW. (1996) *J Nutri.*, 126, 1722-1731.
- Fairburn CG. Doll HA. Welch SL. Hay PJ. Davies BA. O'Connor ME. (1998) *Arch Gen Psychiatry*, 55, 233-241.
- Finn PD. Cunningham MJ. Rickard DG. Clifton DK. Steiner RA. (2001) *J Clin Endocrinol Metab.*, 86, 422-6.
- Foltin RW. & Evans SM. (1999) *Pharmacol Biochem Behav.*, 62, 457-64.
- Fontana DJ. Daniels SE. Wong EH. Clark RD. Eglen RM. (1997) *Neuropharmacology*, 36, 689-96.
- 20 Garrow J. (1991) *Br Med J.*, 303, 704-706.
- Ge J & Barnes NM. (1996), *Br J Pharmacol*, 117, 1475-80.
- Ge J. Barnes NM. Costall B. Naylor RJ. (1997) *Pharmacol Biochem Behav.*, 58, 775-783.
- Gerald C. Adham N. Kao HT. Olsen MA. Laz TM. Schetcher LE. Bard JA. Vaysse PJ. Hartig PR. Branchek TA. (1995) *EMBO J.*, 14, 2806-2815.
- 25 Godart NT. Flament MF. Lecrubier Y. Jeammet P. (2000) *Eur Psychiatry.*, 15, 38-45.
- Grignaschi G. Mantelli B. Samanin R. (1993) *Neurosci Lett.*, 152, 103-6.
- Guerre-Millo M. (1997) *Biomed Pharmacother.*, 51, 318-23.
- Guy - Grand B. (1995) *Obes. Res.*, 4, 491S-496S.
- 30 Harris RB. Mitchell TD. Simpson J. Redmann SM Jr. Youngblood BD. Ryan DH. (2002) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282, R77-88.
- Hastings JA. Wiesner G. Lambert G. Morris MJ. Head G. Esler M. (2002) *Regul Pept.*, 103, 67-74.
- Heisler LK. Chu HM. Tecott LH. (1998) *Ann N Y Acad Sci.*, 15: 861:74-8.

- Hoebel BG. (1997) *Appetite*, 29, 119-133.
- Inoue T. Tsuchiya K. Koyama T. (1994) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49, 911-920.
- Jiang JC. & Gietzen DW. (1994) *Pharmacol Biochem Behav.*, 47, 59-63.
- Joseph MH. & Kennett GA. (1983) *Brain Res.*, 270, 251-257.
- 5 Joubert L. Claeysen S. Sebben M. Bessis AS. Clark RD. Martin RS. Bockaert J. Dumuis A. (2002) *J Biol Chem.*, 277, (28) 25502-11
- Kelley AE. Swanson CJ. (1997) *Behav Brain Res.*, 89, 107-113.
- Kennett GA. Bright F. Trail B. Blackburn TP. Sanger GJ. (1997) *Neuropharmacology*, 36, 707-712.
- Konstandi M. Johnson E. Lang MA. Malamas M. Marselos M. (2000) *Pharmacol Res.*, 41, 341-346.
- 10 Koob GF. Nestler EJ. (1997) *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 9, 482-497.
- Kristensen P. et al. (1998) *Nature*, 393, 72-6.
- Kucksmarski RJ. Flegal KM. Campbell SM. Jonhson CL. (1994) *J Am Med Assoc.*, 272, 205-211.
- Lilenfeld LR. et al., (1998) *Arch Gen Psychiatry*, 55, 603-610.
- Lowry CA., Rodda JE. Stafford L. Lightman Ingram CD. (2000) *J. Neurosci.*, 20, 7728-7736.
- 15 Lucas G. Di Matteo V. De Deurwaerdère P. Porras G. Martin-Ruiz R. Artigas F. Esposito E. Spampinato U. (2001) *Eur. J. Neurosci.*, 13, 889-890.
- Lucas J. Yamamoto A. Scearce-Levie K. Saudou F. Hen R. (1998) *J Neurosci.*, 18, 5537-5544.
- Mc Mahon LR. & Cunningham KA. (1999) *J Pharmacol Exp Ther.*, 291, 300-307.
- 20 Momose K. Inui A. Asakawa A. Ueno N. Nakajima M. Fujimiya M. Kasuga M. (1999) *Diabetes Obes Metab.*, 5, 281-284.
- Morley JE. Levine AS. Rowland NE. (1983) *Life Science*, 32, 2169-82.
- Nonogaki K. Strack AM. Dallman MF. Tecott LH. (1998) *Nat Med.*, 4(10), 1152-6.
- Pelleymounter MA. Cullen MJ. Baker MB. Hecht R. Winters D. Boone T. Collins F (1995) *Science*, 28;269(5223), 540-3.
- 25 Phillips T.J. Hen R. Crabbe J.C. (1999) *Psychopharmacology* 147, 5-7.
- Price ML. Lucki I. (2001) *J. Neurosci.*, 21, 2833-2841.
- Rodgers RJ. Haller J. Holmes A. Halasz J. Walton TJ. Brain PF. (1999) *Physiol. Behav*, 68, 47-53
- Rybkin II. Zhou Y. Volaufova J. Smagin GN. Ryan DH. Harris RB. (1997) *Am J Physiol.* 273, R1612-22.
- Salamone JD. Cousins MS. Snyder BJ. (1997) *Neurosci Biobehav Rev.*, 21, 341-359.
- 30 Samanin R. Garattini S. (1996) *Therapie*, 51, 107-15.
- Saudou F. Hen R. (1994) *Medical Chemistry Research*, 4, 16-84.
- Scearce-Levie K. Viswanathan SS. Hen R. (1999) *Psychopharmacology*, 141, 154-161.
- Scearce-Levie K. Coward P. Redfern CH. Conklin BR. (2001) *Trends Pharmacol Sci.*, 22, 414-20.

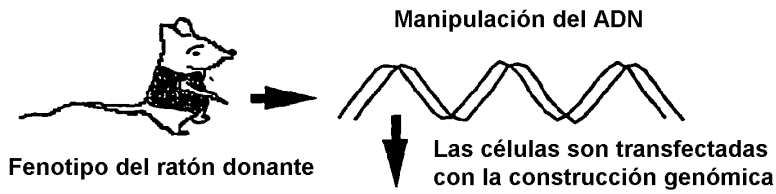
- Semenova TP. Ticku MK. (1992) *Brain Res.*, 588(2), 229-36.
- Sillaber I. Montkowski A. Landgraf R. Barden N. Holsboer F. Spanagel R. (1998) *Neuroscience*, 85, 415-425.
- Silvestre JS. Fernandez AG. Palacios JM. (1996) *Eur J Pharmacol*, 309, 219-222.
- 5 Stanley SA. Small CJ. Murphy KG. Rayes E. Abbott CR. Seal LJ. Morgan DG. Sunter D. Dakin CL. Kim MS. Hunter R. Kuhar M. Ghatei MA. Bloom SR. (2001) *Brain Res.*, 893, 186-94.
- Steward LJ. Ge J. Stowe LR. Brown C. Bruton RK. Stokes PRA. Barnes NM. (1996) *J. Pharm.*, 117, 55-62.
- Stradford TR. Kelley A. (1997) *J Neurosci.*, 17, 4434-4440.
- Stradford TR. Kelley A. (1999) *J Neurosci.*, 19, 11040-8.
- Stradford TR. Swanwon CJ. Kelley A. (1998) *Behav Brain Res.*, 93, 43-50.
- 10 Taber MT. Fibiger HC. (1997) *Neuroscience*, 76, 1105-112.
- Ulmer C. Engels P. Abdel'Al A. Lubbert H. (1996) *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.*, 354, 210-212.
- Vergoni AV. & Bertolini A. (2000) *Eur J Pharmacol.*, 405 (1-3), 25-32.
- Vickers SP. Dourish CT. Kennett GA. (2001) *Neuropharmacology*, 2, 200-9.
- Visselman JO. Roig M. (1985) *J Clin Psychiatry*, 46, 118-24.
- 15 Vilaro MT. Cortès R. Gerald C. Branchek TA. Palacios JM. Mengod G. (1996) *Mol Brain Res.*, 43, 356-360.
- Waeber C. Sebben M. Nieoullon A. Bockaert J. Dumuis A. (1994) *Neuropharmacology*, 33, 527-541.
- Yamada J. Sugimoto Y. Ujikawa M. (1999) *Eur J Pharmacol.*, 383, 49-51.
- Zahorodna A, Tokarski K, Bijak M. (2000) *Pol. J Pharmacol.*, 52(2), 107-9.

REIVINDICACIONES

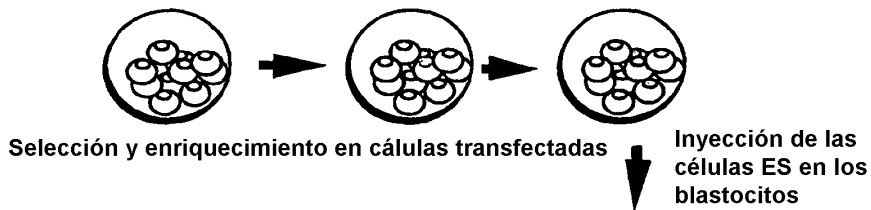
1. Utilización de un agonista del receptor 5-HT₄ elegido en las 6 clases químicas que son los indoles, las benzamidas, el benzoato, las aril-cetonas las bencimidazonas y las 1,8-naftilamidas o de un sal farmacéuticamente aceptable de este agonista para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la bulimia y/o la obesidad, o de un antagonista elegido en las 6 clases químicas que son los carboxilatos de indol, las imidazonas, las aril-cetonas, las bencimidazonas y las 1,8-naftilamidas o agonista inverso del receptor 5-HT₄ o de un sal farmacéuticamente aceptable de estos para la preparación de un medicamento destinado a llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención de la anorexia o la adicción a los fármacos de abuso.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho ligando no es un ligando del receptor 5-HT₃.
3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho ligando es específico del receptor 5-HT₄.
4. Método para identificar un compuesto biológicamente activo susceptible de ser utilizado en el tratamiento de una patología relacionada con una conducta obsesiva y/o la obesidad, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- la puesta en contacto del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente con dicho compuesto biológicamente activo, y
 - determinar si dicho compuesto biológicamente activo es capaz de modular la actividad basal del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha etapa (a) comprende las etapas siguientes:
- la puesta en contacto de células que expresan un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente, et
 - la incubación de dichas células con dicho compuesto biológicamente activo.
6. Método según la reivindicación 5, en el que las células cultivadas en la etapa (i) son células que sobre-expresan en su superficie un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que las células cultivadas en la etapa (i) son transformadas por una molécula de ácido nucleico, que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente o un vector que comprenda, al menos una molécula de ácido nucleico, que codifique un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente equivalente, asociada con secuencias de control adaptadas.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la molécula de ácido nucleico que codifica un receptor 5-HT₄ funcional o un receptor funcionalmente es, de forma ventajosa, una molécula que codifica un receptor 5-HT₄ de mamíferos y, de una manera muy particular, es una molécula que codifica el receptor 5-HT₄ humano.
9. Método según una cualquiera des reivindicaciones 4 a 8, en el que la modulación de la actividad basal del receptor 5-HT₄ o de un receptor funcionalmente equivalente es medida a través de la activación (para un agonista) o de la inhibición (para un antagonista o un agonista inverso) de la transducción de la señal.
10. Método según la reivindicación 4, en el que, en la etapa (a), los receptores 5-HT₄ o los receptores funcionalmente equivalentes son insertados en liposomas y son integrados en biosensores.

Figura 1

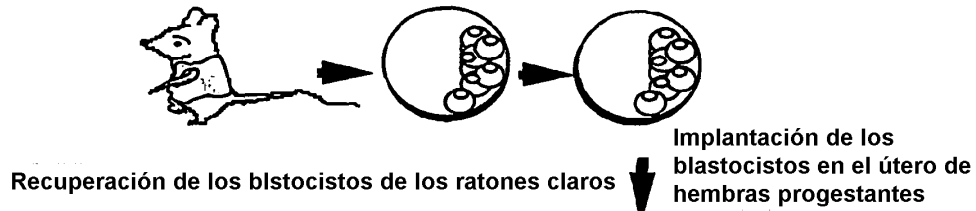
(1) Sector de la Biología Molecular: preparación del ADN



(2) Sector del cultivo de células: manipulación de las células madre embrionarias (ES)



(3) Sector relacionado con la microcirugía: manipulación de los blastocistos



(4) Sector relacionado con el alojamiento: descendencia del ratón

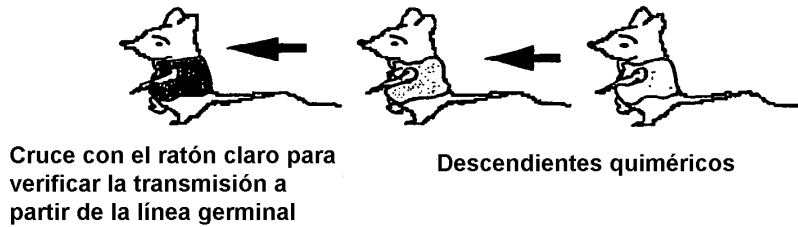


Figura 2

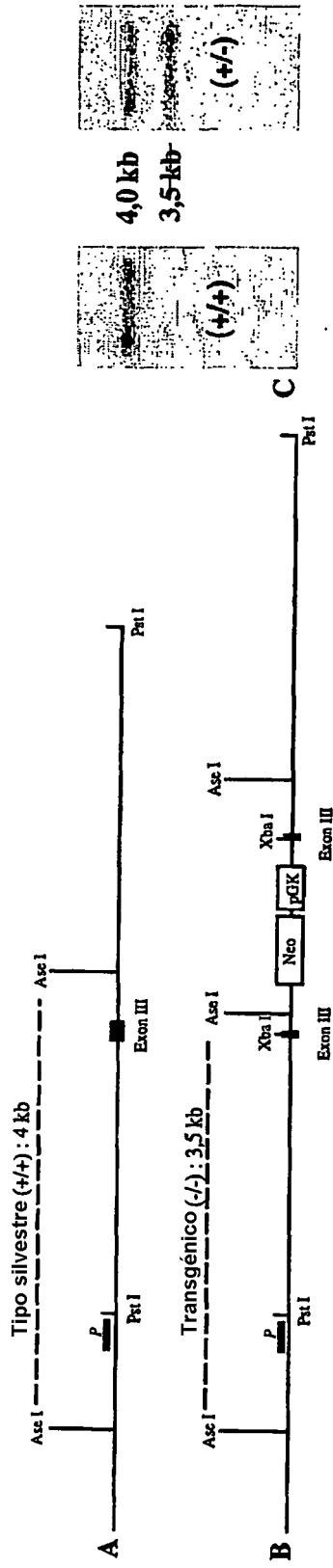


Figura 3

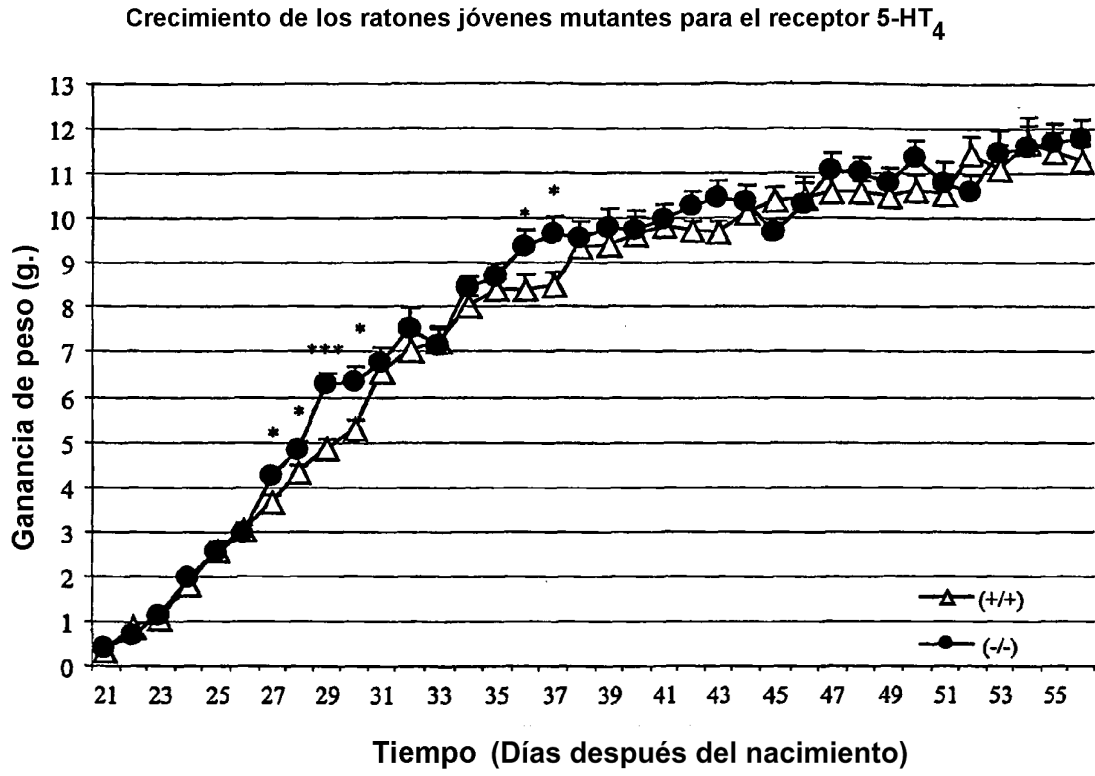
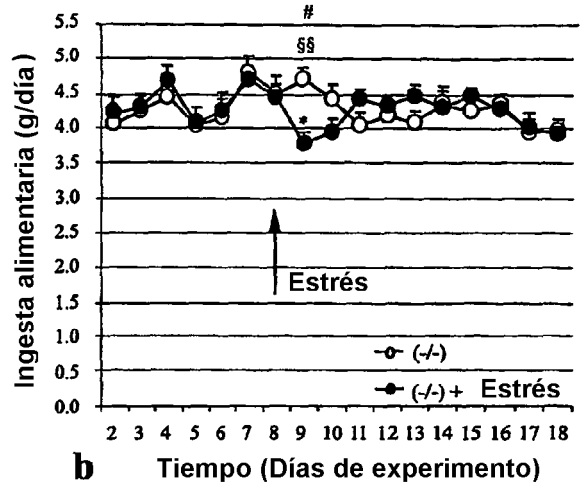
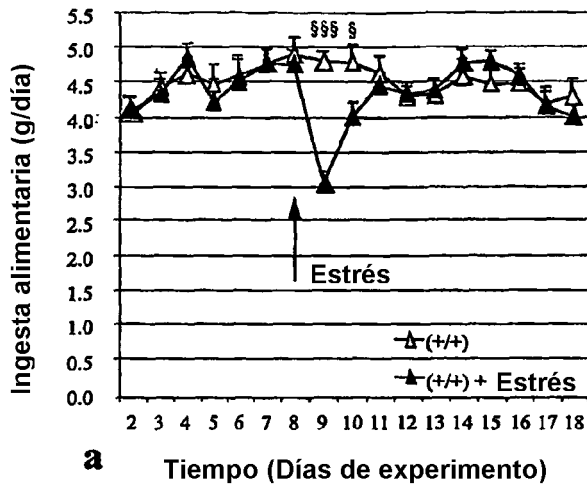


Figura 4

Ingesta alimentaria después del estrés de coacción



Ganancia de peso después del estrés de coacción

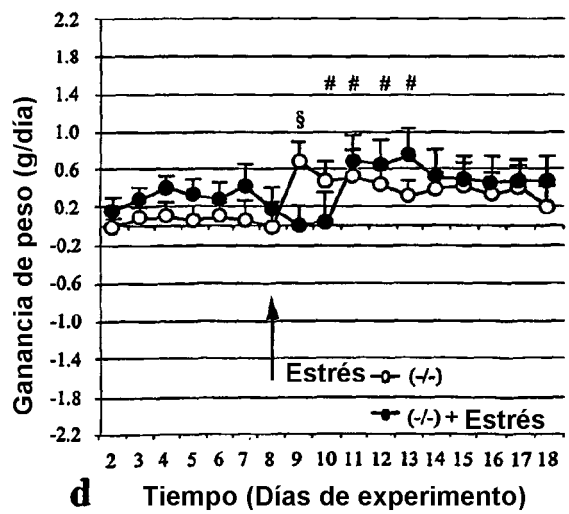
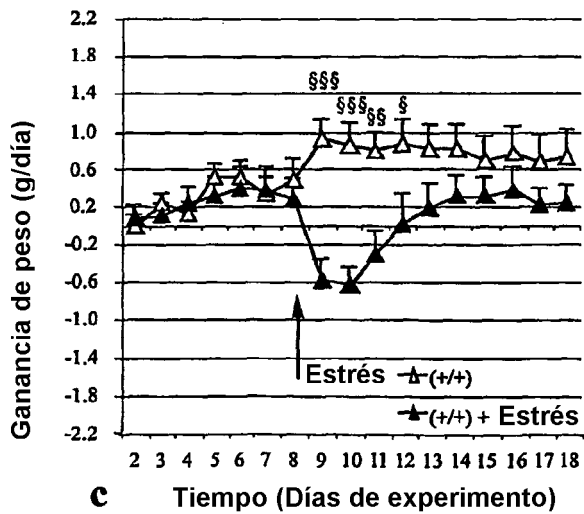


Figura 5

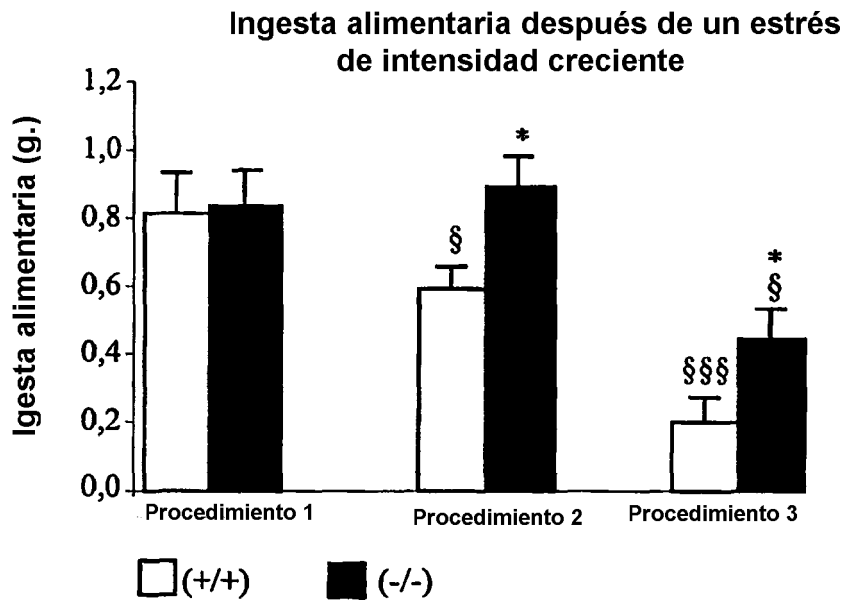


Figura 6

Fig. 6A

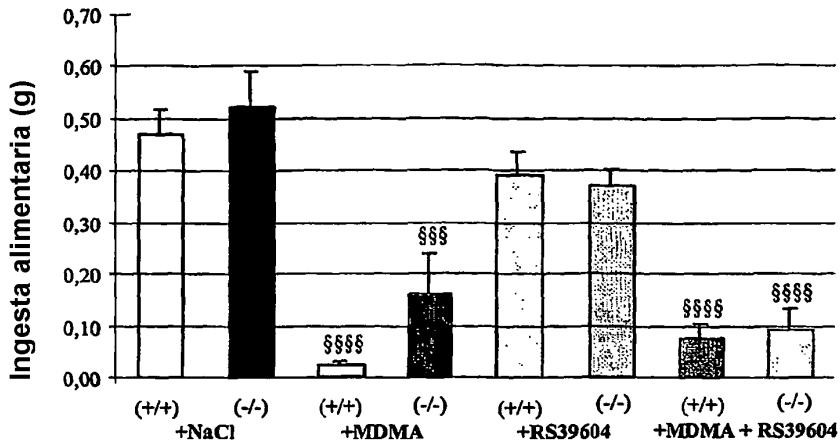


Fig. 6B

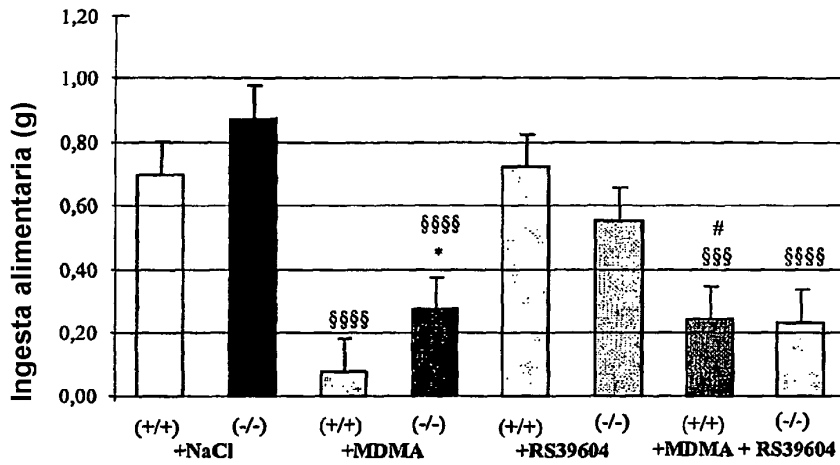


Fig. 6C

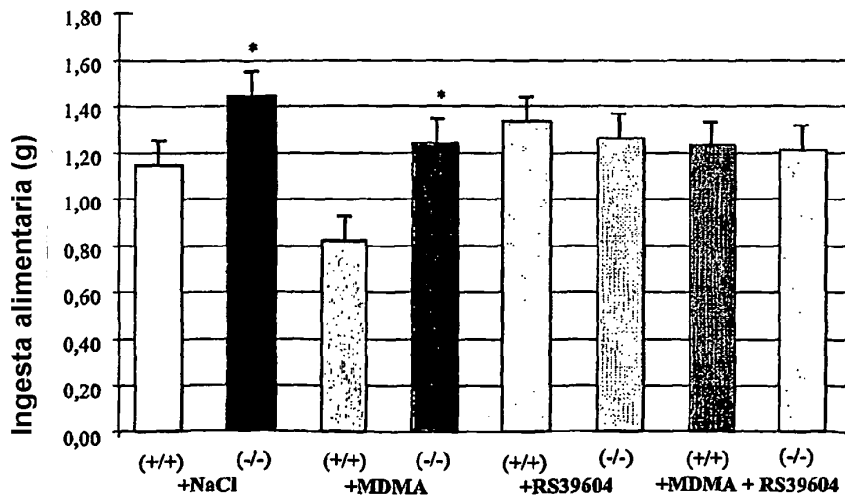


Figura 7

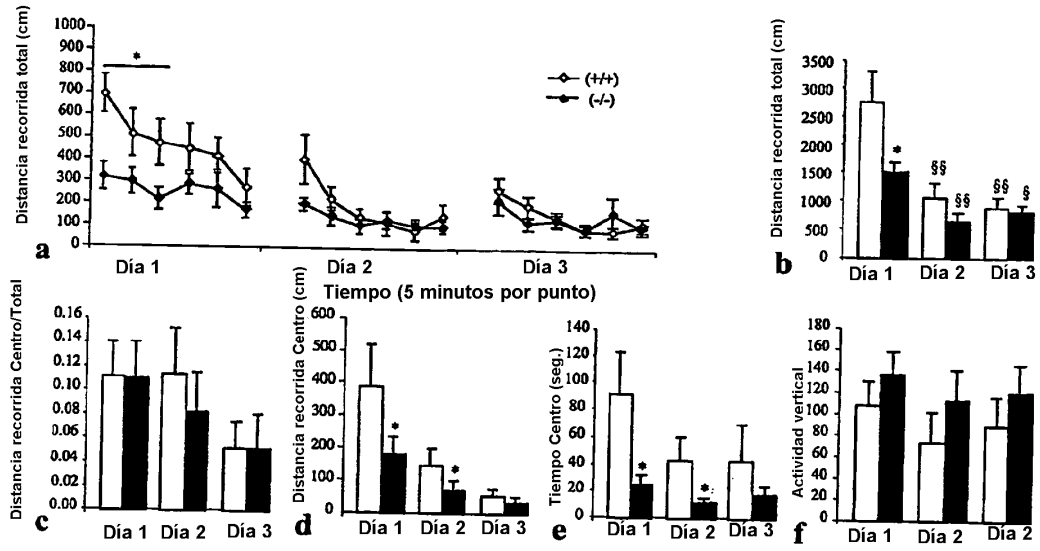


Figura 8

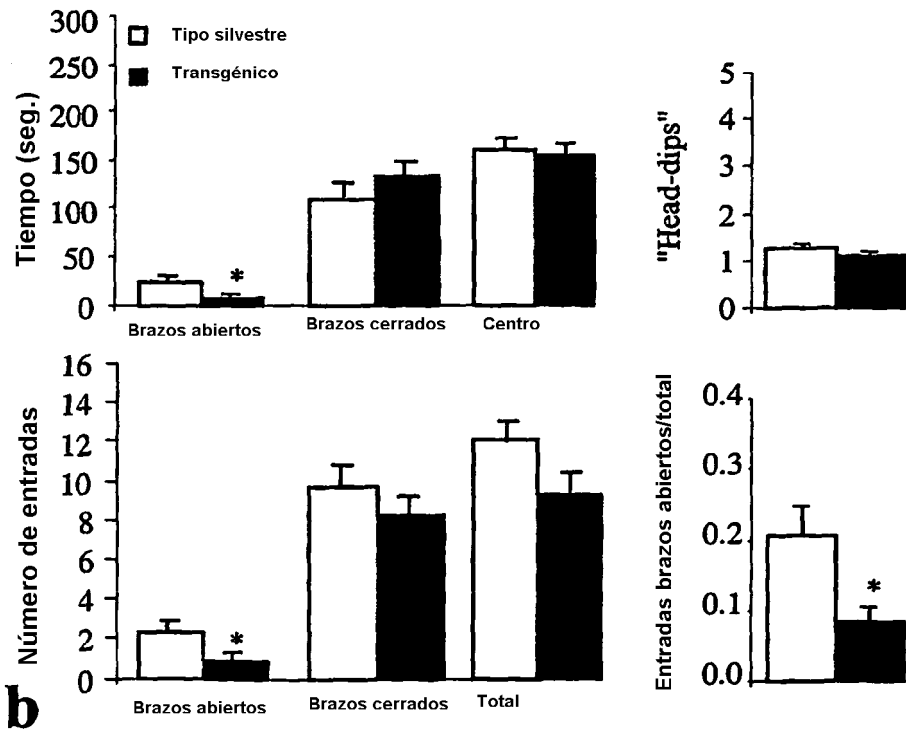
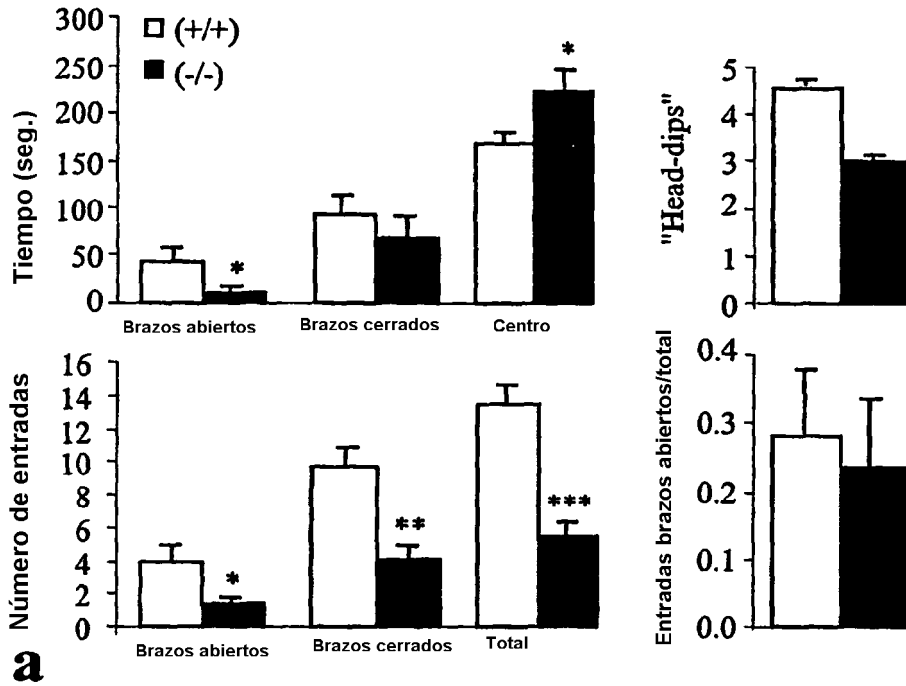


Figura 9

