



HAL
open science

Régulation des comportements sociaux par l'action séquentielle de l'ocytocine et de la vasopressine dans le septum latéral

Amélie Borie

► **To cite this version:**

Amélie Borie. Régulation des comportements sociaux par l'action séquentielle de l'ocytocine et de la vasopressine dans le septum latéral. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT: 2018MONTT015 . tel-01907829

HAL Id: tel-01907829

<https://theses.hal.science/tel-01907829>

Submitted on 29 Oct 2018

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

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

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

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle (UMR5203, U1191)

REGULATION DES COMPORTEMENTS SOCIAUX PAR L'ACTION SEQUENTIELLE DE L'OCYTOCINE ET LA VASOPRESSINE DANS LE SEPTUM LATERAL

Présentée par Amélie BORIE

Le 3 juillet 2018

Sous la direction de Michel DESARMENIEN
et Freddy JEANNETEAU

Devant le jury composé de

Bice CHINI, Senior Research Scientist, Istituto di Neuroscienze (Milan, Italie)

Vivien CHEVALEYRE, DR, Centre de Psychiatrie et Neurosciences (Paris)

Maithé TAUBER, PUPH, Hôpital des enfants (Toulouse)

Emmanuel BOURINET, DR, Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier)

Michel DESARMENIEN, DR, Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier)

Freddy JEANNETEAU, CR, Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier)

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mes deux encadrants qui m'ont tous les deux beaucoup appris au cours des 4 dernières années.

Michel Desarménien, qui a accepté de m'encadrer il y a maintenant plus de 4 ans. Je me suis réellement amusée à découvrir, avec vous, l'électrophysiologie. Je suis très reconnaissante du temps que vous m'avez accordé, de votre patience et de votre disponibilité, tout particulièrement ces derniers mois. Merci également pour les nombreux conseils, scientifiques mais également humains que vous m'avez donné et pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de cette thèse.

Freddy Jeanneteau, directeur de mon équipe d'accueil. Tes remarques ont toujours été constructives et m'ont permis d'avancer dans la démarche scientifique. Tu m'as poussé à ne pas me contenter de ce que je connaissais et à faire mieux et je t'en remercie. Je tiens également à te remercier de m'avoir toujours écouté et d'avoir pris en considération mes remarques mais également de m'avoir encouragé et soutenu.

Merci à vous deux.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- Bice Chini qui a accepté de faire partie des rapporteurs de cette thèse
- Vivien Chevalyre qui a participé aux 3 comités de thèses qui ont permis de faire évoluer ce travail et qui fait également parti des rapporteurs
- Maithé Tauber dont les travaux chez les enfants ont inspiré ces recherches
- Emmanuel Bourinet qui a participé au dernier comité de thèse et dont les remarques ont été très utiles

Cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est sans les conseils de Margarita Arango et de Gilles Guillon.

Gilles, merci pour votre disponibilité et vos conseils. Votre vision de pharmacologiste nous a permis de mener ces expériences à bien. Vos conseils pour la vulgarisation scientifique et l'enseignement m'ont également été très utiles.

Marga, au-delà de ta bonne humeur communicative, tes conseils techniques et scientifiques m'ont réellement permis d'avancer. Avec ta rigueur, ta passion et l'énergie que tu mets dans ton travail, tu es vraiment un modèle pour moi. Merci.

Je souhaite également remercier les autres membres présents ou passés du laboratoire :

- Yann, merci pour ta bonne humeur et tes « Oh purée » signature qui m'ont fait beaucoup rire.
- Elisabete, ça a réellement été un plaisir de travailler avec toi pendant un an. Ton calme et ta gentillesse ont apporté une touche de sérénité au laboratoire.
- Geoffrey, merci de ton travail et de toute la bonne volonté dont tu as fait preuve.

Je remercie également les chercheurs qui m'ont aidé au cours de cette thèse via leur participation à mes différents comités de thèse : Antoine Depaulis, Jean Valmier, Emmanuel Valjent et Michel Vignes ; et ceux qui ont relu ma demande de financement pour la 4^{ème} année et m'ont conseillé : Patrice Mollard et Philippe Marin.

Ce travail n'aurait pu être accompli sans l'aide des stagiaires qui ont chacun apportés un petit quelque chose lors de leur passage au laboratoire.

Laetitia, ça a été un réel plaisir de travailler avec quelqu'un d'aussi organisé, rigoureux, travailleur et aussi gentil. Je suis contente que tu aies trouvé une voie dans laquelle tu t'épanouies professionnellement.

Maria, merci de ta bonne humeur communicative ! Tes « buenos dias » pleins d'énergie m'ont donné le sourire. Bon courage pour les mois qui arrivent !

Emi, merci de ton enthousiasme ! Continue de faire les choses avec autant d'énergie !

Margaux, j'ai été étonnée de voir, chez quelqu'un d'aussi jeune, autant de bonne volonté et de remarques pertinentes. C'est un plaisir de travailler avec toi.

Djodi, la force tranquille. Ta bonne humeur et ta tranquillité tout en efficacité nous ont donné le sourire lors de ton passage. Merci.

Enfin, Johanna et Laurie, merci de votre gentillesse et de votre travail.

Je souhaite également remercier les collaborateurs qui nous ont permis de mener ce travail à bien :

- Nicola Marchi qui m'a permis d'utiliser l'EEG et m'a donné des conseils quant à son utilisation. Badreddine Boussadia (Pedro), qui m'a initié aux chirurgies.
- Françoise Muscatelli qui nous a donné la lignée de souris Magel2KO et qui a partagé avec nous son expérience sur cette lignée. Je tiens également à remercier les différents membres de son équipe pour les discussions que nous avons eu et en particulier Fabienne Schaller pour ses nombreux conseils.

Je remercie les services communs de l'IGF qui ont fait leur possible pour nous rendre la vie plus facile. Carmen et Anne, je tiens à vous remercier pour votre disponibilité et votre efficacité (on ne vous le dit certainement pas assez). Jocelyne, Victor et Rachel merci d'avoir été compréhensifs et d'avoir fait face à nos demandes de dernière minute.

Je remercie également les membres du plateau i-explore. Karim, merci de ta patience et de ta compréhension de nos demandes ; Denis, Elodie et Quentin, merci de vos conseils, de votre bonne humeur et du temps que vous m'avez accordé; Eloïse, Frederic, Luc et Steeve, merci de votre bonne humeur et de votre travail.

La vie au laboratoire, ce n'est pas seulement les expériences et les manips. C'est pourquoi je tiens à remercier tous les membres de l'association CBS2 avec qui on a passé du temps à organiser des soirées, la journée CBS2... Ces moments ont été extrêmement formateurs tout en restant ludiques et je vous en remercie.

En particulier, je tiens à remercier Samy, Benoit et Matthias avec qui nous avons partagé cette aventure de l'asso mais également les années de master, le concours de l'ED... Je vous souhaite le meilleur.

Yasmine, Lama... merci pour tout. Votre soutien, en particulier au cours de ces derniers mois, a été essentiel. Merci d'avoir été honnêtes avec moi et de m'avoir supporté. Yasmine, ton calme, ta persévérance et la force de ton caractère te permettront de réussir. Lama, j'ai appris à te connaître et j'ai découvert une personne vraie et sincère qui fait les choses avec toute l'énergie dont elle dispose. Je suis vraiment contente d'avoir partagé cette aventure avec vous.

Je souhaite aussi à remercier les doctorants ou nouveaux docteurs avec qui j'ai partagé, devant un café (ou un grand nombre de cafés), les aléas de la thèse : Pierre, Malik, Ombeline (on peut enfin dire « on l'a fait ! »), Pierre (n°2 ^^), Alexandre, Pedro, Joëlle, ... merci pour ces moments.

Guillaume, tu sais à quel point ta présence m'a apporté. Tu m'as remonté le moral dans les moments difficiles, as fêté avec moi les réussites et tu m'as poussé quand j'en avais besoin. Je te remercie du soutien sans faille dont tu as fait preuve. Je ne serais certainement pas venu au bout de cette thèse sans tes encouragements.

Je souhaite également remercier mes parents qui m'ont encouragé dans mon choix de faire une thèse et qui m'ont soutenu ensuite au long de celle-ci. Je remercie également mon frère, Adrien, pour son soutien.

Grace à vous tous, cette expérience a été plus que formatrice sur un plan scientifique mais également sur un plan humain. Encore une fois, merci.

RESUME	5
ABSTRACT.....	6
LISTE DES ABBREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	8
INTRODUCTION	10
1. L'OCYTOCINE ET LA VASOPRESSINE : DEUX NEURO-MODULATEURS CENTRAUX	11
1.1. <i>Généralités sur l'ocytocine et vasopressine</i>	11
1.1.1. Deux hormones peptidergiques	11
1.1.2. La production d'ocytocine et de vasopressine	11
1.1.3. Principales fonctions périphériques de l'ocytocine et de la vasopressine.....	19
1.1.4. Une régulation du système ocytocine/vasopressine à long terme via des mécanismes épigénétiques	20
1.2. <i>Un système ocytocine/vasopressine central</i>	21
1.2.1. Libération centrale de l'ocytocine et de la vasopressine	21
1.2.2. Des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont exprimés centralement.....	26
1.2.3. Stimuli responsables d'une libération centrale d'ocytocine et de vasopressine	29
1.3. <i>Fonctions centrales de l'ocytocine et de la vasopressine</i>	30
1.3.1. L'ocytocine et la vasopressine, deux neuromodulateurs centraux	30
1.3.2. L'action centrale de l'ocytocine et de la vasopressine module la valence des informations perçues	31
1.3.3. L'ocytocine et la vasopressine régulent les comportements.....	31
1.4. <i>Deux systèmes à étudier en parallèle</i>	32
1.4.1. Des systèmes présentant de fortes homologies	32
1.4.2. Compensations fonctionnelles entre les systèmes ocytocine et vasopressine	34
2. L'OCYTOCINE ET LA VASOPRESSINE : MODULATEURS DU COMPORTEMENT SOCIAL.....	36
2.1. <i>Ocytocine/vasopressine et réponse sociale</i>	36
2.1.1. Le système ocytocine/vasopressine module une grande variété de comportements sociaux	36
2.1.2. Activation aiguë chez l'adulte.....	41
2.1.3. Activation chronique chez l'adulte	42
2.2. <i>Ocytocine et vasopressine dans le cadre de pathologies entraînant des troubles du comportement social</i>	42
2.2.1. Troubles du spectre autistique : un trouble neuro-développemental	42
2.2.2. Une connectivité cérébrale altérée dans les troubles du spectre autistique à l'origine des déficits comportementaux ?.....	45
2.2.3. Ocytocine et vasopressine dans le traitement des troubles du spectre autistique ?	47
2.2.4. Autres maladies neuro-développementales associées à des troubles sociaux et pour lesquelles un traitement à l'ocytocine semble prometteur.....	49
3. DEVELOPPEMENT, SYSTEME OCYTOCINE/VASOPRESSINE ET TROUBLES SOCIAUX	58
3.1. <i>Périodes critiques et développement cérébral</i>	58
3.1.1. Exemple de période critique : le switch du potentiel d'équilibre du GABA induit par l'ocytocine	58
3.1.2. Période critique et troubles neuro-développementaux	59
3.2. <i>Développement du système ocytocine/vasopressine</i>	60
3.2.1. Production d'ocytocine et de vasopressine au cours du développement	60
3.2.2. Maturation post-natale des propriétés des neurones ocytocinergiques et vasopressinergiques	60
3.2.3. Les récepteurs centraux de l'ocytocine et de la vasopressine au cours du développement	61
3.2.4. Influence des événements péri-nataux sur les systèmes ocytocine et vasopressine	62
3.3. <i>L'ocytocine et la vasopressine comme modulateurs du développement</i>	64
3.3.1. Ocytocine et vasopressine : effets organisationnels	64
3.3.2. Ocytocine et vasopressine : des molécules importantes pour le développement du système nerveux	66
3.4. <i>Traitement précoce à l'ocytocine : vers un effet curatif ?</i>	67

3.5. Le septum : une cible du système OT/VP et d'un traitement précoce à l'ocytocine	68
3.5.1. Généralités	68
3.5.2. Réponse à l'ocytocine et à la vasopressine des neurones du septum latéral	74
PROBLEMATIQUE	78
STRATEGIE EXPERIMENTALE	81
MATERIEL ET METHODES	85
1. MODELES GENETIQUES EXPERIMENTAUX	86
2. GENOTYPAGE	87
3. STATISTIQUES	87
4. ELECTROPHYSIOLOGIE	89
5. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES NEURONES ENREGISTRES	93
6. UTILISATION DE RETRO-BILLES	94
7. IMMUNOHISTOCHEMIE	94
8. ETUDE COMPORTEMENTALE	95
9. ENREGISTREMENTS ELECTROENCEPHALOGRAPHIQUES	99
10. INJECTIONS INTRACEREBRALES D'AGONISTES OU D'ANTAGONISTES	101
11. OPTOGENETIQUE	103
12. AUTORADIOGRAPHIE	105
13. INJECTION DES SOURIS AU COURS DE LA PREMIERE SEMAINE DE VIE	106
RESULTATS	107
PARTIE A : MODULATION D'UN RESEAU SEPTAL PAR L'OCYTOCINE ET LA VASOPRESSINE ET IMPLICATION POUR LA REGULATION DES COMPORTEMENTS SOCIAUX	108
1. LA VASOPRESSINE ET L'OCYTOCINE : EFFETS SEQUENTIELS POUR LA REGULATION DES COMPORTEMENTS SOCIAUX ...	109
1.1. <i>Résultats</i>	109
1.2. <i>Discussion</i>	117
1.2.1. Comparaison avec les résultats des études précédentes	117
1.2.2. Biais possibles dans l'interprétation des résultats	118
1.2.3. Questions soulevées, hypothèses et expériences possibles	119
2. SIGNATURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE L'IMPACT DE L'OCYTOCINE ET DE LA VASOPRESSINE SUR LE SEPTUM LATERAL	120
2.1. <i>Résultats</i>	120
2.1.1. Electrophysiologie sur tranche	120
2.1.2. Electrophysiologie in vivo : EEG cortical	132
2.2. <i>Discussion</i>	136
2.2.1. Comparaison avec les résultats des études précédentes	136
2.2.2. Questions soulevées et expériences possibles	138
3. CARACTERISATION DU RESEAU NEURONAL IMPLIQUE	140
3.1. <i>Résultats</i>	140
3.1.1. Un réseau local sensible à l'ocytocine et/ou à la vasopressine	140
3.1.2. Résultats préliminaires : Modulation in vivo de l'activité des fibres ocytocinergiques du septum latéral issues du PVN	148
3.2. <i>Discussion</i>	152
3.2.1. Principaux résultats et interprétations possibles	152
3.2.2. Comparaison avec les résultats des études précédentes	153
3.2.3. Questions soulevées et expériences possibles	155

4. CARACTERISATION D'UNE TRACE EEG CORTICALE DEPENDANTE DE L'ACTIVATION SEPTALE DES RECEPTEURS DE L'OCYTOCINE ET DE LA VASOPRESSINE MIS EN JEU LORS DES COMPORTEMENTS SOCIAUX.....	157
4.1. <i>Résultats</i>	157
4.1.1. Caractérisation de traces EEG induites par l'interaction sociale et l'habituation sociale	157
4.1.2. Des traces dépendantes de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine et/ou de la vasopressine	163
4.2. <i>Discussion</i>	166
4.2.1. Comparaison avec les résultats des études précédentes	166
4.2.2. Questions soulevées et expériences possibles	166
5. LES SOURIS MAGEL2KO PRESENTENT DES DEFICITS D'ACTIVITE DU SYSTEME OCYTOCINE/VASOPRESSINE SEPTAL	167
5.1. <i>Résultats</i>	167
5.1.1. Evaluation du nombre de sites de liaison de l'ocytocine et de la vasopressine	167
5.1.2. Une réponse électrophysiologique à l'ocytocine et à la vasopressine altérée chez les animaux Magel2KO	171
5.1.3. Des défauts de comportements sociaux corrélés à des défauts dans l'activité EEG	171
5.2. <i>Discussion</i>	176
5.2.1. Principaux résultats et interprétations possibles	176
5.2.2. Comparaison avec les résultats des études précédentes	176
5.2.3. Questions posées et expériences possibles.....	178
6. BILAN ET CONCLUSION	179
PARTIE B : DEVELOPPEMENT DU SYSTEME OCYTOCINE ET CONSEQUENCE D'UN TRAITEMENT PRECOCE A L'OCYTOCINE CHEZ LES SOURIS MAGEL2KO	180
1. DEVELOPPEMENT DES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET MORPHOLOGIQUES DE NEURONES OCYTOCINERGIQUES DU PVN CHEZ LA SOURIS MAGEL2KO	181
1.1. <i>Résultats</i>	181
1.2. <i>Discussion</i>	184
1.2.1. Interprétation des résultats obtenus et lien avec les études précédentes.....	184
1.2.2. Questions posées et expériences possibles.....	185
2. IMPACT D'UN TRAITEMENT PERINATAL A L'OCYTOCINE SUR LA MATURATION DES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES NEURONES A OCYTOCINE	186
2.1. <i>Résultats</i>	186
2.2. <i>Discussion</i>	190
2.2.1. Interprétation des résultats obtenus et lien avec les études précédentes.....	190
2.2.2. Questions posées et expériences possibles.....	190
3. BILAN ET CONCLUSIONS.....	191
DISCUSSION GENERALE	192
1. UN RESEAU SEPTAL SENSIBLE A L'OCYTOCINE ET A LA VASOPRESSINE DONT LA FONCTION EST ESSENTIELLE A LA REGULATION DES COMPORTEMENTS SOCIAUX	193
1.1. <i>Résumé des principaux résultats obtenus et élaboration d'un modèle</i>	193
1.1.1. Une séquence ocytocine/vasopressine	193
1.1.2. Réponse des neurones du septum latéral à la vasopressine et à un agoniste des récepteurs de l'ocytocine.....	193
1.1.3. Elaboration d'un modèle basé sur une libération séquentielle de vasopressine et d'ocytocine dans le septum latéral	194
1.1.4. Explications, basées sur ce modèle, de l'impact comportemental de la modulation pharmacologique de cette séquence	197
1.1.5. Situations physiologiques ou pathologiques induisant une altération de la séquence vasopressine/ocytocine et conséquences comportementales	197
1.1.6. Perspectives : la restauration de la séquence vasopressine/ocytocine permettrait-elle de corriger les troubles comportementaux observés chez les souris Magel2KO ?	200
1.2. <i>Analyse critique des résultats obtenus</i>	200
1.3. <i>Le septum chez l'Homme</i>	204
2. PERSPECTIVES DE RECHERCHE FONDAMENTALE	204
2.1. <i>Régulation des effets séquentiels de la vasopressine et de l'ocytocine</i>	205

2.2.	<i>Détermination des neurones septaux activés par l'interaction et l'habituation sociale et de leurs rôles respectifs dans la régulation des comportements sociaux</i>	208
2.3.	<i>Mode d'action de la modulation, par l'administration précoce d'ocytocine, du développement du système ocytocinergique</i>	210
3.	ORIGINE DES TROUBLES INDUITS PAR LA DÉFICIENCE EN MAGEL2	211
3.1.	<i>Les gènes de la famille MAGE codent pour des protéines impliquées dans la régulation du système ubiquitine/protéasome et leur délétion induit des syndromes semblables</i>	212
3.2.	<i>Fonction du système ubiquitine/protéasome et troubles sociaux</i>	213
3.3.	<i>Une altération de la fonction ocytocinergique</i>	214
4.	EXPLOITATIONS DES RÉSULTATS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES.....	215
4.1.	<i>Du modèle souris Magel2KO aux troubles du spectre autistique</i>	215
4.2.	<i>Traitement des troubles induits par l'altération de la fonction du réseau septal sensible à l'ocytocine et/ou à la vasopressine</i>	216
4.3.	<i>Utilisation des résultats pour la classification des troubles autistiques</i>	217
BIBLIOGRAPHIE		218

RESUME

Contexte : L'ocytocine (OT) et la vasopressine (VP) modulent les comportements sociaux. Leurs rôles ont été étudiés indépendamment l'un de l'autre mais des effets combinatoires de ces deux peptides sont à envisager puisqu'ils sont tous les deux libérés au cours des comportements sociaux. Dans le septum latéral (SL), une structure cérébrale intégrant des informations sociales, l'ocytocine et la vasopressine sont libérées au cours des interactions sociales et modulent la reconnaissance ainsi que la discrimination sociale.

Objectif : Comprendre la fonction duale de l'ocytocine et de la vasopressine mise en jeu lors des interactions sociales dans un cadre physiologique et pathologique

Méthode : Chez la souris mâle, nous avons utilisé l'activité électroencéphalographique (EEG) comme marqueur et avons caractérisé des traces EEG dépendantes de l'OT et de la VP. Nous avons manipulé le système OT et le système VP au sein du septum au cours d'un protocole de reconnaissance/discrimination sociale en utilisant des outils pharmacologiques ou optogénétiques. Des expériences d'électrophysiologie sur tranche ont permis de caractériser la réponse électrophysiologique des neurones du septum latéral à l'application de chacun de ces peptides.

Résultats : L'étude de l'activité EEG nous a permis de discriminer des effets induits par l'action septale de l'OT et la VP dans la bande de fréquence theta. Ces résultats suggèrent que la VP serait libérée dans le septum au cours de la première rencontre avec un juvénile alors que l'OT serait libérée au cours du processus d'habituation. La modulation de l'action de l'OT et de la VP sur le SL démontre que l'activation des récepteurs V1a au cours de la première rencontre est essentielle à la discrimination sociale tandis que l'activation des récepteurs à l'OT au cours du processus d'habituation permet de regain d'intérêt lorsqu'un nouveau juvénile sera présenté. Nous montrons aussi que l'OT et la VP modulent l'activité électrique de la quasi-totalité des neurones septaux. La nature de ces modulations définit 3 catégories de neurones qui communiquent entre eux via des signaux GABAergiques. Chez la souris Magel2KO, un modèle murin de troubles des comportements sociaux, la balance des effets septaux de l'OT et de la VP est altérée. Ceci suggère que cette régulation pourrait être impliquée dans certaines conditions pathologiques.

Conclusion : Ces résultats mettent en évidence qu'il est essentiel, lorsque l'on étudie l'ocytocine, d'étudier le système vasopressinergique. Avec cette approche, nous avons montré que l'activation séquentielle du SL par l'OT et la VP est importante pour la régulation des interactions sociales. De plus, cette séquence d'évènements est altérée dans un modèle animal présentant des troubles sociaux.

ABSTRACT

Context : Oxytocin (OT) and vasopressin (VP) modulate social behaviors. The roles of OT and VP have been interrogated so far in isolation whereas combinatorial effects are anticipated as both hormones are secreted during social behavior. In the lateral septum (LS), a brain area processing behavioral social cues, OT and VP are released during social interaction and modulate social recognition or discrimination.

Aim : To understand the dual function of OT and VP during social behavior in physiological and pathological conditions

Methods : In male mice, we used electroencephalographic (EEG) activity as a readout to characterize OT and VP dependent electrophysiological signatures and their sequence. We manipulated OT and VP systems to LS during social recognition/discrimination paradigm using pharmacology and optogenetic tools. Using slice electrophysiology, we characterized electrophysiological responses of LS neurons to both of these hormones.

Results : Measurement of EEG theta activity allowed us to discriminate between OT and VP dependent LS modulation and indicated that VP would be released in the LS during 1st encounter with a juvenile while OT would be released during the habituation process. Modulation of OT and VP actions on the LS demonstrate that V1a activation during 1st encounter is essential for social discrimination and OT receptor activation during the habituation process allows the regain of interest for a new juvenile. We also demonstrated that OT and VP modulate electrical activity of almost all LS neurons. The nature of this modulation define 3 neuronal categories that communicate with each other through GABAergic signalling. Magel2KO mouse, which features social deficits, presents an altered balance of LS regulation by OT and VP. It suggests that this regulation could be involved in some pathological symptomatology.

Conclusions : These results shed a light on the necessity to study vasopressin along with oxytocin. Doing this, we showed that vasopressinergic and oxytocinergic activation of the LS are sequentially important during the social recognition paradigm. Furthermore, this sequence of events is impaired in a mouse model featuring deficits of OT and social disabilities.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACTH : hormone adréno-cortico-trophique	ISI : intervalle inter-spike
Alpha-MSH : alpha-melanocyte stimulating hormone	KI : Knock-in
ASD : Autism Spectrum Disorders (troubles du spectre autistique)	KO : Knock-out
CA1/2/3 : régions de la corne d'Ammon de l'hippocampe	LCR : liquide cérébro-rachidien
CRF : facteur de libération de la corticostérone	LS : septum latéral
DREADD : Designer receptors exclusively activated by designer drugs	LTD : dépression à long terme
DSM-5 : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (version 5)	LTP : potentialisation à long terme
E20, E15.5,18.5... : jour embryonnaire 20, 15.5, 18.5...	MAGE : Melanoma Antigen Gene
EC50 : concentration efficace médiane	MC : Manning compound
EEG : électroencéphalographie	MC4R : récepteur 4 à la mélocortine
ERalpha : récepteurs aux oestrogènes alpha	MEG : magnétoencéphalographie
FMR1 : fragile mental retardation protein 1 (gène)	MS : septum médian
FMRP : fragile mental retardation protein (protéine)	OT : ocytocine
FXS : syndrome du X fragile	OT-R : récepteurs de l'ocytocine
GABA : acide gamma-amino-butérique	P0, P7-8... : jour post-natal 0, 7-8...
GFP : green fluorescent protein	PAM : alpha-amidating monooxygenase
GH : growth hormone	PBS : phosphate buffer saline
IRMf : imagerie par resonance magnétique fonctionnelle	PFA : paraformaldéhyde
	PVN : noyau paraventriculaire
	PWS : syndrome de Prader Willi
	SON : noyau supra-optique
	SYS : syndrome de schaaaf yang
	Tg : transgénique
	TGOT : Thr ⁴ -Gly ⁸ -ocytocine
	VP : vasopressine
	WT : wild-type
	YFP : yellow fluorescent protein

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Maturation de l'ocytocine et de la vasopressine

Figure 2 : Affinité de différents agonistes et antagonistes pour les récepteurs à l'ocytocine et à la vasopressine de souris

Figure 3 : Expression de récepteurs de l'ocytocine (OT-R) et de la vasopressine (V1a et V1b) par les différentes structures cérébrales chez les rongeurs adultes

Figure 4 : Critères diagnostiques pour l'établissement du diagnostic d'ASD selon le DSM-V

Figure 5 : représentation de la région Prader Willi du chromosome 15 chez l'Homme

Figure 6 : Patron d'expression cérébrale de Magel2 déterminé par hybridation in situ de l'ARN chez des souris

Figure 7 : Principales structures cérébrales au sein desquelles l'expression des récepteurs de l'ocytocine et/ou de la vasopressine décroît au cours du développement post-natal

Figure 8 : Anatomie et connectivité du septum

MATERIEL ET METHODES

Figure 9 : Protocole de reconnaissance sociale et de reconnaissance d'objet

Figure 10 : Système d'enregistrement EEG utilisé

RESULTATS

Figure 11: L'activation des récepteurs septaux de la vasopressine et de l'ocytocine est essentielle respectivement pour l'habituation et la discrimination sociale.

Figure 12: L'activation des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine n'est pas essentielle à la reconnaissances et à la discrimination des objets.

Figure 13 : 3 catégories neuronales du septum latéral définies par leur réponse électrique à l'application de TGOT et de vasopressine

Figure 14: Les 3 catégories neuronales décrites possèdent des propriétés morphologiques et électrophysiologiques propres

Figure 15: La TGOT et la vasopressine modifient le patron d'activité électrique des neurones du septum latéral

Figure 16 : L'administration intra-septale de TGOT ou de vasopressine induit des changements d'activité EEG spécifiques dans la bande theta

Figure 17: L'activité synaptique des neurones du septum latéral est majoritairement liée à l'activité électrique GABAergique locale

Figure 18: Effet de l'application de TGOT et de vasopressine sur l'activité synaptique des neurones appartenant aux 3 catégories précédemment décrites

Figure 19: Effets de la GABAzine sur les changements d'activité électrique induits par la TGOT et la VP

Figure 20 : Résultats préliminaires suggérant que l'inhibition optogénétique des terminaisons ocytocinergiques du septum latéral altère la discrimination sociale

Figure 21 : Des changements spécifiques dans l'activité EEG induits par l'interaction avec un juvénile ou un objet inconnu et un juvénile ou un objet familier

Figure 22 : Les changements d'activité EEG induits par l'habituation sociale sont dépendants de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine

Figure 23 : Une diminution du nombre de sites de liaisons de l'ocytocine dans la partie frontale du septum latéral chez des souris Magel2KO sans altération du nombre de sites de liaison de la vasopressine

Figure 24 : Modification des proportions de neurones appartenant à chacune des catégories précédemment décrites chez les souris Magel2KO

Figure 25 : Les souris Magel2KO présentent des troubles du comportement social ainsi qu'une altération de la réponse EEG induite par la présentation d'un juvénile

Figure 26 : Les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des neurones ocytocinergiques du PVN diffèrent entre les souris mâles Magel2WT et Magel2KO

Figure 27 : Un traitement périnatal à l'ocytocine (ou à la TGOT) restaure l'augmentation de l'amplitude des événements synaptique observée chez les souris Magel2KO

DISCUSSION

Figure 28 : Modèle mettant en relation les 3 catégories neuronales décrites au sein du septum latéral et proposant une hypothèse quant au rôle de ce réseau pour la régulation des comportements sociaux

INTRODUCTION

1. L'ocytocine et la vasopressine : deux neuro-modulateurs centraux

1.1. Généralités sur l'ocytocine et vasopressine

1.1.1. Deux hormones peptidergiques

L'ocytocine et la vasopressine sont deux hormones dont les rôles périphériques sont bien décrits. L'ocytocine a été très étudiée pour son rôle dans la parturition et l'allaitement et est utilisée pour déclencher l'accouchement [1]. La vasopressine, aussi appelée hormone anti-diurétique (ADH), régule l'état hydrique et la pression artérielle [2][3].

Ces deux hormones sont composées de 9 acides aminés (nonapeptides) et leurs structures sont caractérisées par un pont disulfure formé par les cystéines situées en position 1 et 6. Les gènes de l'ocytocine et de la vasopressine sont situés à proximité l'un de l'autre sur le chromosome 20 chez l'Homme. Ces gènes sont tous les deux composés de 3 exons. L'ARNm issu de la transcription de l'ADN va coder pour des précurseurs d'hormones: pré-pro-ocytocine et pré-pro-vasopressine [4].

La maturation de la pré-pro-ocytocine permettra l'expression de l'ocytocine et également d'une protéine associée, appelée la neurophysine 1, qui sera présente dans les vésicules de sécrétion. Cette dernière se lie à l'ocytocine [5] et joue le rôle de transporteur (fig 1).

La maturation de la pré-pro-vasopressine permettra l'expression de la vasopressine, d'une neurophysine 2 de séquence très semblable à la neurophysine 1 et qui joue le rôle de transporteur de la vasopressine, et d'une glycoprotéine appelée co-peptine (fig 1). Le rôle physiologique de cette dernière n'est pas compris, mais elle est souvent utilisée pour les dosages plasmatiques chez l'Homme car elle est plus stable que la vasopressine et son utilisation en tant qu'outil diagnostique est envisagée dans le cadre de plusieurs pathologies [6]. Notons que chez le rat Brattelboro, une mutation dans la partie codante de la neurophysine II est responsable des défauts de transport de la vasopressine et du diabète insipide observé chez ces animaux [7].

1.1.2. La production d'ocytocine et de vasopressine

1.1.2.1. Des hormones produites par les neurones magno- et parvo-cellulaires hypothalamiques

L'ocytocine et la vasopressine sont des hormones produites, principalement, au niveau de l'hypothalamus.

- par les neurones parvo-cellulaires du noyau para-ventriculaire (PVN) qui projettent vers le système porte de l'adénohypophyse où ces hormones régulent la libération de différents facteurs endocrines (ACTH et prolactine par exemple). Ces derniers réguleront les fonctions physiologiques telles que la réponse au stress ou la lactation.
- par les neurones magnocellulaires du PVN, du noyau supra-optique (SON) et des noyaux accessoires qui projettent dans le système sanguin de la neurohypophyse. Ceci permet leur acheminement jusqu'aux tissus cibles situés en périphérie (utérus, canaux galactophores, reins, glande surrénale...).

Notons que certains types cellulaires retrouvés en périphérie peuvent produire de l'ocytocine et c'est notamment le cas du corps lutéal [8] [9] ainsi que des membranes amniotiques et chorioniques [10]. De la même manière, des organes périphériques peuvent produire de la vasopressine. C'est le cas de la glande médullo-surrénale au sein de laquelle la production de vasopressine peut être stimulée par l'application du facteur de libération des corticostéroïdes (CRF) [11].

1.1.2.2. Maturation et dégradation de l'ocytocine et de la vasopressine

La pré-pro-ocytocine, tout comme la pré-pro-vasopressine, comprend une séquence signal qui va permettre à ces précurseurs de se rendre dans le réticulum endoplasmique où ils seront pris en charge afin de subir une maturation. Une peptidase va d'abord cliver la séquence signal. La pro-hormone convertase va alors séparer l'ocytocine (ou la vasopressine) et la neurophysine. A ce stade, l'ocytocine comporte, en C-terminal 3 acides aminés (Glycine, Lysine et Arginine) qui seront ensuite clivés par la carboxypeptidase E, une glycoprotéine transmembranaire. L'alpha-amidating monooxygénase (PAM) va ensuite amidier la partie C-terminale du peptide et former l'ocytocine ou la vasopressine mature. Notons que cette étape d'amidation n'a lieu qu'au cours de la vie post-natale pour l'ocytocine chez les rongeurs alors qu'elle a déjà lieu au cours de la vie embryonnaire pour la vasopressine [12] (fig 1).

Certaines études suggèrent que des formes immatures de l'ocytocine pourraient être sécrétées et avoir des fonctions physiologiques. C'est notamment le cas de l'ocytocine-Gly-Lys-Arg qui favorise la différenciation des cardiomyocytes [13] [14]. La libération de formes immatures peut être contrôlée par des processus physiologiques. Ainsi, on retrouve plus de formes immatures dans le sang de personnes traitées aux oestrogènes ou de femmes enceintes [15]. Je n'ai trouvé aucune étude similaire concernant les effets de formes immatures de la vasopressine.

L'ocytocine et la vasopressine peuvent être dégradées par les enzymes de la famille des ocytocinases [16] (qui dégradent également les enképhalines, les dynorphines et l'angiotensine III) mais aussi par d'autres peptidases. Les ocytocinases sont des enzymes membranaires mais leur clivage par des métallo-protéases peut induire leur sécrétion [17]. Ces enzymes sont retrouvées en périphérie mais également au sein du cerveau chez l'Homme et les rongeurs [18]. La demi-vie de l'ocytocine et de la vasopressine dans ces deux compartiments (2 minutes dans le sang et 20 minutes dans le liquide céphalorachidien [19]) suggère que l'action de ces enzymes est principalement périphérique. Néanmoins, dans les neurones magnocellulaires du SON et du PVN, l'expression des ocytocinases augmente au cours de la lactation et elle limite le phénomène d'auto-activation des neurones de l'hypothalamus [20]. D'autres processus physiologiques modulent l'activité de cette enzyme. Ainsi, dans le cas d'un stress, l'activité de l'ocytocinase diminue dans la fraction soluble de l'amygdale [21]. Notons que les produits de dégradation de la vasopressine, par exemple, peuvent également activer les récepteurs de la vasopressine et induire une réponse calcique [22]

1.1.2.3. La libération axonale de l'ocytocine et de la vasopressine

Généralités

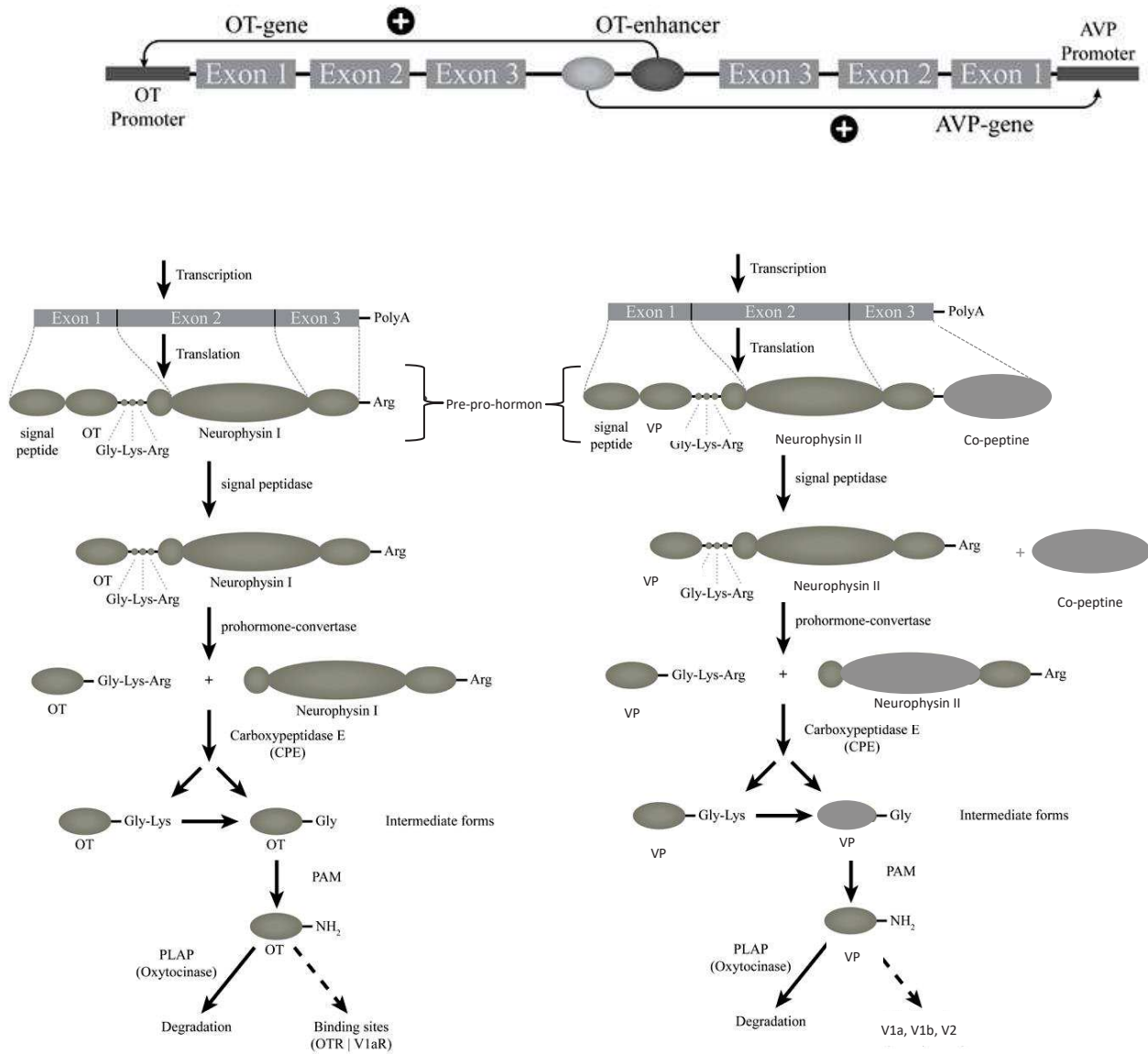
La libération d'ocytocine, comme celle de vasopressine, nécessite tout d'abord l'ancrage des vésicules à corps dense à proximité du site de libération. Les vésicules pourront ensuite fusionner avec la membrane plasmique via un mécanisme d'exocytose. Ces deux phases sont dépendantes du calcium et peuvent être induites par la présence de potentiels d'action au niveau des neurones ocytocinergiques ou vasopressinergiques [23][24].

L'efficacité de la libération dépend de la fréquence des potentiels d'action et celle-ci est maximale lorsque l'activité électrique présente des bursts séparés par de courtes périodes silencieuses [25][26]. Ce mécanisme de facilitation de la libération s'explique notamment par une meilleure capacité à recruter le calcium intracellulaire [27].

Les libérations périphériques d'ocytocine et de vasopressine sont dues aux neurones magnocellulaires.

Figure 1 : Maturation de l'ocytocine et de la vasopressine

Adapté de Grinevich et collaborateurs, *Frontiers in Neuroanatomy*, 2014 [28]



Spécificités de l'ocytocine

a. Le principal stimulus physiologique induisant une sécrétion d'ocytocine est l'arrivée de la fin de la gestation [29]. En effet, l'ocytocine permet la parturition.

b. Un autre stimulus induisant une sécrétion d'ocytocine qui a été très étudiée est la tétée chez la femelle lactante [30].

c. Physiologiquement, l'ocytocine est également libérée en situation de stress que ce soit :

- le stress physique, induit par une perturbation de l'homéostasie. C'est le cas dans le cadre d'une perturbation de l'osmolarité par exemple [31]
- le stress psychologique, induit par l'anticipation d'un stimulus nocif. C'est le cas lorsqu'un rongeur explore un nouvel environnement ou dans les protocoles de peur conditionnée [32].

Quelle que soit son origine, le stress induit l'activation de l'axe hypothalamo-adéno-surrénalien ce qui stimule le système sympathique. La noradrénaline issue de la médulla oblongata peut alors induire la libération d'ocytocine [32]. Notons que l'ocytocine est également sécrétée en réponse à la nouveauté puisqu'une administration (intra-péritonéale) d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine diminue l'hypophagie induite par la présentation d'un nouvel environnement [33].

d. La stimulation tactile peut induire une libération d'ocytocine. Ainsi, des études au cours desquelles l'ocytocine plasmatique a été dosée par radio-immuno-assay ont montré chez le rat anesthésié que les caresses, tout comme la stimulation des fibres A responsables de la sensation de toucher, peuvent induire la libération d'ocytocine. Il en est de même pour les stimuli d'ordre douloureux ou la stimulation des fibres C responsables de la transmission des informations nociceptives [34]. Cette libération met également en jeu des neurones parvocellulaires qui agissent directement sur les neurones spinaux mais qui activent aussi la production d'ocytocine par les neurones magnocellulaires [35].

e. Chez l'Homme, la visualisation d'une vidéo à caractère émotionnel est suffisante pour induire une augmentation de 47% de l'ocytocine sanguine dont l'origine est méconnue [36].

f. La libération d'ocytocine suit le cycle oestral. Ainsi, chez la femelle, la sécrétion augmente depuis la phase d'oestrus jusqu'à la phase de pro-oestrus [37] [29].

Spécificités de la vasopressine

La majeure partie des stimuli stressants induisent une libération périphérique de vasopressine.

a. La vasopressine est libérée dans le sang en réponse à un stress osmotique. Celui-ci est perçu au niveau d'osmorécepteurs hypothalamiques notamment [2]. Ainsi, les neurones vasopressinergiques du SON répondent à une augmentation de la pression osmotique en doublant leur activité électrique [31] induisant ainsi une libération de vasopressine. De façon intéressante, la réponse à un stress osmotique constant est une libération pulsatile de vasopressine. L'intensité du choc osmotique module la quantité de vasopressine libérée à chaque pulse mais pas la fréquence de ceux-ci [38].

b. En cas de chute de la pression artérielle, la vasopressine va également être libérée en périphérie. En effet, l'angiotensine (II et III) libérée suite à une chute de la pression artérielle augmente l'activité des neurones magnocellulaires du PVN et du SON, induisant ainsi la libération de vasopressine dans le sang (pour revue, voir [39]).

c. La libération de vasopressine est aussi induite en cas d'hypoxie [40]. Celle-ci peut être détectée via les chemo-récepteurs situés centralement (principalement au niveau de la medulla ventrolatérale rostrale et sensibles au pH sanguin), au niveau des carotides (activés par une faible tension O₂) ou des reins.

1.1.2.4. Récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine

Les récepteurs de l'ocytocine

L'ocytocine se lie à son récepteur avec une affinité nanomolaire (fig 2). Ce récepteur est couplé aux protéines G : la liaison de l'ocytocine induit l'activation d'une protéine Gq responsable de la stimulation de la phospho-lipase C. Ceci induit un mécanisme de mobilisation du calcium intracellulaire (issu du réticulum) dépendante du calcium (calcium induced calcium release) via l'activation de récepteurs de l'inositol tri-phosphate (IP₃) [41].

Chez l'adulte, les récepteurs de l'ocytocine (OT-R) périphériques sont retrouvés principalement au niveau du muscle utérin et des canaux galactophores chez les mammifères. Ils sont alors responsables respectivement de la contraction du muscle utérin lors de l'accouchement [42][43] et de l'éjection de lait au cours de la lactation [44]. On retrouve également des récepteurs de l'ocytocine au niveau du système nerveux périphérique où ils jouent un rôle dans le contrôle de la douleur [45] ainsi que dans le système nerveux central.

Il a aussi été démontré récemment que l'ocytocine pouvait se lier au récepteur-canal TRPV1 (EC50 de l'ordre de la micromolaire) induisant sa désensibilisation et un effet analgésique [46].

Les récepteurs de la vasopressine

Il existe 3 récepteurs de la vasopressine [47] dont les fonctions sont complémentaires :

- les récepteurs V1a et V1b [48] qui sont tous deux associés à la protéine Gq. La voie de signalisation qu'ils induisent est la même que celle décrite précédemment pour le récepteur de l'ocytocine.
- le récepteur V2 qui est associé à la protéine Gs. Son activation induit une production d'AMPc.

Le récepteur V1a est principalement exprimé au niveau des vaisseaux sanguins dont il régule la contraction [49]. On le retrouve aussi exprimé au niveau de tissus périphériques (foie, reins...) et du système nerveux central [48][50].

Le récepteur V1b [51] est principalement exprimé par les cellules corticotropes de l'adénohypophyse où il régule la libération d'ACTH. Il est aussi exprimé par certains tissus périphériques (reins, thymus, cœur...) et par le système nerveux central.

On retrouve le récepteur V2 fortement exprimé au niveau du rein mais aucune étude n'a démontré d'expression centrale de récepteur V2 jusqu'ici.

Notons que dans le cerveau, des récepteurs V1a, V1b et OT-R sont exprimés.

Figure 2 : Affinité de différents agonistes et antagonistes pour les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine de souris – communication des Dr Gilles Guillon et Rafik Marir

Les affinités indiquées ont été déterminées à partir :

- de cultures de cellules HEK293 pour les récepteurs de l'ocytocine et pour les récepteurs V1b
- de foie pour les récepteurs V1a
- de rein pour les récepteurs V2

Affinités (nM)	Statut pharmacologique	OT-R	V1a	V1b	V2
ocytocine	Hormone naturelle	0,83	20,4	36,3	93
vasopressine	Hormone naturelle	1,8	1,3	0,3	0,3
TGOT	Agoniste OT-R	0,04	>1.000	>10.000	
Manning compound	Antagoniste V1a et OT-R	42,6	1,7	73,9	
Atosiban	Antagoniste OT-R	1,3	>1.000	>1.000	
OTA3 [52]	Antagoniste OT-R	1,24	>10.000	>10.000	
SR126678	Antagoniste OT-R et V1b	4	1117	29	1056
dLeu ⁴ Lys ⁸ VP	Agoniste V1b	99	1993	1,4	60,7
SR149415	Antagoniste V1b	62	4329	1,5	3137
dDAVP	Agoniste V2 et OT-R	46,7	2437	192	1,9
SR121463	Antagoniste V2 et V1a	1465	23	>10.000	3,4
Fe201874	Agoniste V1a et OT-R	20	40	184	597
SR49059	Antagoniste V1a et OT-R	13,2	0,9	116	697
LVA	Antagoniste V1a	3,9	0,1	9,7	

1.1.3. Principales fonctions périphériques de l'ocytocine et de la vasopressine

1.1.3.1. L'ocytocine et son rôle au cours de la parturition et de l'allaitement

L'ocytocine joue un rôle essentiel dans la mise-bas et dans l'allaitement. Afin que ces fonctions soient assurées, le système ocytocine subit une maturation importante au cours de la gestation. Le nombre de récepteurs de l'ocytocine augmente à la fin de la gestation au niveau du muscle utérin mais aussi centralement. D'autre part, l'ocytocine libérée localement au niveau de l'hypothalamus, induit des changements morphologiques des neurones ocytocinergiques, diminue la sensibilité de ces neurones au GABA et change leurs propriétés électrophysiologiques [53] [54] [55].

Au cours de la parturition, l'action de l'ocytocine en périphérie facilite la libération de prostaglandines ce qui amplifie les contractions du muscle utérin et facilite la mise bas [43].

L'ocytocine joue également un rôle essentiel au cours de l'allaitement. Des bursts d'activité des neurones à ocytocine précèdent l'éjection du lait [30]. Ainsi, chez la femelle allaitante, la succion déclenche une libération d'ocytocine responsable de la contraction des canaux galactophores induisant une expulsion du lait [44].

1.1.3.2. La vasopressine et la régulation de l'état hydrique

Suite à la détection d'une hyper-osmolarité plasmatique, la vasopressine est libérée en périphérie via la neurohypophyse. Celle-ci va alors activer les récepteurs V2 situés au niveau du tube contourné distal et du canal collecteur rénal. Leur activation induit la synthèse et la translocation d'aquaporine 2 à la membrane. Cette dernière est un canal qui laisse passer l'eau et son expression permet une réabsorption d'eau via la concentration de l'urine. Pour revue, voir [2].

1.1.3.3. La vasopressine et la régulation de la pression artérielle

La vasopressine est aussi libérée en cas de chute de la pression artérielle. Dans ce cas également, elle va être libérée via la neurohypophyse dans la circulation générale. Dès lors, elle atteindra les récepteurs V1a situés sur les cellules musculaires lisses (ou éventuellement au niveau de l'endothélium) et l'activation de ces récepteurs induira la contraction des vaisseaux [56]. Ceci permet une normalisation de la pression artérielle.

Les récepteurs V1a jouent également un rôle dans la régulation du volume sanguin [57] via leur action sur le système rénine-angiotensine-aldostérone et l'augmentation de l'excrétion d'eau via les urines [58].

1.1.3.4. La vasopressine et la régulation hormonale du stress

La vasopressine joue un rôle complémentaire au facteur de libération de la corticostérone (CRF). En effet, sa libération au niveau de l'éminence médiane induit la libération d'ACTH par les cellules corticotropes de l'adénohypophyse. Cette dernière agira en périphérie au niveau de récepteurs cortico-surrénalien et permettra la libération de glucocorticoïdes. Ainsi, la vasopressine est un acteur majeur de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, un axe essentiel à la régulation du stress.

La vasopressine peut également agir directement au niveau de la glande médullosurrénale et induit alors la libération de catécholamines [11].

1.1.4. Une régulation du système ocytocine/vasopressine à long terme via des mécanismes épigénétiques

Les mécanismes de modulation de l'activité du système ocytocine/vasopressine décrits précédemment conduisent à des modulations peu durables. Néanmoins, des mécanismes épigénétiques peuvent induire des effets à long terme sur l'expression des récepteurs de l'ocytocine et/ou de la vasopressine ou des peptides. Ces mécanismes pourraient être impliqués dans la physiopathologie des troubles du comportement [59].

Chez l'Homme, un lien a été fait entre certaines modifications épigénétiques du gène codant pour le récepteur de l'ocytocine (méthylation de l'ADN) et la perception des émotions (études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) fonctionnelle) [60] ou encore des troubles sociaux de type autisme [61]. De plus, un stress psychologique pourrait réguler les mécanismes épigénétiques touchant le gène du récepteur de l'ocytocine. Son incidence dans la petite enfance pourrait conduire à une altération précoce de la fonction ocytocinergique (la méthylation du promoteur est associée à une diminution des taux sanguins d'ocytocine [62]) et à une altération des comportements sociaux [61]. Chez la souris, des études ont permis de montrer que la méthylation du promoteur du gène codant pour le récepteur de l'ocytocine est impliquée dans la régulation de son expression et que ce contrôle est régulé de manière structure-spécifique [63]. De plus, les méthylation ont lieu dans des zones de liaison de facteurs de transcription tels que le récepteur aux oestrogènes alpha (ERalpha) [63] et la méthylation de ce site inhibe significativement la transcription de l'ARNm codant pour le récepteur de l'ocytocine [64]. Ce résultat suggère que la modulation de l'expression des récepteurs par des modulateurs tels que les oestrogènes dépendent des modifications épigénétiques portées par le gène de ces récepteurs.

La modification épigénétique du gène de l'ocytocine, elle aussi, a été impliquée dans la régulation de la sociabilité chez l'Homme. Ainsi, une faible méthylation de l'ADN est corrélée à une meilleure reconnaissance des émotions faciales. De plus, notons que ces modifications épigénétiques peuvent avoir des conséquences anatomiques puisque la méthylation du gène de l'ocytocine est inversement corrélée au volume de matière grise du gyrus fusiforme [65].

Le système vasopressinergique est également susceptible aux facteurs épigénétiques. Ainsi, la séparation de la mère induit, chez les souris, une augmentation de l'expression du gène de la vasopressine associée à une diminution de la méthylation de séquences régulatrices. Ceci conduit à une altération de la réponse au stress et de la mémoire [66] [67]. Ainsi, un stress périnatal conduit à un marquage épigénétique du gène de la vasopressine qui induit une augmentation de son expression et a un impact sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, la susceptibilité au stress que présentent ces animaux à l'âge adulte [68].

1.2. Un système ocytocine/vasopressine central

Les fonctions périphériques de l'ocytocine et de la vasopressine ont été extensivement étudiées mais ne seront pas traitées dans cette thèse. Les fonctions centrales de ces peptides, elles, sont moins bien comprises mais une altération de ces fonctions semble être mise en jeu dans le cadre de nombreuses pathologies telles que les troubles du spectre autistique.

1.2.1. Libération centrale de l'ocytocine et de la vasopressine

1.2.1.1. Ocytocine et vasopressine : transport sang/cerveau, liquide cérébro-rachidien/parenchyme cérébral

Dans le cadre des études qui seront décrites, 3 compartiments sont à prendre en considération pour comprendre les effets centraux de l'ocytocine et de la vasopressine :

- le compartiment sanguin au travers duquel ces molécules jouent le rôle d'hormones
- le parenchyme cérébral au sein duquel les concentrations de ces deux peptides varient en fonction de la structure considérée
- le liquide cérébro-rachidien

Ocytocine/vasopressine et barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique limite les échanges entre le sang et le système nerveux central. Ceci est essentiel afin de limiter les variations de composition du milieu extracellulaire et l'entrée de pathogènes. Cette barrière est composée de cellules endothéliales qui forment des jonctions serrées ainsi que de pieds astrocytaires situés à la surface de ces cellules. Les péricytes jouent également un rôle dans le contrôle de l'étanchéité de cette barrière [69]. Le passage de molécules depuis le sang vers le cerveau ou inversement est régulé via la mise en jeu de protéines de transport spécifiques [70].

L'ocytocine et la vasopressine étant libérées en très grande quantité dans le sang, il est envisageable qu'une diffusion ou qu'un transport depuis le sang vers le cerveau soit responsable des effets centraux de ces neuropeptides. L'utilisation d'ocytocine ou de vasopressine radio-marquées a permis d'étudier le passage de ces peptides au travers de la barrière hémato-encéphalique. L'ocytocine radiomarquée injectée dans le liquide cérébro-rachidien (LCR) est capable de traverser la barrière puisqu'elle est retrouvée dans le sang. Ce passage est saturable ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de transport [71]. La vasopressine peut également traverser la barrière hémato-encéphalique et se retrouver dans le sang après avoir été injectée dans le LCR [72]. Elle est capable de traverser la barrière dans l'autre sens mais elle sera alors rapidement dégradée [73]. Dix minutes après l'injection sous-cutanée ou intra-veineuse d'ocytocine ou de vasopressine, environ 0,002% de la quantité injectée sera retrouvée dans le cerveau [19].

Ainsi, le passage entre le sang et le LCR est limité mais semble néanmoins possible. Par ailleurs, notons que des facteurs pathologiques [74] [75], développementaux [76] [77] ou environnementaux [78] interagissent avec ce phénomène et ce transport peut donc devenir important dans des conditions physiologiques particulières.

Ocytocine/vasopressine et liquide cérébro-rachidien

La délimitation entre le tissu interstitiel du cerveau et le LCR est formée par une couche de cellules épendymales qui bordent les parois des ventricules [79].

De nombreuses études ont montré la présence d'ocytocine et de vasopressine dans le LCR. Celles-ci peuvent provenir d'une diffusion depuis le parenchyme ou d'une libération contrôlée depuis le PVN ou le noyau supra-chiasmatique. En effet, ces structures sont proches du 3^{ème} ventricule et l'étude immuno-histochimique des neurones à ocytocine et à vasopressine montre des prolongements qui se dirigent vers le ventricule. De façon intéressante, les neurones du système ocytocine/vasopressine des espèces primitives envoient également des prolongements dans le ventricule et ceux-ci peuvent induire la libération intraventriculaire d'ocytocine mais peuvent aussi sentir les variations de composition du LCR [80].

Notons que les taux de vasopressine mesurés dans le LCR suivent un rythme circadien et ceci est sous le contrôle du noyau supra-chiasmatique suggérant une libération de vasopressine au sein du LCR [81].

Ainsi, les variations de la quantité d'ocytocine et de vasopressine du LCR peuvent refléter l'activité ocytocinergique et vasopressinergique de structures proches des ventricules du fait d'une diffusion de ces neuro-peptides. Néanmoins, une libération dans une structure éloignée des ventricules n'induirait probablement pas d'augmentation des taux d'ocytocine et de vasopressine dans le LCR car ces peptides seront dégradés rapidement (pour revue, voir [82]).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons sur la libération des peptides au sein du parenchyme cérébral (et plus précisément au sein de structures cérébrales déterminées) mais il est important de garder en mémoire l'influence de ces deux compartiments (sang et LCR) sur les niveaux centraux d'ocytocine et de vasopressine.

1.2.1.2. Production de l'ocytocine et de la vasopressine libérées centralement

Les sources de l'ocytocine centrale sont les mêmes que celles de l'ocytocine périphérique. En effet, centralement, seuls les neurones du PVN, du SON et des noyaux accessoires expriment l'ocytocine [83].

La vasopressine libérée centralement met en jeu d'autres structures cérébrales contenant des neurones vasopressinergiques. C'est le cas :

- du noyau supra-chiasmatique : la vasopressine issue de ce noyau joue un rôle important dans la régulation du rythme circadien [84][85]
- du bulbe olfactif [86]
- du noyau du lit de la strie terminale (BNST) et de l'amygdale [83]: chez les rongeurs la vasopressine issue de ce noyau joue un rôle dans l'agressivité et la régulation de la reconnaissance sociale [87]

Notons que ces deux dernières structures, souvent rassemblées sous le terme « amygdale étendue », sont riches en récepteurs vasopressinergiques et que leur production de vasopressine est l'objet d'un important dimorphisme sexuel dépendant de la testostérone [88].

1.2.1.3. Deux modes de libération centraux de l'ocytocine et de la vasopressine : axonale et dendritique

Libération axonale

La libération axonale d'ocytocine et de vasopressine au sein du cerveau a été suggérée lorsque des synapses ocytocinergiques ou vasopressinergiques ont été découvertes dans le système limbique [89]. Des fibres vasopressinergiques et ocytocinergiques innervant plusieurs structures cérébrales (amygdale, noyau du lit de la strie terminale, aire tegmentale ventrale, noyau du raphé dorsal...) ont également été découvertes [90] [91]. Les techniques récentes, plus sensibles, permettent de montrer qu'à quelques exceptions près, les structures cérébrales exprimant des récepteurs de l'ocytocine possèdent également des fibres ocytocinergiques [92]. En 2012, Knobloch et collaborateurs ont été les premiers à montrer que certains neurones ocytocinergiques du SON, du PVN ou des noyaux accessoires envoient des axones vers la neurohypophyse et vers des structures cérébrales définies (dans ce cas, dans l'amygdale) [91].

La fonctionnalité de ces connexions a récemment été démontrée par des études utilisant l'optogénétique notamment :

- pour stimuler les fibres vasopressinergiques de l'aire CA2 de l'hippocampe issues du PVN. Cette stimulation a fait perdurer la mémoire sociale des animaux testés, démontrant une fonction de ces fibres d'origine hypothalamique [93].
- pour stimuler les fibres ocytocinergiques de l'amygdale. Cette stimulation a induit une diminution du comportement d'immobilité induit par la peur chez le rat [91].

Libération dendritique

La libération d'ocytocine et de vasopressine ne se fait pas seulement à partir des axones puisqu'il existe une libération dendritique [94]. Ces deux peptides peuvent alors avoir un effet autocrine ou paracrine puisque les neurones ocytocinergiques (et les neurones vasopressinergiques) hypothalamiques possèdent eux même des récepteurs de l'ocytocine (ou de la vasopressine) [95][96] et que des synapses ocytocinergiques ont été observées sur les neurones à ocytocine [97]. Ainsi, dans certains processus physiologiques, l'ocytocine libérée au niveau des dendrites induit, via une action auto ou paracrine, une amplification de la libération d'ocytocine. Ce mécanisme de libération locale est, par exemple, nécessaire au réflexe d'éjection du lait induit par la tétée [98][99][100]. Une telle libération pourrait également moduler l'activité au sein de structures cérébrales proches de l'hypothalamus. Ceci expliquerait que le pallidum ventral, l'aire préoptique médiane ou l'hypothalamus ventral expriment des récepteurs de l'ocytocine bien que des fibres ocytocinergiques n'aient pu être détectées au sein de ces structures [92].

L'activation des récepteurs vasopressinergiques des neurones à vasopressine induit d'une part une augmentation de la libération dendritique mais module négativement l'activité électrique et par conséquent la libération axonale au niveau de l'hypophyse [101]. Ceci suggère que les deux modes de libération peuvent être indépendants l'un de l'autre.

Autre possibilité

Il n'est pas exclu que l'ocytocine ou la vasopressine périphériques influent sur l'activité des régions péri-ventriculaires au niveau desquelles la barrière hémato-encéphalique est moins « étanche » (septum latéral, hippocampe, hypothalamus) [102]. Ces hormones pourraient, via une action sur le PVN notamment, moduler leur propre libération. Dans cette thèse, nous nous concentrerons néanmoins sur les effets centraux liés à la libération locale de ces neuro-peptides (mode de libération axonal).

1.2.1.4. Facteurs modulant la libération centrale d'ocytocine et de vasopressine

Plusieurs facteurs impliqués dans la régulation de la libération d'ocytocine ont été décrits.

Parmi les protéines impliquées dans la libération de l'ocytocine, CD38 a été beaucoup étudiée. CD38 est une protéine à activité ADP-ribosyl-cyclase qui induit la production d'ADP-ribose, un messenger intracellulaire qui module les mouvements de calcium via l'activation de la protéine kinase C [103][104]. Les souris CD38^{-/-} présentent des taux d'ocytocine circulante et dans le LCR qui sont faibles mais une accumulation d'ocytocine au niveau de l'hypothalamus. Les troubles sociaux observés chez ces animaux peuvent être restaurés par l'administration d'ocytocine. Chez l'Homme, un polymorphisme dans ce gène est associé à une diminution des taux d'ocytocine circulante et à l'autisme [105].

Un autre modulateur de la libération d'ocytocine est l'alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH), une hormone produite par les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire de l'hypophyse et par des neurones du noyau arché de l'hypothalamus. L'action de cette hormone passe notamment par l'activation du récepteur de la mélocortine 4 (MC4R) qui est exprimé au niveau de l'hypothalamus. Un agoniste MC4R, ou l'alpha-MSH elle-même, induit l'augmentation du calcium intracellulaire dans les neurones à ocytocine du noyau supraoptique et la libération dendritique d'ocytocine. Néanmoins, l'activité électrique de ces neurones est diminuée suite à l'application de ces molécules ce qui diminue la libération d'ocytocine au niveau de la neurohypophyse [106]. Dans certaines études, un agoniste MC4R est utilisé afin d'induire, entre autres, la libération endogène d'ocytocine [107].

Ocytocine/vasopressine endogènes : taux centraux vs circulants

Chez l'Homme, les mesures d'ocytocine et de vasopressine sont principalement réalisées à partir d'échantillons sanguins. Une méta-analyse récente a permis de montrer une corrélation entre les taux d'ocytocine mesurés au sein du LCR et les taux d'ocytocine sanguine dans le cadre d'un stress ou d'une administration intra-nasale [108]. Une étude a également pu montrer que chez l'Homme, les taux de vasopressine circulants (associés à un état anxieux) corrélaient avec l'activation de l'amygdale [109].

Ainsi, dans certaines conditions physiologiques, les taux d'ocytocine et/ou de vasopressine circulants peuvent nous informer sur un état physiologique central. Cependant, une étude récente indique que les méthodes de mesure utilisées donnent des résultats qui divergent et on ne peut pas toujours établir de corrélation fiable entre concentration plasmatique et cérébrale [110].

Administration périphérique et taux centraux d'ocytocine

Les administrations d'ocytocine réalisées chez l'Homme utilisent des voies d'entrée périphériques :

- injection intra-nasale (pour revue, voir [111])
- injection intraveineuse.

Notons que les mécanismes d'action de l'ocytocine injectée par voie intra-nasale sont peu connus (effet périphérique principalement ?) et que ceci génère des doutes quant à l'efficacité d'un tel traitement [112].

Néanmoins, des études réalisées chez les rongeurs ou chez les primates [113][114] démontrent que l'administration intra-nasale d'ocytocine induit une augmentation des taux d'ocytocine mesurés dans le LCR. Chez les rongeurs, des études montrent qu'une telle administration augmente les concentrations en ocytocine au sein de certaines structures cérébrales (hippocampe, amygdale) et il en est de même pour une administration intra-péritonéale [113]. Cette augmentation pourrait être due :

- à l'entrée de l'ocytocine administrée dans le cerveau
- à la stimulation de la production endogène d'ocytocine (directe via une action sur les neurones ocytocinergiques ou indirecte via la modulation d'un paramètre induisant lui-même l'activation des neurones ocytocinergiques).

1.2.2. Des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont exprimés centralement

On retrouve des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine dans diverses structures du cerveau [115]. Tout d'abord, on retrouve ces récepteurs au sein de l'hypothalamus, respectivement sur les neurones

à ocytocine [95] et à vasopressine [96] [116] (autorécepteurs) du PVN et du SON (qui expriment les OT-R et des récepteurs de la vasopressine V1a). Ils permettent, via un mécanisme de rétrocontrôle dépendant du calcium [117] [118], de moduler l'activité des neurones à ocytocine et à vasopressine [119] [120] [121] et la libération de ces deux peptides dans certaines conditions physiologiques (lactation [30], choc osmotique [122]). Les récepteurs du système ocytocine/vasopressine sont également exprimés par d'autres structures hypothalamiques [28] [123] [124] [125] parmi lesquelles on retrouve notamment :

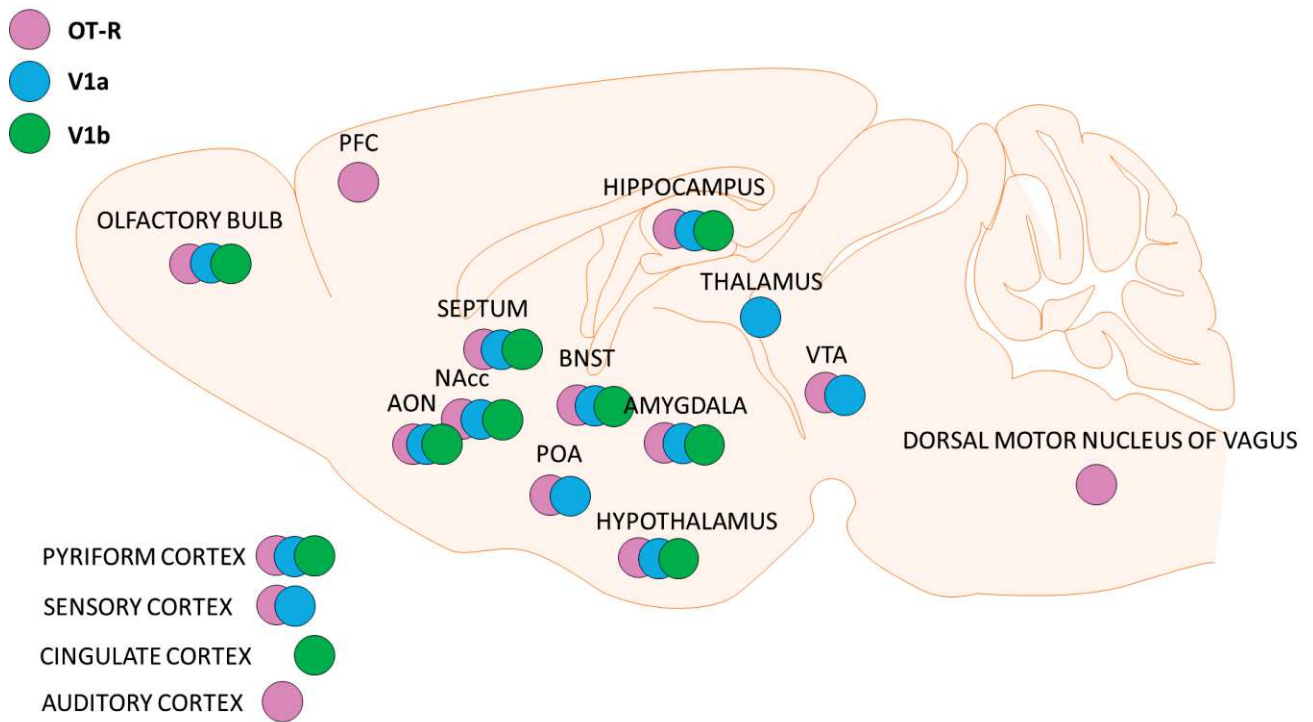
- L'hypothalamus latéral qui exprime des récepteurs V1a de la vasopressine
- L'hypothalamus ventro-médian qui exprime des récepteurs de l'ocytocine
- Le noyau supra-chiasmatique qui exprime des récepteurs V1a et OT-R
- Le noyau arqué qui exprime des récepteurs V1a et V1b

Les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont également retrouvés dans le système limbique et le cortex où leur activation module des comportements sensoriels, émotionnels, sociaux et mnésiques. Les récepteurs OT-R de l'hippocampe dorsal (CA2/CA3) modulent ainsi la reconnaissance sociale [126] tandis que ceux exprimés par le septum latéral modulent la réponse de peur [127]. Une représentation schématique des principales structures cérébrales exprimant chaque sous type de récepteurs est présentée en figure 3.

Certaines structures cérébrales possèdent des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine. C'est notamment le cas de l'amygdale centrale au sein de laquelle on retrouve des neurones activés suite à l'application d'ocytocine et d'autres activés en réponse à l'application de vasopressine. De manière intéressante, les neurones activés par l'ocytocine sont capables d'inhiber ceux activés par la vasopressine fournissant un exemple de régulation locale par ces deux peptides [128]. Ce mécanisme serait important pour la régulation de la réponse à la peur.

Notons que l'expression des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine est sujette à un dimorphisme sexuel [129][130][131]. Le dimorphisme sexuel ne touche pas seulement les récepteurs puisque le nombre de neurones vasopressinergiques au sein de l'amygdale étendue est plus important chez le mâle (pour revue, voir [123]). Ces différences pourraient s'expliquer par la sensibilité de ces systèmes aux hormones stéroïdiennes sexuelles [132] [133] [134].

Figure 3 : Expression de récepteurs de l'ocytocine (OT-R) et de la vasopressine (V1a et V1b) par les différentes structures cérébrales chez les rongeurs adultes [28] [123] [124] [125]



AON : anterior olfactory nucleus ; BNST : bed nucleus of the stria terminalis ; SCN : suprachiasmatic nucleus ; NAcc : nucleus accumbens ; PFC : prefrontal cortex ; POA : preoptic area ; VTA : ventral tegmental area

1.2.3. Stimuli responsables d'une libération centrale d'ocytocine et de vasopressine

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ocytocine et la vasopressine peuvent activer un rétrocontrôle local de leur libération au sein de l'hypothalamus.

Au delà de ce mécanisme qui a été bien étudié, les études récentes se sont portées sur la libération centrale de ces peptides. Celles-ci ont pu montrer qu'un grand nombre de stimuli modulent la libération d'ocytocine et de vasopressine au sein de certaines structures cérébrales (pour revue, voir [82]). Pour étudier ces libérations endogènes, des expériences utilisant la micro-dialyse ont été réalisées et ont permis de montrer une libération de ces peptides en réponse à une grande variété de stimuli sociaux notamment :

- Dans le cadre des comportements sexuels
 - une libération d'ocytocine dans le PVN de rats mâles en réponse à la présence d'une femelle réceptive [135]
- Dans le cadre de la parturition, l'allaitement et le comportement maternel
 - une libération d'ocytocine dans les bulbes olfactifs induite par la stimulation vagino-cervicale chez la brebis qui pourrait être impliquée dans l'induction du comportement maternel et la reconnaissance olfactive de la progéniture [136]
 - une libération d'ocytocine dans l'hippocampe et le septum chez la ratte lactante [137] et dans la substance noire et les bulbes olfactifs de la brebis au cours de la parturition et l'allaitement ainsi que dans la substance noire au cours de la prise alimentaire [138]
 - une libération d'ocytocine dans le PVN et l'amygdale centrale lors de l'agression maternelle chez les rattes lactantes (high-anxiety related behavior Wistar rats) lorsqu'une femelle vierge est introduite dans la cage [139] [140]
- Dans le cadre de l'agressivité ou de l'anxiété
 - une libération de vasopressine dans le septum lors d'un comportement agressif entre deux rats mâles. Notons que la corrélation entre la concentration septale de vasopressine et les niveaux d'agressivité n'est pas claire et semble dépendre majoritairement de l'état anxieux des animaux [141]
 - une libération d'ocytocine dans l'amygdale centrale de rats mâles en réponse à un stress aigu (protocole de nage forcée) [142]
- dans le cadre des interactions sociales

- Une libération de vasopressine dans le septum latéral chez les rats mâles en réponse à la rencontre avec un juvénile mâle [143]
- une libération d'ocytocine dans le septum latéral de rats mâles lorsqu'un juvénile mâle précédemment rencontré est à nouveau présenté [144]

Dans plusieurs études mentionnées plus haut, les microdialyses ont été réalisées dans différentes structures cérébrales mais l'impact du stimulus étudié n'a été observé que dans l'une d'entre elles. Par exemple, l'étude de Bosch et collaborateurs réalisée en 2004 [140] a permis de montrer une libération d'ocytocine dans le PVN de femelles vierges introduites dans la cage de femelles lactantes mais aucune variation n'a été vue concernant la libération d'ocytocine dans le septum latéral ou l'amygdale centrale. Ainsi, la libération intra-cérébrale d'ocytocine et de vasopressine est stimulus spécifique et est contrôlée spatialement. Ce résultat semble favoriser l'hypothèse de sécrétion synaptique activité-dépendante au détriment de l'hypothèse de diffusion des compartiments sanguin ou LCR, bien que celle-ci ne soit pas formellement invalidée.

1.3. Fonctions centrales de l'ocytocine et de la vasopressine

1.3.1. L'ocytocine et la vasopressine, deux neuromodulateurs centraux

L'ocytocine et la vasopressine sont deux neuromodulateurs centraux. Leur libération, conditionnée par un stress [82] [142], induit la modulation de circuits neuronaux définis. L'effet neuromodulateur de ces deux peptides a particulièrement bien été étudié au sein de l'amygdale centrale chez la souris. Une étude a ainsi permis de montrer que l'ocytocine et la vasopressine sont capables de moduler différemment l'influence des afférences corticales et de celles issues de l'amygdale latérale, modulant ainsi l'intégration des informations issues de ces structures [128].

Chez l'Homme également, un stress psychologique (induit par l'opération d'un parent) induit l'augmentation des taux plasmatiques et centraux (LCR) de vasopressine [145]. Centralement, la vasopressine pourrait moduler l'activité de différentes aires cérébrales et ainsi réguler la réponse émotionnelle au stimulus stressant.

Ces peptides ne sont pas seulement libérés en cas de stress aigu mais une augmentation des taux d'ocytocine centraux a également été montrée au cours de la lactation. Au cours de ce processus, l'intégration des informations sensorielles est largement modulée. Une étude a notamment permis de montrer que dans ce cadre, l'ocytocine augmente la réponse du cortex auditif aux cris des petits chez la ratte. Ceci permet une réaction plus rapide de la mère qui va chercher le souriceau isolé [146].

1.3.2. L'action centrale de l'ocytocine et de la vasopressine module la valence des informations perçues

Les effets de l'ocytocine sur la réponse à un conditionnement aversif sont dépendants du contexte et de la structure cérébrale considérée :

- Lorsque le conditionnement aversif est induit par un protocole de défaite sociale, les récepteurs (septaux) de l'ocytocine sont responsables d'une augmentation de l'immobilité qui traduit une augmentation de l'anxiété [127].
- Lorsque le conditionnement aversif est induit par des chocs électriques, la stimulation optogénétique de la libération d'ocytocine (au sein de l'amygdale) diminue l'immobilité ce qui traduit un effet anxiolytique [91].

Des études comme celles-ci suggèrent que la libération d'ocytocine (ou de vasopressine) pourrait, en fonction du contexte, moduler l'intégration des informations sensorielles et leur associer une valence agréable ou désagréable [147].

Ainsi, l'ocytocine (administrée ou libérée via l'utilisation d'outils chémo-génétique) augmente la réponse de peur induite, chez la souris, par l'observation d'un congénère en détresse [148].

1.3.3. L'ocytocine et la vasopressine régulent les comportements

La modulation de la valence associée au contexte permettrait l'adaptation des comportements à la nature du stimulus évocateur. Chez le rongeur, la libération de vasopressine (dans l'amygdale) induite par le protocole de la nage forcée (un paradigme consistant à faire nager un rongeur dans un environnement duquel il ne peut s'échapper) favorise l'adoption d'une stratégie passive "d'abandon" [149]. Ainsi, ce peptide module la stratégie comportementale mise en œuvre dans un contexte donné.

Dans le cadre de l'effet anorexigène de l'ocytocine, l'utilisation d'agoniste et d'antagoniste des récepteurs de l'ocytocine a permis de montrer que l'activation des récepteurs de l'ocytocine du noyau accumbens module la prise alimentaire probablement via une modulation de l'activité du système de la récompense [150]. De plus, cet effet est perdu dans un contexte social, soutenant l'hypothèse selon laquelle l'action de ce peptide permet de prendre en compte le contexte. De façon complémentaire, il a été montré que l'ocytocine favorise le contrôle cognitif via une activation des réseaux du cortex pré-frontal [151] [152], limitant ainsi la consommation de nourriture palatable. Ainsi, l'action de ce peptide régule les comportements alimentaires via une modulation de l'activité de réseaux neuronaux et ceci de façon contexte-dépendante.

1.4. Deux systèmes à étudier en parallèle

1.4.1. Des systèmes présentant de fortes homologies

1.4.1.1. Homologies entre l'ocytocine et la vasopressine

Les gènes codant pour l'ocytocine et la vasopressine sont très proches l'un de l'autre : ils sont situés sur le même chromosome, dans des loci chevauchants orientés têtes bêtes. Ils sont tous les deux composés d'une séquence signal et de 3 exons dont le premier code pour l'hormone, et le second pour un transporteur nommé neurophysine 1 ou 2. Chez le rat, les exons 1 et 3 de l'ocytocine et de la vasopressine possèdent des séquences très proches (70 à 90% d'homologie selon la séquence) [153]. Ces fortes similitudes mènent à l'expression de deux nona-peptides dont les différences sont seulement de 2 acides aminés.

Notons que des peptides homologues à l'ocytocine et à la vasopressine sont retrouvés chez la majorité des espèces animales. Ainsi, on retrouve par exemple une conopressin chez les escargots et les cônes et une inotocine chez les insectes. Ces nona-peptides présentent de fortes homologies entre eux et avec l'ocytocine et la vasopressine. De plus, des études démontrent que la fonction de ces peptides est également similaire. Ainsi, chez *caenorhabditis elegans*, la mutation de la nématocine ou de l'un de ses récepteurs altère les comportements reproducteurs (sans altérer les fonctions sensori-motrices) [154] rappelant le rôle de l'ocytocine dans les comportements reproducteurs des mammifères. Chez les vertébrés, on retrouve souvent, chez le même animal, deux homologues de cette famille : la vasotocine et la mésotocine ou l'isotocine [155].

Ceci suggère que le gène codant pour un peptide ancestral serait apparu tôt au cours de l'évolution, aurait évolué différemment selon les espèces et aurait, dans certaines espèces, subi une duplication. Chez les vertébrés, les deux peptides résultants ont évolué et divergé [156]. Ceci explique les similitudes et complémentarités fonctionnelles observées dans les effets de ces deux peptides.

1.4.1.2. Homologies entre leurs récepteurs

La comparaison des gènes codant pour les 3 récepteurs de la vasopressine et de celui codant pour le récepteur de l'ocytocine a également permis de démontrer de grandes homologies.

Comme pour les peptides, il n'y aurait eu initialement qu'un récepteur pour ce système et celui-ci aurait été dupliqué à plusieurs reprises. Chacun des gènes aurait alors divergé pour donner les 4 récepteurs présents aujourd'hui chez les mammifères: OT-R, V1a-R, V1b-R et V2-R. En divergeant, chacun de ces récepteurs aurait acquis des fonctions spécifiques (contraction du muscle utérin pour OT-R, vasoconstriction pour V1a...) tandis que certaines fonctions physiologiques seraient encore sous-tendues par plusieurs de ces récepteurs, en particulier en ce qui concerne les fonctions centrales (OT-R et V1a sont tous les deux importants pour la formation du couple) [157].

Du fait de ces fortes homologies, la pharmacologie du système ocytocine/vasopressine est complexe. L'ocytocine, à forte dose, peut lier les récepteurs de la vasopressine tandis que la vasopressine, elle, peut se lier aux récepteurs de l'ocytocine (fig 2).

Pour cette raison, il est difficile d'étudier le rôle spécifique de chacun de ces peptides dans la régulation des comportements. Le développement de molécules agonistes ou antagonistes spécifiques est actuellement au centre de diverses études et seule l'utilisation de tels outils nous permettra de discerner les effets dépendant des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine (pour revues, voir [158] [159] [160]).

Notons que les propriétés pharmacologiques des agonistes et antagonistes varient en fonction de l'espèce, rajoutant un niveau de complexité au système.

Ainsi, il est important de choisir les outils (et leurs concentration) de manière raisonnée afin que les conclusions tirées quant à l'implication du système ocytocinergique ou du système vasopressinergique soient correctes.

1.4.2. Compensations fonctionnelles entre les systèmes ocytocine et vasopressine

1.4.2.1. *Un système ocytocine et un système vasopressine distincts*

Bien que les séquences des exons des gènes codants pour l'ocytocine et la vasopressine soient très proches, les séquences composant les introns, elles, diffèrent grandement. Les régions régulatrices situées 500 paires de bases avant le site de début de transcription ont été bien étudiées et ceci a permis de montrer que ces régions régulatrices diffèrent entre les gènes de l'ocytocine et de la vasopressine. L'étude de ces séquences suggère que les facteurs de transcription recrutés pour l'expression de l'ocytocine et de la vasopressine sont différents. Ainsi, l'expression de l'ocytocine et de la vasopressine peut être ségréguée dans des cellules différentes et l'expression de l'un ou l'autre des peptides sera induite dans des conditions physiologiques différentes elles aussi. Pour revue, voir [161].

1.4.2.2. *L'administration d'ocytocine exogène induit l'activation des récepteurs de la vasopressine*

L'ocytocine pouvant se lier aux récepteurs de la vasopressine, l'administration d'ocytocine exogène à des animaux peut induire des effets de type vasopressine (et inversement). Un exemple démonstratif provient des souris déficientes pour le récepteur de l'ocytocine. Ces animaux présentent des troubles sociaux et des défauts d'adaptabilité qui en font un bon modèle d'autisme. Malgré l'absence de récepteur chez ces animaux, l'injection intra-cérébrale d'ocytocine induit une amélioration des troubles due en réalité à l'activation des récepteurs V1a [162]. Une telle promiscuité fonctionnelle est aussi observée chez des animaux sauvages tels que les campagnols chez qui un traitement intra-nasal chronique à l'ocytocine diminue le nombre de cellules du PVN qui expriment la vasopressine chez le mâle [163].

Notons que plusieurs structures cérébrales expriment à la fois des récepteurs de l'ocytocine et des récepteurs de la vasopressine [164]. Par conséquent, ces possibilités d'action croisée des nonapeptides sont à envisager même dans le cas d'une injection localisée des peptides. De plus, il n'est pas exclu que certaines cellules expriment des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine et qu'ainsi, les deux peptides soient capables de moduler l'activité d'une même cellule.

1.4.2.3. *Adaptation à un déficit dans l'un des systèmes au cours du développement*

Comme nous le verrons dans la suite de cette thèse, le développement du système ocytocine/vasopressine a majoritairement lieu en post-natal. Ainsi, des modifications environnementales ou hormonales peuvent influencer le développement de ces systèmes. Des études chez le campagnol ont montré qu'un traitement avec un antagoniste du récepteur de l'ocytocine au cours du premier jour post-

natal a des conséquences à long terme sur le système vasopressine (diminution du nombre de récepteurs V1a dans le septum latéral et le noyau du lit de la strie terminale notamment) [165]. De plus, les souris déficientes pour le récepteur de l'ocytocine (souris OT-R KO) présentent une diminution de la liaison au récepteur V1a dans le noyau olfactif accessoire et le cortex pyriforme ainsi qu'une augmentation dans l'hippocampe [162] suggérant une compensation développementale.

Il est connu que les événements ayant lieu au cours de la petite enfance peuvent avoir des conséquences épigénétiques notamment au niveau des gènes codant pour le CRF, les récepteurs aux glucocorticoïdes ou la vasopressine [166]. Le rôle des événements précoces dans la régulation épigénétique du système ocytocine/vasopressine a été traité dans la partie 1.1.4. de cette thèse.

Ce chapitre nous a permis de rappeler les principales caractéristiques du système ocytocine/vasopressine ainsi que les principales fonctions de celui-ci.

Dans la partie suivante, nous aborderons le rôle joué par ces peptides dans la régulation des comportements sociaux (physiologiques et pathologiques) via leur action centrale.

2. L'ocytocine et la vasopressine : modulateurs du comportement social

2.1. Ocytocine/vasopressine et réponse sociale

2.1.1. Le système ocytocine/vasopressine module une grande variété de comportements sociaux

On regroupe sous le terme "comportement social" tous les comportements mettant en relation deux individus. Ainsi, on peut différencier les interactions sociales observées chez l'adulte, l'agressivité/la hiérarchie sociale, l'interaction entre un mâle et une femelle (comprenant tous les comportements reproducteurs ainsi que les comportements liés au couple), le comportement parental et le comportement de jeu. L'ocytocine et la vasopressine sont impliquées dans tous ces aspects et ceci dans de nombreuses espèces animales via l'action de ces neuropeptides sur différentes structures cérébrales appartenant à des réseaux neuronaux régulant les comportements sociaux (pour revue, voir [167][168]).

Les principales fonctions du système ocytocine/vasopressine ont été mises en évidence par des manipulations de la fonction de celui-ci. Un résumé des principales découvertes est présenté en figure 3.

Les études réalisées chez l'Homme suggèrent que la modulation des comportements sociaux par le système ocytocine/vasopressine est conservée.

Ainsi, des taux importants de vasopressine plasmatiques sont associés à un réseau social étendu tandis que des taux faibles sont associés à la peur de l'attachement [169]. Ce résultat est surprenant puisque le stress augmente les taux de vasopressine plasmatiques (ainsi que les taux dans le LCR) [145] et que le stress est associé à une baisse de la sociabilité. Il est possible que les taux plasmatiques de ces hormones soient le reflet d'un ensemble d'évènements conduisant à des libérations directes ou indirectes dans le sang. Ainsi, l'interprétation de ces résultats nécessite de prendre en considération l'historique des patients. De plus, plusieurs polymorphismes dans le gène codant pour le récepteurs de l'ocytocine ou les récepteurs V1a ont été associés à des niveaux d'empathie [170][171], de confiance différents [172][173] ou de réponse à la trahison [174]. De même, des études ont permis de montrer que certains polymorphismes du récepteur V1b étaient associés à des troubles du comportement et notamment à une sensibilité accrue à la dépression et à des risques de tentatives de suicide plus élevés. L'étude de ces variants ont permis de montrer des fonctions de couplage différentes aux voies de signalisation intracellulaire [175].

L'impact de la variation dans la séquence microsatellite située en 5' du gène codant pour le récepteur V1a pour la régulation de la formation du couple ne s'arrête pas aux rongeurs. En effet, des variations dans cette séquence microsatellite sont également associées à des variations dans le comportement conjugal chez l'Homme [176].

Notons que chez l'Homme les taux plasmatiques d'ocytocine et de vasopressine sont associés respectivement à la fréquence des contacts affectueux d'un parent vers son enfant et la tendance à stimuler l'enfant au travers de jeux [177].

Chez la femme, deux polymorphismes dans le récepteur de l'ocytocine ont été associés à des comportements maternels positifs et à une réponse importante du cortex orbito-frontal, du cortex cingulaire antérieur et de l'hippocampe à la présentation d'une photographie de leur enfant [178]. De même, certaines femmes présentant des variations dans le gène codant pour CD38, une protéine importante pour la libération centrale d'ocytocine, partagent plus de regards avec leurs enfants [179].

L'ocytocine et la vasopressine sont des hormones pro-sociales dont le rôle va dépendre de l'espèce considérée. Dans les espèces grégaires, l'ocytocine et la vasopressine régulent les interactions au sein d'un groupe. En effet, chez le mandarin, l'ocytocine et la vasopressine produites au niveau du PVN régulent les comportements grégaires : la vasopressine les favorise chez le mâle et la femelle tandis que l'ocytocine les favorise chez les femelles uniquement [180]. Chez le campagnol, les mâles dominants possèdent moins de neurones ocytocinergiques et plus de neurones vasopressinergiques au sein du PVN, du SON et de l'hypothalamus latéral et antérieur que les individus dominés tandis que les femelles dominantes possèdent plus de neurones vasopressinergiques au sein de l'hypothalamus latéral et antérieur que chez les individus dominés [181].

Figure 3 : Rôles du système ocytocine/vasopressine dans la régulation des comportements sociaux chez les rongeurs

NATURE DU COMPORTEMENT SOCIAL	Système impliqué	Structure	Fonction	Outils utilisés pour la démonstration	Références
Interaction sociale	OT-R		Préférence sociale et préférence pour la nouveauté sociale	Souris OT-R KO	[162]
	OT	Amygdale médiane	Reconnaissance sociale	Souris OT-KO, administration locale d'OT (0,1pg)	[182]
	OT	Noyau accumbens	Préférence pour la nouveauté sociale	Administration d'antagonistes (OTA3, 10ng/côté - rat)	[183]
	OT et son interaction avec la sérotonine	Noyau accumbens	Aspect récompensant des interactions sociales	Inhibition optogénétique des terminaisons ocytocinergiques	[184]
	V1a		Reconnaissance sociale	Souris V1a KO	[185]
	V1a	Bulbes olfactifs	Reconnaissance sociale	siRNA dirigé contre le V1a	[86]

	V1a	Septum latéral	Reconnaissance sociale	Stratégie virale permettant une surexpression du V1a (AAV), administration d'agonistes (AVP, 2ng - rat) ou d'antagonistes (Manning Compound, 5ng ; OTA3, 5ng - rat)	[186]
	VP	Aire CA2 de l'hippocampe	Augmentation de la durée de la reconnaissance sociale	Activation optogénétique des fibres VP du PVN	[93]
Aggressivité, hiérarchie sociale	OT/VP	Aire préoptique médiane, amygdale, noyau du lit de la strie terminale	Aggressivité maternelle	Mesure de la libération locale des peptides, manipulation génétique et pharmacologique des systèmes	Pour revue, voir [183]
	OT-R	Amygdale	Comportement de soumission induit par le stress	Administration locale d'antagonistes (OTA3, 1µg/côté - rat)	[187]

Formation du couple	V1a	Variation d'expression dans le pallidum ventral	Préférence pour le partenaire	Variations de longueurs d'une séquence microsatellite située en 5' du gène codant pour V1aR différent entre les espèces de campagnol monogames et polygames. Expériences de remplacement de la séquence de l'espèce polygame par celle de l'espèce monogame.	Pour revue, voir [189]
Comportement parental	OT-R V1a	Septum latéral	Fréquence des comportements maternels	Corrélation entre la fréquence des comportements maternels et la densité de ces récepteurs dans le septum latéral dans des lignées de souris hybrides	[192]
	OT-R	Cortex auditif	Augmentation de la sensibilité aux informations auditives	Activation optogénétique des fibres issues du PVN, administration localisée d'antagonistes (OTA : 1,5µL à 1µM; L-368,899 : 1,5µL à 2.5mM)	[146]
Comportement de jeu chez les juvéniles	V1a	Septum latéral	Augmentation du jeu chez le mâle et diminution chez la femelle	Administration locale d'agonistes (AVP, 200pg - rat) ou d'antagonistes (Manning Compound, 10ng – rat)	[188]

2.1.2. Activation aiguë chez l'adulte

Plusieurs études ont consisté à administrer de l'ocytocine à des sujets sains afin d'étudier l'impact de cette hormone sur la cognition sociale (empathie, interprétation des émotions à partir d'une photographie, coopération, ...). Malgré un possible biais dû à l'hétérogénéité historique et génétique, ces études permettent d'avoir accès à des réponses socio-cognitives plus élaborées que les études réalisées chez les rongeurs.

Pour cela, l'ocytocine a été administrée principalement par voie intra-nasale et afin d'étudier son impact sur l'activité cérébrale et les connections entre différentes structures cérébrales, des IRM fonctionnelles ont été réalisées (pour revue, voir [189] [190]). L'effet le plus reproduit est la modulation de l'activité au sein de l'amygdale et notamment la diminution de l'activation induite par des visages énervés. L'administration d'ocytocine module également la connectivité fonctionnelle entre l'amygdale et le cortex orbito-frontal, le cortex cingulaire antérieur ou l'hippocampe.

Bien que les études soient moins nombreuses, elles ont également permis de montrer qu'une administration intranasale de vasopressine atténue l'activité d'un réseau amygdale/cortex préfrontal en réponse à la vue de visages effrayés [191] et module la reconnaissance sociale, probablement via une modulation de l'activité de la jonction temporo-pariétale [192].

En terme de comportement, les études ont permis de montrer un effet bénéfique de l'ocytocine sur la réponse à un stimulus menaçant, la reconnaissance des émotions, l'attention visuelle ou encore la confiance (pour revue, voir [193]).

Dans une revue publiée en 2012, Bos *et al.* [194] suggèrent que la vasopressine (et la testostérone) auraient un effet stimulant via une augmentation de la vigilance et de la motivation à agir tandis que l'ocytocine (et les œstrogènes), via son action sur le système parasympathique, promouvrait les comportements calmes et l'attention/le soin portés aux jeunes.

2.1.3. Activation chronique chez l'adulte

Bien qu'un traitement aigu à l'ocytocine ait des effets positifs sur le comportement social, il est intéressant de noter qu'un traitement chronique n'est certainement pas envisageable chez l'Homme. En effet, des études réalisées chez les rongeurs ont permis de montrer qu'un traitement intranasal chronique (jusqu'à 21 jours de traitement) réalisé chez l'adulte altère les comportements sociaux. Ceci pourrait être dû à un effet du traitement sur l'expression des récepteurs de l'ocytocine mais également de la vasopressine : le traitement diminue le nombre de sites OT-R dans différentes structures cérébrales impliquées dans la régulation des comportements sociaux (septum latéral, hippocampe, noyau olfactif antérieur, cortex piriforme, noyau accumbens et amygdale) mais augmente le nombre de sites V1a dans le septum latéral spécifiquement [195]. De la même manière, chez le campagnol des prairies, alors qu'un traitement aigu à l'ocytocine améliore la préférence pour le partenaire, un traitement chronique l'altère [196]. Un traitement intra-cérébro-ventriculaire de 7 jours (pompes osmotiques), lui, diminue l'agressivité et augmente l'exploration sociale chez le rat [197]. La divergence dans ces résultats pourrait s'expliquer par le mode d'administration de l'ocytocine. En effet, lors de l'administration périphérique, les doses utilisées sont très importantes et au moment où la drogue est injectée, la concentration est très importante et peut induire une désensibilisation des récepteurs de l'ocytocine ou encore une activation des récepteurs de la vasopressine. L'administration avec la pompe est plus contrôlée et permet d'éviter cet effet bolus ainsi que le stress induit par la manipulation et l'injection.

Jusqu'ici, aucune étude n'a permis d'identifier un effet comportemental suite à un traitement chronique à la vasopressine chez l'adulte probablement parce que les effets indésirables induits par un tel traitement (hausse de la pression artérielle notamment) seraient importants et limiteraient la valeur des conclusions.

2.2. Ocytocine et vasopressine dans le cadre de pathologies entraînant des troubles du comportement social

2.2.1. Troubles du spectre autistique : un trouble neuro-développemental

L'organisation mondiale pour la santé estime que dans le monde, 1 enfant sur 160 est atteint du syndrome du spectre autistique (ASD) [198]. Le diagnostic ASD est établi lorsque les patients présentent :

- Des troubles persistants de la communication et de l'interaction sociale

- Un répertoire de comportements, d'intérêts et d'activités restreint et répétitif

Ces symptômes doivent être présents tôt au cours du développement et causer une altération significative du comportement social, professionnel ou d'autres éléments importants du fonctionnement quotidien. D'autre part, ces troubles ne doivent pas être expliqués simplement par la présence de déficits intellectuels ou un retard développemental global (critères définis dans le DSM-5 – fig 4) [199].

Comme le montre cette définition, on rassemble sous le terme ASD des troubles de sévérité variée dont les causes diffèrent. L'étiologie des ASD reste en effet méconnue.

Les études de familles de patients ont mis en évidence l'implication de la génétique dans le développement de ces troubles. En effet, le risque d'être atteint d'autisme augmente considérablement lorsqu'un membre de la fratrie est atteint d'ASD (prévalence évaluée entre 3 et 14% selon les études) [200]. Plusieurs gènes ont été identifiés comme facteurs de risques pour le développement de l'autisme et plusieurs d'entre eux sont connus pour leur implication dans la fonction synaptique glutamatergique [201] mais également GABAergique [202].

Bien que des facteurs de risque génétiques aient été décrits, il est important de garder en mémoire que la majorité des cas d'ASD ne sont pas expliqués par des variations génétiques. Ainsi, le facteur environnemental joue un rôle important dans le développement de cette pathologie. Il a été montré que l'exposition à des toxines, une synthèse de mélatonine anormale, une déficience en zinc, une infection virale prénatale, un stress prénatal, l'âge des parents ou le diabète de la mère sont des facteurs de risques [203]. Parmi ces facteurs, plusieurs jouent un rôle avant même la naissance de l'enfant. Une étude californienne a été menée sur 404 jumeaux mono ou dizygotes dont au moins un des membres est autiste. Les résultats indiquent que le partage de facteurs environnementaux joue un rôle plus important que l'héritabilité génétique dans l'apparition des ASD chez deux jumeaux [204].

Le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5) décrit les troubles neuro-développementaux comme :

“a group of conditions with onset in the developmental period. The disorders typically manifest early in development, often before the child enters grade school, and are characterized by developmental deficits that produce impairments of personal, social, academic, or occupational functioning. The range of developmental deficits varies from very specific limitations of learning or control of executive functions to global impairments of social skills or intelligence.”

Les ASD sont ainsi définis comme des troubles neurodéveloppementaux.

Figure 4 : Critères diagnostiques pour l'établissement du diagnostic d'ASD selon le DSM-V – Adapté d'après Spectredelautisme.com

Critères diagnostiques d'après le DSM-V – troubles du spectre autistiques

1. Déficiences persistantes dans la communication et les interactions sociales dans de multiples contextes (par exemple : déficits de la réciprocité sociale émotionnelle, déficits dans les comportements de communication non verbaux utilisés pour l'interaction sociale, déficits dans le développement, le maintien et la compréhension des relations)
2. Modes restreints, répétitifs de comportements, d'intérêts ou d'activités (par exemple : mouvements moteurs, utilisation d'objets ou parole stéréotypés ou répétitifs, insistance sur l'adhésion inflexible à des habitudes ou modes ritualisés de comportements verbaux ou non verbaux, intérêts très restreints et circonscrits qui sont anormaux dans leur intensité ou leur orientation, hyper ou hypo-réactivité à des entrées sensorielles ou niveau d'intérêt inhabituel pour les aspects sensoriels de l'environnement)
3. Symptômes présents dans la période de développement précoce
4. Symptômes causant une altération cliniquement significative du fonctionnement actuel dans les domaines sociaux, scolaires ou professionnels ou d'autres domaines importants
5. Ces perturbations ne sont pas mieux expliquées par la déficience intellectuelle

2.2.2. Une connectivité cérébrale altérée dans les troubles du spectre autistique à l'origine des déficits comportementaux ?

Selon une hypothèse actuelle [205], les troubles observés dans les ASD seraient dus à une connectivité anormale des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation des comportements sociaux. Ces altérations auraient lieu précocement (avant 1 an) et permettraient également d'expliquer les troubles non sociaux associés aux ASD [206] [207].

2.2.2.1. Des altérations morpho-anatomiques

Plusieurs études montrent des altérations morpho-anatomiques du cerveau des patients autistes. Il y a plus de 20 ans déjà, une étude montrait que le volume du cerveau des patients atteints d'ASD était plus important que celui de contrôles. Cette différence est due à une augmentation de la taille des ventricules mais également à une augmentation du volume de tissu cérébral évalué par IRM [208]. Ces résultats ont été confirmés via une méta-analyse récente [209] néanmoins, les différences sont principalement observées au cours de l'enfance avec 37% des enfants autistes âgés de 2 à 4 ans qui sont diagnostiqués macrocéphales [210]. Une étude prospective récente a permis de montrer que ces défauts apparaissent avant que les premiers troubles comportementaux ne soient visibles. En effet, les enfants qui vont être diagnostiqués autistes à 24 mois présentent déjà, entre 6 et 12 mois, une augmentation de la surface corticale [211].

Après une phase de macrocéphalie dans la jeune enfance, on observe un arrêt de la croissance cérébrale qui induit une normalisation voire une diminution en comparaison d'un développement typique [212]. En effet, chez des enfants se développant de façon typique, le volume de la matière grise frontale augmente de 20% entre 2-4 et 6-8 ans alors qu'elle n'augmente que de 1% chez les enfants atteints d'ASD. Ces résultats suggèrent un développement précoce anormal chez les patients atteints d'autisme.

Au-delà des différences dans le volume cérébral total, des études par IRM ont permis d'évaluer le volume occupé par la substance blanche, représentative des connexions entre structures cérébrales. Les patients présentent une hypo-connectivité cérébrale. Il a d'abord été montré une diminution de la taille du corps calleux chez les patients autistes, cette diminution étant principalement localisée dans la partie postérieure du corps calleux, une zone dans laquelle on trouve des fibres issues des lobes pariétaux [213]. Les lobes pariétaux sont impliqués dans l'intégration d'informations issues de différentes modalités sensorielles et les patients autistes présentent effectivement des difficultés à interpréter les actions des personnes qui les entourent. Une étude menée chez des patients atteints du syndrome d'Asperger, une sous-catégorie de troubles autistiques, a mis en évidence une diminution du volume de la substance grise dans

l'aire de Brodmann n°44 (pars opercularis), une aire cérébrale importante pour l'activité du système des neurones miroirs [214] suggérant encore des déficits d'interprétation des informations sociales.

2.2.2.2. *Des altérations de la connectivité fonctionnelle*

L'étude de la connectivité fonctionnelle chez les patients autistes a été rendue possible par le développement de techniques complémentaires [215]:

- l'électroencéphalographie (EEG) qui permet d'étudier l'activité électrique cérébrale. L'utilisation de casques multi électrodes permet de déterminer l'origine du signal et ainsi, des corrélations peuvent être faites entre l'activité ayant lieu dans différentes aires cérébrales. En fonction de l'importance de ces corrélations, les médecins peuvent évaluer la connectivité fonctionnelle.
- la magnétoencéphalographie (MEG) permet d'étudier la connectivité cérébrale de façon similaire à l'EEG, la différence venant du fait que la MEG étudie les champs magnétiques induits par l'activité électrique du cerveau.
- l'IRM fonctionnel qui permet d'identifier l'activité métabolique des aires cérébrales du fait de leur forte consommation de glucose

Ainsi, il a été montré que les différences observées entre patients atteints du spectre autistique et contrôles ne sont pas seulement anatomiques. Une méta-analyse des données obtenues par électroencéphalographie ou magnétoencéphalographie confirme l'existence d'une hypo-connectivité fonctionnelle entre les aires distantes du cerveau chez les patients autistes [216]. Ce défaut de connectivité est particulièrement marqué en ce qui concerne les connections inter-hémisphériques et ceci est en accord avec la taille réduite du corps calleux chez les patients autistes [213].

Les données les plus récentes suggèrent que l'étude, par IRM, de la connectivité fonctionnelle chez des patients de moins de 6 mois permettrait de prédire les enfants qui développeront un trouble autistique avec une très bonne fiabilité [207]. Ceci est encourageant mais notons qu'il existe plusieurs formes d'autisme (avec ou sans déficience intellectuelle par exemple) et qu'il est peu probable qu'un traitement convienne à toutes les formes. Des outils diagnostiques doivent encore être développés afin de discerner ces différentes formes.

2.2.2.3. *Des altérations de la fonction synaptique*

Une altération de la fonction synaptique pourrait expliquer ces défauts de connectivité fonctionnelle dans les ASD. Des études génétiques ont montré que parmi les gènes de susceptibilité à l'autisme, une grande

partie sont impliqués dans la fonction synaptique [217] [202] et cette dernière est au cœur des études cliniques en cours dans le cadre des ASD [218]. D'autre part, les facteurs environnementaux augmentant le risque de développer un ASD sont eux-mêmes susceptibles de moduler la fonction synaptique [203].

Notons que certains des déficits décrits précédemment sont récapitulés dans des modèles murins d'« autisme » induits par l'expression de modifications génétiques retrouvées dans certains cas génétiques d'ASD. C'est notamment le cas de la souris FMR1-KO déficiente pour le gène FMR1 codant pour la protéine « fragile mental retardation protein », qui est un modèle du syndrome du X fragile, la forme la plus courante de retard cognitif dans laquelle les troubles comportementaux sont très semblables à ceux observés dans le cadre des ASD. Dans ce modèle murin, les animaux présentent des défauts dans la morphologie des épines dendritiques dans le cortex sensoriel [219], le gyrus denté [220] ou les cellules pyramidales de l'aire CA1 de l'hippocampe [221]. Des études basées sur l'imagerie 2-photon des épines dendritiques corticales ont permis de montrer que, chez la souris WT, il existe dans les phases précoces du développement des épines dendritiques immatures se présentant sous la forme de filopodes. Celles-ci sont ensuite remplacées par des épines « mushroom » dont la tête est plus grosse. Cette transition est retardée de plusieurs semaines chez les souris FMR1KO [222].

L'utilisation de ce modèle permet de mieux comprendre le lien entre un problème de maturation des épines dendritique et les troubles sociaux observés dans la pathologie et le modèle animal. En effet, les études ont pu montrer, dans ce modèle, une insensibilité des épines à l'expérience sensorielle [223] suggérant que les circuits neuronaux ne sont pas activés par les stimuli sensoriels au cours du développement, induisant un développement aberrant.

2.2.3. Ocytocine et vasopressine dans le traitement des troubles du spectre autistique ?

2.2.3.1. Un déficit du système ocytocine/vasopressine dans les troubles du spectre autistique

Connaissant le rôle du système ocytocine/vasopressine dans la régulation des comportements sociaux, plusieurs groupes ont tenté d'évaluer l'activité de ce système dans le cadre des troubles autistiques. Des études génétiques ont montré que des variations dans les gènes de l'ocytocine, de la vasopressine, de leurs récepteurs ou de CD38 étaient associés aux symptômes autistiques et au diagnostic d'ASD (pour revue, voir [224]).

Ces dernières années, et afin d'identifier de nouvelles cibles, la recherche de biomarqueurs de l'autisme a suscité un grand intérêt (pour revue, voir [225]). En 1998, Modhal et al [226] observent pour la première fois que les patients autistes présentent des taux d'ocytocine circulante diminués. Quelques années plus tard, ces résultats ont été raffinés au travers d'une étude qui a permis de montrer que bien que les taux

d'ocytocine mature soient diminués chez les patients, les taux d'ocytocine immature, eux, sont augmentés. Ceci suggère un déficit dans le maturation de l'ocytocine chez les patients autistes [227].

De façon semblable, il a été montré chez des patients autistes que les taux de vasopressine circulants sont inversement corrélés avec la sévérité des troubles sociaux (considérés comme un score faible au test « Theory of Mind and Affect Recognition tasks ») [228].

Ces résultats indiquent un défaut d'activité du système ocytocine/vasopressine chez les patients autistes et suggèrent l'utilisation de l'ocytocine et/ou de la vasopressine dans un objectif thérapeutique.

2.2.3.2. Traitement à l'ocytocine chez l'adulte

Les modèles animaux d'autisme sont nombreux [229] et permettent d'étudier le rôle de gènes de susceptibilité dans le développement de troubles sociaux. L'utilisation de ces animaux a permis de tester plusieurs pistes thérapeutiques et parmi celles-ci, l'ocytocine a donné des résultats très prometteurs.

Un traitement à l'ocytocine ou la stimulation de la libération d'ocytocine endogène via l'utilisation d'agonistes MC4R ou via une stratégie chémogénétique (utilisation de Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, DREADD) améliore les déficits sociaux observés chez les souris *Cntnap2*^{-/-}, un modèle d'ASD [107]. Des effets semblables ont été confirmés dans d'autres modèles animaux (pour revue, voir [230] ou [231]). Bien que toutes les études réalisées chez l'animal ne permettent pas de confirmer ces effets positifs [232], ces résultats ont conduit des cliniciens à envisager l'utilisation d'un traitement à l'ocytocine chez l'Homme. Pour cela, ils ont d'abord évalué les effets indésirables potentiels induits par un tel traitement. Une étude réalisée chez des patients ayant entre 10 et 17 ans suggère qu'un traitement chronique à l'ocytocine (12 semaines de traitement) ne présente pas de risque majeur pour des sujets atteints d'ASD [233].

Les résultats des premières études réalisées chez l'Homme sont encourageants. Ainsi, un traitement aigu à l'ocytocine chez l'adulte atteint d'ASD semble avoir des effets positifs notamment sur la reconnaissance des émotions et le contact visuel (pour revue, voir [234] [235]). Néanmoins, notons qu'un tel traitement reste symptomatique et non curatif.

Notons cependant que ces études sont récentes et que nous n'avons probablement pas encore le recul nécessaire pour voir d'éventuels effets néfastes à long terme.

2.2.3.3. *Traitement à l'ocytocine chez le jeune*

L'ocytocine joue un rôle important à la naissance en régulant le switch du GABA rendant celui-ci inhibiteur et limitant ainsi les effets cérébraux de l'hypoxie induite par le changement de mode d'oxygénation chez le bébé. De façon intéressante, ce switch est altéré chez deux modèles animaux d'autisme (les rats exposés au valproate au cours du développement intra-utérin et les souris porteuse d'une mutation "X fragile") [236] suggérant un défaut ocytocinergique dans ces modèles animaux. Ce résultat suggère que l'ocytocine aurait un rôle particulier au cours du développement et que ce rôle serait perdu chez des modèles animaux d'ASD, mettant ainsi en évidence l'intérêt potentiel d'un traitement précoce dans le cadre de ces pathologies.

Chez la souris *Cntnap2*^{-/-}, bien qu'un traitement aigu à l'ocytocine soit bénéfique, notons qu'un traitement chronique réalisé chez le jeune induit des effets bénéfiques plus durables et une réversion des déficits d'expression d'ocytocine observés au niveau du PVN chez ces animaux à P30 [107].

Le lien entre ocytocine/vasopressine et développement sera plus amplement traité dans la partie III de cette introduction.

2.2.4. *Autres maladies neuro-développementales associées à des troubles sociaux et pour lesquelles un traitement à l'ocytocine semble prometteur*

2.2.4.3. *Pourquoi étudier les syndromes d'origine génétique responsables de troubles sociaux ?*

L'étude des ASD est rendue difficile par la grande variabilité dans la sévérité du trouble et l'origine de la pathologie (génétique, environnementale). En effet, les résultats a priori contradictoires obtenus dans certaines études peuvent parfois s'expliquer par la sélection de patients présentant des co-morbidités spécifiques (déficience intellectuelle associée ou non par exemple) [237].

Notons que les syndromes du spectre autistique ne sont pas les seules pathologies entraînant des troubles sociaux. Plusieurs syndromes trouvant leur origine dans un défaut génétique ont pour conséquence une altération des comportements sociaux. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie des troubles sociaux, il est souvent plus simple de sélectionner une pathologie d'origine connue (gènes identifiés) et dont la manifestation clinique est pénétrante.

Plusieurs études sur l'ocytocine et la vasopressine se sont portées sur des syndromes d'origine génétique marqués par des troubles des comportements sociaux et dans lesquels la prévalence d'ASD est significativement augmentée par rapport à la population générale. Ainsi, nous traiterons principalement:

- du syndrome du X fragile (FXS)

- du syndrome de Prader Willi (PWS)
- du syndrome de Schaaf Yang (SYS)

Nous traiterons aussi du syndrome de Williams, une pathologie marquée par une hyper-sociabilité.

2.2.4.4. *Le syndrome de Williams*

Le syndrome de Williams est une pathologie d'origine génétique liée à une délétion sur le chromosome 7 du locus q11.23 dont le diagnostic est établi via « fluorescence in situ hybridization » (FISH). Parmi les gènes touchés par cette délétion, le plus étudié est l'élastine dont la mutation peut causer une sténose aortique supra-valvulaire.

Ce syndrome touche un individu sur 20.000 et induit des troubles divers : troubles cardio-vasculaires, retard psychomoteur, dysmorphie du visage, hypercalcémie et altération cognitive et comportementale. Les troubles comportementaux sont marqués par une hyper-sociabilité [238] et une hypersensibilité au bruit notamment [239].

Le système ocytocine/vasopressine est modulé par la pathologie. En effet, les patients présentent des taux d'ocytocine circulante plus élevés que la population générale. L'augmentation des taux d'ocytocine et de vasopressine dépendante de l'activité (exposition au froid ou stimulation auditive) est également plus importante chez les patients [240].

Les récepteurs de l'ocytocine sont plus exprimés chez les patients que chez des contrôles [241]. En 2015, Haas and Smith [242] ont proposé que l'absence de la protéine WBSCR22, une protéine impliquée dans la production de la méthyl-transférase, induirait un défaut de méthylation des gènes codant pour les récepteurs de l'ocytocine et que ce défaut d'expression des récepteurs pourraient être à l'origine de la perturbation du système ocytocinergique observé dans ce syndrome (voir partie 1.1.4.).

2.2.4.5. *Le syndrome du X fragile (FXS)*

Le syndrome du X fragile est la cause la plus fréquente de déficit intellectuel héréditaire et l'une des principales causes génétiques de l'autisme. En France, 1 garçon sur 5000 et 1 fille sur 9000 sont diagnostiqués FXS. C'est une maladie due à une hyper-méthylation du gène FMR1 causée par une répétition anormale du codon CGG à proximité de celui-ci. Le gène FMR1, situé sur le chromosome X, code pour la protéine FMRP (fragile mental retardation protein). Cette protéine est impliquée dans le transport des ARNm mais également dans leur traduction à la synapse. La mutation de cette protéine cause des altérations synaptiques avec des épines dendritiques qui sont longues et fines et, chez la souris, elle induit aussi une altération de la potentialisation à long terme (LTP) et une augmentation de la dépression à long terme (LTD) dans certaines

structures cérébrales. Le second chromosome X permet souvent de limiter les troubles d'où une prévalence plus faible chez les femmes.

Chez un modèle murin de ce syndrome, le switch du GABA n'a pas lieu à la naissance mais un traitement à l'ocytocine de tranches aigües de cerveau issus d'animaux à P0 permet de le restaurer [236].

Chez l'Homme, un traitement intra-nasal à l'ocytocine chez des patients âgés de 13 à 28 ans semble bénéfique puisqu'il diminue l'anxiété sociale (mesurée 50 minutes après l'administration du traitement) [243].

2.2.4.6. *Le syndrome de Prader Willi (PWS)*

Le syndrome de Prader Willi est une maladie d'origine génétique touchant moins d'un enfant sur 10.000 (Orphanet). Elle est due à l'absence d'expression d'une série de gènes soumis à empreinte situés sur le chromosome 15 (locus PWS : 15q11-q13). Le diagnostic peut être établi tôt [244] car les enfants présentent une hypotonie importante (qui peut même être détectée au cours de la période prénatale) et un test génétique permet de confirmer le diagnostic. Ceci permet généralement une prise en charge précoce : pour les enfants nés en France en 2013, l'âge de prise en charge médian est de 18 jours [245].

Les symptômes de la maladie évoluent au cours du développement (pour revue, voir [246]). Dans la petite enfance, les patients présentent une hypotonie importante et des troubles de la prise alimentaire nécessitant souvent une intubation au cours des deux premières années de vie. Autour de 4-5 ans, les enfants présenteront une absence de satiété conduisant à une hyperphagie marquée et, en l'absence d'un suivi, à une obésité morbide. Cette seconde phase s'accompagne du développement de troubles de l'apprentissage et du comportement plus ou moins marqués ainsi que de troubles sociaux. En outre, les patients présentent des caractéristiques physiologiques traduisant un déficit endocrinien tels que des troubles de la reproduction ou une petite taille.

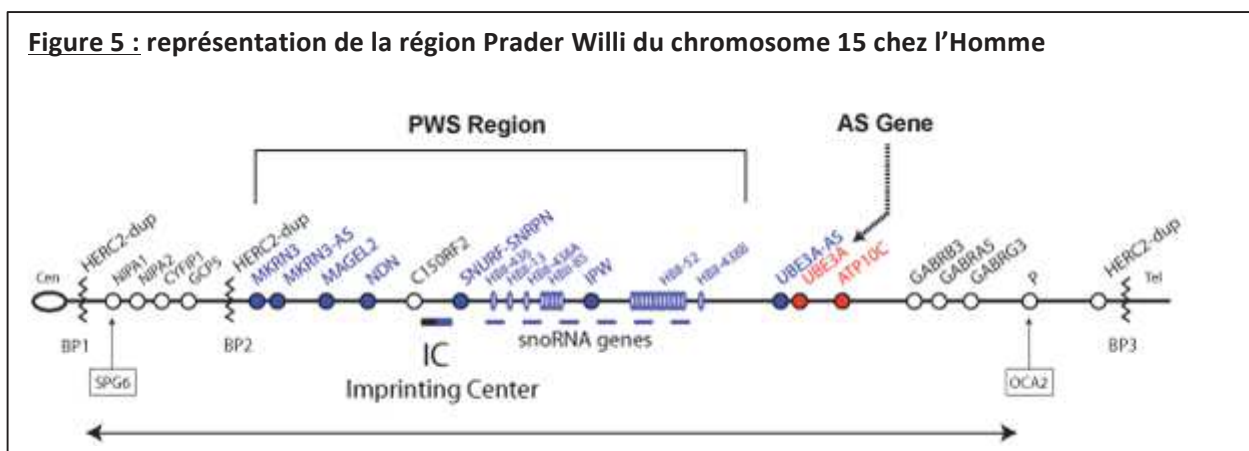
Afin de traiter le problème majeur que présente l'obésité chez ces patients, la prise en charge passe actuellement par un contrôle constant de l'accès à la nourriture. Pour ces raisons, les patients ne peuvent avoir que très peu d'indépendance. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont actuellement envisagées afin de diminuer l'impact de la pathologie :

- un traitement à base d'hormone de croissance (GH). Celui-ci diminue l'obésité en favorisant la croissance et permet ainsi une meilleure répartition du poids. Une étude rétrospective sur 522 enfants atteints du syndrome de Prader Willi a en effet montré un impact bénéfique du traitement à la GH sur la croissance et sur l'indice de masse corporelle [247].

- une modulation du ratio ghréline acétylé (forme orexigénique) sur ghréline non-acétylée qui est augmenté chez les patients. Ainsi, un traitement par voie sous-cutanée de 14 jours avec un analogue de la ghréline non-acétylé s'est avéré prometteur puisqu'il induit une diminution de l'appétit ainsi qu'une diminution de la masse grasseuse et de la circonférence de la taille [248].

Les mécanismes conduisant à la pathologie ne sont pas élucidés et cela est probablement dû au fait que le nombre de gènes impliqués est important (Fig 5). Des études se sont penchées sur le rôle de chacun des gènes notamment en utilisant des modèles transgéniques murins (pour revue, voir [249]). Parmi les gènes impliqués, on compte notamment :

- des gènes de la familles MAGE (melanoma-associated antigen). C'est le cas de Necdin et de Magel2, deux gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la voie recyclage/élimination des protéines dépendant de l'ubiquitination [250] [251]. Cette famille de gènes a d'abord été étudiée du fait de sa forte expression par les tissus tumoraux mais ils sont également exprimés par les tissus sains.
- des snoRNA (small nucleolar RNA) dont la fonction est encore mal connue.



L'utilisation de souris déficientes pour la protéine Necdin a mis en évidence le rôle de celle-ci dans la croissance axonale [252] mais également dans les troubles respiratoires sérotonine-dépendants observés dans la pathologie [253].

L'utilisation de souris déficientes pour le gène Magel2, a quant à elle mis en évidence l'implication de ce gène dans les troubles alimentaires précoces ainsi que dans les troubles sociaux et d'apprentissage observés dans la pathologie [254] [255], mais également dans la régulation des rythmes circadiens [256].

Ces différences de fonctions peuvent être dues à une expression différentielle des 2 gènes. En effet, bien qu'aucun anticorps spécifique n'existe pour localiser ces deux protéines, des expériences d'hybridation in situ de l'ARN ont été menées. Celles-ci ont permis de montrer qu'au cours du développement [257], à E15.5-E18.5, les deux gènes sont exprimés dans le cerveau mais le patron d'expression de Magel2 et de Necdin au sein de l'hypothalamus diffère :

- Magel2 est principalement exprimé au niveau du noyau suprachiasmatique, du SON et de l'aire pré-optique. De façon intéressante, le patron d'expression de Magel2 dans le SON et le noyau suprachiasmatique rappelle celui de la vasopressine.
- Necdin est exprimé dans l'aire péri-fornicale, l'hypothalamus latéral, l'hypothalamus médio-dorsal et le noyau arqué.

Dans le cadre du syndrome de Prader Willi, une altération du système ocytocinergique a été identifiée. Ainsi, le nombre de neurones ocytocinergiques du PVN est diminué chez les patients [258]

Chez ces patients, une administration intra-nasale d'ocytocine (aigüe ou de quelques jours) améliore le comportement social [259] [260] suggérant qu'un traitement à l'ocytocine pourrait s'avérer positif dans le cadre de cette pathologie.

Plusieurs études cliniques ont été développées afin d'étudier l'éventuel impact d'un traitement chronique à l'ocytocine dans le cadre du PWS (pour revue, voir [261]). Une étude récente a permis de montrer une amélioration du comportement chez les enfants de moins de 11 ans via un traitement de 4 semaines à l'ocytocine (moins de colères, de tristesse, de conflits et de comportements liés à la nourriture ainsi qu'un meilleur comportement social) alors que le même traitement altère la joie, augmente la tristesse et les colères chez des enfants de plus de 11 ans [262]. Cette dichotomie dans les effets peut expliquer les effets négatifs observés par Einfeld et collaborateurs [263] suite à un traitement chronique à l'ocytocine chez des enfants de plus de 13 ans.

Ainsi, l'âge auquel a lieu le traitement serait déterminant, suggérant un impact développemental. Une étude menée par le groupe de Maithé Tauber a consisté à traiter des enfants de moins de 6 mois à l'ocytocine pendant 1 semaine [264]. Sans effet néfaste, un tel traitement améliore la prise alimentaire chez les bébés ainsi que le comportement social. Les effets ne sont pas uniquement aigus puisque l'impact positif de ce traitement est encore présent à 2 ou 3 ans. Ainsi, le suivi des patients traités indique une amélioration de leurs capacités motrices par rapport à des sujets non traités (suggérant une diminution de l'hypotonie) et également de meilleures compétences sociales. Cet effet à long terme sur les interactions sociales suggère

que le développement du cerveau des patients a été modifié par l'administration d'ocytocine et que l'activité des réseaux neuronaux régulant les comportements sociaux s'est normalisé.

2.2.4.7. *Le syndrome de Schaaf Yang (SYS)*

Le syndrome de Prader Willi, comme le syndrome de Williams, est un trouble complexe puisqu'il implique plusieurs gènes.

Le syndrome de Schaaf Yang est causé par une mutation dans un seul des gènes de la région PWS : le gène *Magel2*. La mutation touche l'allèle d'origine paternelle. Décrit pour la première fois par Schaaf en 2013 [265], le syndrome est caractérisé par une importante prévalence d'ASD (75% des patients présentant une mutation dans *Magel2* sont également diagnostiqués ASD alors que seulement 25% des patients atteints du syndrome de Prader Willi le sont), un retard mental et certains troubles Prader-Willi-like dont notamment l'hypotonie [266].

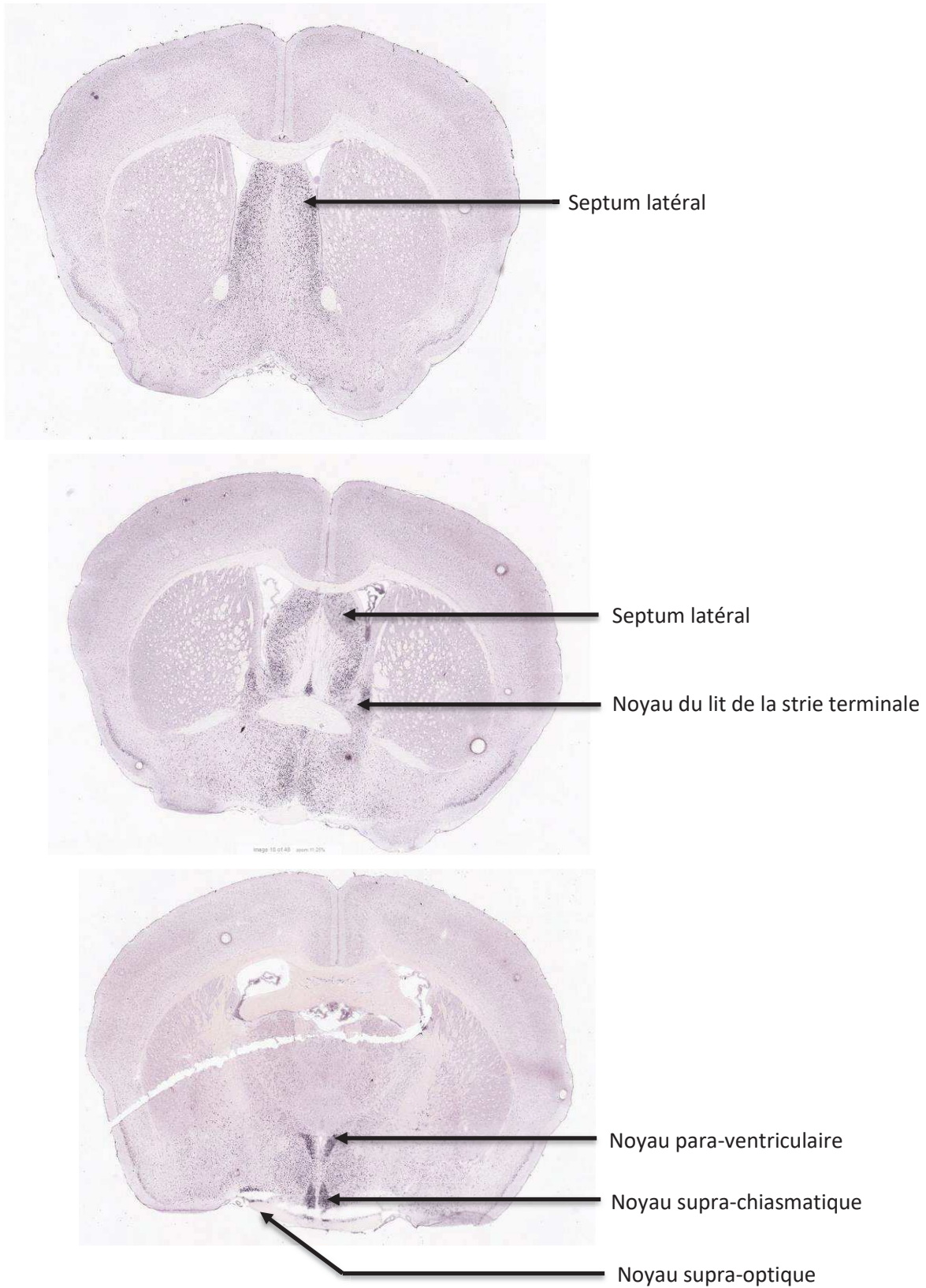
Il est possible que les taux d'ASD soient sous-estimés dans le cadre du syndrome de Prader Willi du fait de la gravité des autres troubles ou que le nombre de patients atteints du syndrome de Schaaf Yang non ASD soit sous-estimé car ils ne présentent que peu de troubles rendant ainsi le diagnostic difficile à établir.

Bien que le rôle exact de la protéine *Magel2* soit mal compris, celui-ci semble essentiel pour le recyclage des protéines membranaires et la régulation des processus d'ubiquitination (pour revue voir [267]). Nous reviendrons sur ce mécanisme dans la Discussion générale.

L'ARN messager codant pour cette protéine est exprimé fortement par les structures cérébrales essentielles pour l'effet de l'ocytocine et de la vasopressine sur la régulation des interactions sociales (voir Fig 6) :

- Le noyau suprachiasmatique et le noyau du lit de la strie terminale qui produisent la vasopressine et projettent vers les structures cérébrales dans lesquelles elle module les comportements sociaux
- Le noyau paraventriculaire et le noyau supra-optique qui produisent l'ocytocine et de la vasopressine
- Le septum latéral qui médie plusieurs des effets pro-sociaux de l'ocytocine et de la vasopressine

Figure 6 : Patron d'expression cérébrale de Magel2 déterminé par hybridation in situ de l'ARN chez des souris – images issus de l'Allen Brain Atlas



Afin d'étudier la fonction du gène *Magel2*, des modèles murins déficients pour ce gène ont été générés (pour revue, voir [268]) :

- la souris *Magel2*KO générée par l'équipe de Rachel Wevrick (*Magel2^{tm1Stw}*) dans laquelle la fonction du gène est perdue et dans laquelle le cadre de lecture ouvert est remplacé par une cassette LacZ-neo [256]. Cette souris exprime ainsi une protéine fusionnée à la bêta-galactosidase que l'on peut localiser. Ceci permet de suivre le pattern d'activation du promoteur et des éléments régulateurs: ces animaux présentent une mortalité à la naissance de l'ordre de 10%, une diminution de la prise de poids précédant le sevrage suivie par une augmentation de l'adiposité après le sevrage [269], une diminution de la masse musculaire et de l'activité locomotrice [270], une altération de la réponse à la nouveauté [271], des troubles circadiens [256], une infertilité progressive [272] et une altération tardive de l'olfaction. Tous ces défauts sont caractéristiques de perturbations des fonctions hypothalamiques primitives.
- la souris *Magel2*KO générée par l'équipe de Françoise Muscatelli (*Magel2^{tm1.1Mus}*) qui présente une délétion du gène *Magel2* ainsi que de ses séquences promotrices (région de 3.397kb) [254] : ces animaux présentent une mortalité péri-natale de l'ordre de 50%, une altération du système ocytocinergique (au cours de la période péri natale : accumulation de formes immatures de l'ocytocine ; chez l'adulte : diminution du nombre de récepteurs de l'ocytocine dans le septum latéral, augmentation de l'immuno-réactivité ocytocinergique dans différentes structures cérébrales) et une altération de l'activité de succion [254], du comportement social ainsi que de l'apprentissage et de la mémoire [255].

Le cadre de lecture ouvert du gène *Magel2* fait seulement 1.5kb [273]. La souris générée par Rachel Wevrick possède donc entre 1.5 et 2kb de séquences régulatrices qui sont absentes chez la souris générée par Françoise Muscatelli. Ces séquences régulatrices, dont les fonctions sont méconnues et qui pourraient également moduler l'expression d'autres gènes au sein de la région PWS (notamment le gène *Necdin*) pourraient expliquer les différences phénotypiques observées entre ces deux lignées (différence dans les taux de mortalité péri-natale par exemple).

L'équipe de Françoise Muscatelli a montré que les souris *Magel2*KO présentaient une altération précoce de l'expression de différentes hormones telles que l'orexine A, l'ocytocine ou la vasopressine. Au cours de la période périnatale, ces souris présentent une accumulation des formes immatures de l'ocytocine suggérant un défaut de la maturation de ce peptide. Un traitement précoce à l'ocytocine chez ces animaux

restaure les troubles alimentaires ainsi que la mortalité précoce suggérant un rôle primordial de l'ocytocine [254]. De façon intéressante, un traitement précoce à l'ocytocine est également suffisant pour restaurer les troubles sociaux chez l'adulte ainsi que l'expression des récepteurs de l'ocytocine ou l'immuno-réactivité ocytocinergique. Ce résultat suggère que l'ocytocine injectée en post-natal corrigerait un problème neurodéveloppemental [255].

3. Développement, système ocytocine/vasopressine et troubles sociaux

3.1. Périodes critiques et développement cérébral

3.1.1. Exemple de période critique : le switch du potentiel d'équilibre du GABA induit par l'ocytocine

La notion de période critique pour le développement de réseaux neuronaux a d'abord été découverte dans le cortex visuel suite à des expériences de privation sensorielle réalisées par Wiesel and Hubel en 1965 [274]. Il existe des périodes critiques au cours desquelles certains événements doivent avoir lieu afin d'assurer un bon développement.

Chez les mammifères, la naissance est un événement stressant au cours duquel le nouveau-né change de mode d'oxygénation. Lors de la transition d'un apport d'oxygène via le sang maternel à la respiration, le nouveau-né traverse une période d'hypoxie. Les neurones consommant beaucoup d'énergie, ils sont particulièrement sensibles à celle-ci. Des mécanismes impliquant une régulation de la balance excitation/inhibition se mettent en place peu avant la mise-bas permettant ainsi de diminuer l'activité neuronale et donc le besoin en oxygène.

Dans certaines structures, dont l'hippocampe, l'innervation GABAergique est plus précoce que l'innervation glutamatergique et au cours du développement prénatal, le GABA est dépolarisant [275]. Ceci est dû à une concentration intracellulaire importante d'ions chlorure. Ainsi, lorsque le GABA se lie au récepteur-canal GABA_A, celui-ci s'ouvre et laisse sortir des ions chlorure. Ces derniers étant chargés négativement, leur sortie va induire une dépolarisation qui peut suffire à exciter les neurones.

Le potentiel d'inversion du courant induit par le GABA chute brusquement avant la naissance (E20) dans l'aire CA3 de l'hippocampe chez le rat. Le potentiel d'inversion du courant induit par le GABA passe alors sous la valeur du potentiel de repos rendant le GABA hyperpolarisant. Ceci est associé à une diminution du potentiel de repos neuronal. Cet événement est transitoire puisque dès P1, le GABA redevient dépolarisant. Ce changement est dépendant de l'activation des récepteurs de l'ocytocine [276] probablement activés par l'ocytocine maternelle qui est libérée en grande quantité au cours de la parturition.

Le mécanisme d'action est le suivant : l'activation du récepteur de l'ocytocine induit une augmentation de l'activité du co-transporteur KCC2 via une phosphorylation et une augmentation de son insertion et/ou de sa stabilité au sein de la membrane plasmique. Ce transporteur extrude les ions chlorures ce qui abaisse le potentiel d'inversion du courant induit par le GABA et le rend hyperpolarisant et inhibiteur [277].

Notons que le GABA redeviendra dépolarisant au cours du développement post-natal du fait d'une augmentation d'expression du canal KCC2 et d'une diminution de l'expression de NKCC1 [278].

3.1.2. Période critique et troubles neuro-développementaux

Les troubles neuro-développementaux sont par définition causés par des événements délétères ayant lieu au cours du développement et ayant des conséquences à long terme sur la fonction neuronale, sensorielle ou comportementale.

Les facteurs de risques non-génétiques ayant été décrits dans le cadre de l'autisme concernent une altération de l'homéostasie ayant lieu au cours d'une période définie (développement prénatal ou petite enfance) que l'on peut considérer comme une période critique. De plus, les gènes associés à l'autisme sont en grande partie associés à la fonction synaptique et on comprend qu'une altération de la fonction synaptique puisse induire une connexion aberrante de certains réseaux neuronaux. Dans une revue publiée en 2016, Marin [279] suggère que les troubles neuro-développementaux seraient dus à des événements ayant lieu au cours du développement précoce (hypoxie, infection maternelle) qui vont induire des remaniements via l'activation de mécanismes compensatoires conduisant à une organisation pathologique du cerveau.

Dans une revue publiée en 2005, Gilbert décrit les mécanismes par lesquels les facteurs environnementaux peuvent influencer l'expression génique [280]. Il décrit ainsi 3 mécanismes principaux :

- Les facteurs environnementaux sont perçus et conduisent à des modulations endocrines. Les hormones libérées peuvent moduler l'expression génique
- Les facteurs environnementaux modulent le patron de méthylation de certains gènes (épigénétique) ce qui module leur transcription
- Le microbiote de l'hôte module l'expression génique de ce dernier

Des expériences ont permis de montrer que l'enrichissement environnemental a des conséquences sur le comportement des animaux [281] [282]. L'une d'entre elle a consisté à enrichir l'environnement dans lequel ont été élevées des souris avant le sevrage et les résultats ont montré une accélération de leur maturation cérébrale (pic de doublecortin arrivant plus précocément), plus de marqueurs de maturité neuronale à P14 (NeuN par exemple), densité des épines dendritiques augmentée dans le gyrus denté et synapses plus matures) [283]. Ainsi, il semble que l'exposition à un environnement spécifique puisse moduler le développement cérébral et ceci pourrait être à l'origine d'une partie des troubles neuro-développementaux et ceci, notamment via une action épigénétique (voir 1.1.4)

D'autre part, le développement des systèmes ocytocine/vasopressine est extrêmement sensible à la manipulation des animaux par un expérimentateur. Ainsi, des campagnols mâles manipulés au cours de leur premier jour de vie présentent, après le sevrage, une augmentation du nombre de neurones exprimant l'ocytocine dans le NSO. Notons que ces animaux présentent également plus de comportements de type alloparental quand des bébés leurs sont présentés que les campagnols qui n'ont pas été manipulés [284].

3.2. Développement du système ocytocine/vasopressine

3.2.1. Production d'ocytocine et de vasopressine au cours du développement

Bien que la pre-pro-ocytocine soit produite tôt au cours du développement (E14,5 chez la souris [92], E16/E17 chez le rat [12], il faut attendre la fin de la vie embryonnaire (E21 ou P0 [254] [155]) pour que la forme mature soit produite par les neurones du PVN suggérant que l'ocytocine foetale n'aurait pas de rôle au cours du développement prénatal.

La maturation de la vasopressine est plus précoce puisqu'une forme amidée du peptide peut être détectée dès E16 chez le rat. Notons qu'au cours du développement embryonnaire, on retrouve 5 à 10 fois plus de précurseurs de la vasopressine que de précurseurs de l'ocytocine [12] [285] ce qui suggère qu'au cours du développement embryonnaire, le système vasopressinergique est plus actif que le système ocytocinergique. Malgré tout, le rôle développemental de la vasopressine foetale n'est pas connu.

3.2.2. Maturation post-natale des propriétés des neurones ocytocinergiques et vasopressinergiques

Le développement morpho-fonctionnel des neurones ocytocinergiques et vasopressinergiques continue durant la période postnatale. Chez le rat, les neurones magnocellulaires du SON ne sont ainsi matures en termes de morphologie et d'activité électrophysiologique qu'après la seconde semaine post-natale. Ainsi, les propriétés des potentiels d'actions produits par ces neurones évoluent au cours de la première semaine post-natale avec notamment un seuil de déclenchement des potentiels d'action qui s'hyperpolarise progressivement. Au début de la seconde semaine post-natale, l'arborisation dendritique de ces neurones se densifie et le GABA, initialement excitateur, devient inhibiteur. A cette période d'extension suit un élagage des dendrites. Ainsi, nous pouvons penser que l'extension permet au neurone de connecter plusieurs cibles et seules certaines d'entre elles seront maintenues ensuite. Les neurones ont donc acquis leur phénotype "adulte" à la fin de la seconde semaine post-natale chez le Rat [286].

Notons que la phase d'extension dendritique nécessite la libération locale d'ocytocine et/ou de vasopressine [287] et cette maturation post-natale est donc dépendante d'une régulation autocrine.

3.2.3. Les récepteurs centraux de l'ocytocine et de la vasopressine au cours du développement

Les patrons d'expression des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont modulés au cours du développement (voir Fig 7).

De nombreuses études ont utilisé l'autoradiographie afin de caractériser le nombre de sites de liaison spécifiques de l'ocytocine et par conséquent la densité des récepteurs de l'ocytocine dans le cerveau de Rat. Les premiers récepteurs de l'ocytocine apparaissent dès E14 au niveau du complexe vagal [288].

Le fait que les récepteurs de l'ocytocine soient présents avant que l'ocytocine mature ne soit produite est surprenant mais plusieurs hypothèses expliquent leur rôle :

- l'ocytocine immature pourrait moduler l'activité du récepteur
- d'autres peptides (tels que la vasopressine) pourraient activer ou moduler ce récepteur
- l'ocytocine maternelle, capable de traverser le placenta chez l'Homme [289], pourrait atteindre le cerveau des fœtus du fait de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [77] aux étapes précoces du développement.

A la fin de la deuxième semaine post-natale (P10-P13), des récepteurs de l'ocytocine sont retrouvés dans le noyau olfactif antérieur, le caudé putamen, le noyau accumbens, le cortex cingulaire, le noyau du lit de la strie terminale, le septum, le thalamus et l'amygdale. Ensuite, le patron d'expression de ces récepteurs va subir d'importants remaniements : dans le noyau accumbens par exemple, le nombre de sites de liaison OT-R va augmenter entre P10 et P20 puis il diminuera ensuite pour atteindre les niveaux observés chez l'adulte (pour revue, voir [80]). Les niveaux d'expression seront stables uniquement après la puberté [288].

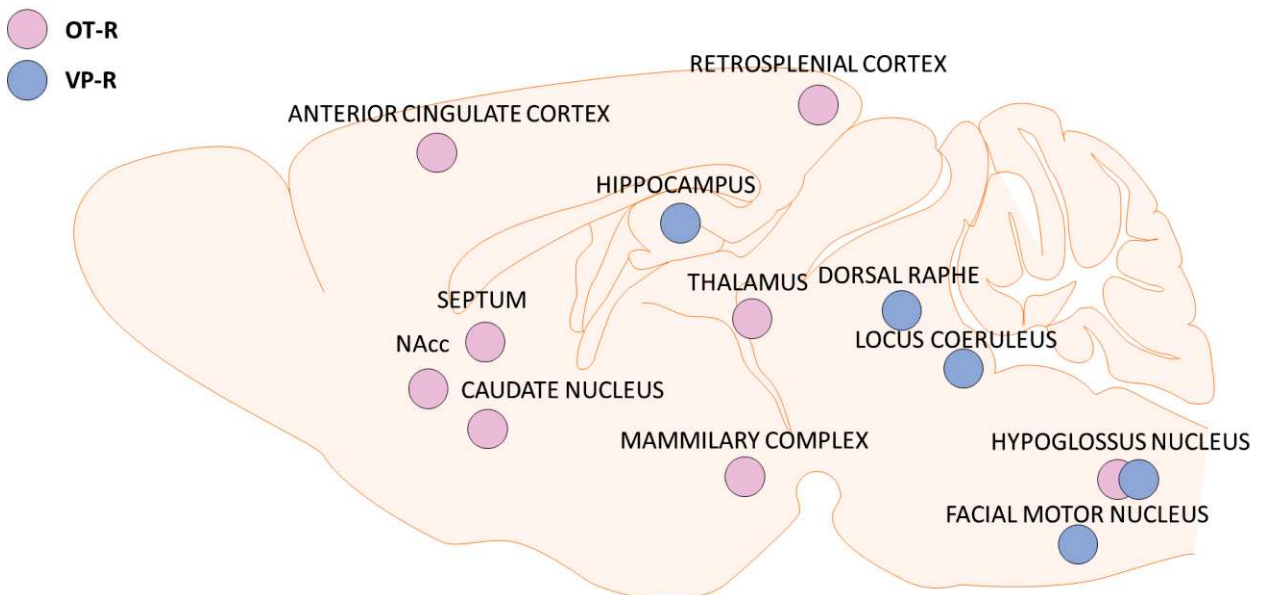
Des études similaires ont été menées afin d'étudier les récepteurs de la vasopressine. Ceux-ci apparaissent d'abord dans la formation réticulée où ils sont retrouvés dès E16 chez le rat [288]. Entre E17 et P5, d'autres structures acquièrent des récepteurs de la vasopressine. C'est le cas notamment du lobe antérieur de l'hypophyse, du noyau supra-chiasmatique, du septum, des plexus choroïdes, du locus coeruleus, du noyau du tractus solitaire, du noyau olfactif antérieur, du noyau accumbens, de l'amygdale, du thalamus, de l'hippocampe, du noyau du raphé... A partir de P5, aucune nouvelle structure ne présente de récepteurs de la vasopressine mais l'intensité du marquage dû à la liaison du radio-ligand peut être modifiée : on observe par exemple une augmentation de la liaison dans le noyau supra-chiasmatique et une diminution

dans le raphé dorsal [288]. Le patron d'expression des récepteurs de la vasopressine change peu après le sevrage chez des animaux non modifiés génétiquement (P21).

Notons que dans le septum latéral et le noyau de la strie terminale, le nombre de récepteurs de l'ocytocine, comme le nombre de récepteurs de la vasopressine est modulé au cours de la période post-natale [290] :

- la liaison V1a dans le septum latéral augmente entre 5 et 8 semaines puis reste stable ensuite
- la liaison V1a dans le noyau du lit de la strie terminale ventral augmente entre 5 et 16 semaines
- la liaison OT diminue dans le septum latéral après 5 semaines

Figure 7 : Principales structures cérébrales au sein desquelles l'expression des récepteurs de l'ocytocine et/ou de la vasopressine décroît au cours du développement post-natal [28] [288]



NAcc = nucleus accumbens

3.2.4. Influence des évènements péri-nataux sur les systèmes ocytocine et vasopressine

3.2.4.1. Effet d'une modulation précoce du système ocytocine

La modulation précoce du système ocytocine a des conséquences à long terme sur le système ocytocine/vasopressine. Ainsi, chez le campagnol des prairies mâle, l'administration par injection intrapéritonéale d'un antagoniste des récepteurs de l'ocytocine le premier jour de la vie, induira, chez l'adulte,

une diminution du nombre de sites de liaison de type V1a dans l'aire pré-optique médiane, le noyau du lit de la strie terminale et le septum latéral [165].

Les modèles animaux de pathologies entraînant des troubles des comportements sociaux sont également sensibles à la modulation précoce de l'activité du système ocytocinergique. En effet, les souris Magel2KO présentent une diminution du nombre de récepteurs de l'ocytocine chez l'adulte dans le septum latéral par rapport aux animaux WT. Un traitement précoce à l'ocytocine (injections sous cutanées au cours de la première semaine de vie) permet de normaliser le nombre de récepteurs de l'ocytocine chez l'adulte dans cette structure et de restaurer les comportements sociaux [255].

Notons que peu d'études se sont concentrées sur les effets à long terme d'une modulation précoce du système vasopressine car cette hormone, administrée en périphérie module notamment la pression artérielle. L'administration de vasopressine peut ainsi avoir de lourdes conséquences indépendantes d'une action centrale.

3.2.4.2. *Stimuli sociaux et développement des systèmes ocytocine/vasopressine*

L'abondance des stimuli sociaux module le développement du système ocytocine/vasopressine. Lorsque plusieurs portées de souris Balb/c sont élevées ensemble (3 mères par cage), les mères présentent un comportement maternel exacerbé. Les souris ayant grandi dans ces conditions présentent, à P28, une augmentation du nombre de récepteurs de l'ocytocine dans le septum latéral dorsal et ventral, le noyau dorsal endopiriforme, le cortex insulaire agranulaire et le noyau du lit de la strie terminale. Ces animaux présentent également une diminution du nombre de récepteurs de la vasopressine dans le septum latéral dorsal. De plus, leur réponse au stress est modifiée puisqu'ils présentent, après sevrage, une diminution des comportements "anxieux" lorsqu'un nouvel environnement leur est présenté [291].

De la même manière, la séparation de la mère 3 heures par jour au cours de 2 premières semaines post-natales va modifier, chez les bébés, le développement du système ocytocine/vasopressine avec notamment [292]:

- une diminution transitoire du nombre de récepteurs V1a dans le septum latéral et le noyau arqué (observée à la 5ème semaine de vie mais restaurée à la 8ème semaine de vie)
- une augmentation du nombre de récepteurs V1a dans le cortex piriforme à partir de la 8ème semaine post-natale
- une diminution transitoire du nombre de récepteurs de l'ocytocine dans le cortex insulaire agranulaire (jusqu'à la 8ème semaine post-natale)

- une diminution du nombre de récepteurs de l'ocytocine dans le septum latéral et le caudé putamen et une augmentation dans l'hypothalamus ventro-médial à la 16ème semaine post-natale

Dans cette étude, les impacts de la séparation de la mère sur la production d'ocytocine ou de vasopressine ou sur l'expression des récepteurs à court terme n'ont pas été étudiés.

Notons que les rats Wistar mâles présentent une augmentation de la concentration en vasopressine dans le septum latéral lors d'une interaction sociale avec un juvénile. Les animaux sujets au protocole de séparation de la mère ne présentent pas cette augmentation et ce défaut est associé à une incapacité à reconnaître un individu déjà rencontré [143]. Ainsi, ce n'est pas seulement l'expression des récepteurs qui est altérée par ce stress périnatal mais également la libération de vasopressine dépendante d'un stimulus social.

3.3. L'ocytocine et la vasopressine comme modulateurs du développement

3.3.1. Ocytocine et vasopressine : effets organisationnels

L'ocytocine et la vasopressine sont principalement connues pour leurs fonctions endocrines et leur fonction de neuromodulateurs mais ce sont également des éléments clés du développement cérébral. Ces nonapeptides ne permettent pas seulement le bon développement des systèmes ocytocinergique et vasopressinergique mais ils jouent un rôle organisationnel plus global. Ce rôle pourrait expliquer l'expression transitoire de récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine dans certaines structures cérébrales.

3.3.1.1. Le système ocytocine/vasopressine module le développement cérébral et endocrinien

Des études menées sur le rat Brattleboro ont mis en avant le rôle de la vasopressine dans le développement cérébral. En effet, ces animaux présentent un développement cérébral altéré avec notamment une diminution de l'activité mitotique et un nombre moins important de cellules dans le cervelet. Une supplémentation en vasopressine (administrée par voie sous cutanée) au cours du développement prénatal permet de restaurer ces défauts de croissance (pour revue, voir [293]).

L'application transitoire d'ocytocine sur des cultures neuronales issues d'hippocampe induit une diminution de la complexité dendritique de ces neurones ainsi que de l'abondance d'autapses. Cet effet passe par l'activation du récepteur de l'ocytocine [294]. Ainsi, l'ocytocine ne permet pas seulement de favoriser le phénotype neuronal mais elle jouerait également sur la maturation morphologique des neurones. De façon similaire, les neurones hippocampiques et corticaux de souris déficientes pour CD38, une protéine connue pour son rôle dans la libération d'ocytocine, présentent des défauts morphologiques avec notamment une altération de la complexité dendritique (évaluée via l'analyse de Scholl des dendrites apicales) [295].

Notons que le devenir des progéniteurs neuronaux est également modulé par l'ocytocine. Ainsi, l'administration d'ocytocine favorise la neurogenèse in vitro [296] et in vivo [297]. L'ocytocine pourrait jouer un rôle important dans le développement neuronal expliquant l'impact majeur d'une application aiguë et précoce d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine.

D'autre part, l'impact néfaste d'une privation sensorielle sur le développement cortical est dépendant de l'ocytocine. Ainsi, chez la souris, la privation précoce d'informations sensorielles perçues visuellement ou via les moustaches induit une diminution de la fréquence des événements synaptiques perçus par les neurones pyramidaux des couches II et III ainsi que de leur activité synaptique. Ceci est corrélé avec une diminution du nombre de neurones ocytocinergiques du PVN et des taux réduits d'ocytocine au sein du cortex somatosensoriel et visuel (sans effet sur les taux plasmatiques). L'injection d'ocytocine dans le cortex somatosensoriel le jour précédant des enregistrements électrophysiologiques permet de restaurer les défauts observés. De plus, des troubles similaires peuvent être induits chez des animaux WT via l'injection intra cérébro ventriculaire d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine démontrant que ces troubles sont dépendants de l'ocytocine [298]. L'ocytocine joue donc un rôle positif pour le développement des cortex sensoriels.

A l'interface entre le central et le périphérique, une étude réalisée chez le poisson zèbre a permis de montrer que l'ocytocine joue un rôle crucial pour le développement de l'interface neuro-vasculaire de l'hypophyse en modulant la morphogenèse endothéliale [299]. Cette modulation aura un impact à long terme sur la capacité de la neurohypophyse à assurer la libération des hormones dans la circulation sanguine.

3.3.1.2. *Impact sur la balance excitation/inhibition*

Lorsque le système ocytocine/vasopressine est altéré, le développement cérébral s'en trouve perturbé. L'absence de récepteurs V1a induit, chez la souris, une augmentation du nombre de neurones parvalbumine dans le cortex sensoriel [300]. Ceci suggère un mécanisme compensatoire probablement dû à un manque d'inhibition qui était physiologiquement induite via le récepteur V1a. D'autre part, les neurones hippocampiques issus de souris KO pour les récepteurs de l'ocytocine forment moins de synapses inhibitrices [162] [294] suggérant un rôle positif de l'ocytocine dans la formation de synapses inhibitrices

Ces données suggèrent que le développement de la balance excitation/inhibition nécessite l'activité du système ocytocine/vasopressine.

3.3.2. Ocytocine et vasopressine : des molécules importantes pour le développement du système nerveux

3.3.2.1. *Des mécanismes de résistance à l'anoxie induite par la naissance qui dépendent de l'ocytocine et de la vasopressine*

Comme nous l'avons vu en 3.1, l'impact de l'ocytocine maternelle sur l'activité de KCC2 au niveau du cerveau du fœtus, conduit, peu avant la naissance, à un déplacement du potentiel d'équilibre des ions chlorure. Ce mécanisme conduit à un effet transitoirement inhibiteur du GABA [276] avec pour conséquence une diminution de l'activité cérébrale et donc de la sensibilité à l'anoxie.

La vasopressine participe également à la protection du cerveau du bébé face à l'hypoxie. Celle-ci active, via le récepteur V1a, les interneurons hippocampiques du cerveau du fœtus induisant ainsi une désynchronisation de l'activité électrique dans cette structure [301]. Les contractions modifient la pression artérielle du bébé avec pour conséquence une augmentation de la libération de vasopressine fœtale. Ainsi, ce processus pourrait se mettre en place progressivement aux alentours de la parturition [302].

Ces deux mécanismes ont pour conséquence une diminution de l'activité neuronale et ont ainsi un effet neuro-protecteur primordial au moment de la naissance.

3.3.2.2. *L'ocytocine précoce module le développement d'autres systèmes neuro-modulateurs*

L'ocytocine joue un rôle dans le développement des hormones sexuelles stéroïdiennes et de leurs récepteurs. Ainsi, un traitement périnatal avec un antagoniste des récepteurs de l'ocytocine diminue la

quantité de récepteurs ERalpha dans l'aire pré-optique médiane des campagnols femelles [303] et l'augmente dans le noyau du lit de la strie terminale [304].

Le développement du système sérotoninergique est également modulé par l'ocytocine. Ainsi, l'injection d'ocytocine à P1 augmente l'immuno-réactivité sérotoninergique dans l'hypothalamus antérieur, l'amygdale et l'hypothalamus latéral chez le campagnol mâle [305].

L'ocytocine semble avoir ainsi un effet développemental sur plusieurs systèmes neuromodulateurs. Le traitement périnatal (P1) à l'ocytocine chez le rat Wistar mâle induit ainsi des changements avec notamment, à 4 mois [306]:

- une augmentation de la concentration en noradrénaline du cortex frontal et du cervelet et une diminution dans la medula oblongata
- une diminution de la dopamine plasmatique et une augmentation dans le cortex frontal

Encore une fois, peu d'études se concentrent sur le rôle précoce de la vasopressine pour le développement des systèmes neuro-modulateurs. Néanmoins, les effets retrouvés après un traitement précoce à l'ocytocine pourraient en partie être dus à une activation du système vasopressinergique.

3.4. Traitement précoce à l'ocytocine : vers un effet curatif ?

Dans le cadre des troubles neuro-développementaux, l'objectif est maintenant de trouver des traitements qui modifieraient le décours de la pathologie plutôt que de corriger des symptômes seulement. Pour cela, les traitements doivent être administrés tôt, avant l'installation des troubles, et un important travail a donc été fait dans le diagnostic précoce des troubles neuro-développementaux. Pour l'autisme, le diagnostic reste tardif (2 ans minimum) contrairement à d'autres troubles neuro-développementaux tels que le syndrome de Prader Willi pour lequel le diagnostic est réalisé de façon très précoce [245].

Les résultats obtenus dans le cadre d'un traitement précoce à l'ocytocine du syndrome de Prader Willi chez l'Homme [264] et chez la souris Magel2KO [255] suggèrent que l'ocytocine pourrait modifier le décours de la pathologie. En effet, un traitement d'une durée d'une semaine a des effets bénéfiques stables, au moins 3 ans chez l'Homme et plusieurs mois chez la souris. Une étude clinique en cours vise à suivre les enfants traités afin de savoir si le traitement aura un impact sur la seconde phase de la pathologie caractérisée par l'hyperphagie et l'obésité.

Dans le cadre de l'autisme, les résultats obtenus par Tyzio et collaborateurs dans le cadre d'un traitement précoce démontrent un effet bénéfique à long terme du traitement à la buprénorphine et

suggèrent qu'un effet similaire pourrait être induit par un traitement à l'ocytocine [236]. De même, dans un autre modèle d'autisme, un traitement de P7 à P21 à l'ocytocine induit une amélioration des troubles sociaux et cela plus d'une semaine après l'arrêt du traitement [107]. Ainsi, l'ocytocine pourrait moduler le développement de plusieurs pathologies dont le syndrome de Prader Willi ou les ASD.

Il est important de rester vigilant quant à ces études qui n'en sont qu'à leurs débuts. Bien que les résultats soient encourageants, les études restent peu nombreuses et nous n'avons encore que très peu de recul sur les effets à long terme de tels traitements [307].

3.5. Le septum : une cible du système OT/VP et d'un traitement précoce à l'ocytocine

3.5.1. Généralités

3.5.1.1. *Subdivisions du septum*

Le septum est une structure cérébrale située dans la partie médiane du cerveau antérieur [308]. Il est limité par les ventricules latéraux, dorsalement par le corps calleux et ventralement par la commissure antérieure (Fig 8A).

Chez l'Homme, le septum est divisé en deux parties [309] :

- Le septum pellucidum composé principalement de faisceaux de fibres et de cellules gliales. Il est situé dans la partie la plus dorsale et étroite et sépare les 2 ventricules latéraux
- Le septum verum qui contient des noyaux de neurones (septal nuclei). Celui-ci correspond au septum des rongeurs

Chez les rongeurs, le septum est divisé en septum latéral et septum médian. Le septum médian n'a pas été subdivisé. Ce dernier contient 3 types de neurones : des neurones GABAergiques, des neurones cholinergiques et des neurones glutamatergiques. Le rôle de chacune de ces catégories a été évalué en particulier dans le cadre de la connexion septo-hippocampique et de l'impact de celle-ci dans la régulation des rythmes theta et de différents comportements (alimentaire, exploratoire, cognitifs...) [310].

Le septum latéral comprend :

- le septum latéral dorsal
- le septum latéral intermédiaire
- le septum latéral ventral

Il est aussi important de tenir compte de l'hétérogénéité rostro-caudale du septum en termes de connectivité, de fonction ou de composition. Il a été montré que les neurones du septum latéral sont quasi-

exclusivement des neurones GABAergiques [311] mais ils co-expriment également un bon nombre de peptides ou neurotransmetteurs comme cela a été décrit par Risold et Swanson [312]. Ces derniers ont défini 3 parties dans le septum en fonction de leur chémo-architecture

- le septum latéral rostral qui exprime des ARNm codant pour la neurotensine et l'enképhaline. Cette partie reçoit les afférences issues de la région CA1 de l'hippocampe et est connectée à l'hypothalamus médian
- le septum latéral caudal qui exprime des ARNm codant pour la somatostatine et qui reçoit des afférences issues de l'aire CA3 de l'hippocampe. Il est connecté avec le septum latéral ventral et l'hypothalamus latéral
- le septum latéral ventral qui exprime des ARNm codant pour le récepteur aux oestrogènes et qui reçoit des afférences issues du subiculum ventral et de l'aire pré-optique médiale.

3.5.1.2. Les connexions du septum

Les connexions du septum (Fig 8B) qui ont été les plus étudiées sont celles entre cette structure et l'hippocampe. En effet, l'hippocampe envoie des projections glutamatergiques vers le septum latéral qui est connecté au septum médian. Le septum médian, en retour, envoie des afférences glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques vers l'hippocampe (Fig 8C). Ces connections passent par la fimbria et le fornix. On parle de boucle hippocampo-septo-hippocampique. La fonction de cette boucle a été très étudiée dans le cadre de la régulation des rythmes électroencéphalographiques de type theta notamment.

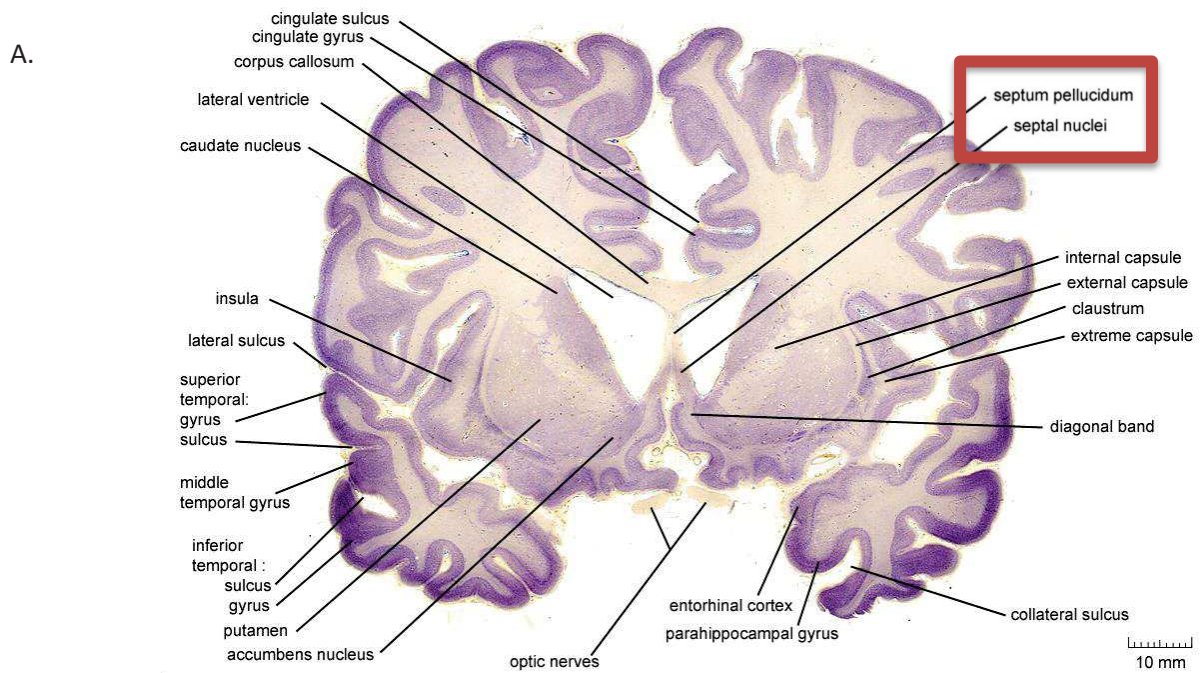
Le septum est également très fortement connecté à d'autres structures (Fig 8B) parmi lesquelles [313] :

- L'hypothalamus et en particulier l'hypothalamus latéral ou l'hypothalamus médian. Une connection GABAergique issue de neurones présents dans le septum latéral dorsal et médian et projetant vers l'hypothalamus latéral régule ainsi la prise alimentaire [314]. De plus, des fibres issues du septum latéral et projetant vers l'hypothalamus latéral régulent l'agression [315]. L'hypothalamus latéral envoie également des fibres (GABAergiques notamment) vers le septum latéral [316]. Notons que les neurones du PVN et du SON envoient des projections ocytocinergiques vers le septum latéral [91] [317].
- Le cortex. Le septum médian fait partie du cerveau antéro-basal (« basal forebrain »), un ensemble de structures comprenant le noyau accumbens, le noyau basal de Meynert, la bande diagonale de Broca, la substantia innominata et le septum médian. Ce système régule, majoritairement via des projections cholinergiques, l'éveil et l'attention [318]. Cet effet

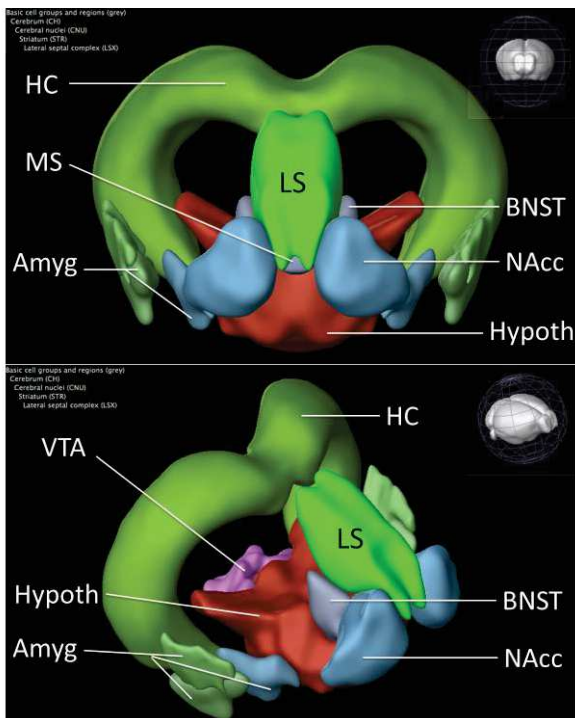
passer par une modulation de l'activité du néocortex. Notons que le septum latéral pourrait également jouer un rôle dans ce processus [319]

- L'amygdale étendue. Le septum reçoit ainsi des projections vasopressinergiques issues du noyau du lit de la strie terminale ainsi que de l'amygdale [83].
- L'aire tegmentale ventrale, qui reçoit des connexions issues du septum latéral notamment mises en jeu lors d'un comportement de recherche de drogue [320]
- Le noyau accumbens. Le septum latéral envoie des afférences GABAergiques vers la partie shell du noyau accumbens [316].

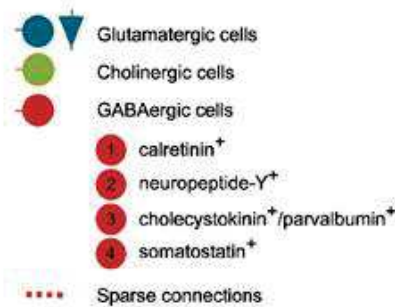
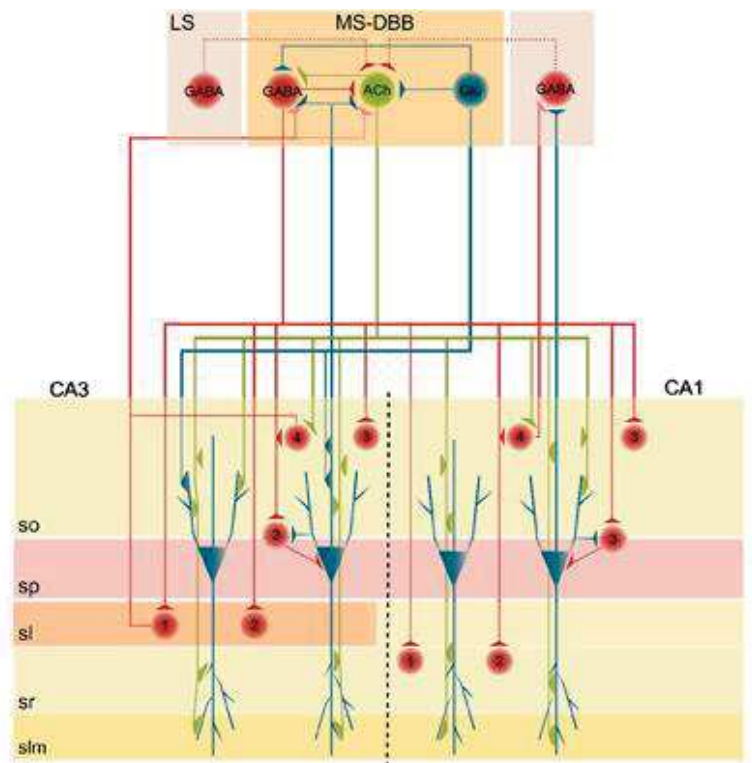
Figure 8 : Anatomie et connectivité du septum



B.



C.



A. Coupe frontale du cerveau humain montrant le septum pellucidum et des noyaux septaux (septum verum) – d’après « The Human Brain Atlas » [321]

B. Principales connexions du septum latéral chez le rongeur – d’après « Allen Brain Atlas » [322]

C1 : vue frontale

C2 : vue latérale

Amyg = Amygdala ; BNST = bed nucleus of the stria terminalis ; HC = hippocampus ; Hypoth = hypothalamus ;

LS = lateral septum ; MS = medial septum ; NAcc = nucleus accumbens ; VTA = ventral tegmental area

C. Les connexions au sein du réseau hippocampo-septo-hippocampiques

Illustration tirée de *Ruivo and Mellor, Frontiers in Synaptic Neurosciences, 2013* [323]

3.5.1.3. Fonctions du septum

Le septum est une structure cérébrale impliquée dans :

- les processus de mémorisation. La lésion du septum médian et de la bande diagonale de Broca altère la mémoire spatiale [324]. La vasopressine libérée au sein du septum peut améliorer ou altérer l'apprentissage en fonction de la nature de celui-ci [325] [326]. De plus, chez l'Homme, le volume occupé par les noyaux septaux a été positivement corrélé à la capacité à se souvenir d'un item [327] ce qui suggère que le rôle de cette structure dans la régulation de la mémoire est conservé.
- le comportement agressif. Le rôle du septum est connu depuis longtemps du fait de la rage septale induite lorsque le septum subit une lésion. Ces résultats ont été raffinés récemment et il a été démontré qu'une libération septale de vasopressine a lieu au cours de l'agression dans un protocole "resident/intruder" chez le rat [290] et que l'inhibition des récepteurs septaux de la vasopressine est suffisante pour diminuer l'agressivité. Les effets sur l'agressivité sont en réalité complexes puisque l'activation d'un réseau septum-hypothalamus ventro-médian diminue l'agression chez la souris [315].
- la régulation de la prise alimentaire. Chez le lapin, une lésion de l'aire septale altère la motivation pour la recherche de nourriture [328]. Plus récemment, il a été montré que le septum pouvait diminuer la prise alimentaire chez le rongeur via un réseau du septum vers l'hypothalamus latéral [314] ou via un réseau de l'hippocampe ventral vers septum latéral [329]
- le système de la récompense. Chez le primate, il a été montré qu'une catégorie de neurones du septum antéro-dorsal est activée lorsqu'une récompense peut éventuellement arriver mais sans certitude [330]. De plus, des neurones du septum latéral projetant sur l'aire tegmentale ventrale sont activés lors de la recherche de drogue [320] suggérant une implication dans les mécanismes de l'addiction.
- l'anxiété. Les rats croisés de façon à obtenir des rats anxieux ou peu anxieux présentent des différences de libération septale de la vasopressine [331]. De plus, l'activité d'une sous population de neurones GABAergiques du septum latéral promeut l'anxiété [332].
- les comportements sociaux. Le septum et, en particulier, la modulation par l'ocytocine et la vasopressine de l'activité du septum est impliquée dans la régulation des comportements sociaux (voir 3.5.3.3).

3.5.1.4. Septum latéral et implication potentielle dans le cadre des troubles neuropsychiatriques

Le septum joue également un rôle important dans la régulation des émotions et de la motivation avec une fonction potentielle dans le cadre de troubles neuropsychiatriques tels que la schizophrénie [333].

Ses connexions lui permettent d'intégrer des informations cognitives (corticales ou hippocampiques par exemple) ainsi que des informations affectives (issues de l'amygdale, de l'hypothalamus...). De plus, son lien avec le système de la récompense (noyau accumbens, aire tegmentaire ventrale) en fait un acteur majeur dans la régulation des comportements affectifs.

Ainsi, la fonction du septum latéral a été associée à :

- La motivation et à la sensibilité aux drogues d'abus. En effet, l'activité du LS activerait le circuit de la motivation impliquant l'aire tegmentaire ventrale et le noyau accumbens.
- Les comportements psychotiques. Les patients atteints de schizophrénie par exemple possèdent un septum pellucidum dégénéré (cavum septum pellicidum)
- L'anxiété. L'activité du septum est augmentée en réponse à une grande variété de stimuli stressants et une lésion du septum augmente la réponse à la peur chez les rongeurs (freezing) suggérant une action anxiolytique de cette structure.
- La dépression. Certains traitements antidépresseurs (fluoxétine par exemple) induisent une augmentation de l'activité du septum ce qui pourrait expliquer une partie de leur effet anxiolytique.

Toutes ces fonctions sont bien détaillées dans une revue de Sheehan et collaborateurs, publiée *dans Brain Research Review* [333].

De plus, son rôle dans l'autisme a été suggéré puisque des altérations anatomiques ont été décrites dans le septum de patients autistes [334] avec notamment une diminution de la densité cellulaire dans le septum [335].

3.5.2. Réponse à l'ocytocine et à la vasopressine des neurones du septum latéral

3.5.2.1. L'ocytocine et la vasopressine sont libérées au sein du septum latéral

L'ocytocine arrivant au septum est issue du noyau paraventriculaire et du noyau supra-optique de l'hypothalamus [83] [317] tandis que la vasopressine, elle, est issue de l'amygdale étendue comprenant le noyau du lit de la strie terminale et l'amygdale [83]. Notons que chez l'Homme également, des cellules vasopressinergiques ont été décrites au sein du noyau du lit de la strie terminale et des fibres vasopressinergiques ont été observées dans les noyaux du septum médian et latéral [336]. De plus, des

récepteurs ocytocinergiques [337] et des sites de liaisons de la vasopressine [338] ont été identifiés chez l'Homme.

De façon intéressante, des synapses ocytocinergiques et vasopressinergiques ont été décrites au sein du septum suggérant une libération très locale de ces peptides [89]. Notons que le septum contient des récepteurs de l'ocytocine (principalement dans la partie médiane du septum et dans le septum latéral ventral) mais également des récepteurs V1a de la vasopressine (dans tout le septum latéral). Néanmoins, nous ne connaissons pas la localisation cellulaire ni subcellulaire de ces récepteurs : sont-ils situés en pré ou en post-synaptique ? Un neurone peut-il exprimer les deux types de récepteurs ?

Des expériences de micro-dialyse ont également permis de démontrer une libération de vasopressine ou d'ocytocine dans le septum latéral, respectivement, lors d'une interaction sociale [143] ou lorsqu'un stimulus social est à nouveau présenté [144]. Notons que les stimuli sociaux ne sont pas les seuls capables d'induire une libération locale d'ocytocine ou de vasopressine : un stress généré par le test de la nage forcé induit une libération septale de vasopressine qui favorise un comportement actif de lutte (un antagoniste V1a injecté dans le septum diminue ce temps de lutte et augmente le temps passé à flotter) [339]. Un stress social (protocole de défaite sociale) est également un stimulus induisant une libération locale d'ocytocine [340] [341].

3.5.2.2. Réponse électrophysiologique des neurones du septum latéral à l'ocytocine et à la vasopressine

Sur des tranches aigües de cerveau de rat, plus de 40% des neurones du septum latéral répondent à l'application de vasopressine par une augmentation de leur activité électrique tandis qu'environ 10% des neurones sont inhibés par une application similaire [342]. Des neurones activés par l'application d'ocytocine ou d'agoniste spécifique des récepteurs de l'ocytocine mais pas par la vasopressine ont également été décrits [342]. En conditions basales, les neurones du septum reçoivent des afférences inhibitrices GABAergiques. Allaman-Exertier et collaborateurs suggèrent que les neurones activés par la vasopressine connectent bon nombre de neurones septaux et leur envoient des afférences inhibitrices induisant ainsi une inhibition indirecte. Ces effets sont dépendants des récepteurs V1a de la vasopressine [343].

La stimulation de la fimbria induit une activité synaptique qui peut être enregistrée dans le septum [344]. De façon intéressante, une stimulation de 2 secondes à 50Hz induit la potentialisation de cette réponse et une LTP peut être observée. Cette LTP est dépendante de la vasopressine [345]. Une étude du même groupe a montré que la vasopressine potentialise l'impact d'une stimulation de la fimbria sur l'activité

synaptique glutamatergique enregistrée dans des neurones du septum latéral [346]. La fimbria transmettant des informations issues de l'hippocampe, ceci suggère un rôle de la vasopressine dans la régulation des événements synaptiques issus de ce circuit hippocampo-septal.

3.5.2.3. Impact d'une augmentation septale d'ocytocine et de vasopressine sur la régulation des comportements sociaux

L'utilisation de micro-dialyse a permis de montrer une libération locale de l'ocytocine et/ou de la vasopressine induite par différents protocoles expérimentaux. Ces libérations peuvent être locales puisque lorsqu'elles sont étudiées dans plusieurs structures cérébrales, il arrive que seulement l'une d'elle présentent l'augmentation de concentration locale en ocytocine et/ou en vasopressine [290]. Afin de comprendre le rôle joué par la libération d'ocytocine ou de vasopressine dans le septum, deux stratégies sont possibles :

- inhiber la libération locale via des outils opto ou chémo-génétiques
- inhiber les récepteurs de l'ocytocine ou de la vasopressine locaux afin de bloquer l'action des neuropeptides

L'impact de la libération septale d'ocytocine et/ou de la vasopressine a bien été étudié lors d'un comportement social via l'injection locale d'antagonistes notamment via rétro-dialyse [325]. Ainsi, il a été montré que la vasopressine joue un rôle dans le comportement social chez le jeune puisqu'elle module le comportement de jeu [188]. La vasopressine septale joue d'autres rôles pro-sociaux notamment en augmentant la fréquence des comportements paternels chez le campagnol des prairies [347]. Ces fonctions sont portées par le récepteur V1a.

L'ocytocine et la vasopressine sont également impliquées dans l'interaction entre anxiété/peur et comportement social : la vasopressine, via V1a, est pro-agressivité chez des rats présentant des hauts taux d'agressivité dans le paradigme resident/intruder [290] tandis que l'ocytocine module l'impact positif d'une expérience sociale sur l'expression de la peur [348].

En terme d'effet sur la mémoire sociale, l'ocytocine via les OT-R [144] [349] et la vasopressine via V1a [350] [351] [352] [353] [354] [143] [355] agissent sur le septum pour permettre la reconnaissance sociale. Notons néanmoins que le rôle spécifique de chacun de ces peptides n'a pas été étudié. Ainsi, l'impact fonctionnel de la balance ocytocine/vasopressine sur les neurones impliqués dans la régulation des comportements sociaux n'a pas été évalué jusqu'ici.

Notons que jusqu'ici, une seule étude a consisté à moduler la libération septale d'ocytocine et à étudier son impact dans les comportements sociaux. Cette étude a permis de montrer un rôle anxiolytique de la libération septale d'ocytocine chez la femelle lactante dans le cadre d'un protocole de peur sociale [317].

3.5.4. Cas pathologiques impliquant une dysfonction septale de l'ocytocine et/ou de la vasopressine

Au-delà des fonctions physiologiques de l'ocytocine ou de la vasopressine au sein du septum, ces systèmes sont altérés dans des conditions pathologiques.

Dans le cadre d'un stress périnatal au cours duquel les bébés sont séparés de leur mère pendant quelques heures, il a été montré que le système vasopressinergique subissait d'importants remaniements qui persistent à l'âge adulte. Ainsi, les rats qui ont été sujets à ce stress présenteront des déficits de reconnaissance sociale. Ces défauts sont dus à une absence de libération de vasopressine dans le septum latéral lors de la première rencontre. Bien que la libération de vasopressine n'ait pas lieu, notons que les récepteurs sont toujours capables de répondre de manière efficace puisqu'une rétro-dialyse de vasopressine dans cette structure restaure le comportement [143].

Dans le cadre d'un modèle murin du syndrome de Schaaf Yang, il a été montré que la souris Magel2KO générée par l'équipe de Françoise Muscatelli, présente d'importantes altérations du système ocytocinergique chez le jeune mais également chez l'adulte [254] [253]. De manière intéressante, bien que l'accumulation de formes immatures de l'ocytocine et l'augmentation de l'immuno-réactivité ocytocinergique chez l'adulte ne touchent pas une structure cérébrale en particulier, la diminution du nombre de récepteurs de l'ocytocine est spécifique du septum latéral. Cette diminution étant restaurée par le traitement précoce à l'ocytocine qui restaure également les troubles sociaux, l'ocytocine septale joue probablement un rôle particulier dans la physiopathologie des troubles sociaux observés dans ce modèle.

PROBLEMATIQUE

Les troubles du spectre autistiques (ASD) touchent près de 1% de la population mondiale. Le coût socio-économique de ces troubles est important puisque les patients ont besoin d'un suivi adapté tout au long de leur vie et qu'ils sont souvent isolés socialement. Aujourd'hui, l'étiologie des ASD reste méconnue et il s'agit en réalité d'une famille de troubles assez hétérogènes. Du fait de cette grande hétérogénéité, aucun traitement efficace n'a encore été développé.

L'ocytocine est un neuropeptide qui intervient dans les comportements sociaux chez l'Homme et l'animal via une action centrale et dont les fonctions sont dérégulées dans les troubles de ces comportements. En effet, dans ces troubles, on observe que la réponse à ce peptide est altérée notamment au sein de structures cérébrales importantes pour la régulation des comportements sociaux. De plus, l'ocytocine offre des perspectives de traitement intéressantes. En effet, les premières études chez l'animal montrent qu'un traitement péri-natal peut s'avérer curatif sur les troubles sociaux et les premières études développées dans le cadre du syndrome de Prader Willi montrent, chez l'Homme, une amélioration à long terme des paramètres sociaux. Ce traitement reste empirique et une **meilleure compréhension de l'origine des troubles sociaux, de la fonctionnalité du système ocytocine et du fonctionnement d'un tel traitement** est essentielle. En effet, il est important de tenir compte du fait qu'une modulation péri-natale de l'activité de ce neuromodulateur aura des conséquences à long terme dont certaines pourraient s'avérer indésirables. De plus, un tel traitement, bénéfique chez les modèles animaux de troubles sociaux, pourrait s'avérer délétère en l'absence de trouble ce qui suggère que son administration doit être extrêmement contrôlée et qu'il est important de connaître la sous-catégorie de patients qui pourrait en bénéficier.

L'ocytocine fait partie, avec la vasopressine, d'une famille de peptides de structure très proches et dont les fonctions sont souvent complémentaires dans la régulation des comportements sociaux. Nous pensons qu'une étude du système ocytocinergique seul n'apportera qu'une explication partielle aux interrogations soulevées et que la **prise en compte du système vasopressinergique est essentielle**.

Ma thèse s'inscrit donc dans une problématique générale visant à déterminer le rôle d'une altération fonctionnelle du système ocytocine/vasopressine dans l'émergence de troubles sociaux.

La force du travail réalisé au cours de cette thèse tient dans l'étude, en parallèle, des systèmes ocytocinergique et vasopressinergique et de leur influence séquentielle sur l'activité d'une structure cérébrale définie.

Des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine étant co-exprimés dans différentes structures cérébrales (hippocampe, hypothalamus, septum, amygdale, etc.) nous pouvons envisager que ces peptides régulent, ensemble, l'activité de ces structures.

Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse que l'action de ces peptides dépend du contexte et qu'en fonction de celui-ci, l'un ou l'autre des peptides est libéré dans une structure donnée. Ainsi, la libération de ces peptides pourrait être vectrice d'informations contextuelles et l'ocytocine et la vasopressine pourraient supporter des informations contextuelles différentes.

L'adaptation des comportements sociaux nécessite la prise en compte d'informations sensorielles dynamiques (interaction avec un congénère connu ou non...). L'ocytocine et la vasopressine pourraient, dans un cadre physiologique, coder pour certaines de ces informations et moduler, en fonction de celles-ci, l'activité de réseaux neuronaux régulant les interactions sociales. La nature de ce codage pourrait résider dans une libération séquentielle de ces deux peptides. Ainsi, la libération de l'un ou l'autre des peptides serait dépendante du contexte et permettrait d'adapter le comportement social à celui-ci.

Ainsi, nous faisons l'hypothèse que **l'établissement de comportements sociaux adaptés réside dans la régulation d'une balance temporelle entre l'activité ocytocinergique et l'activité vasopressinergique et qu'une dysrégulation de cette balance pourrait expliquer certains troubles comportementaux.**

STRATEGIE EXPERIMENTALE

Afin de tester notre hypothèse, nous avons dû mettre au point une stratégie expérimentale et pour cela nous avons :

- choisi un modèle expérimental adapté à cette étude
- concentré notre étude sur l'impact de l'ocytocine et de la vasopressine au sein d'une structure cérébrale définie
- choisi un type de comportement social spécifique

Choix du modèle expérimental : Pour cette étude, le modèle souris s'est imposé. En effet, les rongeurs présentent des comportements sociaux faciles à évaluer. D'autre part, ce projet nécessitant de moduler, dans un réseau neuronal précis, l'activité du système ocytocine et du système vasopressine, nous avons tiré profit :

- Du développement de lignée murines transgéniques : souris ocytocine-GFP et ocytocine-cre
- Du développement d'outils pharmacologiques et optogénétique bien caractérisés permettant la modulation, *in vivo*, de l'activité du système ocytocinergique et du système vasopressinergique
- des connaissances accumulées jusqu'ici quant à l'organisation du système ocytocine/vasopressine : des modes de libération de ces peptides jusqu'à la localisation des récepteurs au cours du développement.

Nous avons choisi d'utiliser un modèle animal présentant à la fois un dysfonctionnement du système ocytocine/vasopressine et des troubles sociaux. En effet, un tel modèle nous permet d'interroger l'implication de la dysfonction ocytocinergique/vasopressinergique dans les troubles qu'il présente.

Nous avons choisi le modèle de souris Magel2KO. Ce modèle est intéressant car il présente les 3 caractéristiques d'un modèle animal pertinent:

- modèle homologue : la mutation de ce gène chez l'Homme induit un syndrome pathologique appelé "**syndrome de Schaaf Yang**" [265]
- modèle isomorphe : 75% des patients diagnostiqués Schaaf Yang sont atteints de troubles du spectre autistique ce qui fait du gène Magel2 un gène de susceptibilité à l'autisme [268]. Chez la souris également, la mutation de ce gène induit, chez l'adulte, des troubles des comportements sociaux bien que les mécanismes mis en jeu dans ces déficits soient encore méconnus [255], [271].

- modèle prédictif : l'étude menée par F. Muscatelli a permis de mettre en évidence l'effet curatif d'un traitement précoce à l'ocytocine [255]. Un traitement semblable a été réalisé chez des patients atteints du syndrome de Prader Willi [264], une pathologie due à l'absence d'un ensemble de gènes à empreinte paternelle dont le gène *Magel2*. Chez ces patients, le traitement améliore notamment les troubles sociaux à long terme puisque les enfants ont aujourd'hui plus de 5 ans.

Choix de la structure cérébrale étudiée : L'ocytocine et la vasopressine sont libérées dans différentes structures cérébrales avec des fonctions parfois antagonistes. Ainsi, l'impact de l'ocytocine et de la vasopressine dépend du réseau ciblé par ces neuromodulateurs. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur l'un d'eux et de ne moduler la libération d'ocytocine et de vasopressine que dans l'une des cibles de ces systèmes.

Nous avons concentré notre étude sur le septum latéral. En effet, cette structure exprime des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine chez la souris et elle est mise en jeu lors de l'interaction sociale avec un congénère. D'autre part, chez la souris *Magel2*KO, une dysfonction du système ocytocinergique septal a été mise en évidence : ces souris expriment moins de récepteurs de l'ocytocine au sein du septum latéral que leurs congénères WT. Cette diminution est associée aux troubles sociaux puisque le traitement précoce qui restaure les comportements sociaux restaure également le nombre de sites de liaison de l'ocytocine au sein du septum [255]. Notons que ces animaux présentent, peu après la naissance une altération des systèmes ocytocinergiques et vasopressinergiques puisque les concentrations hypothalamiques de ces hormones sont diminuées par rapport à des animaux sauvages [254].

L'étude de Lukas et al, publiée en 2011, a également permis de montrer qu'un stress péri-natal (la séparation de la mère) a des conséquences à long terme sur le fonctionnement du système vasopressinergique septal et que ceci est responsable des altérations sociales observées chez les animaux [143].

Choix du test comportemental : Le comportement social évalué lors de cette thèse est l'interaction sociale avec un congénère et l'évolution de cette interaction lors de présentations répétées. Ce test présente plusieurs avantages :

- il donne des informations nombreuses sur les compétences sociales des animaux testés : quantité d'interaction avec un congénère inconnu, capacité à reconnaître le congénère après un certain nombre de présentations et discrimination sociale entre deux individus présentés successivement

- il permet de remplacer le congénère par un objet lors d'une expérience contrôlée. Ceci permet de vérifier que le facteur social est primordial dans les résultats obtenus suite à la manipulation de l'activité du système ocytocine/vasopressine
- des expériences précédentes ont montré que la modulation du septum par le système ocytocine/vasopressine module l'interaction sociale [144][186]

Plusieurs possibilités se sont alors offertes à nous quant au choix du partenaire social. Nous avons choisi d'utiliser des souris mâles juvéniles (3 à 6 semaines) afin que les interactions ne soient biaisées ni par un comportement sexuel ni par un comportement agressif.

Ainsi, au cours de cette thèse, nous nous sommes posés plusieurs questions :

- a. L'ocytocine et la vasopressine libérées au sein du septum latéral ont-elles des fonctions spécifiques pour la régulation des interactions sociales ? Ces fonctions sont-elles mises en jeu successivement ?
- b. Les animaux présentant des troubles sociaux présentent-ils une altération de la modulation par l'ocytocine et/ou la vasopressine du septum latéral qui pourrait expliquer ces troubles ?
- c. La restauration de cette modulation améliore-t-elle les troubles sociaux dans un modèle animal présentant de tels troubles ? (étude en cours)
- d. Peut-on trouver un marqueur, transposable à l'Homme, qui caractériserait une altération de la modulation par l'ocytocine et la vasopressine du septum latéral ?
- e. L'impact bénéfique d'un traitement précoce à l'ocytocine passe-t-il par une amélioration du développement des neurones ocytocinergiques ?
- f. Un traitement précoce permet-t-il de restaurer la modulation par l'ocytocine et la vasopressine du réseau septal chez des animaux malades ? (étude en cours)

Afin de répondre à ces questions, nous avons développé deux études complémentaires.

La première, qui fait l'objet de la partie A des résultats, a permis de caractériser la modulation par l'ocytocine et la vasopressine de l'activité des neurones du septum latéral et ses conséquences comportementales chez la souris WT et la souris *Magel2*KO.

La seconde, partie B des résultats, a consisté en une caractérisation de l'impact du traitement précoce à l'ocytocine chez la souris *Magel2*KO et la souris WT sur l'activité et la morphologie des neurones à ocytocine du PVN, une structure projetant des fibres ocytocinergiques jusqu'au septum latéral.

MATERIEL ET METHODES

1. Modèles génétiques expérimentaux

Des souris mâles de fond génétique C57B6/J ont été achetées chez Janvier ou produites au laboratoire ou au Plateau Central d'Élevage et d'Archivage (PCEA) de Montpellier. Les animaux, maintenus sur le fond génétique C57B6/J, ont eu accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum* et la lumière a suivi un cycle 12h de lumière/12h d'obscurité. Les animaux ont été élevés dans une animalerie de statut sanitaire SOPF. Un enrichissement constitué de morceaux de coton (sage roll, *Safe diet*) a été utilisé dans les cages. Les animaux ont été stabulés en groupe jusqu'aux chirurgies. Après les chirurgies et afin d'éviter que les animaux ne se blessent, nous les avons isolés et ceci jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Après tout transport des animaux (souris achetées chez Janvier ou produites au PCEA), une période d'habituation de plus de 3 jours a été respectée avant le début des expériences.

Les expériences qui font l'objet de cette thèse ont été préalablement approuvées par un comité d'éthique et ont fait l'objet de saisines approuvées (saisine 5133 et 8940). De plus, elles ont été réalisées en accord avec les consignes européennes (Council Directive 86/6009/EEC).

Souris Magel2KOxOT-GFP :

Ces animaux ont été issues d'un croisement entre la lignée Magel2KO (Magel2tm1.1Mus [254], don de F. Muscatelli) et la lignée OT-GFP (Tg(Oxt-EGFP)LC317GSat, Gensat).

Le gène Magel2 étant un gène à empreinte, une femelle hétérozygote pour l'allèle muté Magel2 a été croisée avec un mâle C57B6/J. Les mâles issus de ce croisement porteurs de la mutation à l'état hétérozygote (+/-m) expriment le gène Magel2 et ne présentent donc pas de déficit. Ceux-ci ont été croisés avec des femelles C57B6/J achetées chez Janvier afin de générer des portées comprenant des souris +/-p et leurs contrôles (+/+). L'allèle maternel n'était pas exprimé, les animaux +/-p ne présentent aucune expression du gène Magel2 et seront appelés « Magel2KO » dans le cadre de cette thèse. Les animaux Magel2WT, eux, possèdent deux allèles sauvages du gène Magel2.

Le transgène permettant l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de l'ocytocine a été maintenu à l'état hétérozygote dans les animaux utilisés en expérimentation.

Souris cre :

Deux lignées de souris cre, issues du Jackson laboratory, ont été utilisées dans le cadre de cette étude

:

- la lignée ocytocine-cre (Oxttm1.1(cre)Dolsn/J, [356])
- la lignée vasopressine-cre (Avptm1.1(cre)Hze/J, [357])

Ces lignées sont de type Knock-In (KI) et expriment la cre-recombinase respectivement sous le contrôle du promoteur de l'ocytocine et de la vasopressine. Pour les croisements, un mâle cre/cre a été croisé avec une femelle WT afin que tous les mâles issus du croisement puissent être utilisés pour les expériences. Dans les deux cas, la cre-recombinase a été insérée dans le génome avec un IRES permettant de conserver une expression endogène de l'ocytocine ou de la vasopressine.

2. Génotypage

Le génotype a été réalisé à partir de biopsies (morceaux de queue, d'oreille ou d'orteil). Après digestion (NaOH 25mM, EDTA 0.2mM, 1h à 90°C), et équilibration du pH (Tris HCl 40mM) les réactions de polymérisation en chaîne ont été réalisées avec les amorces de séquence suivante :

- Pour l'allèle WT du gène Magel2 : 5'-GTCACACACCCATTCGACCT-3' et 5'-TACCCTCGGGAGCAGTAGAC-3' (amplicon de 224 paires de bases)
- Pour l'allèle KO du gène Magel2 : 5'-TGCTTCCTGCCCTTCAGTTAC-3' et 5'-GCTTATCGATACCGTCGACCTC-3' (amplicon de 107 paires de bases)
- Pour l'allèle WT du gène de la vasopressine : 5'-GAGTCCGTGGATTCTGCCAA-3' et 5'-CTATGCACGACTTCGGGTGT-3' (amplicon de 205 paires de bases)
- Pour l'allèle WT du gène de l'ocytocine : 5'-CTCAGAACACTGACCCATTTCTCTT-3' et 5'-CCGACAATTAGACACCAGTCAAG-3' (amplicon de 230 paires de bases)
- Pour la cre-recombinase : 5'-TCTGTCCGTTTGCCGGTCGT-3' et 5'-AGACCGCGCCTGAAGATA-3' (amplicon de 114 paires de bases)
- Pour la GFP : 5'-GCAGAAGAACGGCATCAAG-3' et 5'-GCTCAGGTAGTGGTTGTCG-3' (amplicon de 139 paires de bases)

3. Statistiques

Les données de cette thèse sont présentées sous la forme de moyennes +/- SEM (écart standard à la moyenne). Les études statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 7.03 (*GraphPad*). Le seuil de significativité a été placé à $p < 0.05$.

Tests statistiques utilisés

Dans tous les tests, nous avons considéré des données non paramétriques du fait d'un nombre d'échantillons modéré.

Les données considérant deux séries de valeurs ont été comparées à l'aide d'un t-test. Si les deux séries de valeurs étaient des mesures réalisées sur le même animal/la même cellule, nous avons utilisé un paired t-test (Wilcoxon). Sinon, nous avons utilisé un t-test Mann Whitney.

Les données considérant une variable mais plus de 2 conditions ont été analysées par 1-way ANOVA (Kruskal Wallis). Un test post-hoc de Dunns a été utilisé afin de comparer les groupes.

Les données considérant 2 variables et 2 conditions ou plus ont été analysées par 2-way ANOVA. La comparaison de chaque paramètre en fonction du groupe a été évaluée via un test post-hoc de Sidak ou de Tukey.

Lorsque nous avons voulu évaluer l'existence d'un effet, nous avons utilisé un test « Wilcoxon signed rank » afin de comparer les valeurs obtenues à une valeur théorique (100% ou 0).

Méthode de randomisation

Lors des expériences de pharmacologie in vivo, les animaux ont reçu les différents composés dans un ordre défini aléatoirement. Pour le traitement périnatal, les animaux d'une même portée ont reçu la même molécule et la molécule administrée à chaque portée a été définie aléatoirement. Pour les expériences d'électrophysiologie en tranche, l'ordre d'application des molécules actives (TGOT ou vasopressine) a été attribué aléatoirement.

Critères d'exclusion des données

L'inclusion des animaux expérimentaux dans l'analyse expérimentale est conditionnée à l'efficacité de la manipulation expérimentale (virus, canule, fibre optique, génotype) qui dans un protocole d'expérimentation longitudinale est validé a posteriori sur des tissus post-mortem. Cette analyse confirmant la validité des groupes expérimentaux a été conduite en aveugle.

Pour le comportement, les animaux ayant interagit moins de 15 secondes au cours de la première interaction sociale ont été éliminés jugeant d'un désintérêt biaisé pour le dispositif du test. De même, ceux ayant établi moins de 10 contacts avec l'objet au cours de la première rencontre avec celui-ci ont été éliminés. Ces règles n'ont pas été considérées lors des comparaisons entre les groupes Magel2WT et Magel2KO pour ne pas biaiser l'effet du génotype a priori.

Pour les expériences d'injections intra-cérébrales, les animaux dont les zones d'implantation des canules ne correspondaient pas au septum latéral ont été éliminés. Les animaux ne présentant pas d'infection dans le PVN suite à l'injection du virus ont été éliminés des expériences d'optogénétique à posteriori, suite à l'analyse post-mortem des cerveaux. Cette analyse a été effectuée par un expérimentateur indépendant.

Pour les expériences nécessitant l'analyse de l'électroencéphalogramme, les enregistrements comprenant, en condition basale, une forte prépondérance de fréquences très faibles (>50% de la puissance normalisée <1Hz) ont été éliminés car celle-ci représentent des artefacts liés au mouvement de l'animal. De même, les enregistrements au cours desquels le bruit dû au courant électrique (50Hz) s'étalait au-delà de la bande 48-52Hz précédemment définies ont été éliminés.

Pour les expériences d'électrophysiologie réalisées au cours du développement, les données éloignées de la moyenne de plus de deux fois la déviation standard (SD) ont été éliminées.

4. Electrophysiologie

Réalisation des coupes : Après décapitation et extraction du cerveau, des tranches aigües de cerveaux de souris de 300µm d'épaisseur et contenant le septum latéral ou le noyau para-ventriculaire ont été réalisées à l'aide d'un vibratome. Les coupes ont été effectuées dans un "milieu sucrose" maintenu à 4°C et alimenté en carbogène (95% CO₂, 5% O₂).

Les coupes réalisées ont ensuite été déposées sur un filet dans un milieu de type « extra-cellulaire » bullé avec du carbogène. Celles-ci ont été placées pendant une heure au bain marie à 37°C puis laissées à température ambiante avant d'être placées dans la chambre d'enregistrement.

	Fonction	Milieu sucrose	Milieu extra-cellulaire
NaCl		10mM	110mM
KCl		1,2mM	1,2mM
NaHCO₃	Régulation du pH via l'équilibre HCO ₃ ⁻ /CO ₂	26mM	
Glucose	apporter l'énergie nécessaire au neurone	15mM	10mM
KH₂PO₄	apporte du phosphate permettant	1,2mM	

	les phosphorylations nécessaires à la survie des cellules		
CaCl₂	calcium nécessaire à l'activité des cellules	1mM	2mM
MgCl₂	magnésium : co-facteur important de différentes enzymes et inhibiteur des canaux NMDA	2mM	
Sucrose	Permet de compenser la perte d'osmolarité induite par la diminution de la concentration en sodium et calcium (cette dernière permet de diminuer la consommation d'énergie par la tranche et donc l'anoxie)	195mM	0
acide ascorbique	anti-oxydants	0	0,2mM
thiourée		0	0,2mM

Pour les enregistrements réalisés dans le septum latéral, du potassium a été ajouté au milieu extracellulaire de manière à augmenter l'activité électrique spontanée. La concentration de KCl utilisée a donc été de 3.6mM et non de 1.2mM.

Condition de l'enregistrement : Après qu'elles aient été placées dans la chambre d'enregistrement et maintenue à l'aide d'un "fer à cheval" en platine, un milieu extra-cellulaire a été continuellement perfusé à une vitesse de 1mL par minute sur les tranches. Le milieu utilisé a été chauffé et bullé avec du carbogène jusqu'à son arrivé dans la cuve. Une électrode en argent chlorurée a été placée dans le bain et a servi de référence tandis qu'une électrode similaire a été connectée au pré-amplificateur et placée dans une électrode en verre contenant du milieu intra-cellulaire utilisée pour réaliser les enregistrements. La différence de potentiel entre ces deux électrodes (électrode de référence et d'enregistrement) a été enregistrée et traitée à l'aide d'un amplificateur (axopatch 200B, *Axon instruments*).

Les électrodes de verre borosilicaté (GC150F-10, *Harvard apparatus*) ont été étirés avec une étireuse (P97, *Sutter instruments*). La résistance de celles-ci (5MOhm en moyenne) a été évaluée lors de l'entrée dans le bain.

Spécificités des expériences réalisées dans le septum latéral

Les animaux utilisés pour ces expériences sont des souris mâles de fond génétique C57B6/J jeunes adultes ou adultes (>3 semaines).

Des cellules choisies de façon aléatoire au sein du septum latéral dorsal ou intermédiaire ont été enregistrées. Nous avons appliqué, en bain, un agoniste ocytocinergique (TGOT, 10^{-7} M) ou de la vasopressine (10^{-6} M) pendant 2 minutes afin de déterminer l'impact de ces drogues sur l'activité électrique des neurones du septum latéral. La même cellule a ensuite été enregistrée et soumise à l'application de la seconde drogue.

L'ordre d'administration (TGOT-VP ou VP-TGOT) a été déterminé aléatoirement et nous n'avons pas remarqué d'impact de l'ordre de ces administrations sur la réponse électrophysiologique.

Spécificités des expériences réalisées dans le noyau para-ventriculaire (PVN)

Les animaux utilisés pour ces expériences sont des souris mâles de fond génétique C57B6/J portant le transgène de la GFP sous le contrôle du promoteur de l'ocytocine et Magel2+/+ ou Magel2+/-p. Ces animaux ont été utilisés à P7-P8 (post-natal week 1 : PW1) ou à P14-P15 (post-natal week 2 : PW2).

Les cellules enregistrées sont choisies aléatoirement parmi les neurones du noyau para-ventriculaire exprimant la GFP. L'activité électrique spontanée a été enregistrée en configuration « cellule entière » « courant imposé » et l'activité synaptique spontanée en configuration « cellule entière » et en « voltage imposé ».

Evaluation de la fréquence d'émission des potentiels d'action :

En configuration « cellule entière » ou « loose-patch », les potentiels d'action ont été enregistrés pendant au moins 5 minutes avant toute application de drogue respectivement en courant ou voltage imposé. Ensuite, le milieu de perfusion a été remplacé par les drogues diluées dans le milieu extra-cellulaire alimenté en carbogène. L'application de TGOT (Thr⁴Gly⁸-OT, un agoniste spécifique des récepteurs de l'ocytocine) ou de vasopressine a duré 2 minutes puis le milieu extra-cellulaire ne contenant pas de drogue a été réutilisé pour la perfusion afin de laver la drogue précédemment appliquée. Pour l'application de GABAzine ou de tétradotoxine, les applications ont été plus longues (>10minutes).

Drogues utilisées	Fonction	Concentration (mol/L)
TGOT	activation spécifique des récepteurs de l'ocytocine	10^{-7}
vasopressine	activation des récepteurs de la	10^{-6}

	vasopressine	
GABAzine	inhibiteur des récepteurs GABA _A	6x10 ⁻⁶
Tétradotoxine (TTX)	inhibiteur des canaux sodiques	3x10 ⁻⁷

Afin d'étudier le pattern d'émission des potentiels d'action, nous avons calculé l'intervalle de temps entre deux potentiels d'action successifs : intervalles inter-spike (ISI). Ainsi, nous avons calculé l'intervalle de temps entre deux potentiels d'actions successifs. Sachant que les intervalles inter-spike longs, bien que nécessairement moins nombreux que les intervalles inter-spike courts, jouent un rôle primordial dans l'établissement d'un pattern d'activité, nous avons classé les intervalles inter-spike enregistrés au cours d'une période donnée (3min) en fonction de leur durée. La durée de chacun de ces intervalles a permis de calculer le temps passé par la cellule dans chacun de ces intervalles. Les résultats obtenus ont été normalisés, le 100% correspondant à la durée totale de la période étudiée et les valeurs traitées dans les histogrammes cumulatifs correspondent au % de temps passé dans une classe d'intervalle donnée.

Evaluation de la fréquence d'émission des évènements synaptiques : En configuration cellule entière, les évènements synaptiques ont été enregistrés en voltage imposé afin de ne pas contaminer le signal avec d'éventuels potentiels d'action et de contrôler le potentiel de repos de la cellule.

Deux milieux intra-cellulaires différents ont été utilisés au cours de ces expériences : un milieu qui, dans nos conditions d'enregistrement amène le potentiel d'équilibre du chlore à -50mV et un autre dans lequel il est de -80mV. Ce dernier nous permet de discriminer les évènements synaptiques glutamatergiques et GABAergiques lorsque les enregistrements sont réalisés à -50mV. En effet, dans ces conditions, l'activation des récepteurs GABA_A par le GABA induit des courants hyperpolarisants tandis que l'activation des récepteurs AMPA/NMDA par le glutamate induit des courants dépolarisants.

Composition	Fonction	Milieu E_{Cl}=-50mV	Milieu E_{Cl}=-80mV
KCl		9mM	
KMeSO₃	permet d'apporter des ions potassium en limitant l'apport d'ions chlorures	130mM	139mM
NaCl		8mM	4mM

MgCl₂	Le magnesium est un co-facteur essentiel pour le fonctionnement de certaines enzymes et il inhibe l'activité des canaux NMDA	1mM	1mM
EGTA/Na	Chélateur du calcium	0,1mM	
HEPES/NaOH	Permet de contrôler le pH car celui-ci ne peut être régulé par bullage au sein de la pipette	10mM	
pyruvate	permet le fonctionnement du cycle de Krebs	2mM	
malate	permet le fonctionnement du cycle de Krebs	2mM	
NaH₂PO₄	permet d'apporter des ions sodium en limitant l'apport d'ions chlorures	0,5mM	4,5mM
cAMP	second messenger dans plusieurs réactions enzymatiques, permet de réguler la balance cAMP/ATP	0,5mM	
ATP-Mg	apport d'énergie : ATP nécessaire à l'activité cellulaire	2mM	
GTP-Tris	apport d'énergie : GTP nécessaire à l'activité cellulaire	0,5mM	
Phospho-creatine	source d'énergie	14mM	
leupeptine	inhibiteur des protéases	0,1mM	

5. Etude de la morphologie des neurones enregistrés

Afin de déterminer la morphologie des neurones enregistrés, de l'alexa-594-cadavérine a été ajoutée au milieu intracellulaire (*Life technology*, 50 μ M). Cette molécule fluorescente a pu diffuser dans la totalité

du neurone enregistré lorsque les enregistrements ont eu lieu en « cellule-entière ». La cadavérine permet la fixation du fluorophore dans la cellule par le paraformaldéhyde (PFA).

Ainsi, après fixation par bain de PFA sur la nuit et montage des coupes sur des lames (Superfrost plus, *Thermo Scientific*), nous avons pu imager les neurones. Des images successives permettant de reconstruire l'arborisation dendritique d'un neurone ont été acquises dans le plan de coupe (z-stack).

Pour les expériences sur le PVN, le nombre de dendrites primaires a été compté avec le logiciel Image J (*NIH*).

Pour l'analyse de l'arborisation dendritique des neurones du septum latéral, la distance entre chaque image acquise est de 1 μm et une analyse de Scholl a été réalisée à l'aide du logiciel Image J (*NIH*) également.

6. Utilisation de rétro-billes

Des microsphères en latex fluorescentes (*Retrobeads, Lumafuor*) ont été injectées par stéréotaxie dans le cerveau des animaux. Ces billes sont intégrées par les terminaisons synaptiques situées à proximité du site d'injection et remontent l'axone jusqu'au corps cellulaire qu'elles marquent et permettront d'identifier. On parle de rétro-billes. Celles-ci ont été injectées dans le septum médian de souris âgées de 4 semaines (coordonnées stéréotaxiques : angle de 10°, antero-postérieur : +0.05 cm, medio-latéral : +0.1 cm, dorso ventral, -0.4 cm), afin de déterminer les neurones projetant vers le septum médian.

Après injection de 300 nL de rétro-billes diluées au 1/2 dans du PBS à 100 nL/minutes, nous avons attendu 10 minutes avant de retirer l'aiguille afin d'éviter le reflux. Les souris ont été recousues et replacées ensemble pour une semaine au moins. Ensuite, les souris ont été décapitées et les cerveaux extraits rapidement avant de réaliser des coupes de 300 μm destinées à la réalisation d'expériences d'électrophysiologie (voir 4.). Les neurones ayant intégré des billes ont alors été enregistrées et leurs réponses électriques à l'application de TGOT et de vasopressine ont été évaluées afin de déterminer la nature des neurones de sortie du septum latéral.

7. Immunohistochimie

Dans cette étude, nous avons réalisé des immuno-histochimie afin de marquer les neurones ocytocinergiques. Nous avons pour cela utilisé un anticorps anti-neurophysin I réalisé chez la souris qui nous a été donné par le Dr. Gainer [358] ou un anticorps anti ocytocine polyclonal réalisé chez le lapin par le Dr Alonso [359]. Nous avons utilisé ces anticorps dilués au 1/1000.

Nous avons aussi utilisé un anticorps anti-GFP réalisé chez le poulet (*Abcam*, 1/2000) afin d'amplifier le signal GFP ou le signal eYFP.

Pour cela, des cerveaux issus de souris préalablement perfusées au PBS puis au PFA ont été coupés en tranches sériées de 50µm d'épaisseur réparties dans 4 puits. Un puit a été utilisé pour chaque expérience. Après un blocage de 2 heures sous agitation et à température ambiante avec une solution de PBS, BSA 2 %, Triton 0.1 % (PBT) contenant du Fab anti IgG de souris non marqué (*abliance*), les tranches ont été incubées la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBT. Après 3 lavages au PBS, les tranches ont été incubées 2 h à température ambiante et sous agitation avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore (anticorps dirigé contre la souris et réalisé chez l'âne et couplé à une alexa-555, 1/2000, *Invitrogen* ou anticorps dirigé contre le lapin et réalisé chez l'âne et couplé à une alexa-594, 1/3000, *thermofisher*, ou anticorps dirigé contre le poulet et réalisé chez la chèvre, couplé à une alexa-488, 1/2000, *invitrogen*). Après 3 lavages au PBS, nous avons monté ces coupes sur lames (superfrost plus, *Thermo Scientific*) à l'aide d'un milieu de montage (Fluoromount G, *Southern Biotech*). L'imagerie a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Axio-imager Z1, *Zeiss*).

8. Etude comportementale

Une semaine avant la première expérience comportementale, les souris ont été habituées à l'expérimentateur et à la manipulation (contention, mise en place de l'injecteur ou de la fibre optique).

Deux tests comportementaux ont été effectués sur des souris mâles adultes âgées de plus de 10 semaines. Pour chacun des tests, les arènes ont été nettoyées avec des lingettes désinfectantes entre chaque animal afin d'éliminer les odeurs.

Reconnaissance d'objet et reconnaissance sociale

Une arène circulaire de 24 cm de diamètre en plexiglass transparent a été utilisée (Fig 9A1 et A2). Un fond de sciure, un biberon d'eau ainsi que quelques croquettes ont été disposés dans l'arène avant le début de l'expérience.

Après une période d'habituation à l'arène (et à la boîte qui contiendra le juvénile), les juvéniles ont été placés dans la boîte pour une durée de 5 minutes. Ces derniers ont ensuite été retirés des boîtes pour une durée de 20 minutes avant d'être à nouveau placés dans celles-ci pour 5 minutes. Ceci a été reproduit 2 fois et après une nouvelle période sans juvénile de 20 minutes, un nouveau juvénile a été introduit dans la boîte pour 5 minutes (Fig 9B).

Pour la reconnaissance d'objets, le même protocole a été utilisé mais le juvénile a été remplacé par un objet (falcon ou légo par exemple) déposé directement dans l'arène.

3 phases peuvent être discernées dans ce test (Fig 9B) :

- La première rencontre qui indique l'intérêt pour un objet ou une souris (lors de l'étude de l'activité EEG, l'impact de celle-ci sera déterminé en soustrayant le profil EEG obtenu en (b) à celui obtenu en (a)).
- L'habituation qui se traduit par un déclin de l'intérêt au fil des présentations (lors de l'étude de l'activité EEG, l'impact de celle-ci sera déterminé en soustrayant le profil EEG obtenu en (c) à celui obtenu en (a)).
- Le regain d'intérêt lorsque l'animal discrimine le nouvel objet/juvénile (lors de l'étude de l'activité EEG, l'impact de celle-ci sera déterminé en soustrayant le profil EEG obtenu en (d) à celui obtenu en (a))

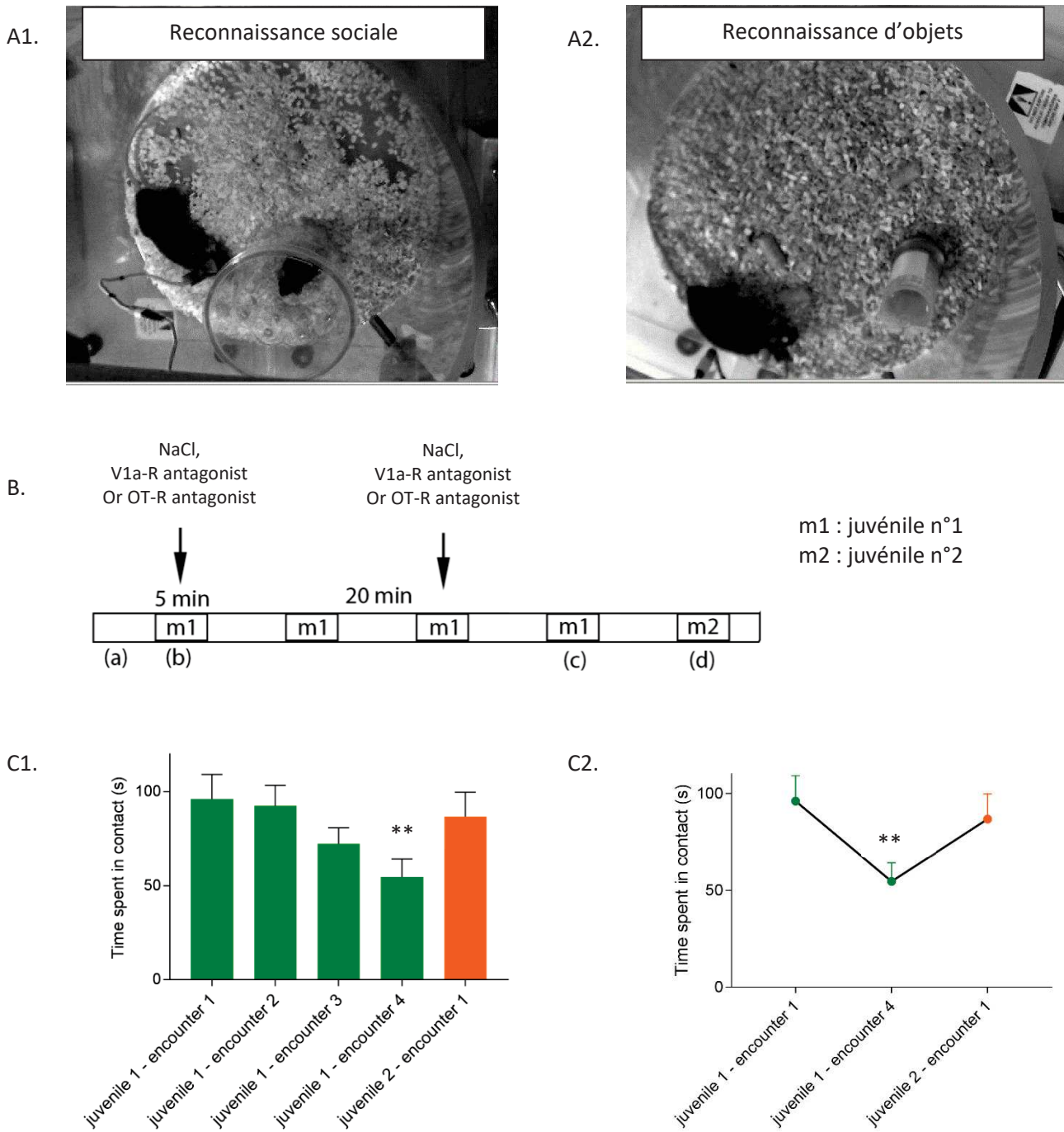
Les résultats obtenus chez des animaux C57B6/J non transgéniques nous permettent de valider ce test (Fig 9C1 et C2). En effet, on retrouve une importante durée d'interaction au cours de la première présentation du juvénile puis celle-ci décroît progressivement. Lors de la présentation du nouveau juvénile en revanche, le temps d'interaction revient au niveau de celui de la première interaction avec le premier juvénile ce qui traduit la préférence pour la nouveauté sociale et la capacité à discriminer deux individus.

Les graphiques qui seront présentés au cours de cette thèse comprendront :

- le temps d'interaction au cours de la première interaction
- le temps d'interaction avec le juvénile après familiarisation (au cours de la 4ème rencontre)
- le temps d'interaction avec le nouveau juvénile

D'autre part, lorsque le temps d'interaction au cours de la première interaction ne sera pas différent entre les groupes étudiés, les données seront présentées normalisées (100% correspondant à la durée de l'interaction lors de la première rencontre avec le premier juvénile).

Figure 9 : Protocole de reconnaissance sociale et de reconnaissance d'objet



A1. Photographie du dispositif expérimental utilisé lors du protocole de reconnaissance sociale

A2. Photographie du dispositif expérimental utilisé lors du protocole de reconnaissance d'objet

B. Protocole expérimental mis en œuvre.

(a) correspond à la période contrôle, (b) à l'interaction avec le premier juvénile, (c) à la 4^{ème} interaction avec le juvénile connu (habituation ayant eu lieu) et (d) à l'interaction avec le nouveau juvénile.

Un protocole identique a été mis en place pour la reconnaissance d'objet mais les juvéniles sont alors remplacés par des objets.

C1. Temps d'interaction avec le juvénile au cours des différentes présentations. (Moyennes +/- SEM, N= 9 animaux)

1-way ANOVA mesures répétées : $p=0.0023$

Comparaison des groupes avec la première colonne par test post-hoc de Dunns.

Juvenile 1 – 1st encounter vs juvenile 1 – 2nd encounter $p>0.9999$

Juvenile 1 – 1st encounter vs juvenile 1 – 3rd encounter $p=0.9322$

Juvenile 1 – 1st encounter vs juvenile 1 – 4th encounter $p=0.0024$

Juvenile 1 – 1st encounter vs juvenile 2 – 1st encounter $p>0.9999$

C2. Représentation des données adoptée au cours de cette thèse (moyennes +/- SEM, N= 9 animaux)

Seules les rencontres juvenile 1 – 1st encounter, juvenile 1 – 4th encounter et juvenile 2 – 1st encounter seront en effet représentées, représentant respectivement l'interaction avec un juvénile inconnu, l'interaction avec un juvénile familier et l'interaction avec un nouveau juvénile inconnu

1-way ANOVA mesure répétées : $p=0.0060$

Comparaison des groupes par test post-hoc de Dunns.

Juvenile 1 – 1st encounter vs juvenile 1 – 4th encounter $p=0.0065$

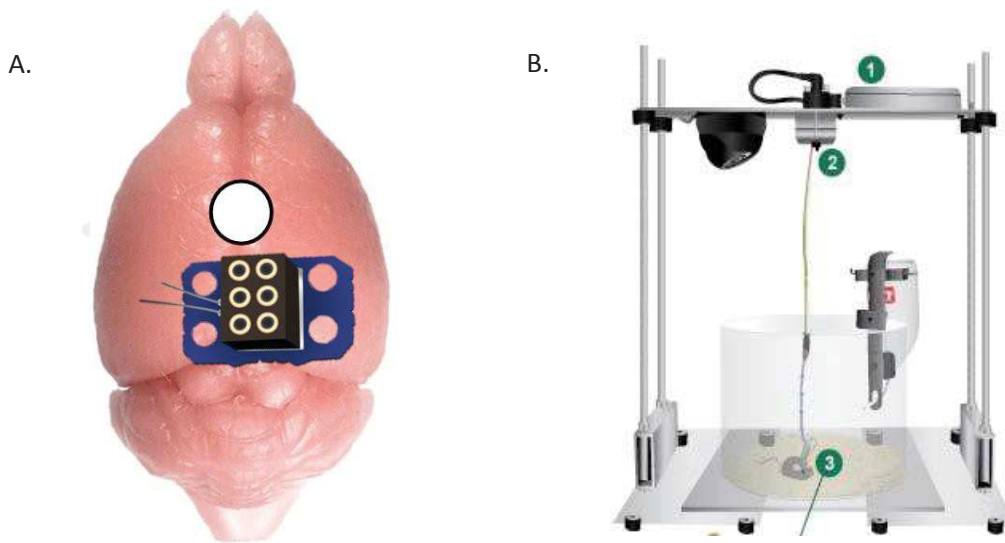
Juvenile 1 – 1st encounter vs juvenile 2 – 1st encounter $p=0.7158$

9. Enregistrements électroencéphalographiques

Système utilisé

Des enregistrements électroencéphalographiques corticaux ont été réalisés. Pour cela, un système d'enregistrement (*Pinnacle technology*) a été implanté sur le crâne des souris (Fig 10A) à l'aide de vis permettant, d'une part, de faire un contact entre le cortex cérébral et le système d'enregistrement et, d'autre part, d'ancrer le système sur le crâne afin de le fixer avec du ciment dentaire.

Figure 10 : Système d'enregistrement EEG utilisé



A. Représentation de l'emplacement de l'implant permettant l'enregistrement EEG
Le rond blanc correspond à la zone d'implantation de la fibre optique. Les deux électrodes sur la droite correspondent aux électrodes de mesure de l'EMG associé au système. Elles ont été coupées avant l'implantation.

B. Représentation du set-up expérimental – d'après www.pinnaclet.com

1. Système d'acquisition du signal
2. Cable permettant les mouvements libres de l'animal dont l'EEG est enregistré
3. Arène dans laquelle ont lieu les expériences

Pour l'enregistrement, les souris ont été branchées à un pré-amplificateur relié à l'ordinateur et contrôlé via le logiciel Sirenia acquisition (*Pinnacle Technology*) (Fig 10B). Les enregistrements ont été réalisés à une fréquence de 600Hz et les fréquences supérieures à 100Hz ont été filtrées. Des caméras à détection infrarouge également contrôlées par le logiciel Sirenia acquisition ont été utilisées et ont permis de filmer les animaux au cours de l'enregistrement afin d'étudier le comportement et de corrélérer les comportements de la souris étudiée avec son électroencéphalogramme. La vidéo permet d'éliminer les artefacts liés au sommeil, au toilettage, au grattage, à la prise de nourriture ou d'eau.

Les données ainsi acquises ont été traitées à l'aide du logiciel Neuroscore (*Data Science International*) qui nous a permis :

- de définir des bandes de fréquence de 0.5Hz et la puissance de chacune de ces bandes de fréquence
- de définir la puissance de sous éléments du rythme theta : 4-8Hz (theta low), 8-12Hz (theta high) Ces calculs ont été effectués indépendamment pour chaque période de 10 secondes dans chaque enregistrement.

Analyse des données

L'utilisation de la vidéo nous a permis de définir et d'éliminer les périodes correspondant à des artefacts. D'autre part, la vidéo et l'EEG nous ont permis de définir les moments où l'animal dort et d'éliminer ces périodes afin de nous concentrer uniquement sur l'activité EEG observée lors des phases d'éveil.

Une fois ce tri effectué, nous avons défini des périodes d'intérêt et moyenné les valeurs de puissance obtenues au cours de ces périodes pour chaque bande de fréquence. Ainsi, nous avons moyenné au cours de ces périodes toutes les valeurs correspondant à la puissance de la bande de fréquence considérée (0-0.5Hz, ...).

Afin de s'affranchir de la variabilité inter-individuelle qui peut notamment être due à l'emplacement des électrodes, nous avons choisi d'utiliser chaque animal comme son propre contrôle. Pour cela, nous avons défini une période contrôle correspondant au début de l'expérience au cours de laquelle nous avons mesuré les paramètres d'intérêt. Nous avons soustrait, aux valeurs obtenues lors des périodes d'intérêt, les valeurs obtenues pour ces périodes contrôle.

Les périodes d'intérêt ont été définies de la façon suivante :

- pour l'interaction sociale ou la reconnaissance d'objet, la période contrôle correspond aux 20 minutes précédant l'introduction de la souris ou de l'objet tandis que la période d'interaction correspond aux 5 minutes au cours desquelles la souris ou l'objet sont présents dans l'arène
- pour les injections de drogues, la période contrôle correspond à une période d'au moins 20 minutes avant l'injection de la drogue tandis que l'effet de la drogue a été analysé au cours de l'heure suivant l'injection

Afin de limiter l'hétérogénéité des réponses inter-individus, nous avons également décidé de normaliser les puissances au cours de chaque période. Pour cela, nous avons considéré comme 100% la somme des valeurs de puissance obtenues sur la plage 0-40Hz.

10. Injections intracérébrales d'agonistes ou d'antagonistes

Système utilisé

Des canules ont été implantées dans le cerveau des souris afin d'administrer dans le septum latéral des agents pharmacologiques modulant l'activité des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine chez des animaux vigiles. Pour cela, des canules bilatérales de 3 mm de profondeur et écartées l'une de l'autre de 0,8 mm ont été utilisées. Ces dernières ont été bouchées à l'aide d'un mandrin pendant la période de repos suivant la chirurgie ainsi qu'entre chaque expérience.

Le système d'injection est composé d'un injecteur bilatéral adapté à la canule qui est relié à deux tuyaux remplis avec du PBS séparé du milieu à injecter par une bulle d'air (qui ne sera pas injectée). Chacun des tuyaux est relié à une seringue Hamilton de 1 μ L dont le débit est régulé par un micro-injecteur (micro 4, *World Precision Instrument*).

Pour chacune des expériences, le système d'injection a été mis en place dans la canule 5 minutes avant le début de l'expérience. Ensuite, 900 nL ont été injectés par hémisphère à raison de 100 nL par minute. Le système d'injection a été laissé en place encore 5 minutes avant d'être retiré.

Lorsque les injections sont effectuées en parallèle d'un protocole de reconnaissance sociale ou de reconnaissance d'objet, notons que l'injection démarre 5 minutes avant la présentation de la souris ou de l'objet.

Les souris ont subi plusieurs injections séparées les unes des autres d'au moins 5 jours.

Drogue	concentration	fonction
TGOT	$3 \times 10^{-7} \text{M}$	activation des récepteurs de l'ocytocine
VP	$3 \times 10^{-6} \text{M}$	activation des récepteurs de la vasopressine
Manning Compound	$3 \times 10^{-6} \text{M}$	inhibition des récepteurs du système ocytocine/vasopressine
Atosiban	10^{-8}M	inhibition des récepteurs de l'ocytocine
Manning Compound	10^{-8}M	inhibition des récepteurs de la vasopressine
NaCl	0,9%	contrôle/diluant

Chirurgie

Après avoir été anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine (100 mg/ml) et de xylazine (20 mg/ml) (200 µL pour une souris de 30g), les poils situés sur la tête coupés, les souris ont été placées dans le cadre stéréotaxique. La peau située sur la tête de l'animal a été désinfectée à l'aide d'une solution de bétadine, une entaille a été faite et le crâne a été nettoyé de façon à observer les sutures du crâne. Les coordonnées stéréotaxiques du Bregma et du Lambda ont été déterminées sur le crâne et la tête a été orientée de façon à ce que ces deux points soient situés à la même profondeur (axe z). Ensuite, nous avons noté la position où devaient être implantées les canules (bregma : +0.05 cm antéro-postérieur, +0.04 cm médio-latéral), percé le crâne à l'aide d'une fraiseuse (*ideal micro drill, World precision instrument*), déchiré les méninges à l'aide d'une aiguille et descendu les canules de 3 mm afin d'atteindre le septum latéral. L'EEG a été placé de façon à ne pas gêner la canule et de façon à ce que la canule ne dérange pas le branchement d'un pré-amplificateur au cours de l'expérience. Cet emplacement a été choisi pour toutes les expériences d'EEG menées (même celles pour lesquelles aucune canule ou fibre optique n'a été implantée). Ces deux systèmes ont été maintenus en place à l'aide de ciment dentaire (*Paladur, Henry Schein*) et un point a été réalisé à l'aide de fil de suture (filapeau) pour ramener la peau de l'animal au-dessus du ciment et ainsi limiter l'accès de l'implant à l'animal. Pour faciliter leur réveil et limiter l'hypothermie induite par l'anesthésie, les animaux ont été placés sur une plaque chauffante à 37°C. Une fois réveillés, ils ont été isolés dans une cage et nous avons ajouté dans une coupelle un anti-inflammatoire (doliprane, 6mg environ) ainsi que du lait concentré afin de faciliter leur récupération. Les animaux ont été observés au cours des jours suivant l'opération afin de détecter une éventuelle douleur et d'y remédier. Une période de récupération de 10 jours a été respectée avant le début des expériences.

Notons qu'un groupe d'animaux a été opéré de façon similaire mais les canules ont, cette fois, été insérées dans le ventricule afin de servir de contrôle (à partir du Bregma, antéro-postérieur : +0.05 cm, médio-latéral, +/-0.1 cm, dorso ventral, -0.3 cm).

Contrôle de la zone de diffusion des drogues administrées

A la fin des expériences, une solution contenant de l'alexa-594-cadavérine (*Life Technology*, 50 μM) a été injectée via les canules. Cette molécule est un fluorophore couplé à une protéine dont les amines établiront des liaisons lorsqu'elles seront en contact avec du PFA. Ceci permettra de fixer le fluorophore dans les cellules qui l'auront incorporé. Le poids moléculaire de l'alexa-594-cadavérine est de 1 kDa et est donc proche du poids moléculaire des peptides injectés. D'autre part, la vitesse et le volume injecté sont les mêmes que ceux utilisés au cours des expériences et ainsi, le volume contenant des cellules marquées par l'alexa-cadavérine nous donne une bonne indication du volume de diffusion des peptides injectés. D'autre part, c'est en utilisant ce volume de diffusion théorique que nous avons pu estimer les concentrations de drogues à injecter au sein du septum.

Contrôle du positionnement des canules et critères d'exclusion

Trois minutes après la fin de l'injection d'alexa-594-cadavérine, les animaux ont été anesthésiés par une injection de 200 μL d'une solution de pentobarbital sodique (54.7mg/mL) puis ont subi une perfusion intra-cardiaque:

- avec du PBS afin de nettoyer les vaisseaux sanguins des globules rouges et ainsi diminuer l'autofluorescence du tissu
- avec du PFA permettant de fixer les tissus

Les cerveaux ont ensuite été coupés au vibratome (coupes de 50 μm) et l'emplacement des canules a été déterminé avec précision par rapport à l'atlas de Paxinos [360]. Les individus dont une canule se trouvait dans le ventricule et non dans le septum latéral ont été exclus du groupe expérimental.

11. Optogénétique

Les expériences d'optogénétique ont été réalisées sur des animaux ocytocine-cre.

Pour cela, nous avons utilisé des animaux âgés de 4 semaines. Des virus (500 nL/hémisphère, 2×10^{11} virions par mL) ont été injectés par stéréotaxie (100nL/minute) bilatéralement dans le PVN de souris OT-cre

(coordonnées par rapport au Bregma: antéro-postérieur -0.01 cm, médio-latéral +/-0.02 cm, rostro-caudal - 0.48 cm) à l'aide d'une seringue (nanofil syringe, *WPI*) et d'une aiguille 33G (Nanofil 33G BVLVD Needle, *WPI*) contrôlée par un micro-injecteur (micro-4, *WPI*).

Deux adeno-associated-virus de sérotype 1 et contenant la séquence d'ADN à exprimer entre des sites loxP (*University of Pennsylvania*, vector core) ont été utilisés :

- AAV1 EF1a DIO eNpHR3.0 eYFP WPRE hGH
- AAV1 EF1a DIO eYFP WPRE hGH

Après la stéréotaxie, les animaux ont été regroupés et nous avons attendu 1 mois afin que les virus s'expriment. Nous avons ensuite implanté des fibres optiques dans le septum latéral (coordonnées par rapport au Bregma en cm : antéro-postérieur : +0,05, médio-latéral : +/-0,04, rostro-caudal : -0,3) et des implants d'enregistrements EEG. Une période de 10 jours de récupération a été établie avant le début de toute expérience de comportement.

Un système de stimulation LED (*Doric Lenses*) a été utilisé. De la lumière jaune (595nm) a été utilisée pour stimuler l'halorhodopsine. Une stimulation continue d'une durée totale de 5 minutes a été réalisée de façon semblable à ce qui avait précédemment été fait dans le tissu cérébral [361] .

Les fibres optiques utilisées (branching fiberoptic patchcord, *Doric lenses*) ainsi que les canules bilatérales (dual fiberoptic cannula, *Doric Lenses*) permettant la stimulation du septum latéral ont une ouverture numérique de 0.53.

L'intensité de la LED a été réglée sur 500 mA lors de l'utilisation conduisant à une puissance, au bout de la fibre optique de 2 mW (mesuré avec un luminomètre, *Thorlabs*) pour la lumière jaune, une intensité qui ne produit pas de photo-dommage dans le tissu. Lorsque des fibres optiques ont été réutilisée, cette intensité a été recalculée afin que la puissance à la sortie de la fibre optique soit la même d'une expérience à l'autre.

Après les expériences, les animaux ont été perfusés au PFA et les cerveaux ont été extraits. Nous avons réalisé des coupes frontales de 50 μ m d'épaisseur contenant le noyau paraventriculaire. Sur ces coupes, nous avons réalisé un immuno-marquage neurophysine 1 (anticorps donné par le Dr. Gainer) ainsi qu'une immuno-histochimie anti-GFP permettant d'amplifier le signal eYFP lié à l'expression du virus. Sur une tranche, nous avons compté, à l'aide du logiciel Image J, le nombre de neurones exprimant la neurophysine 1 (neurones ocytocinergiques) et parmi ceux-ci, nous avons compté le nombre de neurones

exprimant la eYFP. De plus, nous avons compté le nombre de neurones exprimant la eYFP mais n'exprimant pas la neurophysine 1. Ces calculs ont été réalisés sur une tranche donnée en considérant les deux PVN de celle-ci.

12. Autoradiographie

Pour ces expériences, les cerveaux des souris ont été extraits et congelés en vapeurs d'isopentane refroidi à l'aide de carboglace. Des coupes frontales d'une épaisseur de 20 µm ont été réalisées au cryostat et placées sur des lames (Superfrost plus, *Thermo Scientific*).

Des ligands radiomarqués à l'iode spécifiques des récepteurs de l'ocytocine (ornithine-vasotocin analogue iodée (OVTA-I¹²⁵) [362], *PerkinElmer*) ou des récepteurs V1a de la vasopressine (Phenylacetyl1, O-Me-D-Tyr², [125I-Arg6]-vasopressine (LVA-I¹²⁵) [300], *PerkinElmer*) ont été utilisés.

Avant le début de l'expérience, les lames ont été placées à température ambiante pour au moins 30 minutes afin que les coupes décongèlent. Une pré-incubation d'une durée de 15 minutes avec une solution de blocage (tampon I, 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA) puis une incubation de 2 minutes avec un milieu similaire auquel a été ajouté 2 mM de MgCl₂ (tampon II) ont été réalisés. Le magnésium est essentiel pour la liaison de la vasopressine à ses récepteurs [363] et la pré-incubation permet donc de séparer la vasopressine de ses récepteurs et de les rendre disponibles pour la liaison du peptide radio-marqué. Les coupes ont ensuite été incubées 2 h à température ambiante avec le milieu d'incubation sous atmosphère humide.

Le milieu d'incubation :

- Tampon II + Radioligand 50 pM + leupeptine (1 mg/mL)
- Tampon II + Radioligand 50 pM + leupeptine (1 mg/mL) + ligand froid

Dans le cadre d'un marquage des récepteurs de l'ocytocine, le radioligand utilisé est l'OVTA iodée et le ligand froid utilisé est l'ocytocine utilisée à 10⁻⁶ M.

Dans le cadre du marquage des récepteurs V1a de la vasopressine, le radioligand utilisé est la LVP iodée et le ligand froid est la vasopressine 10⁻⁶ M.

Après cette incubation, les lames ont été mises sur glace afin d'arrêter la réaction et après avoir été rincées, elles ont été placées dans une cassette au contact d'un film photographique (Biomax MR film carestream, *Sigma*). Après 24h, les films ont été révélés avec des réactifs photographiques et digitalisés avec un scanner.

A l'aide du logiciel imageJ, le marquage obtenu dans le septum latéral a été évalué. Dans chaque cassette, des lames incubées avec le ligand froid ont été utilisées afin de déterminer le marquage non spécifique. Ce dernier a été soustrait au marquage spécifique pour chaque coupe évaluée. Au sein de chaque film, le marquage pour chaque coupe a été normalisé par rapport au marquage obtenu pour la moyenne des animaux WT de la planche.

NB : ces expériences ont été réalisées avec l'aide et les conseils du Dr Gilles Guillon.

13. Injection des souris au cours de la première semaine de vie

Les femelles WT croisées avec des mâles Magel2^{+/-m} GFP-tg^{+/+} gestantes ont été isolées quelques jours avant la mise bas et leur environnement a été enrichi par l'ajout de morceaux de coton. Elles ont été habituées à l'expérimentateur pendant plusieurs jours. Le jour de la mise bas (P0), les naissances ont été contrôlées le matin et les bébés mâles ont été séparés de la mère le temps de l'injection. Des seringues (nanofil syringe, WPI) de 10 µL ont été utilisées afin d'injecter, en sous-cutané, 10 µL dans chaque flanc des bébés. Après avoir été frottés avec de la litière issue de leur cage d'origine afin d'éliminer l'odeur de l'expérimentateur, les bébés ont été remis en place dans la cage. L'opération a été répétée jusqu'au 6ème jour post-natal (P6) puis les bébés ont été utilisés pour les expériences d'électrophysiologie.

Plusieurs molécules ont été injectées en suivant cette stratégie :

- NaCl 0.9% : cette expérience contrôle nous permet de savoir si l'expérimentation, connue pour son effet stressant, module le développement des neurones ocytocinergiques
- ocytocine (20 µL, 10⁻⁴ M) : ce traitement est connu pour son impact bénéfique sur la pathologie induite par la mutation du gène Magel2 sur le modèle murin.
- TGOT (20 µL, 5x10⁻⁶ M) : ce traitement permet d'évaluer le rôle joué par l'activation vasopressinergique induite par l'administration massive d'ocytocine.

RESULTATS

PARTIE A : Modulation d'un réseau septal par l'ocytocine et la vasopressine et implication pour la régulation des comportements sociaux

Les interactions sociales induisent une libération d'ocytocine et de vasopressine dans le septum latéral. Aujourd'hui, nous ne connaissons pas le rôle respectif de chacune de ces libérations ni leurs impacts comportementaux.

Question posée :

Quelles sont les fonctions respectives de l'ocytocine et de la vasopressine libérées au sein du septum latéral au cours des interactions sociales ?

Objectifs :

- Définir les fonctions respectives de la libération d'ocytocine et de vasopressine au sein du septum au cours des comportements sociaux (1)
- Définir la nature de la modulation, par l'ocytocine et par la vasopressine, de l'activité neuronale septale (2) et mieux comprendre les mécanismes électrophysiologiques mis en jeu (3)
- Définir un paramètre sensible in vivo, mesurable sans être invasif et dépendent de la signalisation des deux hormones dans le septum (4)
- Comparer l'activité de ce système septal dans des animaux sains et des animaux présentant des troubles du comportement social (5)

Stratégie expérimentale mise en œuvre :

Afin de répondre à la question posée nous avons utilisé deux approches principales :

- La première consiste à manipuler le système ocytocine/vasopressine septal chez la souris vigile et à étudier l'impact de ces manipulations sur plusieurs paramètres du comportement social murin.
- La seconde consiste à exploiter les réponses électrophysiologiques des neurones du septum latéral suite à l'application d'ocytocine et/ou de vasopressine afin d'interroger l'organisation du réseau septal modulé par ces deux hormones.

1. La vasopressine et l'ocytocine : effets séquentiels pour la régulation des comportements sociaux

Dans un premier temps, nous nous sommes demandé quel est l'impact comportemental de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine et/ou de la vasopressine ayant physiologiquement lieu au cours des interactions sociales. Pour cela, nous avons manipulé l'activité des récepteurs de ces deux peptides au cours d'un protocole d'interaction sociale et décrit l'impact d'une inhibition de celle-ci. Nous avons choisi un test comportemental nous permettant d'évaluer plusieurs paramètres d'interactions sociales : durée de l'interaction avec un juvénile inconnu, impact d'un protocole d'habituation et interaction avec un juvénile inconnu sans protocole d'habituation.

1.1. Résultats

Afin d'étudier l'impact de la modulation du septum latéral par l'ocytocine et la vasopressine dans la reconnaissance et la discrimination sociale, des antagonistes des récepteurs OT-R ou V1a ont été injectés dans le septum latéral à différents moments de l'interaction sociale (Fig 11A). Pour cela, des canules bilatérales ont été implantées de façon chronique et des injecteurs ont été mis en place au moment de l'expérimentation. Les sites d'implantations des canules dans le septum latéral sont présentés en figure 11B (N=11 souris, taux de réussite à l'implantation de 85% (11/13)) ainsi que le domaine de diffusion de l'Alexa-594-cadaverine (Fig 11C), choisie pour son poids moléculaire équivalent à celui de l'ocytocine, de la vasopressine et des autres peptides qui seront administrés intra-septalement.

Nous avons choisi d'administrer les antagonistes à différents moments du protocole social de façon à définir au cours de quelles phases l'ocytocine et la vasopressine endogènes sont mises en jeu. Lorsque les antagonistes sont injectés au cours de la première interaction, ils nous permettent de déterminer l'impact de ceux-ci sur le processus d'acquisition de la reconnaissance sociale. Lorsqu'ils sont injectés au cours du processus d'habituation (3^{ème} interaction), ils nous permettent d'évaluer l'impact sur les phases (i) d'habituation et/ou (ii) de discrimination avec le nouveau juvénile (inconnu). Afin de tester l'influence de la molécule active, nous avons réalisé des expériences contrôles au cours desquelles une solution physiologique (NaCl 0,9%) a été injectée.

Pour déterminer l'implication de l'activité du système ocytocine/vasopressine septal au cours de l'interaction sociale, nous avons utilisé du Manning compound à une forte concentration (3×10^{-6} M). Lorsque

nous avons voulu interroger l'implication du récepteur V1a de la vasopressine, nous avons injecté du Manning compound à une faible concentration ($10^{-8}M$) dans le septum et lorsque nous avons interrogé l'implication des récepteurs de l'ocytocine, nous avons injecté de l'atosiban ($10^{-8}M$) dans le septum également.

Les concentrations à utiliser ont été calculées en considérant

- un volume de diffusion de $3,375mm^3$ (diffusion dans un cube de 1,5mm de côté) estimé à partir du volume de diffusion de l'alexa594-cadavérine après injection intraseptale (Fig 11C)
- un volume d'injection de $1,8\mu L$.

En utilisant les valeurs de Kd précédemment définies, ces conditions permettent l'inhibition des récepteurs dans les proportions suivantes :

Drogue	Occupation des OT-R	Occupation des V1a-R	Occupation des V1b-R
Manning compound $3 \times 10^{-6}M$	97,4%	99,9%	95,6%
Atosiban $10^{-8}M$	80%	<0.1%	<0.1%
Manning compound $10^{-8}M$	11,1%	75,7%	6,7%

Ces chiffres sont des estimations ne tenant pas compte de la dégradation des peptides car ces deux antagonistes sont dé-amidés et sont donc protégés de la dégradation.

L'impact de ces modulations locales a été évaluée en mesurant le temps d'interaction avec les juvéniles tout au long de l'expérience.

Dans un premier temps, nous nous sommes demandé si l'administration de drogue au cours de la **première interaction** modulait le temps d'interaction au cours de la première rencontre (Fig 11D et 11E). Pour cela, nous avons comparé les données issues des différents groupes et aucun des groupes n'a montré de différence significative avec celui ayant reçu une administration intra-septale de solution saline (1-way

anova : $p=0,0339$; post-hoc : NaCl vs MC high : $p>0,9999$, NaCl vs. Ato-8 $p=0,1150$, NaCl vs. MC low $p>0,9999$) (Fig 11D).

Au vu de cette absence de différence et afin de s'affranchir de la variabilité interindividuelle, nous avons choisi de normaliser les données en définissant 100% comme étant la durée de l'interaction de la souris considérée avec le juvénile au cours de la première rencontre.

Lorsque les drogues sont injectées au cours de la première interaction, nous observons (Fig 11E) que :

- dans le groupe ayant reçu l'injection de solution saline, les animaux présentent une diminution du temps d'interaction entre la 1^{ère} et la 4^{ème} rencontre qui traduit une habituation (post-hoc de Tukey : $n=10$, $p=0,0252$).
- après l'administration d'un antagoniste du système ocytocine/vasopressine (Manning compound, forte concentration), cette habituation n'a pas lieu et le temps d'interaction reste stable tout au long de l'expérience ($n=8$).

Ceci montre une implication du système ocytocine/vasopressine dans la régulation de l'habituation sociale. Nous avons ensuite déterminé que l'habituation sociale était indépendante de l'activation des récepteurs de l'ocytocine puisque l'administration d'atosiban n'altère pas l'habituation (post-hoc de Tukey, $n=8$, $p=0,0372$). En revanche, celle-ci est dépendante de l'activation septale des récepteurs V1a de la vasopressine puisque l'administration d'une faible dose de Manning compound empêche l'habituation sociale ($n=7$).

Notons que la pénétrance de l'effet induit par l'antagoniste V1a (Manning compound faible concentration) est limitée puisque parmi les 7 souris testées, 3 se sont habituées à l'interacteur n°1. Ceci est probablement dû au fait qu'une proportion non négligeable des récepteurs V1a reste active même en présence de cet antagoniste.

Dans un second temps, nous avons interrogé la fonction du système ocytocine/vasopressine au cours du processus d'habituation. Pour cela, nous avons inhibé la fonction des récepteurs via l'administration d'antagonistes au cours de la **3^{ème} rencontre** et nous avons évalué la reconnaissance et de discrimination sociale (Fig 11F et 11G).

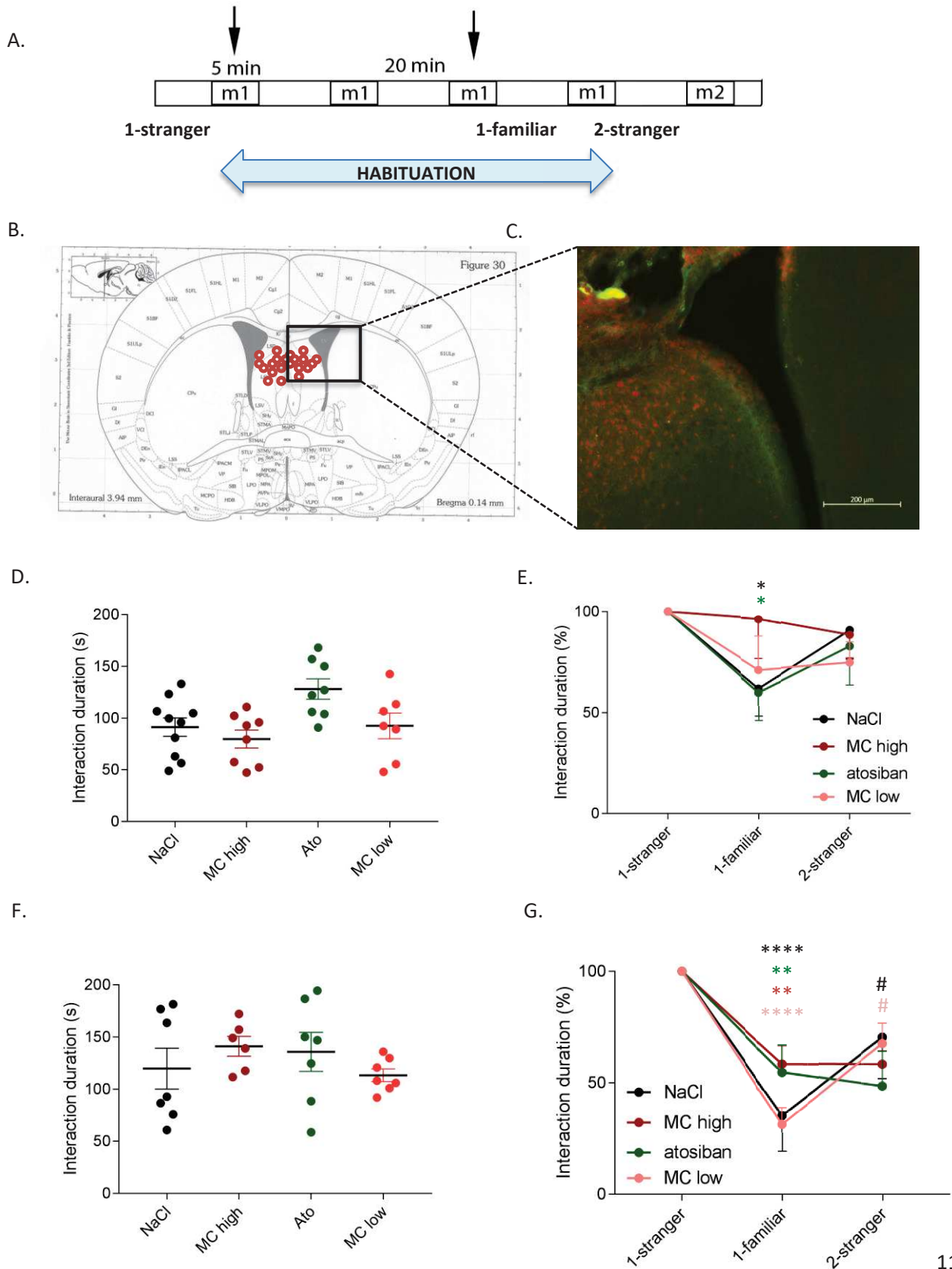
Nous avons d'abord montré que les animaux injectés avec chacune des drogues présentaient des temps d'interaction similaires lors de la 1^{ère} rencontre avec la première souris (Fig 11F). En effet, les souris qui sont injectées avec chacune des drogues interagissent autant que les souris injectées avec du NaCl (1-way ANOVA: $p=0,4553$).

Nous avons réalisé la même normalisation que précédemment et ceci nous a permis de montrer (2-way ANOVA), mesures répétées, effet des présentations successives : $p < 0,0001$) (fig 11G) que :

- l'administration de NaCl au cours de la 3ème rencontre ($n=7$) n'altère ni la reconnaissance sociale (post-hoc de Tukey : $p < 0,0001$) ni la discrimination sociale (post-hoc de Tukey : $p=0,0191$)
- l'administration de fortes concentrations de Manning compound ($n=6$), d'atosiban ($n=7$) ou de faibles concentrations de Manning compound ($n=7$) n'altère pas la reconnaissance sociale (post-hoc de Tukey : respectivement $p=0,0095$, $p=0,0020$ et $p < 0,0001$).
- l'administration de fortes concentrations de Manning compound ($n=6$) empêche le processus de discrimination sociale puisque le temps d'interaction n'est pas augmenté lorsqu'un juvénile inconnu est présenté (post-hoc de Tukey, $p=0,9999$)

Ceci montre une implication du système ocytocine/vasopressine dans la régulation de la discrimination sociale. Nous avons ensuite déterminé que la discrimination sociale était indépendante de l'activation des récepteurs V1a de la vasopressine puisque l'administration de faibles concentrations de Manning compound n'altère pas la discrimination (post-hoc Tukey, $n=7$, $p=0,0153$). En revanche, celle-ci est dépendante de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine puisque l'administration d'atosiban empêche la discrimination sociale ($n=6$, $p=0,8710$).

Figure 11: L'activation des récepteurs septaux de la vasopressine et de l'ocytocine est essentielle respectivement pour l'habituation et la discrimination sociale.



A. Schéma représentatif du déroulé de l'expérience

Les flèches représentent les moments auxquels les injections ont été réalisées.

B. Positionnement des sites d'implantation des canules

C. Zone de diffusion de l'alexa-594-cadavérine dont le poids moléculaire est comparable à celui des peptides utilisés au cours des injections via les canules (1kDa).

D. Durée de la première interaction avec le juvénile dans les groupes ayant reçu la drogue indiquée au cours de la première rencontre (Moyenne +/- SEM, N= 10-8-8-7 souris par groupe)

1-way-anova (Kruskal Wallis) $p=0,0339$; comparaison par analyse post-hoc de Dunns : NaCl vs MC (high ou low) $p=0,9999$, NaCl vs Atosiban : $p=0,1150$

E. Durée normalisée de l'interaction sociale avec le juvénile dans les groupes ayant reçu la drogue indiquée au cours de la première rencontre (Moyenne +/- SEM, N = 10-8-8-7 souris par groupe) - 2-way anova, mesures répétées :

Effet des présentations successives : $F(2,58)=6,182$, $p=0,0037$; effet de la drogue : $F(3,29)=0,5125$, $p=0,6769$; effet de l'interaction : $F(6,58)=0,8719$, $p=0,5211$; validité de l'appariement : $F(29,58)=1,954$, $p=0,0151$

Comparaison entre les groupes par analyse post-hoc de Tukey :

NaCl : 1-stranger vs 1-familier : $p=0,0252$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,1130$

MC high : 1-stranger vs 1-familier : $p=0,9759$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,8659$

Atosiban : 1-stranger vs 1-familier : $p=0,0372$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,3262$

MC low : 1-stranger vs 1-familier : $p=0,2142$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,9776$

F. Durée de la première interaction avec le juvénile dans les groupes ayant reçu la drogue indiquée au cours de la troisième rencontre (Moyenne +/- SEM, N=7-6-7-7 souris par groupe) 1-way anova (Kruskal Wallis) : $p=0,4553$

G. Durée normalisée de l'interaction sociale avec le juvénile dans les groupes ayant reçu la drogue indiquée au cours de la troisième rencontre (Moyenne +/- SEM, N=7-6-7-7 souris par groupe) - 2-way anova, mesures répétées :

Effet des présentations successives : $F(2,46)=39,6$, $p<0,0001$; effet de la drogue : $F(3,23)=0,1087$, $p=0,9542$; effet de l'interaction : $F(6,46)=1,657$, $p=0,1534$; effet de l'appariement : $F(23,46)=2,086$, $p=0,0168$

Comparaison entre les groupes par analyse post-hoc de Tukey :

NaCl : 1-stranger vs 1-familier : $p<0,0001$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,0191$

MC high : 1-stranger vs 1-familier : $p=0,0095$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,9999$

atosiban : 1-stranger vs 1-familier : $p=0,0020$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,8710$

MC low : 1-stranger vs 1-familier : $p<0,0001$, 1-familier vs 2-stranger : $p=0,0153$

(* : 1-stranger vs 1-familier, # : 1-familier vs 2-stranger)

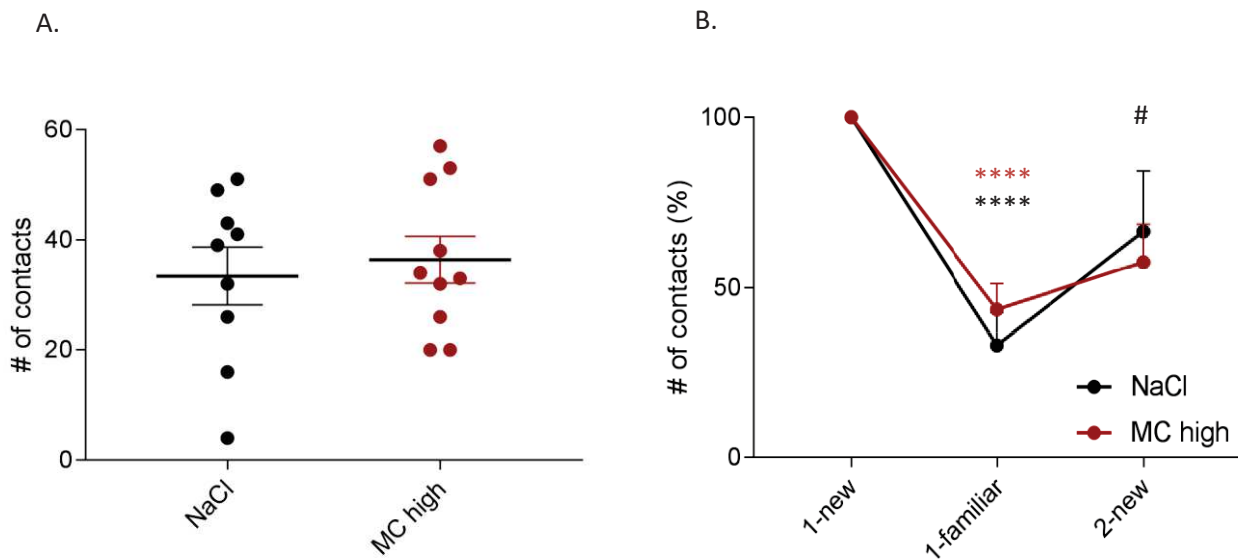
Des expériences identiques ont été réalisées en remplaçant la souris juvénile par un objet inerte, à priori non vecteur d'information sociale, afin de déterminer si l'impact de l'activation des récepteurs de la vasopressine ou de l'ocytocine au cours de l'interaction sociale est spécifique d'un stimulus social (Fig 12). Ces expériences ont permis de montrer que l'administration d'une forte concentration de Manning compound au cours de la première interaction (bloquant les récepteurs du système ocytocine/vasopressine) n'altère pas l'intérêt pour un objet inconnu (Fig 12A). De plus, une telle administration ne bloque pas le processus d'habituation (Fig 12B).

Cette expérience suggère que l'implication du système ocytocine/vasopressine dans le processus d'habituation/discrimination est spécifiquement mis en jeu lors d'un comportement social.

Ces résultats montrent que lors de la première interaction sociale, une activation de récepteurs V1a de la vasopressine a physiologiquement lieu et que celle-ci est nécessaire au processus d'habituation. L'activation de récepteurs de l'ocytocine n'est en revanche pas nécessaire pour ce processus.

De plus, lorsque l'habituation est engagée, une activation septale des récepteurs de l'ocytocine a lieu et est essentielle au regain d'intérêt pour un juvénile inconnu. De façon intéressante, l'activation des récepteurs V1a de la vasopressine ne semble pas essentielle à ce processus.

Figure 12: L'activation des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine n'est pas essentielle à la reconnaissance et à la discrimination des objets.



A. Nombre de contacts au cours de la première interaction avec l'objet chez des souris ayant reçu une injection intra-septale de NaCl (noir) ou d'une forte concentration de Manning compound (3.10⁻⁶ M, rouge) lors de la première interaction (Moyenne +/- SEM, N=8-9 souris par groupe).

T-test (Mann-Whitney), p=0,7953

B. Nombre normalisé de contacts avec l'objet dans les groupes ayant reçus la drogue indiquée au cours de la première rencontre (Moyenne +/- SEM, N = 8-9 souris par groupe) - 2-way anova, mesures répétées

Effet des présentations successives : F(2,30)=29.3, p<0.0001 ; effet de la drogue : F(1,15)=0.002408, p=0.9615 ; effet de l'interaction : F(2,30)=0.7179, p=0.4959 ; effet de l'appariement : F(15,30)=2.236, p=0.0295

Comparaison entre les groupes par analyse post-hoc de Tukey :

NaCl : 1-new vs 1-familiar p<0.0001, 1-familiar vs 2-new p=0.0214

MC high : 1-new vs 1-familiar p<0.0001, 1-familiar vs 2-new : p=0.4255

1.2. Discussion

1.2.1. Comparaison avec les résultats des études précédentes

Des expériences précédentes réalisées chez le rat avaient permis de montrer :

- une libération septale de vasopressine au cours de la première interaction sociale [143]
- une libération septale d'ocytocine plus tardive : lorsque l'interacteur est à nouveau rencontré [144]

De plus, l'impact de ces libérations sur le comportement social et en particulier sur la discrimination sociale a été évalué via l'injection localisée d'antagonistes :

- 5pmoles d'antagoniste des récepteurs V1a (Manning compound) ont été injectés dans le septum latéral de souris avant de tester la discrimination sociale. Une telle administration empêche la discrimination sociale dans un test semblable à celui que nous avons utilisé (4 séances de 1 minute d'interaction avec une femelle ovariectomisée séparées par des périodes de 10 minutes. Une nouvelle femelle est utilisée lors de la 5^{ème} séance) [354]. Notons que dans cette expérience, l'injection a été réalisée sur souris anesthésiée.
- Au moins 5pmoles d'antagoniste des récepteurs de l'ocytocine ont été administrées dans le septum latéral de rat sur une période de 30 minutes via rétrodialyse. Une telle administration après la phase d'acquisition altère la préférence pour la nouveauté sociale 1h après la première interaction [144] suggérant un rôle dans la discrimination sociale.

Bien que les antagonistes utilisés agissent préférentiellement sur les récepteurs ciblés [364], à 5pmoles ou plus, la sélectivité ne peut être assurée. Afin d'appuyer les conclusions, il est important de tester l'impact d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine et des récepteurs de la vasopressine. En effet, si les effets de l'un des antagonistes ne sont pas reproduits avec l'autre, on peut facilement conclure quant à la spécificité de l'effet observé. Cela avait déjà été réalisé dans une autre étude [186] qui avait permis de montrer, chez le campagnol, que la vasopressine était essentielle à la préférence pour la nouveauté sociale. Dans cette étude, il a été montré qu'une administration de Manning compound (5pmoles sur une durée de 30minutes par rétrodialyse) avant la première interaction bloque la préférence pour la nouveauté sociale tandis qu'une administration identique d'antagoniste des récepteurs de l'ocytocine (OTA3, voir figure 2 pour les valeurs d'affinité) est sans impact.

Dans notre étude, nous confirmons ce résultat sur la souris: l'activation septale des récepteurs V1a de la vasopressine lors de la première interaction est essentielle à la préférence pour la nouveauté sociale tandis que l'activation des récepteurs de l'ocytocine ne l'est pas. Néanmoins, le protocole établi nous a permis d'aller plus loin et de démontrer que l'activation des récepteurs de l'ocytocine au cours du processus d'habituation est également essentielle pour le comportement social des rongeurs. Ceci a été rendu possible par :

- l'implantation chronique de canules nous permettant d'administrer les drogues au moment souhaité sans nécessité d'anesthésier les animaux.
- l'utilisation d'un test de reconnaissance sociale permettant de discriminer différentes phases dans le comportement social des rongeurs (habituation, préférence pour la nouveauté...)
- l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine et des récepteurs de la vasopressine

Ainsi, nous montrons par une stratégie d'inhibition pharmacologique des effets séquentiels de la vasopressine et de l'ocytocine endogènes: (i) la libération septale de vasopressine induite par la première interaction avec un juvénile inconnu induit l'activation des récepteurs V1a de la vasopressine ce qui est responsable d'une baisse d'intérêt traduisant une habituation et une reconnaissance sociale ; (ii) lorsque le même animal est à nouveau présenté, l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine a lieu. Bien que cette activation ne joue pas de rôle essentiel pour l'habituation, elle est essentielle au regain d'intérêt induit lorsqu'un nouvel animal est présenté.

1.2.2. Biais possibles dans l'interprétation des résultats

L'analyse du comportement social des rongeurs est complexe. En effet, le paramètre étudié (changement dans la durée de l'interaction) reflète l'intérêt de l'animal étudié pour le stimulus présenté ce qui ne permet pas une interprétation simple des résultats. Dans les études réalisées, il est admis que les rongeurs sont attirés par la nouveauté sociale et qu'une perte d'intérêt pour un nouvel interacteur traduit une altération de la reconnaissance (le rongeur étudié reconnaissant le stimulus auquel il a été habitué, il passe plus de temps avec celui qui lui est inconnu). Afin d'évaluer si les effets observés sont simplement dus à une perte d'intérêt pour la nouveauté, un test de reconnaissance d'objet a été réalisé et les résultats nous permettent d'écarter cette hypothèse. Ainsi, nous considérons que les effets observés sont liés au paramètre social.

1.2.3. Questions soulevées, hypothèses et expériences possibles

Les résultats obtenus montrent des effets séquentiels de ces deux hormones sur le septum latéral. Néanmoins, nous ne connaissons pas les mécanismes par lesquelles la séquence de libération de ces deux peptides est contrôlée. L'une des hypothèses est que l'interaction sociale induirait une libération septale de vasopressine qui empêcherait la libération septale d'ocytocine ou encore les effets de l'ocytocine sur le septum. Ceci pourrait, par exemple, être dû à une action inhibitrice de la vasopressine sur les terminaisons ocytocinergiques ou sur les neurones répondant à l'ocytocine. Lorsqu'un individu serait rencontré à nouveau et reconnu, la libération de vasopressine serait inhibée (ou diminuée) ce qui lèverait le frein sur le système ocytocinergique et lui permettrait de jouer son rôle. Ainsi, si un individu inconnu est présenté, le système vasopressine prendrait à nouveau le dessus et l'action du système ocytocinergique serait bloquée. Il est aussi possible que les deux systèmes soient activés de manière indépendante via une activation temporellement dissociée des afférences des neurones vasopressinergiques et de celles des neurones ocytocinergiques

Afin de tester de telles hypothèses, il serait essentiel de pouvoir moduler, in vivo, l'activité des système ocytocinergiques et vasopressinergiques au même moment et avec une bonne précision temporelle. Ceci serait par exemple rendu possible par l'utilisation de virus et d'une stratégie optogénétique (utilisation de channelrhodopsine ou d'halorhodopsine adressés aux neurones ocytocinergiques ou vasopressinergiques).

Néanmoins, avant d'envisager de telles expériences in-vivo, il est essentiel de mieux comprendre les actions de l'ocytocine et de la vasopressine sur les neurones du septum latéral.

2. Signatures électrophysiologiques de l'impact de l'ocytocine et de la vasopressine sur le septum latéral

Afin de comprendre comment l'activation des récepteurs septaux de l'ocytocine et de la vasopressine au cours des interactions sociales peut réguler la réponse comportementale, il est important de mesurer la réponse de cette structure à l'application de chacune de ces drogues. Pour cela, nous avons décidé d'étudier la réponse électrophysiologique des neurones du septum latéral à l'application d'agonistes de ces deux systèmes *ex vivo*. De plus, nous avons étudié *in vivo* l'impact de l'activation des récepteurs septaux de l'ocytocine et de la vasopressine sur l'activité électroencéphalographique corticale afin de définir un nouveau paramètre (signature) mesurable *in vivo* sur l'animal vigile, mobile et reflétant l'état d'activation du système ocytocinergique et/ou vasopressinergique septal.

2.1. Résultats

2.1.1. Electrophysiologie sur tranche

2.1.1.1. *3 catégories neuronales définies par leur réponse électrique à l'application d'ocytocine et/ou de vasopressine*

Des expériences d'électrophysiologie sur tranche aiguë de cerveau de souris ont été mises en place afin de déterminer l'impact d'un agoniste ocytocinergique (TGOT) et de la vasopressine sur l'activité électrique des neurones du septum latéral.

L'activité électrique spontanée des cellules du septum latéral de souris C57Bl6/J mâle a été mesurée en conditions de base puis après application de TGOT ($10^{-7}M$) et de vasopressine ($10^{-6}M$). La comparaison des profils d'activité avant et après l'application a révélé des réponses très hétérogènes que l'on a classé en fonction de leur représentation sur l'ensemble de la population des cellules enregistrées en configuration « cellule entière » (N = 104). Pour valider ces résultats, nous avons procédé à des enregistrements similaires en configuration « loose-patch » sur des cellules du septum latéral (N = 32).

Critères préalables à l'exploitation des résultats : Les cellules présentant une diminution de plus de

10% de la fréquence de leur potentiels d'action sur une durée de 3 minutes suite à l'application d'une drogue ont été considérées comme inhibées si et seulement si l'effet est réversible lorsque la drogue est rincée du

dispositif. Au contraire, les cellules présentant une augmentation réversible de plus de 10% sur 3 minutes ont été considérées comme activées par la drogue en question.

Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence de 3 catégories de neurones dans le septum latéral (Fig 13A) :

- des neurones dont la fréquence d'émission des potentiels d'action est augmentée par l'application de vasopressine (mais sans effet induit par l'application de TGOT) qui représentent la moitié des neurones enregistrés
- des neurones dont la fréquence d'émission des potentiels d'action est augmentée par l'application de TGOT (mais sans effet induit par l'application de vasopressine) qui représentent environ 20% des neurones enregistrés
- des neurones dont la fréquence d'émission des potentiels d'action est diminuée par l'application de TGOT et de vasopressine. Notons qu'une petite partie des neurones enregistrés présentent une activité électrique inhibée par l'application de l'un ou l'autre de ces peptides. Pour la suite de l'étude, nous rassemblerons les neurones inhibés en 1 catégorie.

Certains neurones enregistrés en configuration cellule entière n'ont pas présenté de modification de la fréquence de leur activité électrique en réponse à l'application de TGOT ou de vasopressine (9/104). D'autres encore ont été excités par l'application de ces deux peptides (3/104). Ces deux cas de figures n'ayant représenté qu'une minorité des cas, nous n'en avons pas tenu compte pour la suite de l'étude.

Notons que les proportions de neurones de chacune de ces catégories sont indépendantes du mode d'enregistrement ("cellule entière" ou "loose-patch") ce qui suggère que le milieu intra-cellulaire utilisé lors des enregistrements en "cellule entière" n'altère pas la réponse des neurones à l'ocytocine et à la vasopressine.

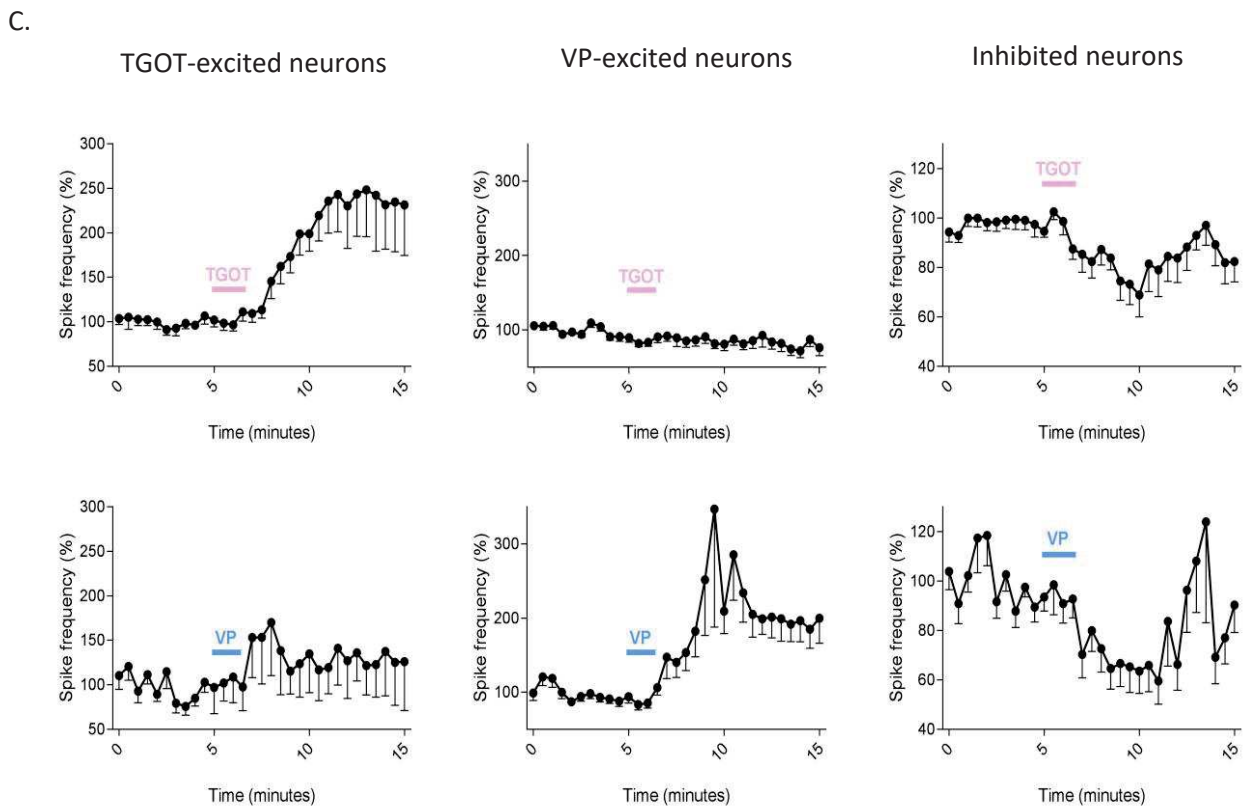
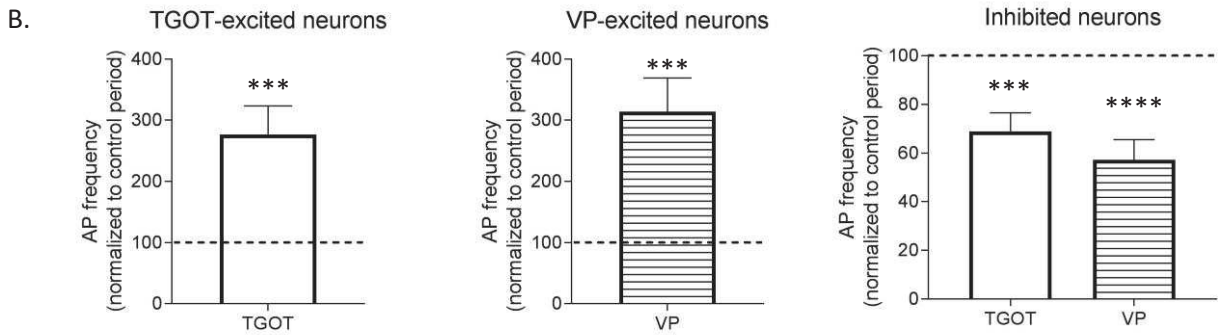
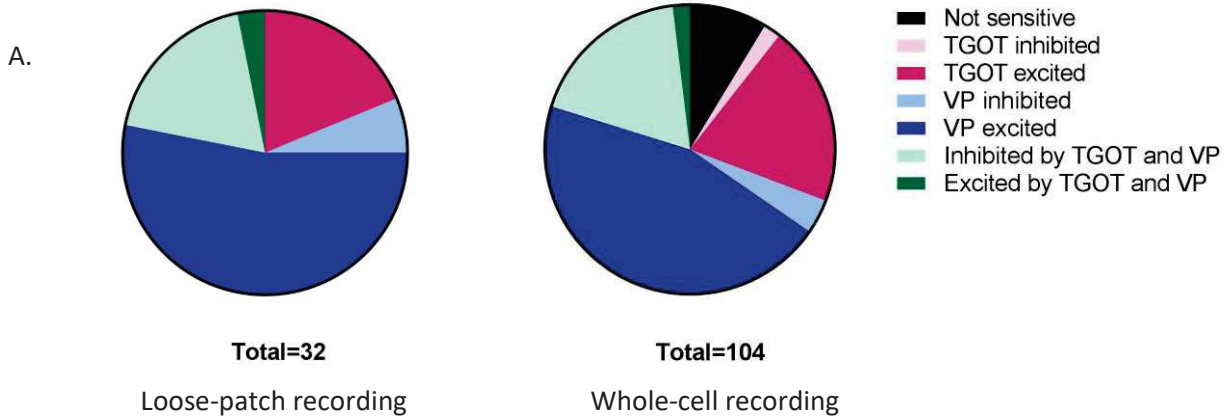
Dans la suite de l'étude, seules ces 3 catégories ont été considérées et dans le cas d'une réponse claire à l'un des peptides nous permettant de classer la cellule, nous n'avons pas appliqué le second peptide.

Nous avons ensuite étudié l'amplitude de l'effet induit par l'application de TGOT et de vasopressine sur la fréquence d'émission des potentiels d'actions dans ces trois catégories cellulaires en configuration « loose-patch » (Fig 13B).

L'excitation induite par l'application de TGOT ou de vasopressine induit une augmentation de la fréquence d'émission des potentiels d'action de l'ordre de 300% (respectivement $p=0,0007$ et $p=0,0005$). Les inhibitions induites, elles, sont de l'ordre de 40% (TGOT $p=0,001$; vasopressine $p<0,0001$).

L'effet de l'application de TGOT ou de vasopressine sur la fréquence d'émission des potentiels d'action met quelques minutes à s'installer (Fig 13C). L'effet sur l'activité électrique est en effet maximal 5 minutes après le début de l'application de la drogue (drogue appliquée entre les minutes 5 et 7 sur la figure). L'inhibition induite dure 5 à 10 minutes. Les excitations, elles, sont plus longues et mettent souvent près de 30 minutes pour s'atténuer. Le retard observé dans l'impact de ces drogues sur l'activité électrique peut s'expliquer par le fait que les neurones enregistrés sont situés en profondeur dans la tranche de cerveau et que les drogues mettent un certain temps à pénétrer dans la tranche et atteindre ces neurones. La durée de l'effet suggère que l'application module un réseau local permettant d'entretenir la modulation induite par la drogue.

Figure 13 : 3 catégories neuronales du septum latéral définies par leur réponse électrique à l'application de TGOT et de vasopressine



A. Classement des cellules en fonction des réponses électriques induites par l'application de TGOT ou de vasopressine

Gauche ("Loose-patch recording"): 19% activés par la TGOT, 6% Inhibés par la VP, 53% activés par la VP, 19% inhibés par la TGOT et la VP, 3% activés par la TGOT et la VP

Droite ("Whole-cell recording"): 9% insensibles, 2% inhibées par la TGOT, 20% actives par la TGOT, 4% inhibés par la VP, 45% actives par la VP, 18% inhibés par la TGOT et par la VP, 2% actives par la TGOT et la VP

B. Amplitude des effets de l'application de TGOT ou de vasopressine sur l'activité électrique dans les 3 principales catégories neuronales décrites.

Pour chaque cellule, une période de 3 minutes au cours de laquelle l'effet maximal a eu lieu a été considérée (Moyenne +/- SEM, N= 29 cellules activées par la TGOT; 34 activées par la vasopressine; 20 inhibées par la vasopressine; 16 inhibées par la TGOT).

Wilcoxon signed rank, différent de 100% (***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$)

C. Cinétiques moyennes des réponses induites par la TGOT et la vasopressine dans chacune des 3 catégories décrites. (Moyenne +/- SEM, $14 < N < 35$ cellules)

Gauche : Neurones activés par la TGOT

Milieu : Neurones activés par la VP

Droite : Neurons inhibés

Le trait rose correspond à la période d'application de la TGOT (2 minutes, de 5 à 7 minutes) et le trait bleu à la période d'application de la vasopressine (2 minutes, de 5 à 7 minutes également).

2.1.1.2. Les neurones de ces catégories ont des propriétés morphologiques et électrophysiologiques propres

Nous avons ensuite analysé les propriétés des neurones appartenant à chacune de ces catégories (Fig 14).

Afin d'étudier la morphologie de ces neurones (Fig 14A), de l'Alexa-594-cadavérine a été ajouté au milieu intra-cellulaire de la pipette lors des enregistrements en configuration cellule entière, ce qui a induit un marquage de l'arborisation dendritique des neurones enregistrés. Ceci nous a permis de montrer que les neurones inhibés par l'un et/ou l'autre des peptides se distinguent des autres neurones par une arborisation dendritique moins denses. Ceci suggère des fonctions différentes selon que ces neurones sont activés ou inhibés.

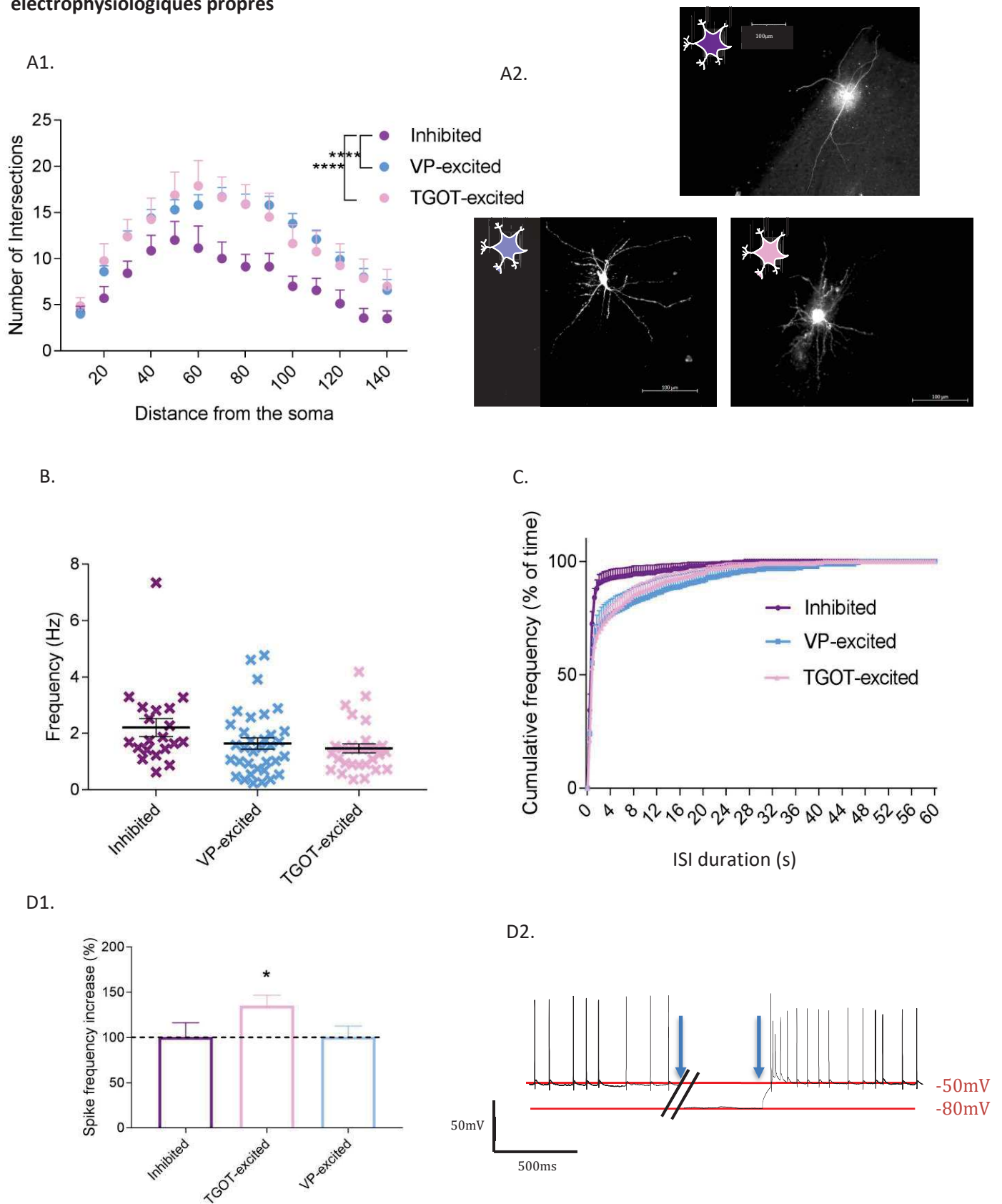
Nous avons également étudié la fréquence spontanée d'émission des potentiels d'action. Pour cela, nous avons décidé de travailler en configuration « loose-patch » afin de ne pas altérer la composition du milieu intra-cellulaire. Nous n'avons pas observé de différence significative entre ces différentes catégories neuronales (Fig 14B). En revanche, l'étude du patron d'activité électrique spontanée en condition basale (Fig 14C) a permis de montrer que les neurones répondant selon les 3 modalités décrites précédemment présentent des caractéristiques propres :

- l'intervalle de temps séparant deux potentiels d'action ("interspike interval" : ISI) des cellules inhibées par l'application de TGOT et/ou de vasopressine est peu variable ce qui suggère une activité électrique régulière
- pour les neurones excités par la TGOT ou par la vasopressine, on peut distinguer deux familles d'ISI : des ISI courts et des ISI plus longs ce qui est caractéristique d'une activité électrique rythmique.

Afin de mieux comprendre l'origine de cette activité rythmique les neurones ont été enregistrés en configuration « cellule entière » « courant imposé » à un potentiel de membrane de -50mV. Nous avons ensuite réalisé des sauts hyperpolarisants d'une durée de 1 seconde. Les sauts de courant permettant à la cellule d'atteindre -80mV ont été étudiés. Dans certaines cellules, nous avons observé un rebond du potentiel de membrane (éventuellement surplombé de potentiels d'actions) juste après le saut et une hyperexcitabilité au cours de la seconde suivant le retour à un potentiel de -50mV (fin du saut). Afin d'évaluer l'amplitude de cet effet rebond induit par l'hyperpolarisation, nous avons déterminé pour chaque cellule la fréquence d'émission des potentiels d'action à -50mV avant le saut hyperpolarisant puis l'éventuelle augmentation de

la fréquence au cours de la seconde suivant un saut à -80mV (Fig 14D). Ceci nous a permis de montrer que les neurones excités par la TGOT présentent un courant induit par l'hyperpolarisation supérieur aux autres catégories. Il est possible que ce rebond participe à la rythmicité observée dans les neurones activés par la TGOT.

Figure 14: Les 3 catégories neuronales décrites possèdent des propriétés morphologiques et électrophysiologiques propres



A. Les neurones inhibés possèdent une arborisation dendritique différente de celle des deux autres catégories neuronales décrites

A1. Analyse de Scholl – 2-way ANOVA (Moyennes +/- SEM, N=7 cellules inhibited, 10 VP-excited, 8 TGOT-excited)

Effet de la distance du soma : $F(13,307)=15.88$, $p<0.0001$; effet du type cellulaire: $F(2,307)=39.03$, $p<0.0001$; effet de l'interaction : $F(26,307)=0.5295$, $p=0.9732$

Comparaison entre les groupes par analyse post-hoc de Tukey : Inhibited vs VP-excited : $p<0.0001$, inhibited vs TGOT-excited : $p<0.0001$, TGOT-excited vs VP-excited : ns

A2. Exemples représentatifs de chacune des 3 catégories

B. La fréquence spontanée d'émission des potentiels d'action est indépendante de la catégorie considérée (Moyennes +/- SEM, N = 20 cellules Inhibited, 34 VP-excited, 29 TGOT-excited).

1-way ANOVA, $p=0.056$; Comparaison entre groupes par l'analyse post-hoc de Dunns : inhibited vs VP-excited : $p=0.1657$, inhibited vs TGOT-excited : $p=0.0559$; VP-excited vs TGOT-excited : $p>0.9999$

C. L'étude de la fréquence cumulée des intervalles interspike permet de différencier les neurones inhibés des 2 autres catégories décrites (Moyennes +/- SEM, N = 20 cellules Inhibited, 34 VP-excited, 29 TGOT-excited).

2-way ANOVA : Effet de la durée de l'ISI : $F(150,12080)=39.14$, $p<0.0001$; effet du type cellulaire: $F(2,12080)=99.12$, $p<0.0001$; effet de l'interaction : $F(300,12080)=0.9226$, $p=0.8015$

Comparaison entre groupes par l'analyse Post-hoc de Tukey : inhibited vs VP-excited : $p<0.0001$; inhibited vs TGOT-excited : $p<0.0001$; VP-excited vs TGOT-excited : $p<0.0001$

D. Une augmentation de la fréquence d'émission des potentiels d'action est induite par l'hyperpolarisation dans les cellules activées par la TGOT

D1. Valeurs moyennes +/- SEM ; N = 11 cellules Inhibited, 13 TGOT-excited, 20 VP-excited

Wilcoxon signed rank, different from 100%, TGOT-excited : $p=0,0116$

D2. Exemple représentatif de l'augmentation de fréquence d'émission des potentiels d'action induite par l'hyperpolarisation dans les neurones activés par la TGOT. La première flèche représente le début du saut hyperpolarisant faisant passer le potentiel de membrane de la cellule de -50mV à -80mV et la seconde représente la fin du saut hyperpolarisant

2.1.1.3. La TGOT et la vasopressine modulent le patron d'activité électrique des neurones du septum latéral

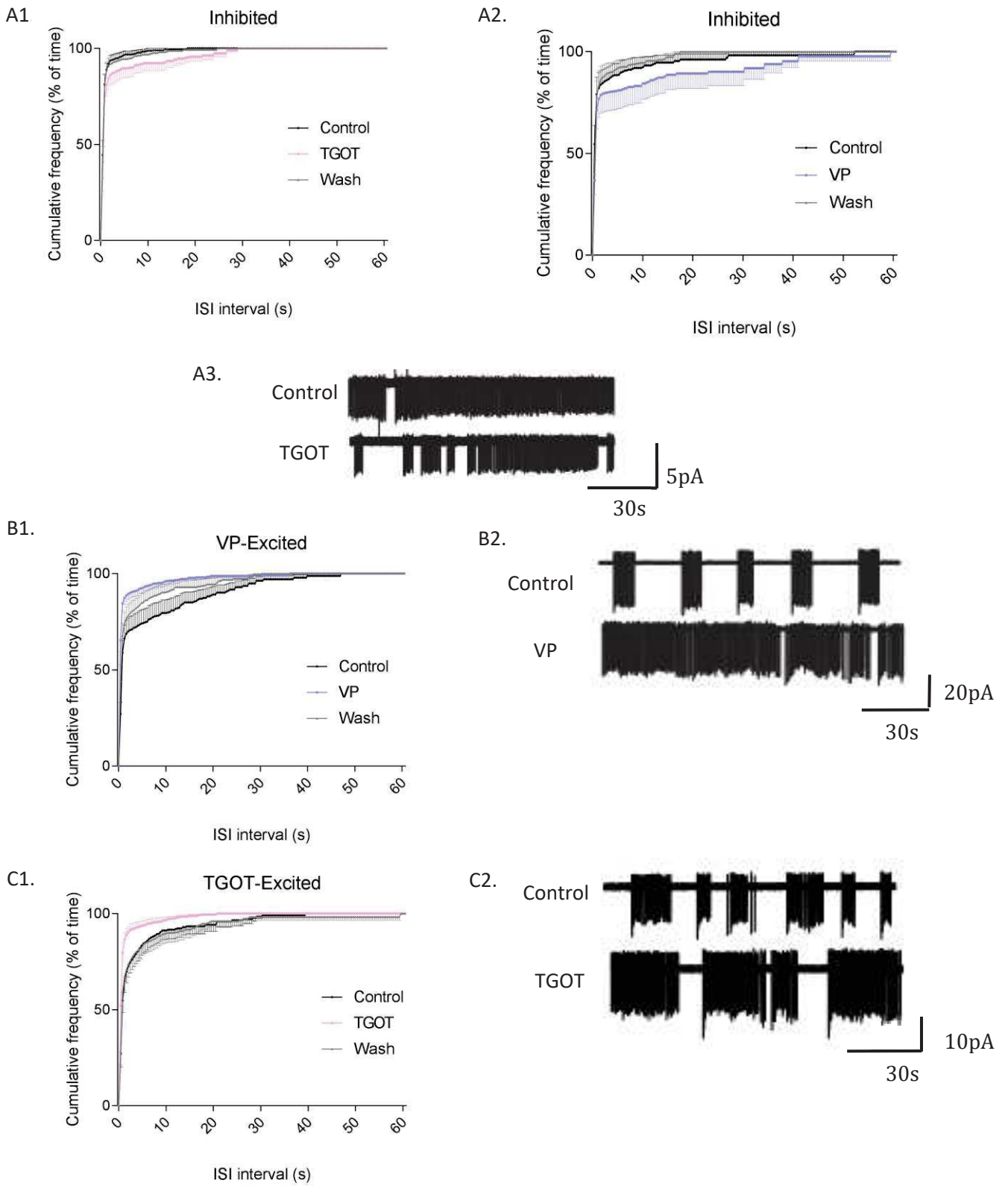
Puisque nous avons observé des patrons d'émission des potentiels d'action différents entre les 3 catégories, nous avons analysé l'effet de la vasopressine et de la TGOT sur celui-ci.

Dans les neurones inhibés, la TGOT (Fig 15A1) et la vasopressine (Fig 15A2) ne changent pas la pente de la courbe des intervalles inter-spike (ISI) à son origine, ce qui signifie que la fréquence au sein des bouffées d'activités (« bursts ») est inchangée. En revanche, l'application de l'un ou l'autre des peptides module l'activité des neurones en rallongeant la durée des intervalle inter-spike (Fig 15A3). Ainsi, ceci montre que l'action de la TGOT et de la vasopressine sur l'activité des neurones inhibés passe par une modulation du patron d'activité électrique : après l'application, les neurones deviennent rythmiques.

Dans les neurones excités, ni la TGOT (Fig 15B1), ni la vasopressine (Fig 15C1) ne changent la pente de la courbe des ISI à l'origine. Ces peptides ne modulent donc pas la fréquence au sein des bouffées d'activité. En revanche, la TGOT (Fig 15B2) et la vasopressine (Fig 15C2) modifient la fréquence des ISI longs et donc les périodes de silence séparant les bouffées d'activité.

Notons que ces effets sont réversibles puisque les courbes après rinçage se rapprochent de celles obtenues avant l'application de drogues. A noter toutefois, que le lavage de l'effet de la vasopressine sur les neurones activés par la vasopressine est partiel.

Figure 15: La TGOT et la vasopressine modifient le patron d'activité électrique des neurones du septum latéral



Fréquences cumulatives des intervalles interspikes (ISI) dans les neurones inhibés (A), activés par la TGOT (B) ou activés par la vasopressine (C).

Chaque courbe a été établie en considérant une période de 3 minutes au moment où l'effet de la drogue est maximal

A1. Effet de l'application de TGOT sur les neurones inhibés

N=17 cellules, 2-way ANOVA, mesures répétées selon les deux paramètres

Effet de l'intervalle d'ISI : $F(151,2416)=49.22$, $p<0.0001$; effet de la drogue : $F(2,32)=4.719$, $p=0.0160$; effet de l'interaction : $F(302,4832)=3.651$, $p<0.0001$

A2. Effet de l'application de VP sur les neurones inhibés

N=12 cellules, 2-way ANOVA, mesures répétées selon les deux paramètres

Effet de l'intervalle d'ISI : $F(151,1661)=24.51$, $p<0.0001$; effet de la drogue : $F(2,22)=1.682$, $p=0.2090$; effet de l'interaction : $F(302,3322)=1.141$, $p=0.0548$

A3. Exemple représentatif d'enregistrements

La trace du haut correspond à un enregistrement en condition contrôle (avant l'application de la drogue) et la trace du bas correspond à la réponse à l'application de TGOT

B1. Effets de l'application de vasopressine sur les neurones activés par la vasopressine

N=20 cellules, 2-way ANOVA, mesures répétées selon les deux paramètres

Effet de l'intervalle d'ISI : $F(151,2869)=37.38$, $p<0.0001$; effet de la drogue : $F(2,38)=4.988$, $p=0.0119$; effet de l'interaction : $F(302,5738)=5.192$, $p<0.0001$

B2. Exemple représentatif d'enregistrements

La trace du haut correspond à un enregistrement en condition contrôle (avant l'application de la drogue) et la trace du bas correspond à la réponse à l'application de vasopressine

C1. Effets de l'application de TGOT sur les neurones activés par la TGOT

N=20 cellules, 2-way ANOVA, mesures répétées selon les deux paramètres

Effet de l'intervalle d'ISI : $F(151,2869)=44.92$, $p<0.0001$; effet de la drogue : $F(2,38)=3.289$, $p=0.0481$; effet de l'interaction : $F(302,5738)=3.939$, $p<0.0001$

C2 : Exemple représentatif d'enregistrements

La trace du haut correspond à un enregistrement en condition contrôle (avant l'application de la drogue) et la trace du bas correspond à la réponse à l'application de TGOT

2.1.2. Electrophysiologie in vivo : EEG cortical

Dans l'optique d'une éventuelle utilisation de nos résultats chez l'Homme, nous avons décidé d'étudier l'EEG avec des électrodes de surface implantées sur le crâne de la souris. La sensibilité des outils de détection expérimentaux associée à la petite taille du cerveau murin en comparaison avec le cerveau humain, permet de détecter des changements d'activité EEG dans le tissu cérébral profond comme ça a déjà été démontré pour le système septo-hippocampal [365].

Pour établir la preuve de concept, nous avons implanté sur le crâne de souris C57BL6 des implants EEG ainsi qu'une canule bilatérale permettant l'administration intra-septale (au niveau du septum latéral dorsal ou intermédiaire) d'agonistes des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine (pour zone d'implantation des canules, voir figure 11 ; résultats de la manipulation Fig 16).

L'administration septale de solution saline module l'activité EEG en diminuant la puissance relative des bandes de fréquence comprises entre 9 et 11Hz (Wilcoxon signed rank, différent from 0, $p < 0.05$, données non présentées dans cette thèse) montrant un effet de l'injection.

Nous avons montré que l'administration d'agonistes ocytocinergiques (TGOT $3 \times 10^{-7}M$) ou de vasopressine ($3 \times 10^{-6}M$) induit des changements dans l'activité EEG qui sont différents de ceux induits par une administration de NaCl (Fig 16A). La puissance relative des bandes de fréquence 1 et 1.5Hz est significativement diminuée par l'administration de TGOT tandis que celle des bandes de fréquence 8.5 et 9Hz est augmentée (Fig 16A). L'administration de vasopressine, elle, induit une diminution significative de la puissance relative de la fréquence 1Hz et une augmentation des bandes de fréquences comprises entre 8 et 10.5Hz (Fig 16B).

Les principaux changements induits par l'administration intra-septale de vasopressine et de TGOT indiquent un impact marqué sur les bandes de fréquences correspondant aux rythmes theta (4-12Hz, [366][367]).

De plus, les changements diffèrent entre les fréquences basses du theta (4-8Hz, theta low) et les fréquences hautes du theta (8-12Hz, theta high).

L'étude des changements EEG induits par les administrations de NaCl, de vasopressine ou de TGOT sur ces deux sous parties de la bande theta nous ont permis de montrer que :

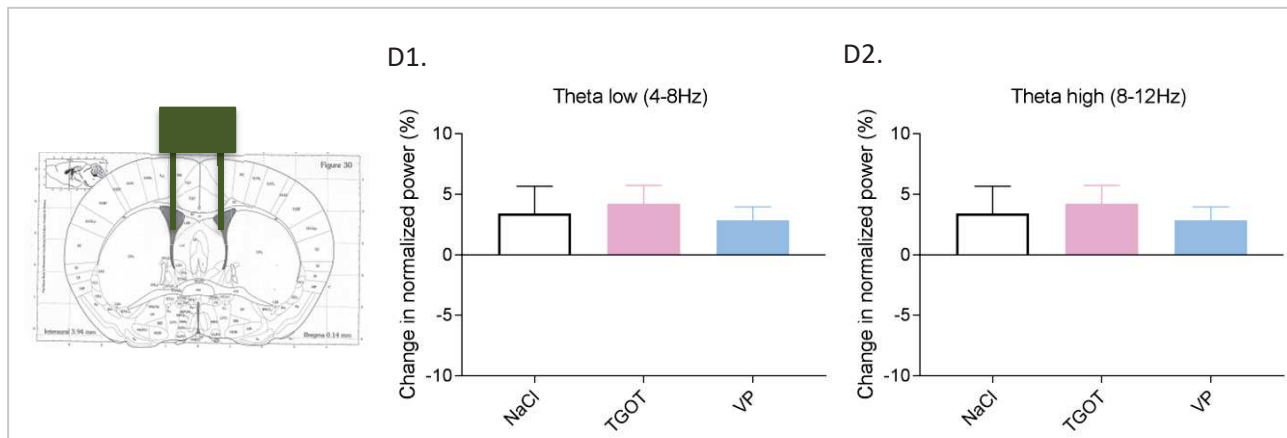
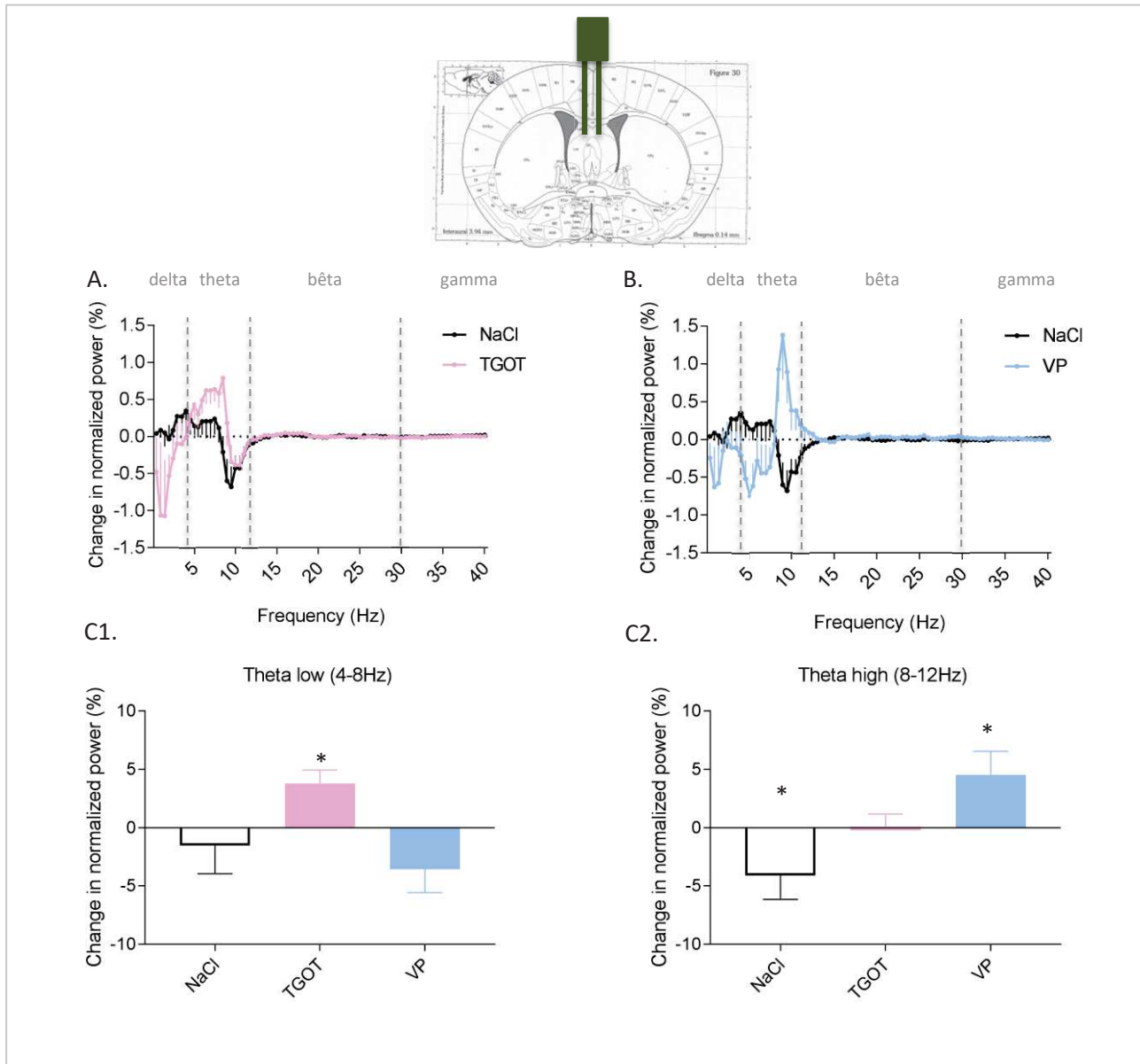
- La puissance relative de la bande de fréquence theta bas n'est modulée que par l'administration intra-septale de TGOT, qui l'augmente (Fig 16 C1).

- La puissance relative de la bande de fréquence theta haut est diminuée par l'administration intra-septale de NaCl et augmenté par l'administration intra-septale de vasopressine (Fig 16C2).

Notons que les effets de l'administration intra-septale de TGOT et de vasopressine sont différents : la TGOT augmente la prépondérance des ondes de type theta bas alors que la vasopressine augmente la prépondérance des ondes de type theta haut.

D'autre part, des injections semblables de TGOT ou de vasopressine réalisées via des canules implantées dans les ventricules latéraux n'induisent pas d'effet sur la bande de fréquence theta (Fig 16D1 et D2). Le nombre d'animaux utilisés dans cette expérience reste faible mais les tendances induites par l'administration intra-cérébro ventriculaire de NaCl, de TGOT ou de vasopressine sont identiques.

Figure 16 : L'administration intra-septale de TGOT ou de vasopressine induit des changements d'activité EEG spécifiques dans la bande theta



Delta (0-4Hz), theta (4-12Hz), bêta (12-30Hz) et gamma (>30Hz) correspondent aux ondes constituant l'activité EEG

A : Comparaison de l'effet d'injections intra-septales de NaCl et de TGOT sur les bandes de fréquences inférieures à 40Hz (Moyennes +/- SEM, N=15 souris pour NaCl, N=10 souris pour TGOT)

2-way ANOVA : Effet de la bande de fréquence : $F(79,1840)=3.089$, $p<0.0001$; effet de la molécule injectée :

$F(1,1840)=0$, $p>0.9999$; effet de l'interaction : $F(79,1840)=1.981$, $p<0.0001$

Comparaison entre groupes par l'analyse Post-hoc de Sidak : $p<0.05$ pour les bandes de fréquences comprises entre 1 et 1.5Hz, 8.5 et 9Hz.

B : Comparaison de l'effet d'injections intra-septales de NaCl et de vasopressine (VP) sur les bandes de fréquences inférieures à 40Hz (Moyennes +/- SEM, N=15 souris pour NaCl, N=9 souris pour VP)

2-way ANOVA : Effet de la bande de fréquence : $F(79,1760)=0.9485$, $p=0.6075$; effet de la molécule injectée :

$F(1,1760)=0$, $p>0.9999$; effet de l'interaction : $F(79,1760)=4.889$, $p<0.0001$

Comparaison entre groupes par l'analyse Post-hoc de Sidak : $p<0.05$ pour les bandes de fréquences 1Hz, et de 8 à 10.5Hz.

C1 : Effets des administrations intra-septales de NaCl, de TGOT ou de VP sur la bande de fréquence correspondant au theta bas (4-8Hz) (Moyennes +/- SEM, N=15 souris pour NaCl, N=10 souris pour TGOT, n=9 souris pour VP)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : NaCl $p=0.9515$, TGOT $p=0.0137$, VP $p=0.2500$

C2 : Effets des administrations de NaCl, de TGOT ou de vasopressine sur la bande de fréquence correspondant au theta haut (8-12Hz) (Moyennes +/- SEM, N=15 souris pour NaCl, N=10 souris pour TGOT, n=9 souris pour VP)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : NaCl $p=0.3750$, TGOT $p=0.1250$, VP $p=0.1250$

D1 : Effets des administrations intra-cérébro-ventriculaires de NaCl, de TGOT ou de VP sur la bande de fréquence correspondant au theta bas (4-8Hz) (Moyennes +/- SEM, N=4 souris pour NaCl, N=5 souris pour TGOT, n=5 souris pour VP)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : NaCl $p=0.951$, TGOT $p=0.0137$, VP $p=0.2500$

D2 : Effets des administrations de intra-cérébro-ventriculaires NaCl, de TGOT ou de vasopressine sur la bande de fréquence correspondant au theta haut (8-12Hz) (Moyennes +/- SEM, N=4 souris pour NaCl, N=5 souris pour TGOT, n=5 souris pour VP)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : NaCl $p=0.2500$, TGOT $p=0.3125$, VP $p=0.4375$

2.2. Discussion

2.2.1. Comparaison avec les résultats des études précédentes

Etudes en lien avec les résultats obtenus ex-vivo :

L'activité électrique des neurones du septum latéral a été décrite par Gallagher [368], [369] qui a montré l'existence de neurones dont les patrons d'activité permettaient de les classer en neurones rythmiques ou non-rythmiques. Il a également décrit l'arborisation dendritique de ces neurones mais n'a pas réussi à montrer de corrélation entre morphologie et activité électrique.

De façon semblable, une étude réalisée chez le cochon d'Inde a également permis de démontrer l'existence de 3 catégories neuronales au sein du septum latéral medio-latéral [370] [371] :

- Classe A (59,2%) : neurones présentant une forte activité électrique en réponse à une légère dépolarisation, leurs potentiels d'action calciques à haut seuil sont insensibles à la tétrodotoxine. Leurs corps cellulaires sont larges et leurs dendrites (dont les primaires sont larges) contiennent des épines
- Classe B (20,7%) : neurones présentant également une forte activité électrique en réponse à une légère dépolarisation, leurs potentiels d'action calciques à haut seuil ne peuvent être générés qu'en présence d'inhibiteurs de courant potassique rectifiant entrant (tetraethylammonium TEA). Leurs corps cellulaires sont petits à moyens et leurs dendrites fines
- Classe C (20,1%) : potentiels d'action sodiques de faible amplitude suivis par des potentiels calciques lents et larges. Les neurones de cette classe ressemblent à ceux de la classe B.

Les premières études du rôle de la vasopressine et de l'ocytocine sur le septum latéral ont été réalisées il y a plus de 30 ans. Des études électrophysiologiques en champ utilisant la réponse du septum à la stimulation de la fimbria [344] mais ne permettant pas de discerner les effets sur une cellule unique, ont été réalisées. Celles-ci ont permis de montrer que ces hormones modulent la réponse du septum latéral à une stimulation des fibres de la fimbria/fornix [372][373].

En appliquant iontophoriquement, chez des rats, de la vasopressine ou de l'ocytocine sur des neurones du septum latéral, il a été montré que plus de 50% des neurones étaient excités, après une période de latence, par de telles applications [374]. Le groupe de Raggenbass a également réalisé plusieurs études visant à décrire l'impact d'applications de vasopressine sur l'activité électrique des neurones du septum latéral [342], [343], [375]. Dans ces études, il est montré que chez le rat, 44% des neurones

répondent à l'application de vasopressine par une augmentation réversible de leur activité électrique et 7% par une diminution de leur activité électrique, les autres ne montrant pas de changement de la fréquence d'émission de leurs potentiels d'action [342].

En utilisant la réponse à l'application de TGOT et à la vasopressine, nous avons également trouvé une façon de classer les neurones qui permet de mettre en relation pattern d'activité électrique et morphologie.

De façon intéressante, les caractéristiques électrophysiologiques des neurones du septum latéral semblent conservés d'une espèce à l'autre. La classe A décrite chez le cochon d'inde pourrait correspondre aux neurones activés par la vasopressine, la classe B aux neurones activés par la TGOT tandis que la classe C correspondrait aux neurones inhibés par ces peptides. Les proportions observées dans les expériences de Raggenbass sont très proches de celles que nous avons déterminé chez la souris suggérant que la régulation vasopressinergique de l'activité septale serait également hautement conservée.

Etudes en lien avec les résultats obtenus in-vivo :

Des études précédentes avaient déjà permis de montrer que l'action de l'ocytocine et de la vasopressine sur le septum avaient des conséquences sur l'activité EEG hippocampique chez le rat [376]. Des expériences réalisées au cours du sommeil paradoxal ont en effet consisté à injecter intra-septalement 3 ou 10 pmoles de l'un de ces peptides et les résultats ont montré une modulation de l'EEG et en particulier des bandes de fréquences correspondant aux ondes theta (4 à 12Hz). Dans cette étude, les auteurs n'ont pas observé de différences quant aux effets induits par l'administration d'ocytocine ou de vasopressine. Notons que les injections réalisées dans cette étude visaient le septum médian et que le fait que celles-ci aient eu lieu au cours du sommeil et non sur une souris éveillée limite les perspectives de cette étude. En effet, l'activité d'autres systèmes et notamment du système cholinergique (important pour l'attention), pourrait déterminer l'impact de l'ocytocine et de la vasopressine libérées au sein du septum sur l'activité hippocampique. Ainsi, notre étude a été réalisée sur des souris éveillées libres de leurs mouvements. D'autre part, dans le but que nos résultats puissent être utilisés dans un cadre transversal, nous avons réalisé des enregistrements EEG de surface, alors que ceux décrits dans ces études sont intra-hippocampiques.

Des études réalisées chez l'Homme ont également permis de montrer que l'administration intranasale d'ocytocine modifie certains paramètres EEG induisant notamment :

- une diminution du couplage entre des ondes de type delta-beta, delta-alpha, theta-alpha et theta-bêta, suggérant une modulation du couplage entre les oscillations neuronales de différentes fréquences [377]
- une suppression des rythmes mu/alpha (8-10Hz) et bêta (15-25Hz) lors de la perception d'un mouvement [378], un mécanisme qui pourrait être important pour le système des neurones miroir.

Néanmoins, dans ces études, le lien avec l'interaction sociale reste très indirect.

2.2.2. Questions soulevées et expériences possibles

L'existence d'un courant dépolarisant induit par l'hyperpolarisation dans les neurones excités par la TGOT soulève plusieurs questions :

- Quelle est l'origine de cette conductance ? Des études précédentes ont permis de montrer que le septum latéral exprime des canaux HCN (Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel) qui pourraient supporter ces effets [379]. L'activation de ces canaux induit un courant I_h connu notamment pour son impact dans la régulation du potentiel d'action cardiaque mais également impliqué dans la régulation de l'activité neuronale dans certaines structures cérébrales [380]. Il n'est pas non plus exclu que cette conductance soit à un courant calcium bas seuil.
- Le blocage (ou l'activation) de cette conductance change-t-il le patron d'activité électrique dans ces neurones ?
- Cette conductance est-elle activée par la TGOT dans les neurones excités par celle-ci expliquant l'activation de ces neurones et la diminution des périodes de silence ? Une conductance similaire est-elle induite par la vasopressine dans les neurones activés par la vasopressine ?

Ces questions ne seront pas traitées dans la suite de cette thèse.

En revanche, d'autres questions ont été poursuivies dans ce travail de thèse:

- Certaines concernant la nature et l'organisation du réseau septal modulé par l'ocytocine et la vasopressine :

- Les effets de la TGOT et de la vasopressine décrits dans ces trois catégories neuronales sont-ils dûs à l'activation directe des neurones enregistrés ?
- La modulation de l'activité électrique d'une catégorie donnée module-elle les événements synaptiques reçus dans une autre catégorie ?
- D'autres concernant le rôle physiopathologique de ces activations
 - Puisque l'activation des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine septaux est essentielle respectivement pour l'habituation sociale et la discrimination sociale, les réponses électrophysiologiques décrites sont-elles altérées dans un modèle animal de troubles sociaux ?
- Ou encore le suivi, in-vivo de ces activations.
 - Peut on utiliser l'EEG afin de déterminer le moment où à lieu l'activation de ces récepteurs au cours d'une tâche sociale ? Une dysfonction de la réponse à l'ocytocine et/ou à la vasopressine se reflète-t-elle sur l'activité EEG enregistrée au cours d'une tâche sociale chez l'individu sain ? chez un individu malade présentant des désordres du comportement social ?

3. Caractérisation du réseau neuronal impliqué

Dans la première partie des résultats de cette thèse, nous avons montré des effets séquentiels de la vasopressine et de l'ocytocine dans le cadre des comportements sociaux. Nous avons fait l'hypothèse que les neurones septaux sensibles à la vasopressine pourraient inhiber la réponse du septum à l'ocytocine via une action de ces deux peptides sur les mêmes neurones ou via une communication entre les neurones sensibles à la vasopressine et les neurones sensibles à l'ocytocine. Ceci expliquerait les effets séquentiels décrits.

Dans cette partie, nous avons étudié la sensibilité des afférences reçues par les neurones septaux à l'ocytocine et/ou à la vasopressine. La réponse à cette question nous permettra de faire des hypothèses quant à l'organisation du réseau neuronal intra-septal et la réponse à l'application de chacun des deux peptides.

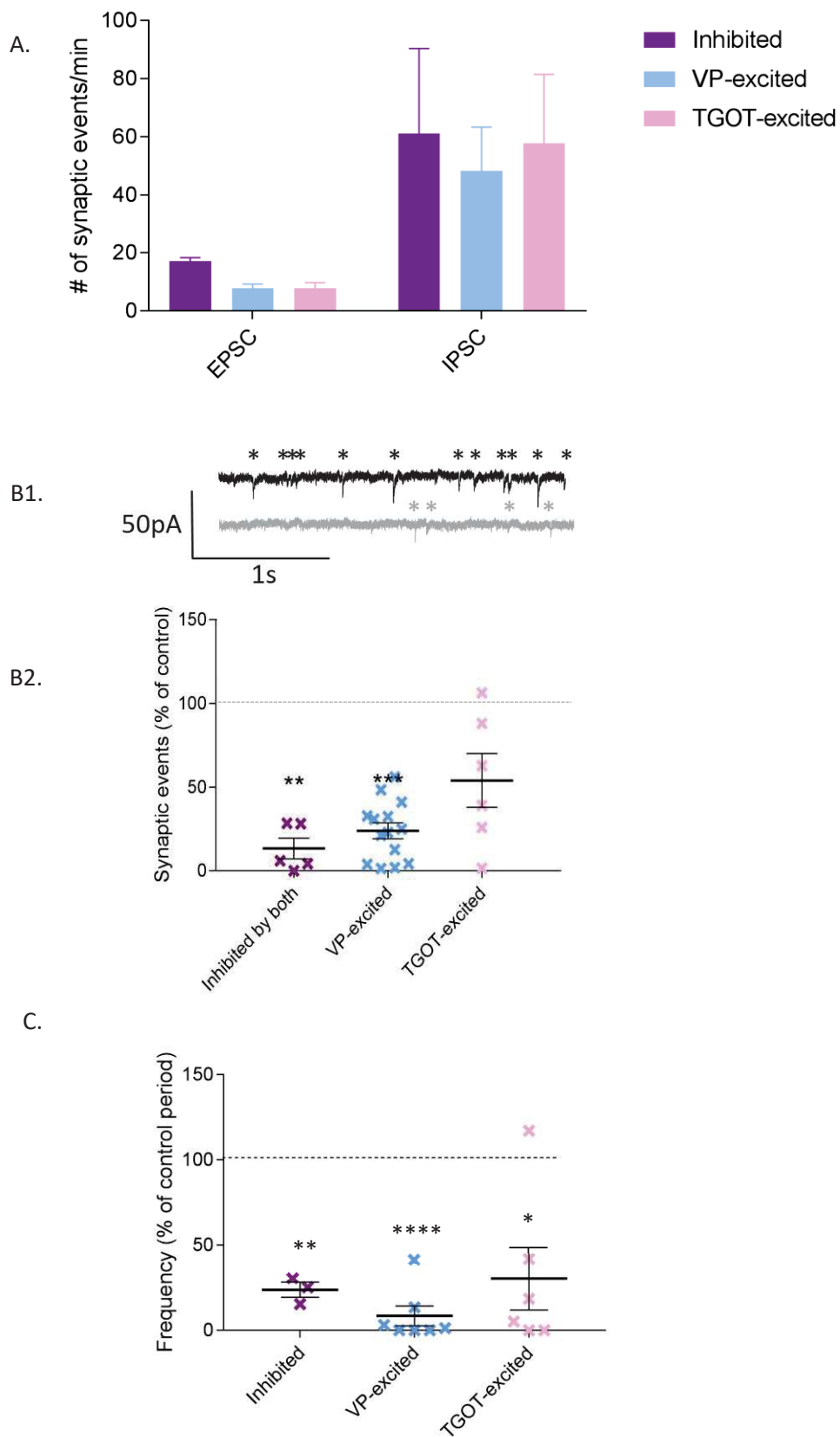
3.1. Résultats

3.1.1. Un réseau local sensible à l'ocytocine et/ou à la vasopressine

Les données obtenues quant à la durée de l'effet induit, ex-vivo, par l'application d'ocytocine et/ou de vasopressine indiquent un effet réseau. Ainsi, nous nous sommes demandé comment les neurones du septum latéral communiquaient entre eux et comment cette communication était modulée par l'application d'agonistes ocytocinergiques ou de vasopressine. Dans ce cadre, nous avons porté notre attention sur l'étude des événements synaptiques reçus par les neurones du septum latéral (Fig 17).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la nature des événements synaptiques reçus par les neurones du septum latéral. La majeure partie des événements synaptiques enregistrés en condition basale sont des événements hyperpolarisants lorsque l'enregistrement est réalisé dans des conditions telles que $E_{Cl^-} = -80mV$ (Fig 17A). Ces événements sont majoritairement de nature GABAergique puisque l'application en bain de GABAzine (un inhibiteur des récepteurs GABA_A) diminue drastiquement l'activité synaptique (Fig 17B). Notons que dans les neurones excités par l'ocytocine, l'application de GABAzine ne diminue l'activité synaptique que de moitié ce qui montre que ces neurones reçoivent également des afférences non-GABAergiques.

Figure 17: L'activité synaptique des neurones du septum latéral est majoritairement liée à l'activité électrique GABAergique locale



A. Nombre d'évènements synaptiques dépolarisants (EPCS: excitatory post-synaptic current) et hyperpolarisants (IPSC : inhibitory post-synaptic currents)

Moyennes +/- SEM, N = 4 cellules inhibées, 14 activées par la vasopressine, 6 activées par la TGOT

Les données ont été acquises à -50mV avec un milieu intra-cellulaire tel que $E_{Cl} = -80mV$, les valeurs indiquées correspondent à une moyenne sur une durée de 3 minutes.

2-way ANOVA : Effet du type d'évènement synaptique (EPCS vs IPSC) : $F(1,42)=11.23$, $p=0.0017$; effet de du type de neurone : $F(2,42)=0.2336$ $p=0.7927$; effet de l'interaction : $F(2,42)=0.04415$, $p=0.9569$

B1. Effet de la GABAzine sur la fréquence d'émission des potentiels d'action: exemple de l'effet obtenu sur un neurone inhibé. Les étoiles correspondent aux évènements synaptiques, la trace noire à une période contrôle précédant l'application de GABAzine et la trace grise à une période pendant l'application de GABAzine

B2. Fréquence normalisée des évènements synaptiques après application de GABAzine

Moyennes +/- SEM, N = 4 cellules inhibées, 14 activées par la vasopressine, 6 activées par la TGOT

Le 100% correspond à l'activité synaptique mesurée avant l'application de GABAzine. Les données ont été acquises à -80mV avec un milieu intra-cellulaire tel que $E_{Cl} = -50mV$

L'activité synaptique est significativement diminuée après application de GABAzine (Wilcoxon signed rank, différent de 100%, respectivement $p=0,002$, $p<0,0001$, $p=0,0352$)

C. Fréquence normalisée des évènements synaptiques hyperpolarisants après application de TTX.

Moyennes +/- SEM, N = 4 cellules Inhibited, 14 activées par la vasopressine , 6 activées par la TGOT

Le 100% correspond à l'activité synaptique mesurée avant l'application de TTX. Les données ont été acquises à -50mV avec un milieu intra-cellulaire tel que $E_{Cl} = -80mV$

L'activité synaptique est significativement diminuée après application de TTX (Wilcoxon signed rank, différent de 100%, respectivement $p=0,0034$, $p<0,0001$, $p=0,0132$)

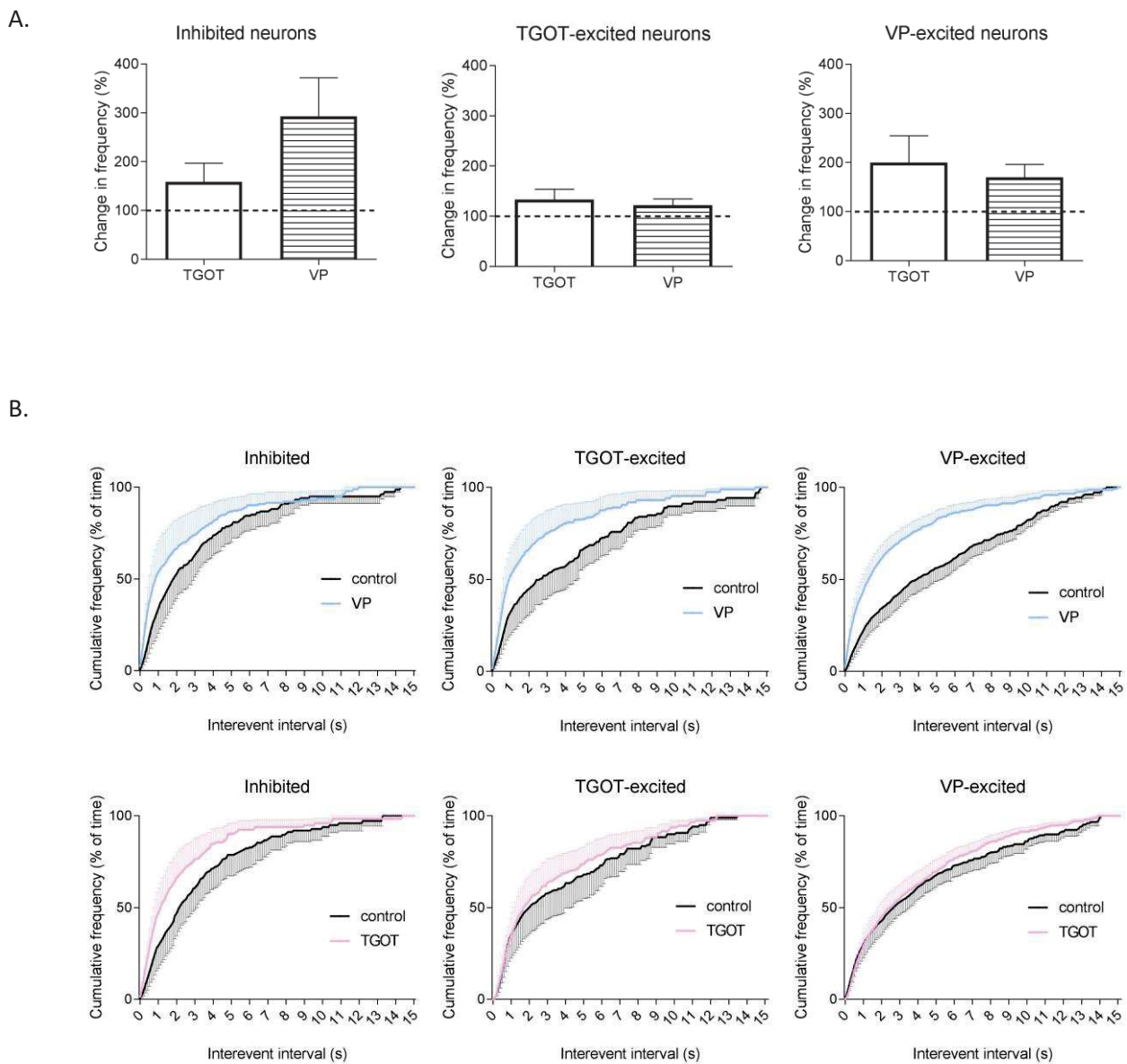
Dans un premier temps, nous avons montré que la majorité des évènements synaptiques reçus sont issus de neurones situés au sein même de la tranche. En effet, l'application de tétrodothine (TTX), un inhibiteur des canaux sodiques qui bloque l'émission de potentiels d'action, induit une diminution drastique de la fréquence des évènements synaptiques spontanés (Fig 17C).

Dans chacune des catégories précédemment évoquées, nous avons étudié l'impact de l'application de TGOT et de vasopressine sur la fréquence des évènements synaptiques reçus (Fig 18). La vasopressine augmente la fréquence des évènements synaptiques dans les neurones excités par la vasopressine mais également dans les neurones inhibés (Fig 18A). Les effets induits par l'application de TGOT ne sont pas significativement différents du 100%.

D'autre part, nous avons étudié l'effet de ces deux peptides sur le patron d'activité des neurones et nous avons ainsi pu observer que la TGOT et la vasopressine modulent toutes les deux le patron d'activité synaptique et cela dans les 3 catégories neuronales identifiées (Fig 18B). L'effet de ces molécules est varié :

- elles ne modulent pas la pente à l'origine de la courbe des intervalles inter-évènements mais diminuent la fréquence des intervalles inter-évènements longs: cas de la TGOT sur les neurones activés par la TGOT et activés par la vasopressine
- elles modulent la pente à l'origine de la courbe des intervalles inter-évènements et augmentent ainsi la fréquence au sein des bursts d'activité synaptique : cas de la vasopressine et de la TGOT sur les neurones inhibés et de la vasopressine sur les neurones VP-excités ou TGOT-excités.

Figure 18: Effet de l'application de TGOT et de vasopressine sur l'activité synaptique des neurones appartenant aux 3 catégories précédemment décrites



A. Effet de l'application de TGOT ou de vasopressine sur la fréquence des évènements synaptiques (enregistrés à -80mV, ECl⁻=-50mV).

De gauche à droite : neurones inhibés, neurones activés par la TGOT, neurones activés par la vasopressine

Moyenne +/- SEM, neurones inhibés : N = 9 pour TGOT et 10 pour VP, neurones activés par la TGOT : N = 9 pour TGOT et 8 pour VP, neurones activés par la VP : N = 15 pour TGOT et 14 pour VP

Wilcoxon signed rank, différent de 100%

Inhibés : effet TGOT p=0.1650, effet VP : p=0,0366

Activés par la TGOT : effet TGOT p=0.1474, effet VP : p=0,1242

Activés par la vasopressine : effet TGOT p=0.0882, effet VP : p=0,0183

B. Effet de l'application de TGOT ou de vasopressine sur le patron de l'activité synaptique : fréquence cumulative des IPSC (enregistrés à -80mV, ECl⁻=50mV)

De gauche à droite : neurones inhibés, neurones activés par la TGOT, neurones activés par la vasopressine

Moyenne +/- SEM, neurones inhibés : N = 6 pour TGOT et 6 pour VP, neurones activés par la TGOT : N = 7 pour TGOT et 7 pour VP, neurones activés par la vasopressine : N = 15 pour TGOT et 18 pour VP

Wilcoxon t-test : p<0,0001 pour tous les tracés représentés

Dans un second temps, nous avons réalisé des expériences visant à déterminer si l'impact de la TGOT ou de la vasopressine sur l'activité électrique de chacune des catégories cellulaires est direct (dépendant uniquement de la cellule enregistrée) ou dépendant d'un effet réseau avec un relai au sein de la tranche. Pour cela, nous avons enregistré l'activité électrique des neurones du septum latéral en présence d'inhibiteurs des événements synaptiques GABAergiques (GABAzine) et nous avons étudié l'impact de l'application de TGOT ou de vasopressine sur celle-ci (Fig 19). Si l'impact de ces drogues est inchangé par l'application de GABAzine, cela signifie que les neurones répondent indépendamment des afférences GABAergiques qu'elle reçoivent suggérant un mécanisme "cell-autonomous". Si, au contraire, les cellules perdent leur réponse, l'activité synaptique GABAergique est nécessaire pour induire une réponse électrique à la TGOT ou à la vasopressine et celle-ci est donc probablement dépendante de l'activation/inhibition d'autres cellules de la tranche suggérant un effet réseau.

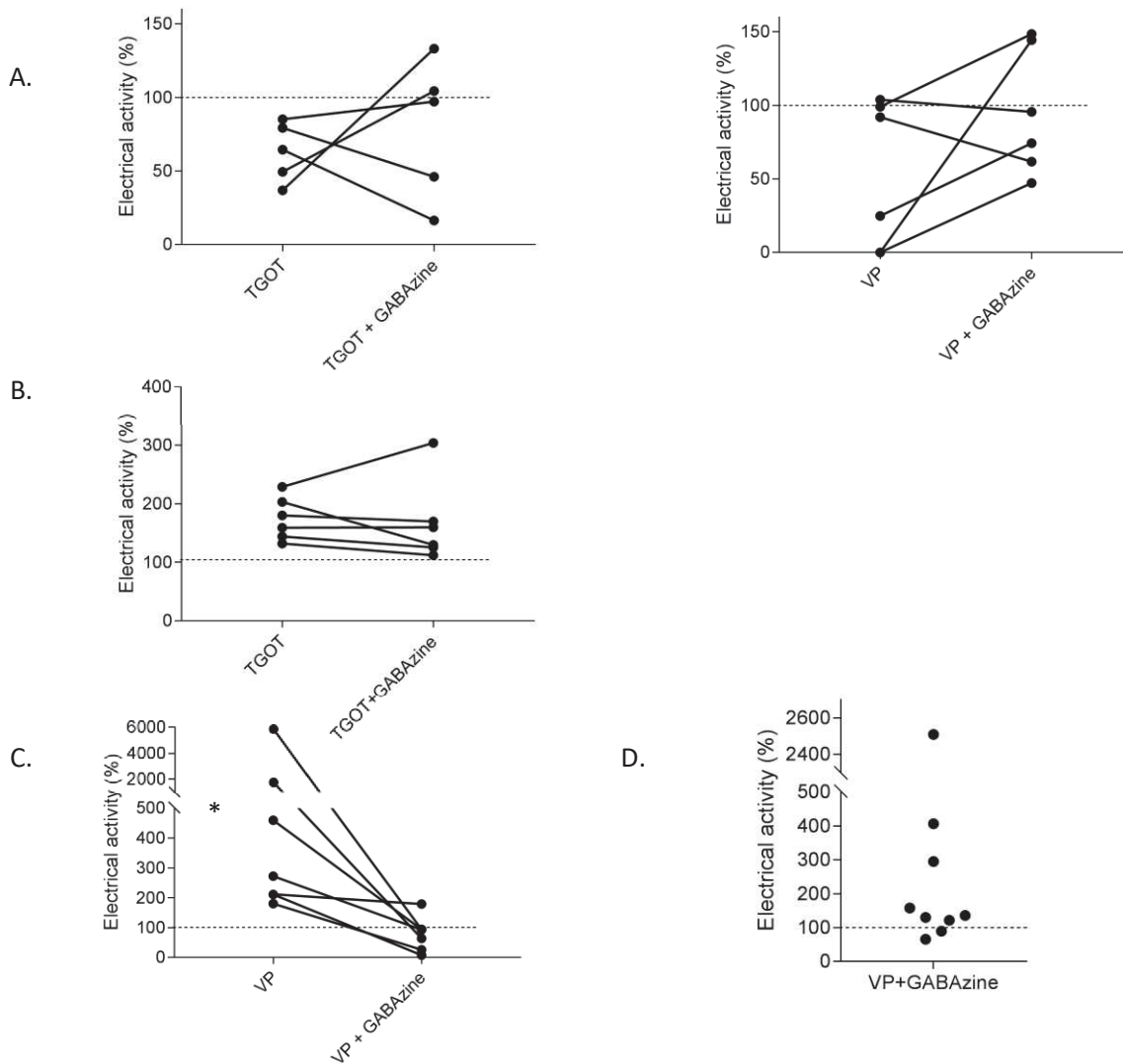
Dans les neurones inhibés (Fig 19A), l'effet de la TGOT ou de la vasopressine sur la fréquence d'émission des potentiels d'action est indépendante des événements synaptiques GABAergiques.

L'effet activateur de la TGOT sur les neurones activés par la TGOT est également indépendant de la présence d'événements synaptiques GABAergiques (Fig 19B).

En revanche, lorsque ces expériences sont réalisées sur les neurones excités par la vasopressine, nous observons que leur réponse électrique à l'application de vasopressine est perdue en présence de GABAzine (Fig 19C). Ce résultat est surprenant car ces neurones reçoivent des événements synaptiques GABAergiques dont la fréquence augmente suite à l'application de vasopressine. En effet, ceci suggère que l'application de vasopressine devrait diminuer l'activité électrique de ces neurones (via un effet dû à l'entrée de chlore ou un effet shunt membranaire) or, la vasopressine augmente l'activité électrique de ces neurones.

Nous avons donc conçu une nouvelle expérience consistant à inhiber les événements synaptiques GABAergiques à l'aide de GABAzine mais nous avons simulé l'arrivée d'événements synaptiques en induisant des sauts de courant (intensité du courant injecté ajustée de façon à ce que le saut soit de 5mV (quelques pA de courant injectés), sauts de 10s toutes les 21s) (Fig 19D). Ceci nous a permis de simuler une activité synaptique (ou plutôt un burst d'activité synaptique semblable à ce qui est observé dans ces neurones) insensible à l'application de vasopressine. Dans ces conditions, l'effet d'une application de vasopressine sur la fréquence d'émission des potentiels d'action est restauré. Ceci suggère que la vasopressine agit pour augmenter l'impact d'une variation du potentiel de membrane au niveau de la cellule et la rend plus sensible aux variations de courant induites par les événements synaptiques.

Figure 19: Effets de la GABAzine sur les changements d'activité électrique induits par la TGOT et la VP



A à C : changements (%) dans la fréquence d'émission des potentiels d'action induits par l'application de vasopressine et/ou de TGOT en absence ou en présence de GABAzine.

A : Neurones inhibés, N=5 neurones pour la TGOT, N=6 neurones pour la VP

B : Neurones activés par la TGOT, N=6 neurones

C : Neurones activés par la VP : N=6 neurones

Paired t-test (Wilcoxon) : A, TGOT : $p=0,6250$, VP : $p=0,1503$; B : $p=0,5625$; C : $p=0,0156$

D : Changements (%) dans la fréquence d'émission des potentiels d'action induits par l'application de vasopressine dans des neurones VP-excités soumis à des sauts de courant dépolarisants en présence de GABAzine, N=9 cellules

Wilcoxon signed rank : différent de 100% : $p=0.0391$

3.1.2. Résultats préliminaires : Modulation *in vivo* de l'activité des fibres ocytocinergiques du septum latéral issues du PVN

Des expériences d'inhibition optogénétique des terminaisons ocytocinergiques du septum latéral ont été réalisées. Pour cela, des animaux exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de l'ocytocine ont été utilisés. Une stratégie virale a été employée afin de faire exprimer aux neurones ocytocinergiques du PVN une eYFP seule (condition contrôle) ou avec une halorhodospine (NpHR3.0) (Fig 20A). Une fibre optique a été mise en place au niveau du septum latéral de manière à stimuler les fibres ocytocinergiques de cette structure uniquement (Fig 20B).

Dans un premier temps, nous avons vérifié le taux d'infection des neurones du PVN (Fig 20C) et dont le phénotype est ocytocinergique (Fig 20D) suite à l'injection intra-PVN de virus contrôle eYFP ou NpHR3.0-eYFP. Notons que dans certains des neurones infectés du PVN (Fig 20E), l'expression de la neurophysine I n'est pas retrouvée. Cela peut être dû à une expression trop faible de ce peptide ne permettant pas le marquage immuno-histochimique, ou bien une perte d'expression temporaire de l'ocytocine dans ces cellules. En effet, l'expression des transgènes validée par l'expression de eYFP peut se matérialiser si et seulement si, l'enzyme cre recombinase a été exprimée dans ces cellules, même si cette expression est transitoire. Ce résultat pose la question de la stabilité du phénotype ocytocinergiques des cellules du PVN. Cependant, la proportion faible de ces cellules et l'indéterminable expression transitoire du phénotype de ces cellules dans un protocole d'experimentation longitudinal nous a poussé à négliger cette catégorie cellulaire.

Lors des expériences de reconnaissance/discrimination sociale mises en place, la stimulation a été induite au cours de la 3^{ème} rencontre, un choix justifié par les expériences pharmacologiques précédentes qui nous ont permis de décrire un effet physiologique des récepteurs ocytocinergiques endogènes lors de la 3^e rencontre suite à des injections intra-septales d'atosiban.

Le temps d'interaction au cours de la première rencontre est similaire dans les deux groupes étudiés (Fig 20F).

Chez les animaux infectés avec un virus permettant l'expression de la eYFP comme chez ceux infectés avec un virus permettant l'expression de l'halorhodopsine, on observe une habituation au stimulus social

(diminution du temps d'interaction induit par la présentation répétée d'un juvénile) malgré la stimulation lumineuse ayant lieu lors de la 3^{ème} rencontre (Fig 20G).

Lorsque l'on compare le temps d'interaction lors de la première interaction avec le premier juvénile au temps d'interaction avec le nouveau juvénile (stimulation optogénétique au cours de la 3^{ème} rencontre), on remarque que (Fig 20G) :

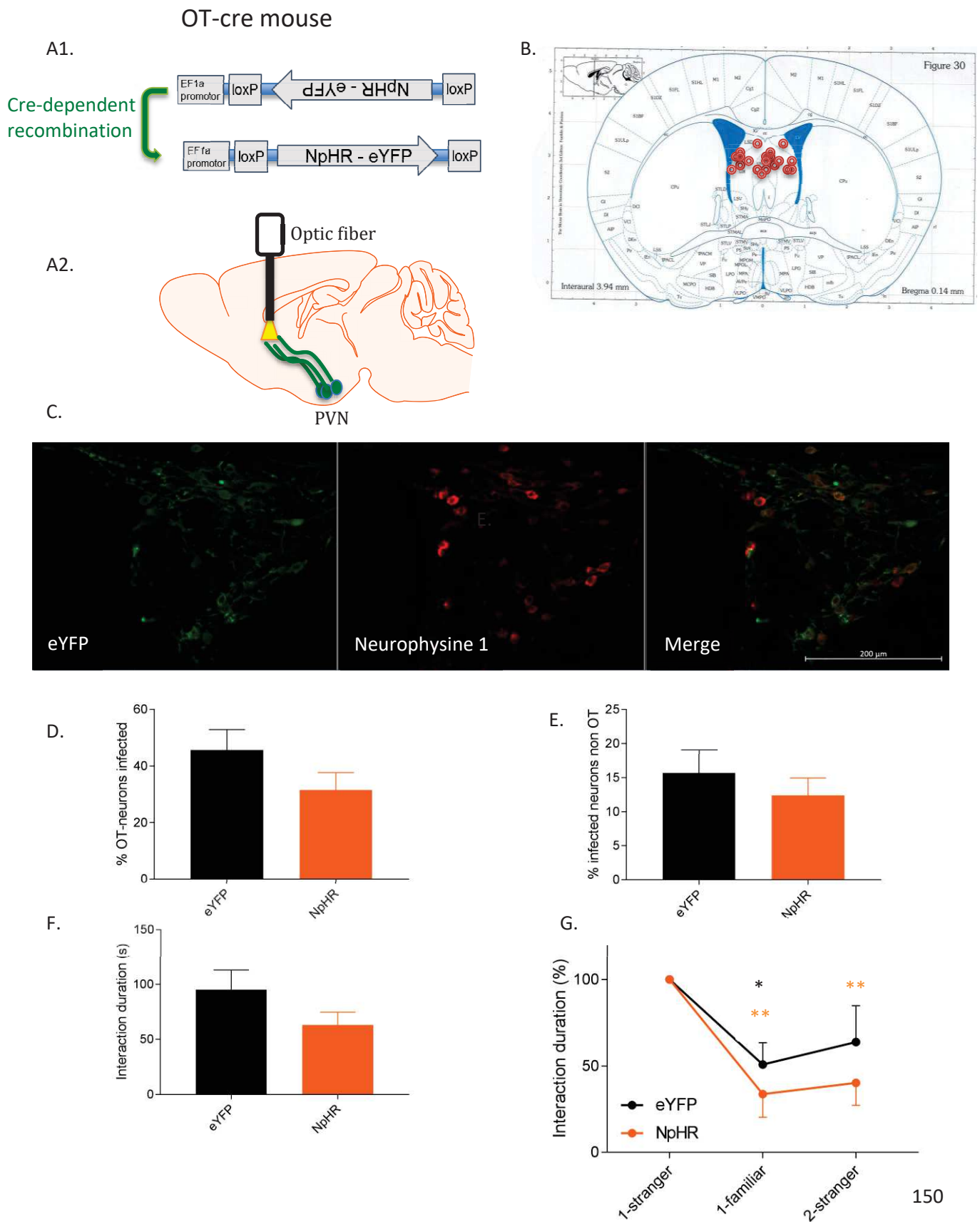
- Chez les animaux infectés avec un virus eYFP, le temps d'interaction n'est pas significativement réduit entre la première interaction et celle avec un nouveau juvénile
- Chez les animaux infectés avec le virus eYFP-NpHR3.0, le temps d'interaction est significativement réduit entre la première interaction et celle avec un nouveau juvénile

Ceci suggère que l'inhibition des terminaisons ocytocinergiques induite par la stimulation optogénétique empêche la discrimination sociale.

Ce résultat, bien que préliminaire et nécessitant d'être confirmé sur une cohorte plus grande, est similaire à ce qui avait été observé chez les animaux recevant une injection intra-septale d'antagoniste des récepteurs de l'ocytocine au même moment.

Ainsi, il semble que l'ocytocine soit libérée par les terminaisons synaptiques septales issues du PVN lorsqu'un animal connu est à nouveau rencontré et ceci est nécessaire au regain d'intérêt induit par la présentation d'un nouveau juvénile.

Figure 20 : Résultats préliminaires suggérant que l'inhibition optogénétique des terminaisons ocytocinergiques du septum latéral altère la discrimination sociale



- A. Représentation du dispositif expérimental utilisé.
- A1. Représentation schématique de la recombinaison induite par la cre-recombinase
- A2. Représentation schématique du cerveau d'une souris OT-cre, de la zone d'implantation des canules ainsi que des neurones du PVN exprimant la eYFP après recombinaison et projetant jusqu'au septum.
- B. Sites d'implantation des fibres optiques dans le septum lateral de N=10 souris. 1 point correspond a 1 site.
- C. Recombinaison des constructions virales (vert : eYFP) spécifique des neurones ocytocinergiques (rouge : marquage neurophysine 1) – échelle : 200µm
- D. Taux d'efficacité de recombinaison des constructions virales par quantification des neurones ocytocinergiques du PVN co-marqués par eYFP et neurophysine (prenant en compte les 2 PVN) - moyenne +/- SEM, N=4 souris eYFP, 6 souris NpHR - t-test
T-test Mann Whitney : p=0.3524
- E. Quantification des neurones infectés par le virus dans lesquels le marquage neurophysine I n'est pas visible - moyenne +/- SEM, N=4 souris eYFP, 6 souris NpHR
T-test Mann Whitney : p=0.4762
- F. Durée de l'interaction avec le premier juvénile présenté chez de souris infectées avec un virus eYFP (N=5 souris) ou un virus NpHR (N=5 souris) - moyenne +/- SEM
T-test Mann Whitney : p=0.3095
- G. Effet de la stimulation jaune du septum latéral lors de la 3^{ème} interaction chez des souris infectées avec un virus eYFP (N=5 souris) ou NpHR (n=5 souris) sur l'habituation et la discrimination sociale - moyenne +/- SEM
2-way ANOVA, mesures répétées : Effet des présentations successives $F(2,16)=12.78$ $p=0.0005$; effet du virus $F(1,8)=1.55$ $p=0.2484$; effet de l'interaction $F(2,16)=0.496$, $p=0.6180$; validité de l'appariement $F(8,16)=1.189$, $p=0.3639$
Comparaison entre groupes par analyse post-hoc de Sidak :
eYFP : 1-stranger vs 1-familiar : 0,0232, 1-stranger vs 2-stranger : $p=0.1023$
NpHR : 1-stranger vs 1-familiar : $p=0.0029$, NpHR 1-stranger vs 2-stranger : $p=0.0065$
* : différent de la durée d'interaction avec la première présentation de la première souris

Les études post-mortem ont été réalisées avec l'aide de deux étudiants qui ont effectué un stage au laboratoire : Djodi Dufner et Laurie Maubernard

3.2. Discussion

3.2.1. Principaux résultats et interprétations possibles

Les résultats obtenus montrent que les événements synaptiques spontanément reçus par les neurones du septum latéral sont dépendants de l'activité électrique des neurones présents dans la tranche et de nature majoritairement GABAergique. De plus, cette activité synaptique est significativement augmentée par la vasopressine dans les neurones activés par la vasopressine ainsi que dans les neurones inhibés. D'autre part, la TGOT et la vasopressine sont tous les deux capables de moduler le patron des activités synaptiques reçues par toutes les catégories de neurones du septum latéral :

- après application de vasopressine, les changements dans le patron de l'activité synaptique rappellent ceux qui avaient eut lieu en terme de patron d'activité électrique dans les neurones activés par la vasopressine après l'application de ce peptide
- après application de TGOT, les changements dans le patron de l'activité synaptique rappellent ceux du patron de l'activité électrique dans les neurones activés par la TGOT après l'application de ce peptide

Une hypothèse que l'on peut émettre est que les neurones activés par l'un ou l'autre des peptides seraient fortement connectés aux autres neurones du septum. Ainsi, lorsque ces neurones sont activés, ils communiquent plus avec les autres neurones de la tranche augmentant ainsi la fréquence des événements synaptiques reçus par ces autres neurones.

Dans les conditions de l'enregistrement, ces modulations de l'activité synaptique sont sans impact sur les changements d'activité électrique. En effet, dans les neurones excités par la VP, la TGOT module les événements synaptiques sans moduler l'activité électrique et inversement dans les neurones activés par la TGOT pour les effets de la vasopressine. Notons qu'il est possible, qu'in vivo, ces modulations de l'activité synaptique aient un impact sur l'activité électrique directement ou sur l'intégration des informations issues d'autres structures cérébrales (fibres issues de l'hippocampe par exemple).

Notons de plus que ces événements synaptiques ne sont nécessaires aux changements électriques induits par les peptides. Ceci suggère que les effets des peptides sont directs et ce sur les 3 catégories neuronales. Une autre hypothèse, pourrait être que les récepteurs, situés sur les astrocytes, induisent une modulation des réseaux neuronaux indépendante de la modulation induite sur l'activité synaptique.

Bien que des études complémentaires doivent être menées afin de comprendre l'organisation du réseau septal et sa régulation par l'ocytocine et à la vasopressine, nos résultats montrent que les neurones sont organisés en réseau et que l'ocytocine et la vasopressine modulent l'activité électrique des neurones du septum latéral mais également leurs inter-communications.

Dans cette partie, nous avons présenté des résultats préliminaires quant aux effets de l'inhibition des terminaisons ocytocinergiques du septum latéral au cours du processus d'habituation. Les données suggèrent que le blocage de l'activité des afférences issues du PVN serait suffisant pour induire des troubles sociaux similaires à ceux observés lors du blocage local des récepteurs de l'ocytocine. Ces données seront complétées prochainement et appuient l'hypothèse selon laquelle cette modulation de l'activité de neurones septaux par l'ocytocine intervient dans la régulation du comportement social. Une étude similaire concernant l'inhibition des terminaisons vasopressinergiques est en cours.

3.2.2. Comparaison avec les résultats des études précédentes

Etudes en lien avec les résultats obtenus ex-vivo :

Une étude précédente [381] avait déjà suggéré que les neurones du septum latéral sont connectés localement via des protubérences qui semblent être des boutons en passant. D'autre part, une étude du même groupe [382] a permis de montrer que les neurones du septum latéral sont très connectés entre eux et que certains neurones forment des couples dont les milieux intra-cellulaires sont en contact et que des échanges, probablement dendrodendritiques ou dendro-somatique, sont possibles. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que cette proximité serait importante pour synchroniser la sortie d'informations et pourrait jouer un rôle dans la régulation des rythmes theta hippocampiques.

Parmi les études précédentes, plusieurs se sont portées sur le rôle de la vasopressine dans l'intégration septale des informations issues de l'hippocampe.

Ainsi, chez le rat, les terminaisons vasopressinergiques et les terminaisons des fibres issues de l'hippocampe innervent les somas des mêmes neurones au sein du septum [383]. Plusieurs études avaient déjà suggéré que la vasopressine libérée au sein du septum pouvait moduler l'action des fibres hippocampo septales contenant des acides-aminés excitateurs. En effet, alors que l'application de vasopressine induit une dépolarisation dans certains neurones, il avait déjà été montré que les neurones ne répondant pas à l'application par une telle dépolarisation répondaient néanmoins par une augmentation de l'amplitude des potentiels excitateurs post-synaptiques induits par la stimulation de la fimbria (induite dans 80% des

neurones enregistrés) [346]. Une étude plus récente dirigée par Raggenbass [343] a permis de montrer que, en l'absence de stimulation de la fimbria, les neurones du septum sont sous l'influence d'un tonus inhibiteur GABAergique et que ce tonus est augmenté suite à l'activation des récepteurs V1a de la vasopressine. Dans cette étude, ils montrent également que l'application de vasopressine peut induire l'activation d'une sous-catégorie neuronale du septum qui serait ensuite responsable de cette inhibition touchant la plupart des neurones du septum latéral.

L'une des conséquences du rôle de la vasopressine dans la modulation de l'intégration des informations issues de l'hippocampe serait sa capacité à moduler la mémoire. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la vasopressine est essentielle au maintien d'une LTP dans le septum suite à la stimulation de la fimbria [384].

Le rôle de l'ocytocine dans la modulation de la transmission synaptique a été moins étudiée dans le septum mais elle l'a été dans l'hippocampe. En effet, dans l'hippocampe, elle module notamment la transmission synaptique glutamatergique (et où cette modulation est perdue suite à un stress prénatal) [385] et l'activité des interneurons fast-spiking [386]. Cette modulation a pour conséquence une amélioration de la transmission des informations. Un rôle similaire au sein du septum (permettant de synchroniser les bursts d'activité par exemple) est possible.

Etudes en lien avec les résultats obtenus in-vivo :

A notre connaissance, seulement deux études ont utilisé des outils optogénétiques afin de montrer un effet pro-social du système ocytocine/vasopressine :

- la première, utilisant une channelrhodopsine adressée aux neurones vasopressinergiques du PVN a permis de montrer que l'activation des terminaisons vasopressinergiques de l'aire CA2 augmente la durée de la mémoire sociale [93]
- la seconde utilisant une halorhodopsine adressée aux neurones ocytocinergiques a permis de montrer que l'inhibition contexte-dépendante des terminaisons ocytocinergiques de l'aire tegmentale ventrale empêche l'acquisition d'une préférence de place induite par le comportement social [387]

Pour notre étude, nous avons décidé d'utiliser l'halorhodopsine (eNpHR3.0) qui, bien que critiquée car elle se désensibilise et module l'homéostasie du chlore [388], a été validée pour la modulation de l'activité des terminaisons ocytocinergiques dans une étude récente dirigée par R. Malenka [387]. Les résultats

obtenus restent à compléter mais la similitude des effets obtenus avec cette technique et avec l'utilisation des antagonistes décrits en partie 1 suggère que l'ocytocine activant physiologiquement les récepteurs septaux de l'ocytocine lors de la présentation d'un congénère déjà rencontré serait issue d'afférences venant du noyau paraventriculaire.

3.2.3. Questions soulevées et expériences possibles

Suite à l'obtention de ces résultats, plusieurs questions se posent :

- Quelle est la voie de sortie du septum latéral responsable des effets de l'ocytocine et/ou de la vasopressine ? Dans ce cadre, nous avons réalisé des expériences de traçage utilisant des billes rétrogrades injectées dans le septum médian afin d'étudier les neurones du septum latéral projetant vers le septum médian et jouant donc un rôle dans la régulation de la boucle hippocampo-septo-hippocampique. Les neurones du septum latéral contenant des billes fluorescentes ont été enregistrés et l'activité électrique des neurones en réponse à l'application de TGOT et de vasopressine a été déterminée. Ainsi, les neurones responsables de la projection vers le septum médian enregistrés ont chacun été classés dans l'une des 3 catégories décrites précédemment. Parmi les 6 neurones enregistrés dont nous avons pu identifier la nature de la réponse à l'application de TGOT et de vasopressine, 5 sont des neurones inhibés (le dernier est un neurone excité par la TGOT). Sachant que ces neurones représentent 20% des neurones du septum latéral, nous avons ici un biais évident suggérant que les neurones du LS projetant vers le MS sont les neurones inhibés par les deux peptides. Rappelons qu'un schéma des connections septo-hippocampe est présenté figure 8 et l'impact de la modulation par l'ocytocine et la vasopressine du circuit septal sur l'activité septo-hippocampique sera discuté dans la discussion générale.
- Les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont-ils effectivement exprimés par tous les neurones sensibles à ces peptides ? Pour répondre à cette question, les outils manquent. En effet, le seul anticorps permettant de marquer les récepteurs du système ocytocine/vasopressine est un anticorps ciblant les récepteurs de l'ocytocine [124] et non commercialisé. Nous avons réalisé des tests immuno-histochimiques mais lors de ceux-ci, un marquage a pu être observé sur des coupes de cerveaux issues de souris OT-R KO indiquant que le protocole que nous avons utilisé ne permet pas un marquage spécifique.
- Une inhibition optogénétique des fibres vasopressinergiques au niveau du septum latéral reproduit-elle l'effet de l'administration intra-septale d'antagonistes des récepteurs V1a ? Est ce

que l'activation des fibres ocytocinergiques ou vasopressinergiques du septum latéral permettrait d'améliorer les comportements sociaux ? Une activation des fibres ocytocinergiques à un moment du test ou de l'ocytocine n'est physiologiquement pas libérée induirait-elle une altération du comportement social ? Et en ce qui concerne la vasopressine ? Ces expériences dont l'enjeu potentiel a des visés thérapeutiques, sont en cours au laboratoire.

4. Caractérisation d'une trace EEG corticale dépendante de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine mis en jeu lors des comportements sociaux

L'étude électrophysiologique menée ex-vivo nous a permis de mieux comprendre les effets de l'ocytocine et de la vasopressine sur l'activité des neurones du septum latéral et d'envisager d'utiliser l'EEG comme un paramètre non-invasif jugeant de l'activation endogène des systèmes ocytocinergique ou vasopressinergique dans le septum. Nous avons vu que les administrations intra-septales de TGOT ou de vasopressine induisent des changements spécifiques dans l'activité EEG. Les expériences comportementales réalisées dans la première partie montrent une activation septale des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine au cours de phases différentes de l'interaction sociale. Par la suite, nous nous sommes donc demandé :

- si la signature d'activité EEG évoquée par l'administration intra-septale de vasopressine est physiologique et détectée pendant la première interaction avec un juvénile inconnu
- si la signature d'activité EEG évoquée par l'administration intra-septale de TGOT est physiologique et détectée pendant la phase de familiarisation avec un juvénile précédemment rencontré.

4.1. Résultats

4.1.1. Caractérisation de traces EEG induites par l'interaction sociale et l'habituation sociale

Des souris C57B6/J ont été implantées avec un système de mesure de l'EEG cortical. Après une phase de récupération, ces animaux ont été soumis à un protocole de reconnaissance sociale. L'impact des différentes phases de reconnaissance/discrimination sociale (première interaction, habituation, présentation d'un nouvel individu) sur l'activité EEG a été étudié (Fig 21).

Pour cela, et afin de s'affranchir de la variabilité inter-individuelle,

- 1. nous avons établi le profil de l'activité EEG au cours d'une période contrôle et nous l'avons soustrait à celui obtenu lors de la première interaction avec un juvénile (bande de fréquence à bande de fréquence). La trace obtenue représente les changements EEG induits par la 1^{ère} rencontre avec un juvénile inconnu
- 2. nous avons établi le profil de l'activité EEG au cours de la première interaction et nous l'avons soustrait à celui obtenu au cours des interactions suivantes avec le même juvénile

(bande de fréquence à bande de fréquence). La trace obtenue représente les changements EEG induits par l'habituation.

- 3. La trace représentant les changements EEG induits par l'interaction avec un nouveau juvénile ont été obtenues comme décrit en 1. ; la trace induite par la première interaction avec le premier juvénile étant remplacée par la trace induite par la rencontre d'un nouveau juvénile.
1. Les changements EEG induits par la première interaction sociale sont caractérisés par une diminution de la puissance relative des bandes de fréquences comprises entre 5 et 8,5 Hz et une augmentation de celles comprises entre 9 et 28.5 Hz ainsi qu'entre 29.5 et 33Hz et entre 36 et 38Hz (Fig 21A1). Ces modifications (et notamment l'augmentation des bandes de fréquences correspondant à du theta haut) ressemblent à celles obtenues lors d'une administration intra-septale de vasopressine.
 2. Les changements EEG induits par l'habituation sociale, sont caractérisés par une augmentation de la puissance relative des bandes de fréquence comprises entre 5 et 8 Hz et une diminution de celles comprises entre 9,5 et 11 Hz. Une diminution de la puissance relative des bandes de fréquences 19.5Hz, 25 à 32.5Hz, 33.5 à 35.5Hz, 36Hz et 37.5 à 39.5Hz est également induite par l'habituation sociale (Fig 21A2).

Ces changements sont observés lorsque l'on compare les traces induites par la 2^{ème}, la 3^{ème} ou la 4^{ème} présentation à celle induite par la 1^{ère} interaction (données non présentées dans cette thèse).
 3. Les changements EEG induits par l'interaction avec le nouveau juvénile sont similaires à ceux qui étaient induits par la première présentation du premier juvénile (augmentation des bandes de fréquences entre 12.5 et 14 Hz, entre 15 et 15.5Hz, à 16.5Hz et entre 20.5 et 21Hz) (Fig 21A3).

Lorsque les 3 courbes ainsi obtenues sont comparées, on remarque que celle correspondant à l'habituation est différente des deux autres (entre 1 et 1.5Hz, à 2.5Hz, à 4.5Hz, entre 7.5 et 8.5Hz, 10 à 10.5Hz) tandis qu'au sein de ces bandes de fréquences, celles correspondant aux nouvelles présentations d'un juvénile sont identiques (Fig 21B1).

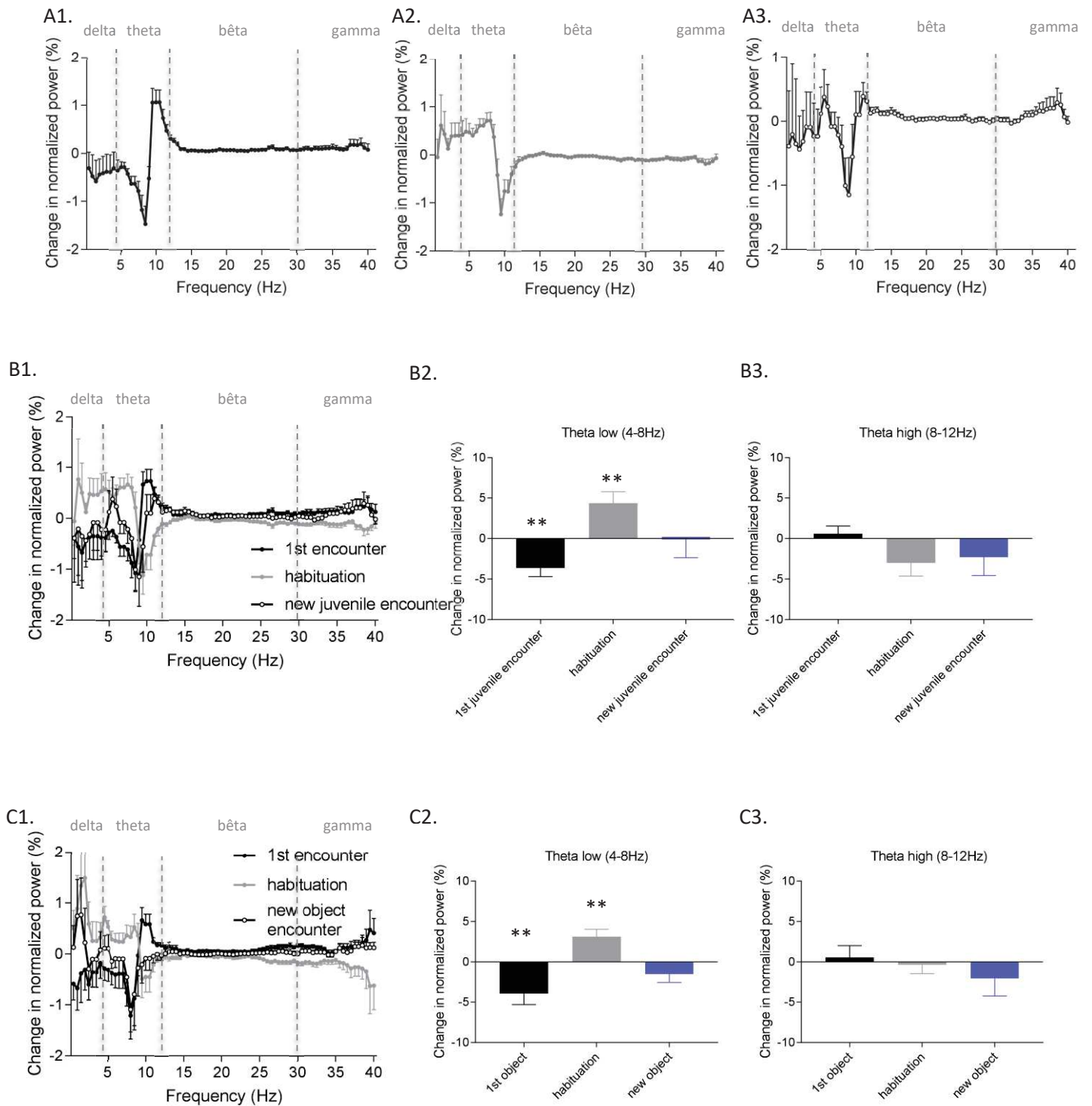
De plus, la rencontre avec le premier juvénile induit une diminution significative de la puissance relative de la bande theta bas (Fig 21B2) sans effet sur la bande theta haut (Fig 21B3) tandis que l'habituation induit une augmentation de la puissance relative de la bande theta bas (Fig 21B2) toujours sans influence sur la bande de fréquence theta haut (Fig 21B3).

De façon intéressante, lorsque les mêmes paramètres sont étudiés sur des animaux réalisant un test de reconnaissance des objets, les changements d'activité EEG induits par ces 3 phases sont similaires à ceux observés au cours de l'interaction sociale (Fig 21C).

Ainsi, les différentes phases d'interaction discriminées lors du test comportemental utilisé induisent des changements d'activité EEG spécifiques et ceux-ci rappellent ceux que nous avons décrit suite à l'application intra-septale de TGOT ou de vasopressine. En effet, l'administration intra-septale de vasopressine induit une augmentation significative de la puissance relative des bandes de fréquences comprises entre 8 et 10.5Hz et l'interaction sociale avec un juvénile inconnu induit également une augmentation de la puissance relative des ondes comprises entre 9.5 et 10.5Hz. De plus, l'administration intra-septale de TGOT induit une augmentation significative de la puissance relative de la bande de fréquence correspondant au theta bas qui est également induite par l'habituation sociale.

Notons que les changements induits dans l'activité EEG par l'interaction sociale ou l'administration intra-septale de TGOT ou de vasopressine ne suivent pas exactement le découpage classique de l'EEG en ondes theta (ou même en ondes theta haut/theta bas).

Figure 21 : Des changements spécifiques dans l'activité EEG induits par l'interaction avec un juvénile ou un objet inconnu et un juvénile ou un objet familier



Delta (0-4Hz), theta (4-12Hz), bêta (12-30Hz) et gamma (>30Hz) correspondent aux ondes constituant l'activité EEG

A. Changements d'activité EEG induits par l'interaction sociale

A1 : changements induits par l'interaction avec le premier juvénile (EEG obtenu au cours de la période contrôle soustrait à celui obtenu au cours de la première interaction) – Moyennes +/- SEM de N= 15 souris
Wilcoxon signed rank, différent de 0, $p < 0,05$ entre 5 et 28.5Hz, 29.5 et 33Hz, 36 à 38Hz

A2 : changements induits par le processus d'habituation (EEG obtenu au cours de la première interactions soustrait à celui obtenu au cours de la 4^{ème} interaction) – Moyennes +/- SEM de N=15 souris
Wilcoxon signed rank, différent de 0, $p < 0,05$ entre 5 à 8Hz ; 9.5 et 11.5Hz ; 19.5Hz, 25 à 32.5Hz, 33.5 à 35.5 Hz, 36.5Hz, 37.5H à 39.5Hz

A3 : changements induits par l'interaction avec le nouveau juvénile (EEG obtenu au cours de la période contrôle soustrait à celui obtenu au cours de la première interaction) – Moyennes +/- SEM de N=12 souris
Wilcoxon signed rank, différent de 0, $p < 0,05$ pour 12.5 à 14Hz, 15 à 15.5Hz, 16.5Hz, 20.5 à 21Hz

B. Changements d'activité EEG induits par les différentes phases de l'interaction sociale, N=12 souris

B1. Changements dans le profil EEG induits par la rencontre avec un nouveau juvénile ou par l'habituation sociale

2-way ANOVA mesurées répétées selon les deux paramètres : Effet de la fréquence : $F(79,869)=1.155$, $p=0.1763$; effet de la présentation : $F(2,22)=0,3112$ $p=0.7358$; effet de l'interaction : $F(158,1738)=1.635$, $p < 0.0001$

Comparaison par analyse post hoc de Tukey :

1st encounter vs habituation, $p < 0,05$: 1Hz à 1,5Hz ; 2,5 à 5Hz, 6 à 8,5Hz ; 9,5 à 11Hz

Habituation vs new juvenile encounter : $p < 0,05$ pour 1 à 1,5Hz ; 2,5Hz ; 4.5Hz ; 7,5Hz à 8,5Hz ; 10Hz à 10,5Hz

1st encounter vs new juvenile encounter : $p < 0,05$ pour 9,5Hz

B2. Effet des différentes phases d'interaction sociale sur la bande de fréquence theta bas (4-8Hz)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : 1st juvenile encounter $p=0.0093$, habituation $p=0.0049$, new juvenile encounter $p=0.8501$

B3. Effet des différentes phases d'interaction sociale sur la bande de fréquence theta haut (8-12Hz)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : 1st juvenile encounter $p=0.7910$, habituation $p=0.0771$, new juvenile encounter $p=0.2334$

C. Changements d'activité EEG induits par les différentes phases de l'interaction avec un objet, N=10 souris

C1. Changements dans le profil EEG induits par la rencontre avec un nouveau juvénile ou par l'habituation sociale

2-way ANOVA mesurées répétées selon les deux paramètres: Effet de la fréquence : $F(79,711)=1.177$, $p=0.1503$; effet de la présentation : $F(2,18)=0,6747$ $p=0.5217$; effet de l'interaction : $F(158,1422)=1.956$, $p<0.0001$

1st encounter vs habituation, $p<0,05$: 0,5 à 2,5Hz ; 4,5Hz ; 5Hz ; 7,5 à 8,5Hz ; 9,5Hz à 10,5Hz ; 39,5Hz et 40 Hz

Habituation vs new object encounter : $p<0,05$ pour 2Hz ; 2,5Hz ; 7,5Hz à 8,5Hz

1st encounter vs new object encounter : $p<0,05$ pour 1Hz ; 1,5Hz ; 9,5Hz

C2. Effet des différentes phases d'interaction avec un objet sur la bande de fréquence theta bas (4-8Hz)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : 1st object encounter $p=0.0059$, habituation $p=0.0098$, new object encounter $p=0.1934$

C3. Effet des différentes phases d'interaction avec un objet sur la bande de fréquence theta haut (8-12Hz)

Wilcoxon signed rank, différent de 0 : 1st object encounter $p=0.3750$, habituation $p=0.6250$, new object encounter $p=0.8457$

4.1.2. Des traces dépendantes de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine et/ou de la vasopressine

Afin de savoir si ces changements d'activité EEG sont effectivement dépendants de l'activation septale des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine les expériences comportementales décrites en partie 1 ont été réalisées en parallèle d'une mesure de l'activité EEG. Les expériences précédentes ayant permis de montrer que les changements dans l'activité EEG induites par l'interaction et l'habituation sociale ont principalement lieu dans la bande de fréquence 4-12Hz correspondant aux ondes theta, nous avons décidé d'étudier ces changements après administration d'antagonistes des récepteurs de la vasopressine ou de l'ocytocine.

Drogue administrée au cours de la première rencontre (Fig 22B et 22C) :

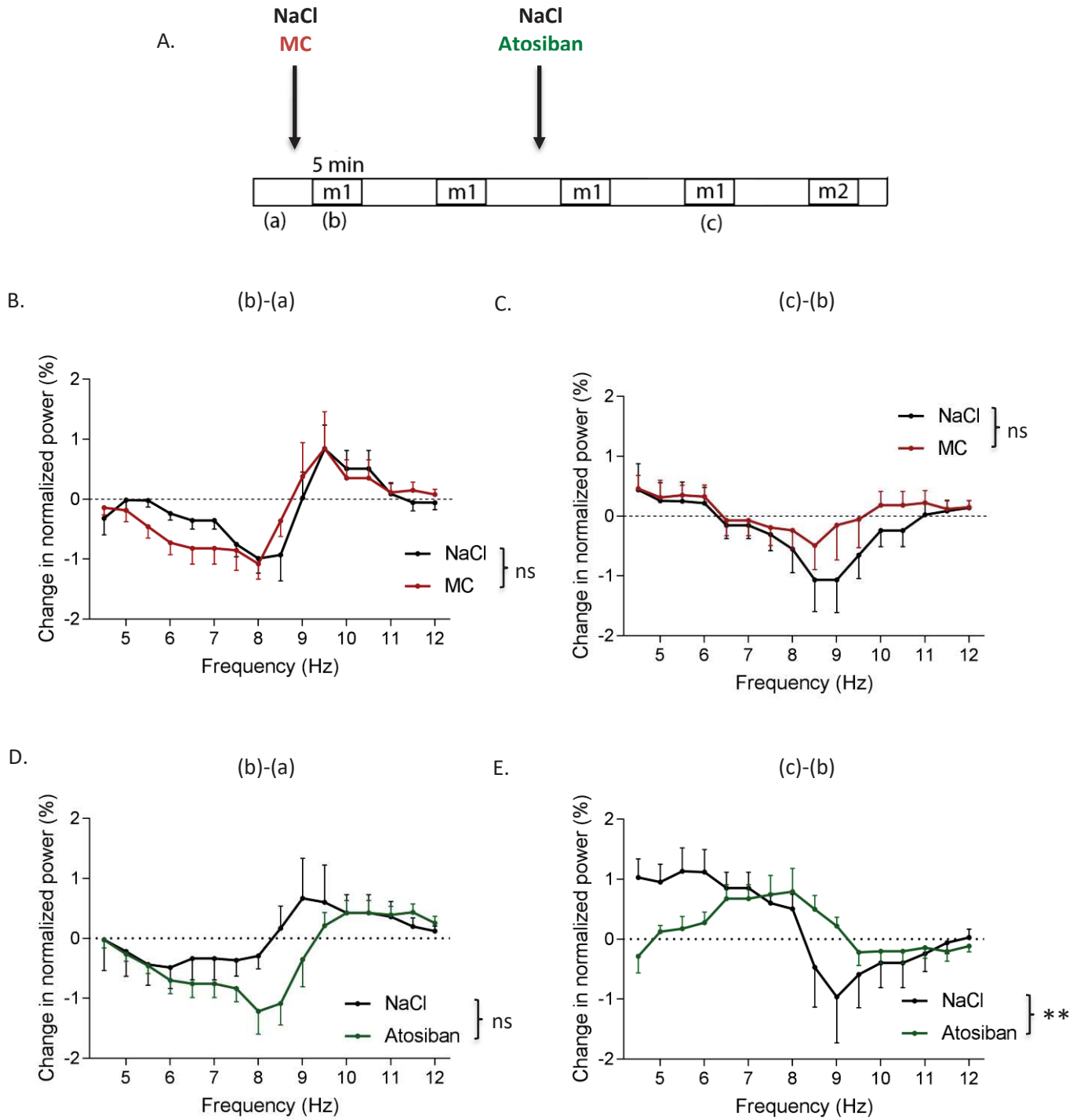
L'administration septale d'antagonistes des récepteurs V1a (Manning compound, $3 \times 10^{-6} \text{M}$) au cours de la première rencontre n'a pas d'impact sur les changements d'activité EEG induits par l'interaction avec le premier juvénile (Fig 22B).

Pour calculer l'impact de l'habituation sociale sur l'activité EEG nous soustrayons, à la valeur de puissance relative de theta obtenue lors de la 4^{ème} rencontre, celle obtenue au cours de la 1^{ère} rencontre. L'injection ayant eu lieu au cours de la première rencontre, et nous savons que l'administration intra-septale de NaCl a un effet sur l'activité EEG (voir figure 16), il est possible que celle-ci ait altérée la réponse EEG. Lorsque nous observons les changements EEG induits par l'habituation sociale et que nous comparons le groupe ayant reçu une administration intra-septale de NaCl à celui ayant reçu une administration intra-septale de Manning Compound, nous n'observons pas de différence significative (Fig 22C).

Drogue administrée au cours de la troisième rencontre (Fig 22D et 22E) :

Les groupes utilisés pour l'administration intra-septale d'atosiban ou de NaCl au cours de la 3^{ème} interaction, présentent des réponses EEG similaires lors de l'interaction avec le premier juvénile (pas d'interaction entre la molécule administrée et la fréquence étudiée) (Fig 22C). En revanche, l'impact de l'habituation sociale sur l'EEG est altéré par l'administration intra-septale d'atosiban (Fig 22D).

Figure 22 : Les changements d'activité EEG induits par l'habituation sociale sont dépendants de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine



Changements EEG dans la bande de fréquence correspondant au theta (4-12Hz) induits par

A. Time-line de l'expérience

M1 correspond aux présentations de la première souris, M2 à la présentation de la nouvelle souris

Les périodes (a), (b) et (c) ont été considérées pour l'analyse des changements d'activité EEG induits par l'interaction ou l'habituation sociale

B. La première interaction sociale après administration intraseptale de NaCl ou de Manning Compound lors de la première interaction sociale (N=9 animaux dans le groupe NaCl, 8 dans le groupe MC, moyenne +/- SEM)

2-way ANOVA mesures répétées, Effet de la bande de fréquence : $F(15,225)=8.41$ $p<0.0001$; effet de la molécule injectée : $F(1,15)=0.1102$ $p=0.7445$; effet de l'interaction : $F(15,225)=0.7756$, $p=0.7040$; validité de l'appariement : $F(15,225)=5.154$, $p<0.0001$

C. L'habituation sociale après administration intraseptale de NaCl ou de Manning Compound lors de la première interaction sociale (N=9 animaux dans le groupe NaCl, 8 dans le groupe MC, moyenne +/- SEM)

2-way ANOVA mesures répétées, Effet de la bande de fréquence : $F(15,225)=2.947$ $p=0.0003$; effet de la molécule injectée : $F(1,15)=1.264$ $p=0.2786$; effet de l'interaction : $F(15,225)=0.4305$, $p=0.9690$; validité de l'appariement : $F(15,225)=5.038$, $p<0.0001$

D. La première interaction sociale après administration intraseptale de NaCl ou d'Atosiban lors de la 3ème interaction sociale (N=6 animaux par groupe, moyenne +/- SEM)

2-way ANOVA mesures répétées, Effet de la bande de fréquence : $F(15,150)=3.963$ $p<0.0001$; effet de la molécule injectée : $F(1,10)=5.826$ $p=0.0364$; effet de l'interaction : $F(15,150)=0.9736$, $p=0.4858$; validité de l'appariement : $F(10,150)=1.245$, $p=0.2672$

E. L'habituation sociale après administration intraseptale de NaCl ou d'atosiban lors de la 3ème interaction sociale (N=6 animaux par groupe, moyenne +/- SEM)

2-way ANOVA mesures répétées, Effet de la bande de fréquence : $F(15,150)=5.053$ $p<0.0001$; effet de la molécule injectée : $F(1,10)=0.1066$ $p=0.7508$; effet de l'interaction : $F(15,150)=2.652$, $p=0.0014$; validité de l'appariement : $F(11,150)=4.637$, $p<0.0001$

Les * présentées sur les graphiques correspondent à la significativité de l'interaction entre les deux paramètres étudiés (fréquence et molécule injectée)

4.2. Discussion

4.2.1. Comparaison avec les résultats des études précédentes

Parmi les études réalisées précédemment, certaines avaient déjà mis en évidence des changements d'activité EEG liés aux interactions sociales. En particulier, une étude réalisée par Tendler et Wagner [389] s'est intéressée aux modifications de l'activité EEG induite par les interactions sociales au cours d'un protocole social similaire au notre. Dans cette étude, le potentiel de champ local a été mesuré dans plusieurs structures cérébrales (bulbe olfactif principal et accessoire, amygdale, cortex pyriforme et septum latéral) en réponse à l'interaction sociale. L'interaction sociale induit une augmentation de la fréquence des événements dans la bande de fréquence correspondant au theta qui s'altère au fil des présentations successives. Notons que l'une des structures au centre de cette étude est le septum latéral et que dans celle-ci également, les changements décrits ont eu lieu au cours de l'interaction sociale.

Dans notre étude, un résultat similaire (changements dans la bande de fréquence correspondant au theta) a été reproduit à partir d'enregistrements réalisés avec des électrodes de surface. Bien que ne donnant pas d'information quant à l'origine des variations dans l'activité EEG enregistrée, un tel enregistrement a l'avantage d'être réalisable chez l'Homme et ceci de manière non invasive via l'utilisation d'électrodes de surface qui peuvent être placées sur le cuir chevelu. De plus, les changements d'activité EEG induits par l'habituation sont dépendants de l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine. Ceci suggère que l'utilisation de l'EEG pourrait permettre de détecter une altération de la modulation du réseau septal par l'ocytocine mis en jeu lors d'un comportement social.

4.2.2. Questions soulevées et expériences possibles

Suite à l'obtention de ces résultats, plusieurs questions se sont posées. La plus intéressante étant probablement la suivante : une dysfonction du réseau décrit jusqu'ici a-t-elle lieu dans le cadre de pathologies telles que les troubles du spectre autistiques, du syndrome de Prader Willi ou du syndrome de Schaaf Yang ? Si oui, peut-on évaluer ces troubles via l'analyse des changements de l'activité EEG induite par l'interaction sociale ?

L'étude de ces questions fait l'objet de la partie 5 de ces résultats.

5. Les souris Magel2KO présentent des déficits d'activité du système ocytocine/vasopressine septal

5.1. Résultats

Comme nous l'avons discuté précédemment, les souris Magel2KO constituent un modèle intéressant pour étudier l'impact d'un défaut septal de réponse à l'ocytocine et/ou à la vasopressine. En effet, les études réalisées chez ces animaux [255][254] ont permis de montrer une altération du système ocytocine/vasopressine et cette altération touche notamment au septum latéral (récepteurs ocytocinergiques moins exprimés dans le septum latéral et immunoréactivité des fibres ocytocinergiques augmentée).

5.1.1. Evaluation du nombre de sites de liaison de l'ocytocine et de la vasopressine

Afin d'évaluer l'impact de la délétion du gène Magel2 sur le système ocytocine/vasopressine décrit, la première étape a consisté à déterminer si ces animaux présentent une altération du nombre de sites de liaison de l'ocytocine et de la vasopressine au sein du septum (Fig 23).

Des expériences d'autoradiographie ont été menées dans l'objectif de confirmer et de compléter les résultats obtenus dans l'étude dirigée par F. Muscatelli [255]. En effet, cette étude avait permis de montrer une diminution du nombre de sites de liaison à l'ocytocine dans le septum latéral des souris Magel2KO mais l'étude n'avait pas prêté attention aux récepteurs V1a de la vasopressine.

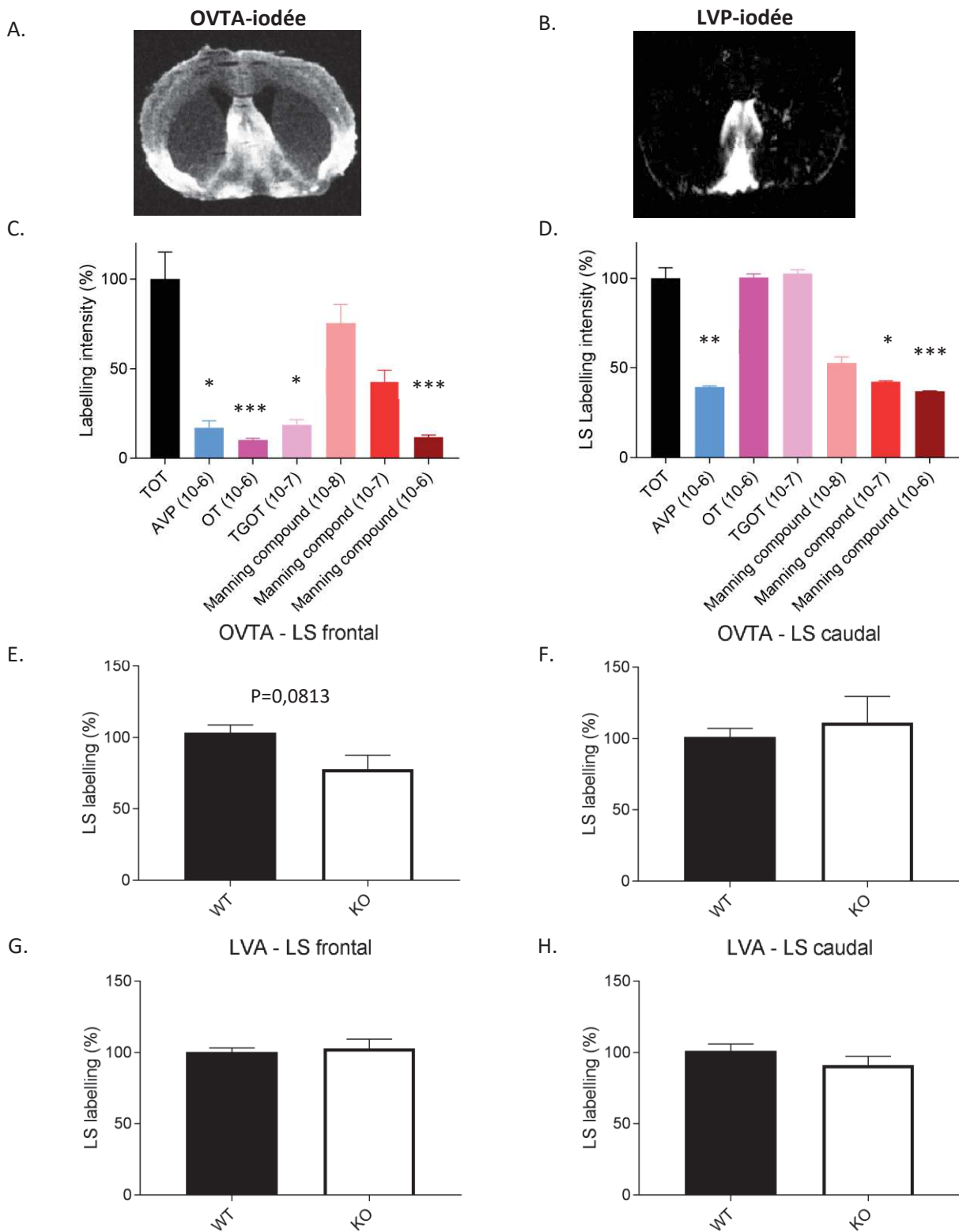
Dans un premier temps, la sélectivité des outils a été vérifiée par des expériences de déplacement. Celles-ci ont permis de confirmer que les ligands radiomarqués utilisés, OVTA et LVP, sont spécifiques respectivement des récepteurs de l'ocytocine et des récepteurs V1a de la vasopressine (Fig 23A et 23B). En effet, la TGOT déplace le marquage induit par le ligand OT-R et le manning compound à des doses faibles déplace le marquage induit par le ligand V1a-R. Notons que la vasopressine induit un déplacement du marquage OT-R ce qui est dû à la faible sélectivité de cet agoniste endogène aux concentrations utilisées.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une hétérogénéité antéro-postérieure de l'effet de la déficience en gène Magel2 sur le nombre de sites de liaison du récepteur de l'ocytocine. En effet, lorsque la partie la plus rostrale du septum est étudiée, nous retrouvons la diminution du nombre de sites de liaison aux récepteurs de l'ocytocine chez les souris Magel2KO décrite dans l'étude de Muscatelli (Fig 23C) (bien que dans notre étude, nous ne trouvons qu'une tendance non significative probablement dû à un nombre trop

faible d'animaux utilisés). En revanche, l'étude de la partie caudale du septum ne permet pas de mettre en évidence une telle différence (Fig 23D).

En ce qui concerne le nombre de sites V1a, aucune différence n'a été obtenue entre les animaux WT et les animaux Magel2KO (Fig 23E et 23F).

Figure 23 : Une diminution du nombre de sites de liaisons de l'ocytocine dans la partie frontale du septum latéral chez des souris Magel2KO sans altération du nombre de sites de liaison de la vasopressine



TOT : total, OT = ocytocine, VP = vasopressine ; concentrations indiquées en moles/L (M)

- A. Exemple de marquage obtenu après incubation d'une tranche de cerveau de souris WT contenant le septum latéral avec l'OVTA iodée (couleurs inversées)
- B. Exemple de marquage obtenu après incubation d'une tranche de cerveau de souris WT contenant le septum latéral avec la LVP iodée (couleurs inversées)
- C. Déplacement de la liaison de l'OVTA-iodée dans le septum latéral chez des souris WT (Moyennes +/- SEM, n=4 coupes pour la vasopressine, n=6 coupes pour les autres)
Kruskal Wallis $p < 0.0001$; Post-hoc : TOT vs AVP $p = 0.0185$, TOT vs OT $p = 0.0001$, TOT vs TGOT $p = 0.0214$, TOT vs Manning compound 10-6M $p = 0.0009$; * : vs TOT
- D. Déplacement de la liaison de la LVP-iodée le septum latéral chez des souris WT (Moyennes +/- SEM, n=4 coupes pour l'ocytocine, n=6 coupes pour les autres)
Kruskal Wallis $p < 0.0001$; Post-hoc : TOT vs AVP $p = 0.0027$, TOT vs Manning compound 10-7M $p = 0.0314$; TOT vs Manning compound 10-6M $p < 0.0001$; * : vs TOT

E à H. radiomarquage dans la partie frontale (C et E) ou caudale (D et F) du LS après incubation avec l'OVTA (C et D) ou la LVP (E et F) chez des animaux Magel2 WT ou KO (Moyennes +/- SEM, N animaux par groupe)

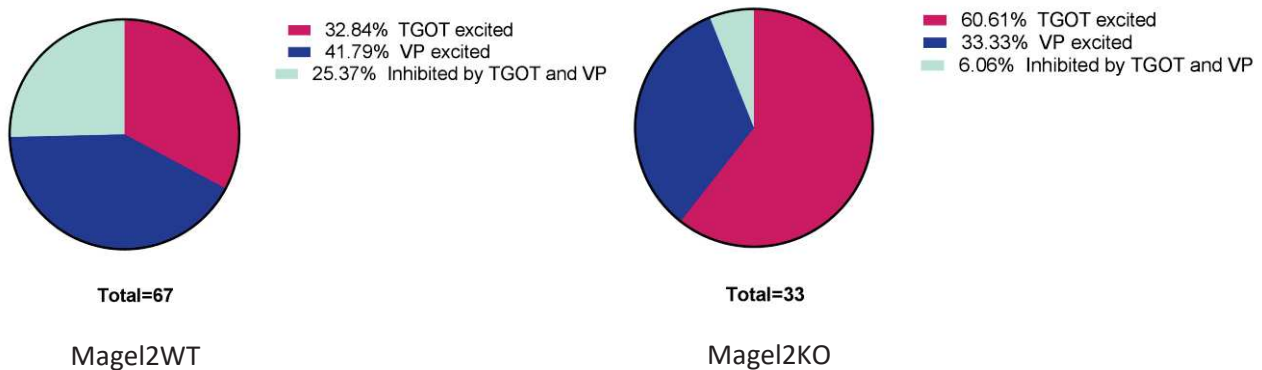
- E. N=6 WT et 8 KO
- F. N=5 WT et 6 KO
- G. N=6 WT et 7 KO
- H. N=6WT et 6 KO

T-test (Mann Whitney) : A $p = 0.0813$; B $p = 0.6623$; C $p > 0.9999$; D $p = 0.1797$

5.1.2. Une réponse électrophysiologique à l'ocytocine et à la vasopressine altérée chez les animaux Magel2KO

L'étude électrophysiologique sur tranche aiguë de cerveau a permis de montrer que les neurones du septum latéral de souris Magel2KO sont sensibles à l'ocytocine et à la vasopressine et les 3 catégories précédemment décrites sont retrouvées. Néanmoins, les proportions de neurones appartenant à chacune des 3 catégories décrites précédemment sont changées chez les souris Magel2KO par rapport aux souris WT issues des mêmes portées (Fig 24). Les souris Magel2KO possèdent moins de neurones inhibés par l'application de TGOT et/ou de vasopressine et le nombre de neurones excités par la TGOT, lui, augmente fortement.

Figure 24 : Modification des proportions de neurones appartenant à chacune des catégories précédemment décrites chez les souris Magel2KO



5.1.3. Des défauts de comportements sociaux corrélés à des défauts dans l'activité EEG

Les résultats présentés précédemment traduisent une altération de la réponse des neurones du septum latéral à l'ocytocine et à la vasopressine chez les souris Magel2KO. Comme nous avons vu que la réponse septale à ces deux peptides est essentielle à la régulation des comportements sociaux, nous avons fait l'hypothèse suivante : les troubles sociaux des souris Magel2KO pourraient être dû à un défaut de la réponse septale à ces deux peptides.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons d'abord évalué la nature des troubles sociaux observés chez les souris Magel2KO afin de voir s'ils reproduisent les effets d'administration intra-septale d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine et/ou à la vasopressine. Si tel était le cas, nous pourrions envisager la possibilité que ces animaux présentent des troubles ocytocinergiques et/ou vasopressinergiques qui pourraient éventuellement expliquer ces troubles.

Dans un premier temps, nous avons évalué la durée de l'interaction avec un juvénile inconnu (Fig 25A). Ce paramètre n'est pas modifié par la déficience du gène Magel2. Le processus d'habituation, lui non plus, n'est pas affecté par la délétion du gène Magel2.

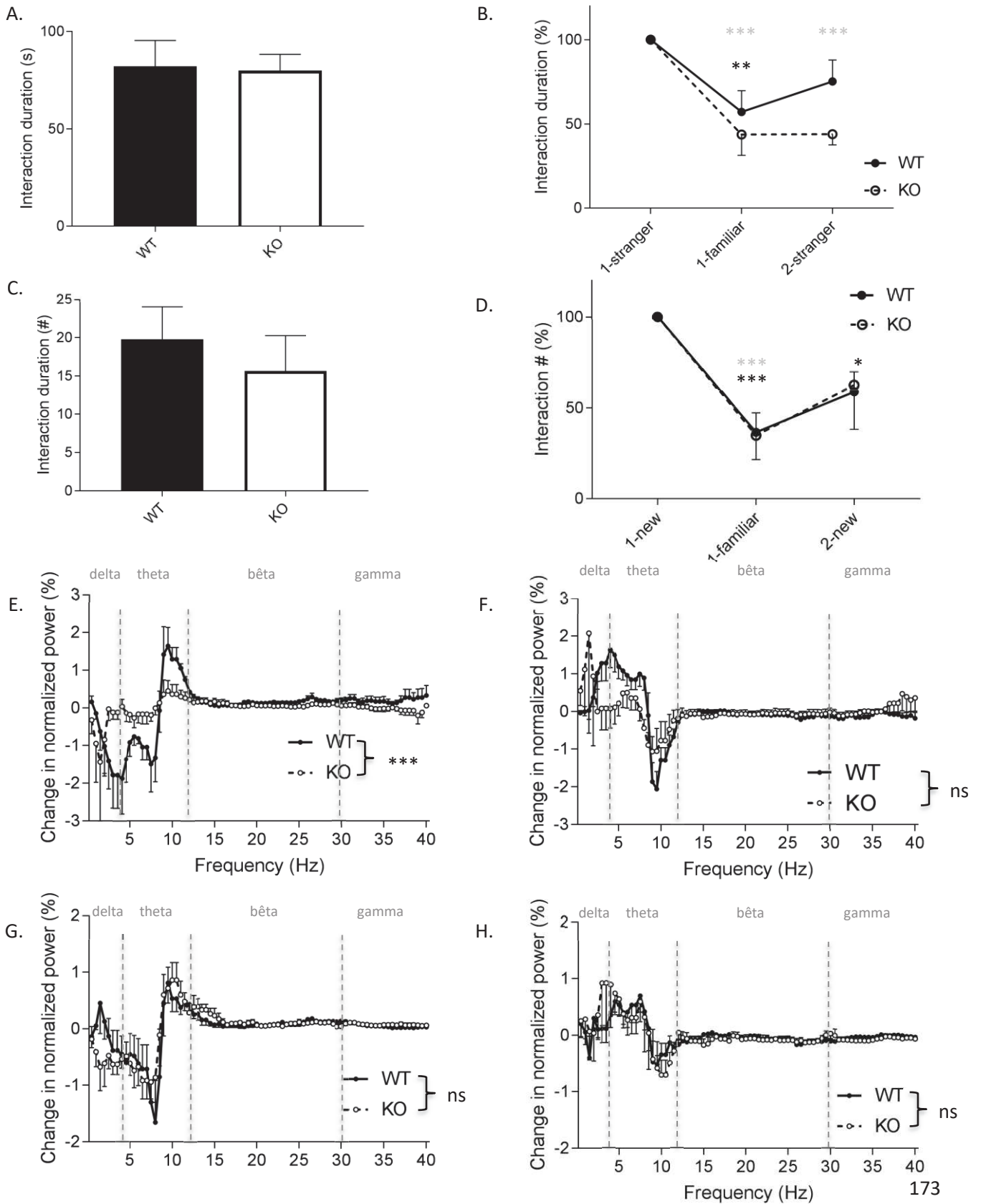
Nous avons ensuite effectué le test décrit précédemment et ceci nous a permis de montrer que les animaux Magel2KO perdent l'intérêt pour un nouveau juvénile au cours du test contrairement aux animaux Magel2WT issus des mêmes portées (Fig 25B).

Le test de reconnaissance des objets a été effectué et aucune altération de la réponse comportementale à la présentation d'un objet, aux présentations successives de celui-ci ou à la présentation d'un nouvel objet n'a été mise en évidence (Fig 25C et 25D).

Au cours de ces tests, la modulation de l'activité EEG induite par les différentes phases du comportement a été évalué. Ceci a permis de montrer que les animaux déficients pour le gène Magel2 ne présentent pas la modulation de l'activité EEG induite par la première interaction sociale avec le premier juvénile chez les animaux WT (Fig 25 E). En revanche, ces animaux présentent les changements d'activité EEG induits par l'habituation sociale (Fig 25 F), par l'interaction avec un objet (Fig 25 G) et par l'habituation à un objet (Fig 25H).

L'étude de l'activité EEG au cours d'une interaction sociale a permis de montrer d'importants troubles dans la phase de première rencontre chez les souris Magel2KO. Ces animaux ne présentent pas d'altération de l'interaction induite par la première présentation d'un juvénile ni d'altération du processus d'habituation. Ceci est en désaccord avec une simple altération de la fonction du système ocytocinergiques et suggère une réorganisation du réseau septal chez les animaux Magel2KO.

Figure 25 : Les souris *Magel2*KO présentent des troubles du comportement social ainsi qu'une altération de la réponse EEG induite par la présentation d'un juvénile



Delta (0-4Hz), theta (4-12Hz), bêta (12-30Hz) et gamma (>30Hz) correspondent aux ondes constituant l'activité EEG

- A. Durée de l'interaction au cours de la première rencontre sociale chez les souris Magel2WT et Magel2KO (Moyennes +/- SEM, N= 7 souris par groupe)

T-test Mann-Whitney, $p=0.6200$

- B. Durée normalisée de l'interaction sociale avec le juvénile chez les souris Magel2WT et Magel2KO (Moyenne +/- SEM, N = 7 souris par groupe) - 2-way anova, mesures répétées :

Effet des présentations successives : $F(2,24)=20.73$ $p<0.0001$; effet du génotype : $F(1,12)=2.691$ $p=0.1268$;

effet de l'interaction : $F(2,24)=1.833$, $p=0.1816$; validité de l'appariement : $F(12,24)=1.845$, $p=0.0974$

Comparaison entre les groupes par analyse post-hoc de Tukey :

WT (*) : 1-stranger vs. 1-familiar $p=0.0034$; 1-stranger vs 2-stranger $p=0.1231$

KO (*) : 1-stranger vs. 1-familiar $p=0.0002$, 1-stranger vs 2-stranger $p=0.0002$

- C. Nombre d'interactions au cours de la première présentation de l'objet chez les souris Magel2WT et Magel2KO (Moyenne +/- SEM, N=9 souris WT et N=8 souris KO)

T-test Mann-Whitney, $p=0.4920$

- D. Nombre normalisée d'interactions avec l'objet chez les souris Magel2WT et Magel2KO (Moyenne +/- SEM, N=9 souris WT et N=8 souris KO) - 2-way anova, mesures répétées :

Effet des présentations successives : $F(2,30)=19.58$ $p<0.0001$; effet du génotype : $F(1,15)=0.002449$ $p=0.9612$;

effet de l'interaction : $F(2,30)=0.034$, $p=0.9666$; validité de l'appariement : $F(15,30)=2.356$, $p=0.0223$

Comparaison entre les groupes par analyse post-hoc de Tukey :

WT (*) : 1-stranger vs. 1-familiar $p=0.0003$, 1-stranger vs 2-stranger $p=0.0209$

KO (*) : 1-stranger vs. 1-familiar $p=0.0005$, 1-stranger vs 2-stranger $p=0.0547$

- E. Changements dans l'activité EEG induits par l'interaction avec un nouveau juvénile (Moyennes +/- SEM, N=6 souris WT, 7 souris KO), 2-way ANOVA

Effet de la bande de fréquence : $F(79,880)=3.941$ $p<0.0001$; effet du génotype : $F(1,880)=0$ $p>0.9999$; effet de

l'interaction : $F(79,880)=1.978$, $p<0.0001$

- F. Changements dans l'activité EEG induits par l'habituation sociale (Moyennes +/- SEM, N=6 souris WT, 7 souris KO), 2-way ANOVA

Effet de la bande de fréquence : $F(79,880)=2.671$ $p<0.0001$; effet du génotype : $F(1,880)=0$ $p>0.9999$; effet de l'interaction : $F(79,880)=1.045$, $p=0.3770$

G. Changements dans l'activité EEG induits par l'interaction avec un nouvel objet (Moyennes +/- SEM, N=7 souris WT, 6 souris KO) – 2-way ANOVA

Effet de la bande de fréquence : $F(79,880)=6.051$ $p<0.0001$; effet du génotype : $F(1,880)=0$ $p>0.9999$; effet de l'interaction : $F(79,880)=0.6642$, $p=0.9887$

H. Changements dans l'activité EEG induits par l'habituation à un objet (Moyennes +/- SEM, N=7 souris WT, 6 souris KO) – 2-way ANOVA

Effet de la bande de fréquence : $F(79,880)=3.138$ $p<0.0001$; effet du génotype : $F(1,880)=0$ $p>0.9999$; effet de l'interaction : $F(79,880)=0.49$, $p>0.9999$

5.2. Discussion

5.2.1. Principaux résultats et interprétations possibles

Dans cette étude, nous avons montré que les souris Magel2KO ont tendance à exprimer moins de récepteurs de l'ocytocine dans la partie frontale du septum latéral sans altération du nombre de récepteurs V1a de la vasopressine.

De façon surprenante, le nombre de neurones du septum latéral répondant à l'application d'ocytocine est augmenté chez ces animaux. La résolution obtenue avec les expériences d'autoradiographie reste faible et nous ne connaissons pas le nombre de cellules du septum latéral possédant des récepteurs de l'ocytocine. En effet, il est possible que bien que moins de récepteurs soient exprimés au sein du septum, ceux-ci soient exprimés par un plus grand nombre de cellules ou encore que les cellules qui les expriment (neurones ou autres) soient plus fortement connectés induisant une réponse plus grande. De plus, notons que la catégorie neuronale la plus sensible au génotype correspond aux neurones inhibés.

Les troubles sociaux observés chez les souris Magel2KO sont similaires à ceux induits par le blocage intra-septal des récepteurs de l'ocytocine au cours du processus d'habituation sociale mais les troubles observés dans la réponse EEG à l'interaction sociale ne vont pas dans ce sens. Les résultats préliminaires obtenus précédemment suggèrent que, chez les souris WT, les neurones de sortie du septum latéral vers le septum médian sont les neurones inhibés. Ces neurones étant presque absents chez les souris Magel2KO, nous pouvons faire l'hypothèse que ces neurones de sortie sont essentiels à l'établissement des comportements sociaux.

Ainsi, les résultats suggèrent une potentielle réorganisation de la réponse septale à l'ocytocine et à la vasopressine chez les animaux Magel2KO.

5.2.2. Comparaison avec les résultats des études précédentes

Dans l'étude de F. Muscatelli, des troubles sociaux ont été décrits chez la souris Magel2KO [255] mais la nature de ces troubles diverge de ceux que nous avons observés au cours de ces expériences. En effet, dans leur étude, il a été montré que la durée d'interaction des souris Magel2KO avec leurs congénères est réduite par rapport aux souris WT. Nous n'observons pas de telles différences mais ceci peut être expliqué par la nature du protocole utilisé. En effet, dans l'étude de F. Muscatelli, les souris ont été soumises au test des 3 chambres et ont eut le choix entre une interaction sociale et une interaction avec un objet. Dans notre

test, seul un des 2 stimuli est présenté à chaque fois. C'est donc le choix entre 2 stimuli qui pourrait expliquer les différences observées entre nos études. Ainsi, le protocole expérimental utilisé au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence un trouble social lié à l'absence de regain d'intérêt pour un nouveau congénère. Ceci apporte une nouvelle vision des troubles observés chez ces animaux.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous effectuons actuellement des expériences visant à évaluer le comportement social de ces animaux avec le protocole classique de l'arène à 3 chambres.

L'étude de la lignée *Magel2* avait déjà permis de mettre en évidence une altération précoce de l'expression hypothalamique d'ocytocine et de vasopressine. De plus, chez l'adulte, une altération du nombre de sites de liaisons de l'ocytocine dans le septum latéral avait été montrée. Ici, nous montrons que le nombre de récepteurs de la vasopressine est inchangé. Ainsi, nous apportons un élément essentiel à la compréhension du fonctionnement de la balance ocytocine/vasopressine dans le septum latéral et à la compréhension des altérations induites par la délétion du gène *Magel2*.

Notons qu'il existe une incohérence apparente entre les résultats obtenus en électrophysiologie (augmentation du nombre de neurones activés par la TGOT) et avec les expériences de liaison (diminution du nombre de sites de liaison de l'ocytocine). Cette incohérence pourrait être expliquée par une altération de la réponse à l'ocytocine spécifique à l'une des catégories neuronales décrites (les neurones inhibés). L'augmentation du nombre de neurones excités par l'ocytocine pourrait être un la résultante d'un mécanisme de compensation.

D'autre part, les outils qui nous ont permis d'identifier les sites de liaison ocytocinergiques et vasopressinergiques ne permettent de le faire qu'avec une résolution limitée. Ainsi, nous ne savons pas si les récepteurs sont situés sur les neurones ou sur d'autres cellules du septum. Une étude en cours dans le laboratoire de Pierrick Poisbeau (communication personnelle, Alexandre Charlet) a permis de montrer qu'il existe des récepteurs de l'ocytocine sur les astrocytes de l'amygdale médiane et que l'impact électrophysiologique d'une application d'ocytocine serait principalement dû à l'activation de ces récepteurs. Nous pouvons envisager un mécanisme similaire dans le septum latéral. Ainsi, si les récepteurs de l'ocytocine sont situés sur les cellules gliales, il est envisageable que bien que le nombre de récepteurs de l'ocytocine diminue dans le septum, les cellules gliales possédant ces récepteurs établissent des contacts avec un plus grand nombre de neurones du septum latéral chez les souris *Magel2*KO. Cette hypothèse pourrait être étudiée par la suite via une étude de la morphologie astrocytaire.

5.2.3. Questions posées et expériences possibles

Une étude de l'organisation du réseau septal répondant à l'ocytocine et à la vasopressine chez les souris WT et les éventuelles altérations de celui-ci chez les souris Magel2KO est possible. Une telle étude, permettrait de mieux comprendre les troubles des souris Magel2KO.

Les résultats obtenus suggèrent que les troubles comportementaux des animaux Magel2KO pourraient être expliqués par une altération de la réponse septale à l'ocytocine et/ou à la vasopressine. La suite de l'étude, actuellement en cours, consiste à vérifier cette hypothèse. Pour cela, notre stratégie expérimentale consiste à moduler l'activité du système ocytocine/vasopressine chez les animaux Magel2KO par plusieurs stratégies :

- injection intra-septale d'agonistes ocytocinergiques ou vasopressinergiques respectivement au cours du processus d'habituation sociale ou de première rencontre
- activation optogénétique des terminaisons ocytocinergiques ou vasopressinergiques du septum latéral aux mêmes moments. Pour cela, nous croisons des animaux déficients pour le gène Magel2 avec des animaux exprimant la cre-recombinase respectivement sous le contrôle du promoteur de l'ocytocine ou de la vasopressine.

Les résultats préliminaires obtenus (3 souris Magel2KO utilisées et 6 souris Magel2WT) suggèrent que l'administration intra-septale de vasopressine lors de la première rencontre restaure un comportement social « normal » chez les souris Magel2KO (diminution d'intérêt induite par les présentations successives et augmentation lorsqu'un nouvel individu est présenté) tandis qu'il l'altère chez les souris Magel2WT. Ces expériences sont en cours.

6. Bilan et conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que la vasopressine et l'ocytocine jouent séquentiellement un rôle pour l'établissement du comportement social. L'activation septale des récepteurs de la vasopressine au cours d'une première interaction sociale est essentielle à la reconnaissance sociale et au processus d'habituation tandis que l'activation des récepteurs de l'ocytocine septaux au cours des interactions suivantes avec le même juvénile est essentielle au regain d'intérêt induit par la présentation d'un juvénile inconnu.

Ces fonctions suggèrent qu'une altération de la réponse du septum à l'ocytocine et/ou à la vasopressine pourrait se traduire par une altération des comportements sociaux. C'est le cas chez les animaux *Magel2*KO dont les neurones du septum sont sensibles à l'ocytocine et à la vasopressine mais dans lesquels la réponse à ces deux peptides est modifiée. Ces animaux présentent des troubles sociaux rappelant ceux induits par l'inhibition des récepteurs de l'ocytocine septaux malgré une augmentation de la proportion des neurones activés par la TGOT suggérant ainsi une réorganisation du réseau septal sensible à l'ocytocine et éventuellement à la vasopressine.

Dans le cadre de cette étude, nous perfectionnons le développement d'un outil de mesure EEG paramétré sur la libération septale d'ocytocine et/ou de vasopressine. En effet, la modification de l'activité EEG induite par l'interaction sociale est dépendante de l'action de l'ocytocine au moins au niveau du septum latéral. De plus, une altération de la fonction de ce système se répercute sur l'activité EEG. Un tel outil devrait nous permettre de diagnostiquer une altération de ce réseau dans des modèles animaux présentant des troubles sociaux (ou chez l'Homme) et de suivre l'efficacité d'un traitement.

Rappel de la question posée initialement

La modulation, par l'ocytocine et la vasopressine de l'activité du septum, est-elle essentielle à la régulation des comportements sociaux ?

Ainsi, pour répondre à la question posée, nous pouvons dire que les neurones du septum latéral sont contrôlés par la vasopressine et l'ocytocine et ce contrôle de l'activité septale est mis en jeu respectivement au cours du processus d'habituation sociale et de discrimination sociale.

PARTIE B : Développement du système ocytocine et conséquence d'un traitement précoce à l'ocytocine chez les souris Magel2KO

Dans l'étude précédemment décrite, nous avons étudié l'impact de l'ocytocine et de la vasopressine sur l'une des cibles des neurones ocytocinergiques du PVN dont la sensibilité à l'ocytocine est altérée dans le cadre d'une déficience pour le gène Magel2: le septum latéral. Dans l'étude présente, complémentaire, nous avons interrogé la fonction des neurones ocytocinergiques au cours du développement. En effet, l'altération de la réponse septale à l'ocytocine a probablement une origine développementale. Ceci est suggéré par le fait que chez les souris adultes mâles Magel2KO, le septum latéral exprime moins de récepteurs de l'ocytocine mais reçoivent un plus grand nombre de fibres contenant de l'ocytocine. Une altération de la connexion ocytocino-septale pourrait avoir pour origine une modification précoce des propriétés des neurones ocytocinergiques qui envoient leurs fibres jusqu'au septum.

Question posée :

Le développement des neurones ocytocinergiques du PVN est-il modifié chez les souris Magel2KO et les défauts observés sont-ils restaurés par le traitement péri-natal à l'ocytocine ?

Objectifs :

- Décrire le développement des propriétés électrophysiologiques et morphologiques des neurones ocytocinergiques du PVN chez des animaux WT et des animaux déficients pour le gène Magel2.
- Comprendre l'impact d'un traitement péri-natal sur les propriétés électrophysiologiques et morphologiques de ces neurones au cours du développement chez des individus Magel2KO et leurs congénères Magel2WT.

Stratégie expérimentale mise en œuvre :

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie en tranche sur les neurones ocytocinergiques du noyau paraventriculaire au cours du développement péri-natal chez des souris mâles Magel2KO et Magel2WT.

NB : Cette étude est l'objet d'une contribution équivalente avec le Dr. Elisabete Augusto. Une partie des données présentées ont été obtenues lors de son post-doctorat au laboratoire.

1. Développement des propriétés électrophysiologiques et morphologiques de neurones ocytocinergiques du PVN chez la souris Magel2KO

1.1. Résultats

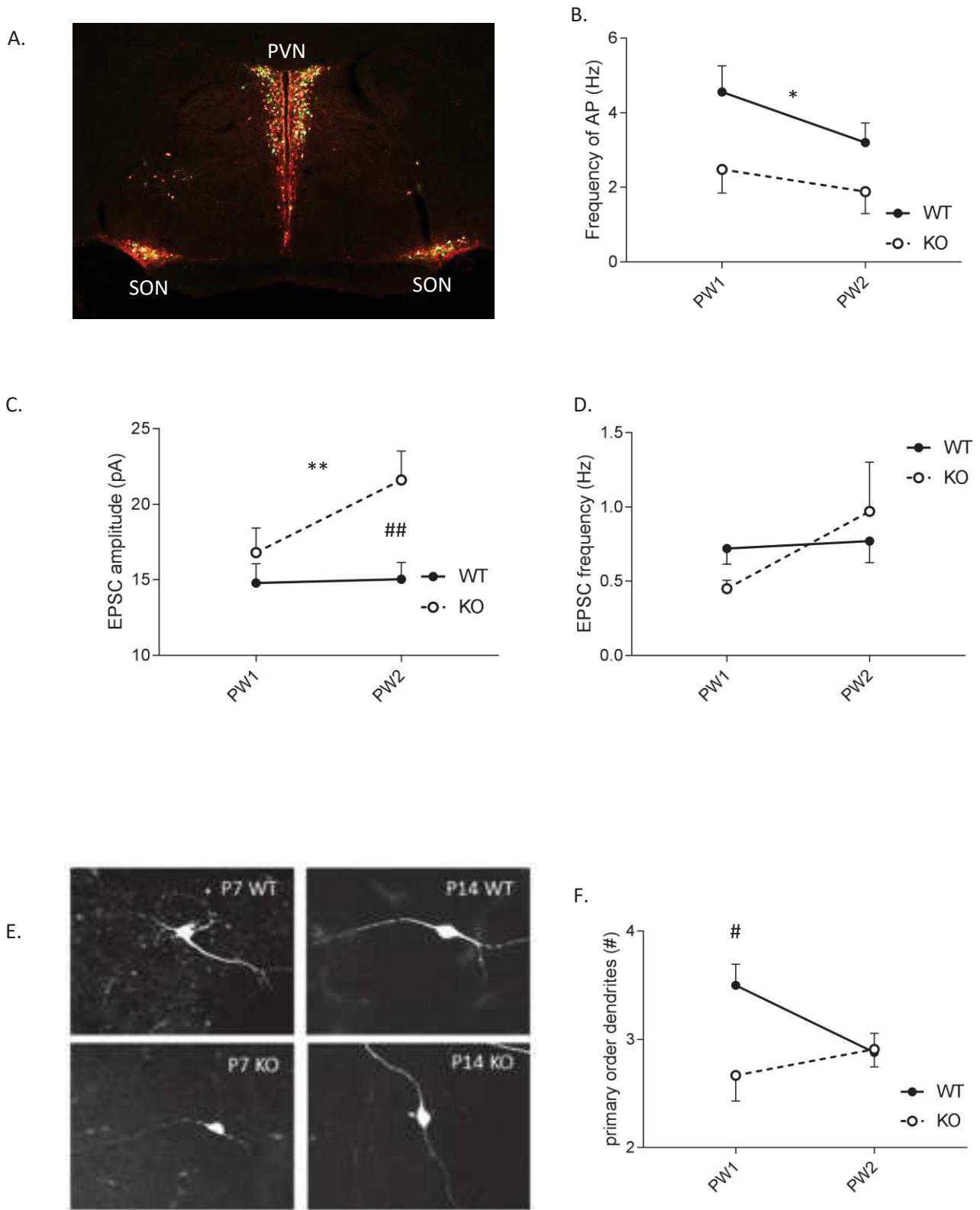
Afin d'étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones OT du PVN, des tranches aiguës de cerveau de souris OT-GFP ont été réalisées au vibratome. Les neurones du PVN GFP+, qui sont de nature ocytocinergiques (Fig 26A) ont été enregistrés. L'activité électrique spontanée à -50mV a été enregistrée en configuration « cellule entière » et « courant imposé ». La fréquence d'émission spontanée des potentiels d'action a ainsi été déterminée. Sur les mêmes cellules, l'activité synaptique spontanée a été mesurée en configuration « cellule entière » et en voltage imposé à -60mV. Ainsi, la fréquence des événements synaptiques et leur amplitude ont été déterminés.

Cette étude a été réalisée lors du 7-8^{ème} jour post-natal (P7-P8) (groupe post-natal week 1 : PW1) et lors du 14-15^{ème} jour post-natal (P14-P15) (groupe post-natal week 2 : PW2).

Lorsque la fréquence des potentiels d'action est évaluée chez des animaux Magel2WT et Magel2KO, on observe que celle-ci est plus faible chez les souris Magel2KO (Fig 26B). Ceci s'accompagne par une augmentation significative de l'amplitude (Fig 26C) mais pas de la fréquence (Fig 26D) des événements synaptiques des neurones du PVN, démontrant des altérations de la fonction de ces neurones aussi précoces que P7-P8 chez les animaux Magel2KO. D'autre part, certains troubles apparaissent plus tard (P14-P15).

L'altération fonctionnelle des neurones OT-GFP du PVN s'accompagne d'une altération significative de la complexité morphologique de ces neurones, très tôt au cours du développement (Fig 26E et 26F). En effet, les souris WT présentent un nombre de dendrites primaires important à PW1. Entre la première et la deuxième semaine, la moitié des dendrites sont perdues, probablement via un mécanisme de sélection (voir discussion). Chez les animaux KO, à PW1 le nombre de dendrites est faible et similaire à celui obtenu à PW2.

Figure 26 : Les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des neurones ocytocinergiques du PVN diffèrent entre les souris mâles Magel2WT et Magel2KO



* : 2 way anova, facteur génotype

: post hoc : différence à un âge donné

A. Illustration obtenue après marquage de la neurophysine 1 (Anticorps généré par G. Alonso) (rouge) dans une souris OT-GFP (vert).

SON = noyau supra-optique, PVN = noyau para ventriculaire de l'hypothalamus

B. Fréquence d'émission spontanée des potentiels d'action (Moyennes +/- SEM, N (cellules) = 20 WT à PW1 et 17 à PW2 ; 7 KO à PW1 et 17 à PW2)

2-way ANOVA : Effet du développement: $F(1,57)=1.862$ $p=0.1778$; effet du génotype : $F(1,57)=5.646$ $p=0.0209$; effet de l'interaction : $F(1,57)=0.2829$ $p=0.5968$

C. Amplitude des évènements synaptiques spontanés excitateurs (EPSC) (Moyennes +/- SEM, N (cellules) = 19 WT à PW1 et 21 à PW2 ; 22 KO à PW1 et 17 à PW2)

2-way ANOVA : Effet du développement: $F(1,75)=2.841$ $p=0.0960$; effet du génotype : $F(1,75)=8.168$ $p=0.0055$; effet de l'interaction : $F(1,75)=0.2307$ $p=0.1330$

Comparaison des groupes par analyse post-hoc de Sidak

PW1 (WT vs KO) $p=0.5601$; PW2 (WT vs KO) $p=0.0066$

D. Fréquence d'émission des évènements synaptiques excitateurs (EPSC) (Moyennes +/- SEM, N (cellules) = 19 WT à PW1 et 20 à PW2 ; 22 KO à PW1 et 15 à PW2)

2-way ANOVA : Effet du développement: $F(1,72)=3.004$ $p=0.0874$; effet du génotype : $F(1,72)=0.0453$ $p=0.8321$; effet de l'interaction : $F(1,72)=2.042$ $p=0.1573$

E. Exemples représentatifs de l'arborisation dendritique de neurones ocytocinergiques issues du PVN de souris Magel2WT ou Magel2KO

F. Nombre de dendrites primaires des neurones OT-GFP du PVN entre PW1 et PW2 chez des souris Magel2KO et Magel2WT - Moyennes +/- SEM, N (cellules) = 12 WT à PW1 et 25 à PW2 ; 29 KO à PW1 et 11 à PW2)

2-way ANOVA : Effet du développement: $F(1,53)=0.7602$ $p=0.3872$; effet du génotype : $F(1,53)=3.449$ $p=0.0688$; effet de l'interaction : $F(1,53)=3.966$ $p=0.0516$

Comparaison des groupes par analyse post-hoc de Sidak

PW1 (WT vs KO) $p=0.0317$; PW2 (WT vs KO) $p=0.09930$

NB : une partie des résultats décrits ici ont été obtenus par Elisabete Augusto. Les images utilisées en figure 16A et 16E sont les siennes.

1.2. Discussion

1.2.1. Interprétation des résultats obtenus et lien avec les études précédentes

Dans cette étude une modification du développement des neurones ocytocinergiques du PVN a été mise en évidence chez les souris *Magel2*KO mâles. Celles-ci présentent :

- une diminution de la fréquence spontanée d'émission de leurs potentiels d'action
- une diminution du nombre de dendrites primaires à PW1
- une augmentation de l'amplitude des évènements synaptiques à PW2

Les études précédentes sur ce modèle avaient permis de montrer une importante réduction de l'ocytocine mature dans l'hypothalamus à P0 ainsi qu'une accumulation de formes immatures au sein du PVN suggérant un défaut précoce de maturation de l'ocytocine [254]. Ces résultats suggéraient des altérations majeures de la fonction des neurones ocytocinergiques.

Le défaut morphologique, à savoir l'impact sur l'arborisation dendritique, est transitoire. Des données obtenues sur quelques animaux à P3 suggèrent qu'à cet âge la différence entre le nombre de dendrites primaires compté sur des neurones issus de souris WT et de souris KO est encore plus marquée. Cette différence est principalement due au fait que les neurones issus de souris WT possèdent une arborisation dendritique plus dense au cours des premiers jours de la vie mais que rapidement, celle-ci s'élague. Cet élagage pourrait être l'objet d'une sélection. Un tel processus a déjà été décrit au cours du développement et joue un rôle important dans la connectivité neuronale du cortex visuel, le tractus infra-pyramidal de l'hippocampe ou du cortex pré-frontal [390]. Ce processus a également lieu au cours du développement post-natal des neurones ocytocinergiques du SON chez le rat [286]. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme de maturation très précoce des neurones OT hypothalamiques pourrait faire défaut chez les animaux *Magel2*KO. Le mécanisme en question semble être impliqué dans le développement des connexions des neurones ocytocinergiques du PVN et pourrait avoir des conséquences importantes sur l'établissement de connexions avec d'autres structures du cerveau via différents systèmes interconnectés dont l'identité et l'état de maturité au cours des premières semaines de vie sont à définir.

Les souris *Magel2*KO présentent des évènements synaptiques plus amples que les animaux WT. Ceci ne peut pas être expliqué simplement par une modification de la résistance membranaire. En effet, si la résistance membranaire augmentait de manière notable en l'absence de *Magel2*, les évènements

synaptiques seraient effectivement plus amples lorsqu'ils sont enregistrés dans le corps cellulaires du fait d'une atténuation réduite mais les évènements synaptiques peu amples, que l'on perd du fait de l'atténuation deviendraient visibles et ainsi, le nombre d'évènements synaptiques que nous sommes capables de détecter augmenterait ce qui n'est pas le cas ici. L'hypothèse que l'on peut avancer est la suivante : chez les souris Magel2KO, le nombre de récepteurs dans chaque synapse est plus grand.

Magel2 joue un rôle important dans la régulation du système de dégradation/recyclage des protéines via le système ubiquitine ligase. Une étude récente qui sera plus amplement discutée dans la partie discussion générale de cette thèse suggère qu'une altération de la fonction du système d'ubiquitination serait à l'origine d'une hyperconnectivité synaptique [391]. Le résultat que nous avons obtenu concernant l'amplitude des évènements synaptiques chez la souris Magel2KO va dans le sens de cette hypothèse.

1.2.2. Questions posées et expériences possibles

Dans cette étude, nous avons choisi d'interroger la fonction des neurones ocytocinergiques du PVN à 2 temps : PW1 et PW2. Notons qu'il serait intéressant d'étudier les mêmes propriétés plus tôt (mais l'expression de la GFP est alors faible ce qui est une limite importante) ou plus tard. En effet, nous pourrions ainsi savoir si les troubles décrits à PW2 perdurent et sont maintenus chez l'adulte ou s'ils sont eux aussi transitoire suggérant que le problème des souris Magel2 est développemental.

Un autre élément qu'il serait intéressant d'étudier est le développement des projections ocytocinergiques vers les autres structures cérébrales [92]. Pour cela, nous pourrions utiliser la technique de transparasation des tissus couplée à un immuno-marquage et à une imagerie réalisée avec un microscope à feuillet de lumière. Cette étude est entreprise par nos collaborateurs de l'équipe de F. Muscatelli.

Il faudrait également étudier la réponse de ces neurones à la stimulations d'afférences issues de structures relevantes dans le cadre de la régulation des comportements sociaux.

Dans la suite de l'étude, nous avons souhaité interroger l'impact d'un traitement péri-natal à l'ocytocine la maturation des neurones OT-GFP du PVN dans des souris MAGEL2 WT et KO.

2. Impact d'un traitement périnatal à l'ocytocine sur la maturation des propriétés électrophysiologiques des neurones à ocytocine

2.1. Résultats

Un traitement sous cutané à l'ocytocine quotidien a été réalisé sur les souriceaux Magel2WT et Magel2KO entre P0 et P6. L'expérience contrôle a consisté en l'injection sous cutanée de solution saline. Les propriétés électrophysiologiques et morphologiques ont ensuite été étudiées.

Lorsque la morphologie des neurones est évaluée à PW1, âge auquel les souris Magel2KO présentent une arborisation dendritique plus faible que les souris Magel2WT, le traitement est sans influence (Fig 27A). Notons que le traitement semble avoir un impact sur ce paramètre puisque le nombre d'arborisations dendritiques des animaux non traités est différent de celui des animaux traités. Ceci peut s'expliquer par un impact du stress induit par la manipulation quotidienne de l'animal ayant lieu lors de l'injection ou par la séparation de sa mère (bien que cette séparation dure moins de 5minutes).

La fréquence d'émission des potentiels d'action, diminuée chez les souris Magel2KO, n'est pas restaurée par le traitement péri-natal. Notons de plus qu'un traitement péri-natal à l'ocytocine chez les animaux WT induit, à PW2, une diminution de la fréquence d'émission des potentiels d'action (Fig 27B). De la même façon que pour la morphologie, on observe un impact de la manipulation sur la fréquence d'émission des potentiels d'action.

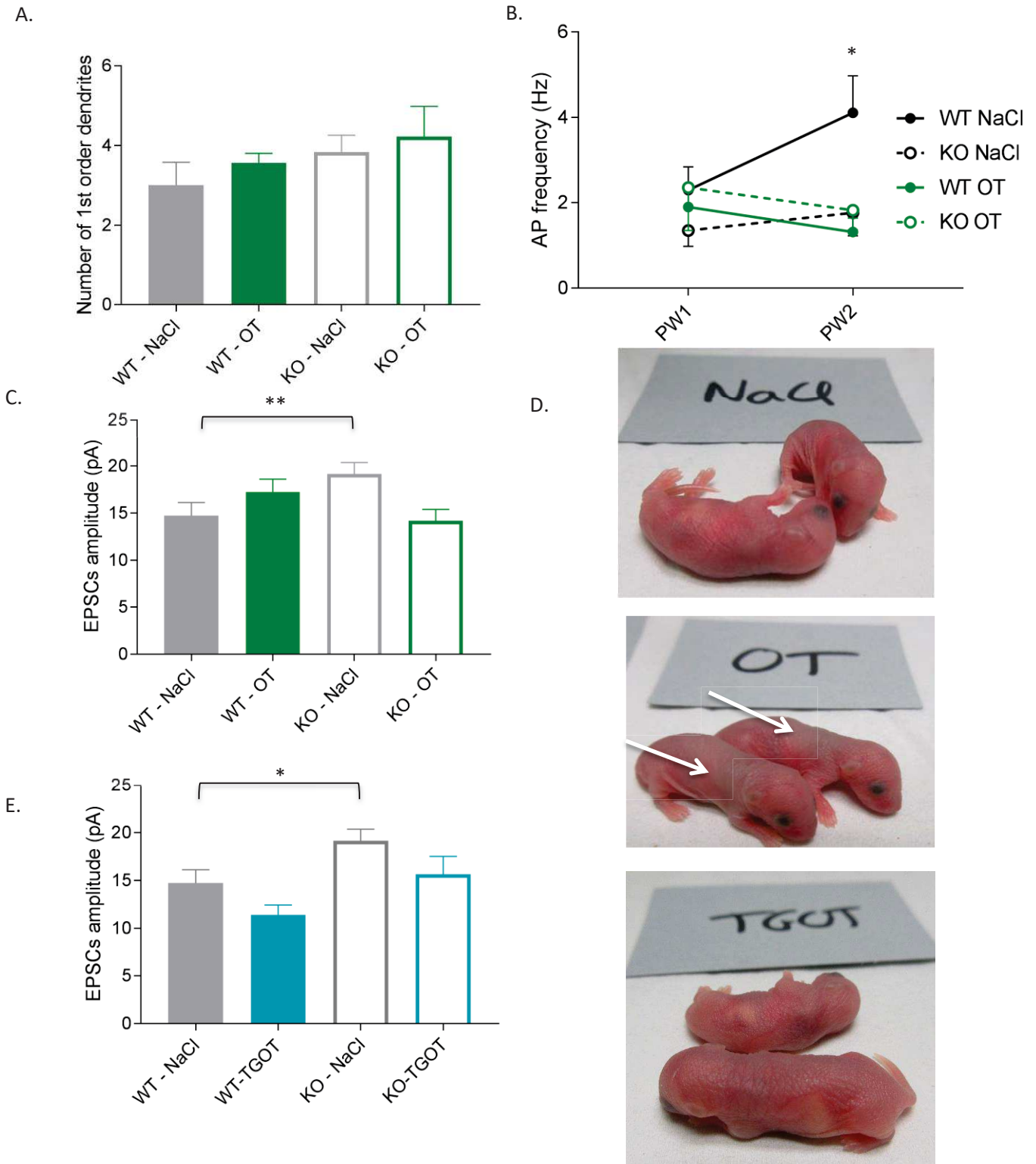
L'amplitude des événements synaptiques enregistrés dans les neurones ocytocinergiques est augmentée à PW2 chez les souris Magel2KO par rapport aux souris Magel2WT des mêmes portées (Fig 27C). Après un traitement périnatal à l'ocytocine, ce défaut est corrigé.

Lors de l'administration, nous avons noté un effet vasopresseur de l'ocytocine au niveau du site d'injection, suggérant que le bolus d'injection d'ocytocine pourrait activer localement des effets non désirés par le biais des récepteurs V1a de la vasopressine (Fig 27D). Nous nous sommes donc demandé si les effets de l'ocytocine sur le développement des propriétés électrophysiologiques des neurones à ocytocine étaient dus à l'activation des récepteurs de la vasopressine ou des récepteurs de l'ocytocine. Pour répondre à ce problème, nous avons administré de la TGOT (la concentration utilisée étant calculée en fonction du Ki de

cette drogue) au lieu de l'ocytocine. Dans ces conditions, l'effet vasoconstricteur n'est plus observé (Fig 27D). Nous avons donc effectué un traitement des souriceaux d'une durée d'une semaine avec de la TGOT injectée quotidiennement en sous cutané. Avec ce traitement, la restauration de l'amplitude des événements synaptique est moins flagrante mais consistante avec le traitement à l'OT (Fig 27^E)

, suggérant vraisemblablement que l'effet vasopresseur du bolus d'injection est finalement négligeable sur la réponse des neurones OT-GFP centraux.

Figure 27 : Un traitement périnatal à l'ocytocine (ou à la TGOT) restaure l'augmentation de l'amplitude des évènements synaptique observée chez les souris Magel2KO



- A. Nombre de dendrites primaires à PW1 chez des animaux Magel2WT et Magel2KO traités au cours de la première semaine de vie à l'ocytocine ou avec une solution saline (Moyenne +/- SEM, N (cellules) = 3 WT NaCl, 12 KO NaCl, 16 WT OT, 9 KO OT)
 2-way ANOVA, Effet du traitement : $F(1,36)=0.6811$ $p=0.4147$; effet du génotype : $F(1,36)=1.673$ $p=0.2041$; effet de l'interaction : $F(1,36)=0.02275$ $p=0.8809$
- B. Fréquence d'émission des potentiels d'action à PW1 et PW2 chez des animaux Magel2WT ou Magel2KO traités au cours de la première semaine de vie à l'ocytocine ou avec une solution saline (Moyenne +/- SEM, N (cellules) = 7 WT NaCl, 15 KO NaCl, 25 WT OT, 8 KO OT à PW1 et 17 WT NaCl, 17 KO NaCl, 17 WT OT, 15 KO OT à PW2)
 2-way ANOVA, Effet du développement : $F(1,113)=0.4168$ $p=0.5198$; effet du génotype : $F(3,113)=3.118$ $p=0.0290$; effet de l'interaction : $F(3,116)=1.679$ $p=0.1756$
 Comparaison des groupes par analyse post-hoc de Sidak
 PW2 : WT NaCl vs KO NaCl $p=0.0145$; WT NaCl vs WT OT $p=0.0020$; WT NaCl vs KO OT $p=0.0242$
- C. Amplitude des évènements synaptiques excitateurs (EPCS) à PW2 chez des animaux Magel2WT et Magel2KO traités au cours de la première semaine de vie à l'ocytocine ou avec une solution saline (Moyenne +/- SEM, N (cellules) = 20 WT NaCl, 20 KO NaCl, 14 WT OT, 14 KO OT)
 2-way ANOVA, Effet du traitement : $F(1,64)=0.5101$ $p=0.4777$; effet du génotype : $F(1,64)=0.769$ $p=0.3838$; effet de l'interaction : $F(1,64)=13.27$ $p=0.0005$
 Comparaison des groupes par analyse post-hoc de Sidak
 WT NaCl vs KO NaCl $p=0.0048$; KO NaCl vs KO OT $p=0.0181$; WT NaCl vs KO OT $p>0.9999$
- D. Photos de souriceaux juste après le traitement périnatal.
 Haut : le traitement au NaCl n'induit pas de vasoconstriction
 Milieu : le traitement à l'ocytocine (20uL à 10^{-4} M) induit une vasoconstriction (indiquée par les flèches blanches)
 Bas : le traitement à la TGOT (20uL à 5×10^{-6} M) n'induit pas de vasoconstriction
- E. Amplitude des évènements synaptiques excitateurs (EPCS) à PW2 chez des animaux Magel2WT et Magel2KO traités au cours de la première semaine de vie à la TGOT ou avec une solution saline (Moyenne +/- SEM, N (cellules) = 20 WT NaCl, 20 KO NaCl, 26 WT TGOT, 10 KO TGOT)
 2-way ANOVA, Effet du traitement : $F(1,72)=8.716$ $p=0.0043$; effet du génotype : $F(1,72)=14.41$ $p=0.0003$; effet de l'interaction : $F(1,72)=0.1779$ $p=0.6745$
 Comparaison des groupes par analyse post-hoc de Sidak
 WT NaCl vs KO NaCl $p=0.0103$; KO NaCl vs KO TGOT $p=0.2017$; WT NaCl vs KO OT $p=0.9957$

NB : une partie des résultats concernant la première semaine post-natale ont été obtenus par
 Elisabete Augusto.

2.2. Discussion

2.2.1. Interprétation des résultats obtenus et lien avec les études précédentes

Nous avons montré que l'administration d'ocytocine à la naissance restaurait, chez les souris Magel2KO, une amplitude des événements synaptiques semblable à celle mesurée chez les souris Magel2WT. Les autres paramètres, eux, ne sont pas améliorés par un tel traitement péri-natal. Afin d'interpréter les résultats obtenus à PW1, nous devons tenir compte du fait que l'administration quotidienne d'ocytocine a eu lieu jusqu'à la veille de l'expérience et qu'un effet à court terme de celle-ci est encore possible. Ceci biaiserait les résultats et pourrait expliquer, en partie, l'impact de la manipulation observé lors de la comparaison des résultats obtenus chez les souris Magel2WT et les souris Magel2WT traitées au NaCl.

En ce qui concerne l'impact du traitement à l'ocytocine chez les animaux WT, celui-ci induit, à PW2 une diminution de la fréquence d'émission des potentiels d'action. Ce résultat est surprenant. En effet, les souris Magel2KO présentent un défaut de maturation de l'ocytocine et une diminution de la fréquence d'émission des potentiels d'action. On s'attendrait donc à ce que les souris WT traitées à l'ocytocine présentent une augmentation de l'activité électrique des neurones ocytocinergiques. Cette incohérence peut s'expliquer de deux manières :

- L'ocytocine pourrait désensibiliser les récepteurs de l'ocytocine chez la souris WT
- La déficience de Magel2 ne module pas seulement le système ocytocinergique mais à des conséquences plus complexes.

De plus, nous montrons qu'une administration d'ocytocine sous forme de « bolus » induit une vasoconstriction probablement dépendante d'une activation des récepteurs V1a de la vasopressine. Chez la souris, l'utilisation de la TGOT est une alternative intéressante qui module de façon semblable l'amplitude des événements synaptiques sans induire de vasoconstriction. Chez l'Homme, l'administration de fortes doses d'ocytocine peut induire un effet cardio-vasculaire [392]. Le développement et l'utilisation de molécules plus spécifiques serait d'un grand intérêt.

2.2.2. Questions posées et expériences possibles

Les questions posées par cette étude concernent principalement le devenir des animaux traités. L'étude actuellement en cours consiste à étudier le comportement social ainsi que la réponse septale à l'ocytocine et à la vasopressine chez des animaux ayant ou non reçu un traitement péri-natal. En effet, au-

delà de ces effets locaux sur l'activité des neurones ocytocinergiques, plutôt faibles, il est possible que le traitement modifie la connectivité du PVN avec ses cibles afférentes ou efférentes chez l'adulte, restaurant ainsi les comportements sociaux.

3. Bilan et conclusions

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des troubles électrophysiologiques et morphologiques des neurones ocytocinergiques du PVN de souris Magel2KO au cours du développement. De plus, elle nous a permis de montrer qu'une partie de ces troubles est restaurée par un traitement périnatal à l'ocytocine ou à la TGOT suggérant que la restauration observée est indépendante de l'activation des récepteurs V1a de la vasopressine.

Question posée :

Le développement des neurones ocytocinergiques du PVN est-il modifié chez les souris Magel2KO et les défauts observés sont-ils restaurés par le traitement péri-natal à l'ocytocine ?

Pour répondre à la question posée, nous pouvons dire que le développement des neurones ocytocinergiques du PVN est modifié chez les souris Magel2KO mais des troubles observés, seuls quelques uns sont restaurés par un traitement OT à la naissance, ne permettent pas d'expliquer raisonnablement les défauts comportementaux observés chez l'adulte. L'étude du comportement des souris adultes traitées à la naissance apportera des réponses, peut être plus incisives, à cette question.

DISCUSSION GENERALE

1. Un réseau septal sensible à l'ocytocine et à la vasopressine dont la fonction est essentielle à la régulation des comportements sociaux

1.1. Résumé des principaux résultats obtenus et élaboration d'un modèle

1.1.1. Une séquence ocytocine/vasopressine

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de montrer que la vasopressine et l'ocytocine libérées au sein du septum latéral lors des interactions sociales sont essentielles à la régulation de des comportements sociaux. De plus ces deux hormones jouent des rôles séquentiels :

- La fonction de la vasopressine est mise en jeu lors de la première interaction avec un juvénile inconnu. Dès lors, elle permet la diminution d'intérêt induite par les présentations successives du même individu.
- La fonction de l'ocytocine est mise en jeu au cours du processus d'habituation. Ainsi, elle permet le regain d'intérêt lorsqu'un nouvel individu est présenté.

Ces deux étapes sont essentielles pour les comportements sociaux et l'ocytocine et la vasopressine jouent ainsi des rôles complémentaires. Notons que ces effets semblent spécifiques des interactions sociales puisque l'administration d'un antagoniste des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine lors de la première interaction n'altère pas significativement l'interaction avec un objet.

1.1.2. Réponse des neurones du septum latéral à la vasopressine et à un agoniste des récepteurs de l'ocytocine

Au cours de cette thèse, nous avons commencé à décrire comment l'action de l'ocytocine et de la vasopressine sur le septum module l'activité des neurones de cette structure. Ainsi, nous avons pu montrer que les neurones du septum latéral répondent à l'application d'ocytocine et/ou de vasopressine par une modulation de leur activité électrique et que la nature de cette réponse détermine 3 catégories neuronales identifiées aux propriétés électrophysiologiques et morphologiques propres.

Notons que l'impact de la vasopressine sur l'activité électrique dans les neurones activés par la vasopressine est dépendant de l'existence d'une activité synaptique. La réponse électrique de ces neurones est donc dépendante de la coïncidence entre une activation des afférences (présence d'évènements

synaptiques) et le signal vasopressinergique. Ces neurones pourraient donc jouer un rôle essentiel dans la détection d'un contexte.

Les différents résultats obtenus nous permettent d'élaborer un modèle illustré en figure 28.

Dans celui-ci, l'ocytocine et la vasopressine modulent l'activité neuronale de deux manières :

- via une action directe sur la fréquence d'émission des potentiels d'action
- via une modulation de l'activité synaptique qui pourrait jouer un rôle sur la modulation des informations reçues d'autres structures cérébrales (hippocampe par exemple)

1.1.3. Elaboration d'un modèle basé sur une libération séquentielle de vasopressine et d'ocytocine dans le septum latéral

Lors de la première rencontre sociale, une activation du BNST [393] [394] [395] induirait l'activation des neurones vasopressinergiques et une **libération septale de vasopressine** [143]. Ceci pourrait être contrôlé par des afférences issues des bulbes olfactifs (puisque l'olfaction constitue le sens principal des rongeurs et que le BNST est fortement connecté aux bulbes olfactifs accessoires). Les neurones du septum latéral étant majoritairement GABAergiques, la vasopressine pourrait alors :

- inhiber directement l'activité des neurones décrits comme « inhibés » modulant ainsi la sortie d'informations du septum latéral vers le septum médian
- augmenter l'activité électrique dans les neurones activés ce qui induirait une augmentation de la fréquence des événements GABAergiques perçus par les neurones inhibés suggérant une amplification de l'inhibition de ces neurones. De plus, en l'absence de stimulation ocytocinergique, ceci induirait un contrôle inhibiteur sur les neurones activés par la TGOT.

L'inhibition des neurones inhibés, qui semblent constituer la voie de sortie du septum latéral vers le septum médian, induirait une désinhibition partielle des neurones cibles au sein du septum médian. Notons que la nature des connections intra-septales est méconnue (pour revue, voir [323] et les références citées) mais le septum latéral semble envoyer des projections GABAergiques vers les neurones cholinergiques du septum médian. Ces derniers sont connectés à l'hippocampe et leur activation optogénétique augmente la proportion d'ondes de type theta (4-10Hz) dans l'activité EEG [396] ce qui est cohérent avec les résultats obtenus dans notre étude. Cette modulation de l'activité hippocampique pourrait résulter en la création d'une « mémoire sociale » à court terme qui serait nécessaire à la reconnaissance sociale et à la diminution d'intérêt au fil des présentations.

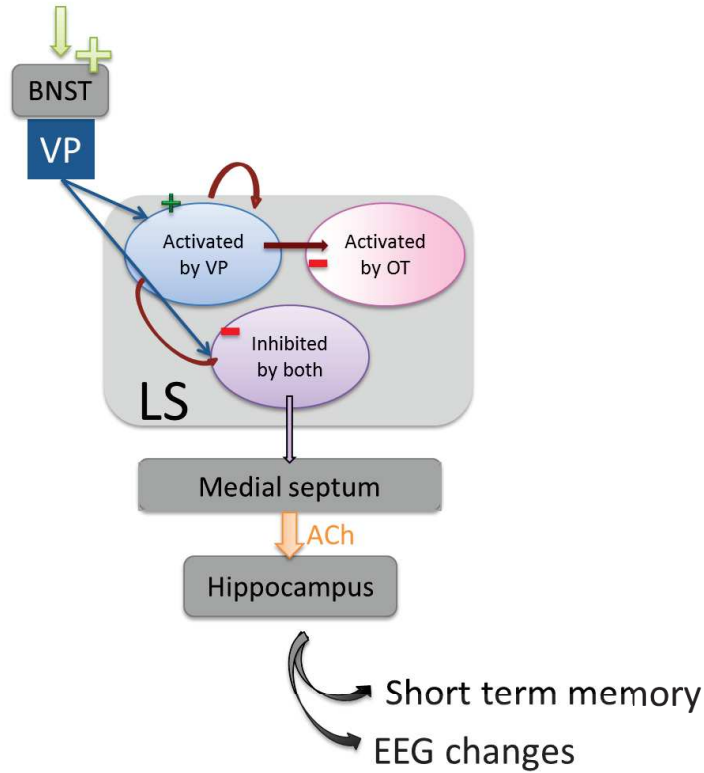
Dans le cas où une nouvelle rencontre avec le même juvénile a lieu, nous faisons l'hypothèse que celle-ci n'induirait pas l'activation du BNST et donc n'induirait pas la modulation de la libération septale de vasopressine. Les effets de l'administration de vasopressine dans la tranche durent plusieurs dizaines de minutes suggérant que dans le cas d'une libération de vasopressine, les effets électrophysiologiques sur les neurones activés par la vasopressine persisteraient. D'autre part, le PVN serait activé et une **libération septale d'ocytocine** serait alors induite. Il y aurait alors une coïncidence d'évènements induisant une inhibition des neurones inhibés ce qui pourrait se traduire par une désinhibition de la connection entre le septum latéral et le septum médian. Dès lors, la désinhibition des connexions cholinergiques du septum médian conduirait à une augmentation de l'attention. Cette augmentation de l'attention serait essentielle au regain d'intérêt pour un nouveau juvénile lorsque celui-ci est présenté à la suite d'un protocole tel que celui que nous avons utilisé. Elle permettrait à la souris étudiée d'être plus sensible lors de la présentation d'un nouveau juvénile. En effet, une étude a permis de montrer que l'activation du septum latéral induisait une diminution de l'éveil cortical cholinergique et dans le cas que nous décrivons, l'action de la vasopressine se traduit par une inhibition des neurones de sortie du septum latéral [319].

Lorsqu'un nouvel individu serait présenté, l'action de la vasopressine sur les neurones activés par la vasopressine pourrait induire une importante inhibition des neurones activés par la TGOT empêchant leur effet et permettant de retrouver une activité dans les neurones inhibés semblable à celle observée lors de la première interaction.

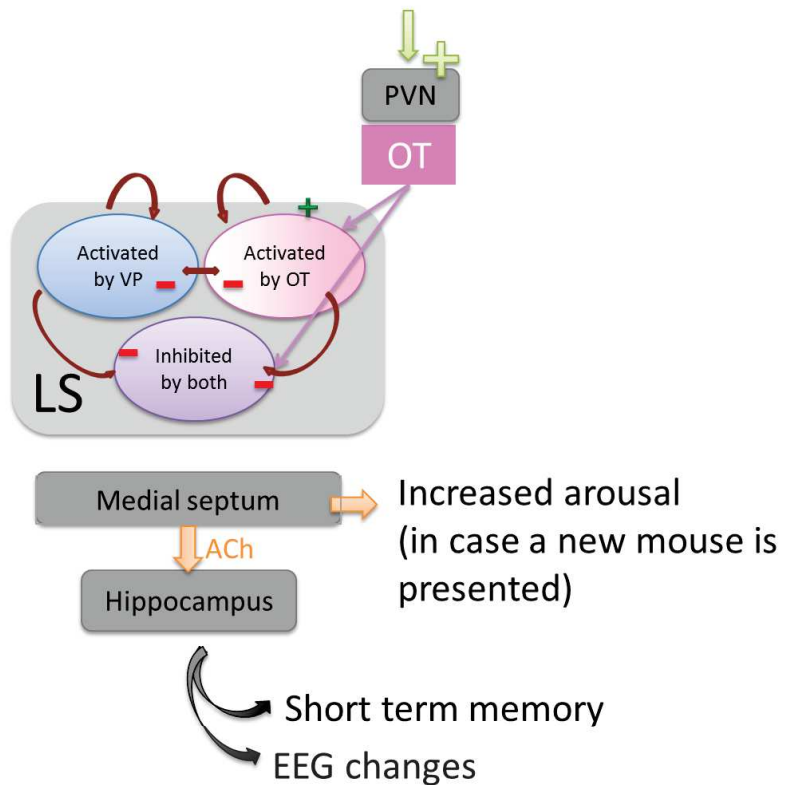
La séquence reflèterait ainsi les signaux cumulatifs successifs : la vasopressine serait libérée seule lors de la première interaction et son effet perdurerait au cours de l'habituation tandis que l'ocytocine ne serait libérée qu'au cours de cette dernière phase.

Figure 28 : Modèle mettant en relation les 3 catégories neuronales décrites au sein du septum latéral et proposant une hypothèse quant au rôle de ce réseau pour la régulation des comportements sociaux

SOCIAL ENCOUNTER



SOCIAL HABITUATION



1.1.4. Explications, basées sur ce modèle, de l'impact comportemental de la modulation pharmacologique de cette séquence

Ce modèle permettrait d'expliquer les effets comportementaux de l'administration septale des antagonistes :

- L'ocytocine n'étant pas libérée au cours de la première rencontre, un antagoniste ocytocinergique est sans impact
- L'antagoniste V1a administré au cours de la première rencontre empêche l'activation vasopressinergique et donc l'identification de l'individu présenté ce qui se traduit par une absence de perte d'intérêt
- L'antagoniste V1a administré au cours de la 3^{ème} rencontre est sans impact puisque l'activation vasopressinergique n'a déjà plus lieu
- L'antagoniste ocytocinergique administré au cours de la 3^{ème} rencontre bloque le regain d'attention nécessaire à l'interaction avec un nouveau juvénile sans altérer la « mémoire » à court terme qui est déjà en place (puisque la souris étudiée ne présente pas d'altération de la reconnaissance sociale lors de la 4^{ème} interaction).

1.1.5. Situations physiologiques ou pathologiques induisant une altération de la séquence vasopressine/ocytocine et conséquences comportementales

Nous avons montré que les souris Magel2KO présentent une altération du regain d'intérêt normalement induit par la présentation d'un nouveau juvénile. De plus, chez ces animaux, la catégorie neuronale correspondant à des neurones inhibés par l'application de TGOT et de vasopressine est presque perdue.

Chez ces animaux, l'ocytocine et la vasopressine pourraient induire une légère désinhibition qui se traduirait par une mémoire à court terme et une habituation. En revanche, les neurones inhibés étant moins nombreux que chez les souris WT, la désinhibition des neurones du septum médian ne pourrait être que très partielle ce qui empêcherait l'effet sur l'attention et qui se traduirait par une absence de regain d'intérêt dans ce protocole.

D'autre part, plusieurs études précédentes ont mis en lumière des défauts pouvant conduire à une altération fonctionnelle de ce réseau.

Facteurs environnementaux

Jusqu'ici une seule étude avait mis en évidence une altération de l'activité vasopressinergique induite par l'interaction sociale au niveau du septum latéral. Cette altération observée chez l'adulte, était la conséquence d'un stress périnatal de séparation de la mère. Ainsi, ce système est contrôlé par des facteurs environnementaux. Dans cette étude, il a été montré que cette altération de la fonction vasopressinergique altère la reconnaissance sociale ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus après inhibition pharmacologique des récepteurs de la vasopressine lors de la première interaction sociale.

D'autre part, plusieurs études avaient montré que des facteurs environnementaux pouvaient influencer sur la modulation de l'activité septale par l'ocytocine et/ou vasopressine. C'est notamment le cas :

- de l'inactivation précoce des récepteurs de l'ocytocine qui diminue le nombre de sites de liaison V1a au niveau du septum [165]. A long terme, ceci induira une diminution des comportements paternels [397].
- de l'utilisation d'amphétamines qui, chez le rat mâle induit une diminution des taux de vasopressine septaux [398]. De plus, une administration d'amphétamines altère la mémoire sociale chez des rats montrant encore l'importance de la régulation vasopressinergique de l'activité septale pour la régulation des comportements sociaux [399].
- de la lactation qui induit une libération septale d'ocytocine [137]. Celle-ci pourrait, chez la mère, prévenir la perte d'intérêt pour les petits via une augmentation de l'attention.

L'impact de ces différents facteurs sur les comportements sociaux pourrait ainsi en partie être expliqué par leur action sur la modification de la réponse ocytocinergique ou vasopressinergique septale induite par l'interaction sociale.

Un facteur environnemental important régulant à la fois le système ocytocine/vasopressine et les comportements sociaux est le stress. Le lien entre stress et comportement social est complexe et contexte dépendant [400] ce qui suggère que le stress agit via des mécanismes différents afin de réguler les interactions sociales. L'un des mécanismes impliqués pourrait passer par une modulation de l'action septale de l'ocytocine et de la vasopressine. En effet, un stress aigu (nage forcée) induit une libération septale de vasopressine et celle-ci favorise une réponse comportementale active (échappement) [339]. Cette libération septale de vasopressine pourrait moduler les comportements sociaux suite au stress.

D'autre part, un stress social induit une libération septale d'ocytocine (sans effet sur la vasopressine) [401]. Une étude de Guzman a permis de montrer que l'activation septale des récepteurs de l'ocytocine

menait à une augmentation du temps d'immobilité induit par la peur suite à un protocole de défaite sociale [127]. Ainsi, l'activation des récepteurs septaux de l'ocytocine est mise en jeu dans l'aversion sociale induite par le stress social. Dans ce cadre, la libération septale de vasopressine n'a pas lieu [401] et ceci pourrait être dû à une modification de l'activité de l'amygdale étendue (BNST et amygdale), une structure sensible au stress [402] et qui envoie des projections vasopressinergiques jusqu'au septum latéral. La séquence vasopressine/ocytocine que nous avons décrite dans le cadre de cette thèse ne serait pas respectée et l'impact de l'ocytocine septale sur l'interaction sociale serait tout autre : elle induirait une aversion sociale.

Facteurs génétiques

Des études précédentes avaient déjà permis de montrer que les rats sélectionnés par croisements pour des hauts ou faibles taux d'anxiété (rats HAB ou LAB) présentaient des taux de vasopressine septaux différents. De plus, les rats LAB présentent une diminution de la libération septale de vasopressine ainsi qu'une activation neuronale induite par l'agression diminuée dans le septum latéral (évalué par le calcul nombre de cellules c-fos positives) et ces animaux présentent une agressivité plus importante que les rats HAB [141]. Ceci correspond à nos résultats dans le sens où une diminution de la libération septale de vasopressine augmente l'agressivité (dans ce papier) et le blocage septal des récepteurs vasopressinergiques empêche l'effet de l'habituation sociale sur la durée des interactions (dans notre étude).

D'autres études encore ont permis de montrer le rôle d'un microsatellite du gène du récepteur V1a dans la formation du couple chez le campagnol. De manière intéressante, ce microsatellite contrôle l'expression du récepteur et diffère entre les espèces monogames et non-monogames [403]. Chez les espèces polygames, le nombre de sites de liaison V1a dans le septum est plus élevé [404]. L'activation de ces récepteurs est essentielle à l'habituation sociale chez la souris. Si ce mécanisme est conservé, il est cohérent qu'ils soient plus exprimés dans les espèces polygames dans lesquelles ce processus d'habituation sociale est bien présent puisqu'ils ne présentent pas de préférence pour leur partenaire.

Ainsi, les résultats obtenus dans le cadre d'un effet génétique sur la modulation, par l'ocytocine et/ou la vasopressine, du septum latéral pourraient être expliqués à la lumière des résultats obtenus dans notre étude.

1.1.6. Perspectives : la restauration de la séquence vasopressine/ocytocine permettrait-elle de corriger les troubles comportementaux observés chez les souris Magel2KO ?

Cette séquence essentielle à la régulation des comportements sociaux semble altérée chez les animaux Magel2KO. Nous avons démarré un programme expérimental consistant à moduler, dans le septum latéral de souris Magel2KO la fonction ocytocinergique et vasopressinergique au cours de l'interaction sociale afin de restaurer les comportements sociaux.

Pour cela, nous avons développé deux stratégies complémentaires:

- la première, pharmacologique, est basée sur l'administration intra-septale de vasopressine lors de la première rencontre ou d'ocytocine lors de la troisième rencontre avec le juvénile.
- La seconde, optogénétique, est basée sur l'utilisation d'une channelrhodopsine adressée respectivement aux neurones vasopressinergiques ou ocytocinergiques et d'une fibre optique permettant d'exciter la channelrhodopsine du septum latéral et d'ainsi induire une libération locale de vasopressine lors de la première rencontre ou d'ocytocine lors de la troisième rencontre.

La seconde stratégie mis en œuvre nécessite tout d'abord de contrôler l'efficacité de la channelrhodopsine pour la libération septale d'ocytocine ou de vasopressine. Pour cela, nous effectuons des tests électrophysiologiques en tranche. Pour ce test, nous utilisons des coupes frontales de cerveau de souris exprimant la channelrhodopsine dans les neurones ocytocinergiques. Un neurone du septum latéral activé par l'ocytocine est enregistré puis la tranche est illuminée afin de stimuler la channelrhodopsine et donc la libération d'ocytocine. Si la libération septale d'ocytocine a lieu, la stimulation devrait reproduire l'effet de l'application de TGOT. En testant ceci en présence d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine, nous pourrions démontrer l'efficacité des outils. Une expérience semblable est réalisée afin de tester l'efficacité d'une stratégie semblable visant à induire la libération septale de vasopressine. De plus, une telle expérience nous permet de tester si la libération septale d'ocytocine et de vasopressine est activité dépendante.

1.2. Analyse critique des résultats obtenus

Comportement chez les rongeurs

Cette étude a été réalisée chez la souris. Chez ces animaux, la reconnaissance sociale se traduit par une perte d'intérêt. Chez l'Homme, la reconnaissance sociale, au contraire, se traduit par une augmentation de l'interaction. La réponse comportementale à la même information varie donc en fonction de l'espèce.

La modulation de l'activité septale par l'ocytocine et la vasopressine est hautement conservée chez les rongeurs (voir la discussion associée à la partie A. 2. des résultats) et semble l'être chez l'Homme puisque des récepteurs de l'ocytocine ont été observés dans cette structure [405].

Néanmoins, il serait intéressant de savoir si l'ocytocine et la vasopressine sont alors libérées dans des conditions différentes d'une espèce à l'autre. Une autre possibilité est que la réponse comportementale à la libération septale de ces deux peptides varie d'une espèce à l'autre via une différence se situant en aval de cette modulation.

Electrophysiologie en tranche

Les expériences d'électrophysiologie ont été réalisées sur des tranches aiguës de cerveau de souris. Dans ces tranches, frontales, les afférences issues de l'hippocampe notamment mais également du BNST et du PVN sont coupées. Des études avaient permis de mettre en évidence un rôle modulateur de la vasopressine sur les EPSC ou les potentiels de champs induits par une stimulation de la fimbria [344][346][372][373]. Dans cette étude, nous sommes amenés à ignorer ces effets.

Expériences mettant en jeu les événements synaptiques

Dans les expériences réalisées visant à décrire l'action de l'ocytocine et de la vasopressine sur l'activité synaptique et ses conséquences sur l'effet modulateur de l'activité électrique, nous n'avons considéré que les événements GABAergiques en nous basant sur le fait que les événements reçus en condition basale sont majoritairement bloqués par la GABAzine et que les neurones du septum latéral eux aussi sont majoritairement GABAergiques [311]. Ainsi, dans nos interprétations, nous n'avons pas tenu compte de l'hypothèse selon laquelle l'ocytocine et/ou la vasopressine pouvaient moduler des afférences glutamatergiques (qui pourraient être nécessaires aux effets électriques induits par l'application de ces drogues).

Bien que l'application de GABAzine n'empêche pas la modulation de l'activité électrique induite par l'ocytocine et/ou la vasopressine sur des tranches frontales de cerveau de souris, il n'est pas exclu que les événements synaptiques GABAergiques (et leurs modulations par l'ocytocine et/ou la vasopressine) jouent un rôle prépondérant dans l'intégration des informations issues de fibres extérieures au septum et qui ont, dans les conditions de l'expérience, été sectionnées.

D'autre part, la mise en évidence d'évènements synaptiques dépendants de l'activation des récepteurs GABA_A (car bloqués par la GABAzine) démontre que du GABA est libéré à proximité des neurones enregistrés. Ce GABA pourrait également agir sur des récepteurs GABA_B et cette action pourrait être nécessaire aux effets électriques de l'application d'ocytocine ou de vasopressine sur l'activité des neurones du septum. Par exemple, l'administration intra-septale de baclofen (agoniste des récepteurs GABA_B) induit, chez la souris, une augmentation du temps passé à consommer du sucrose [406] ce qui suggère un effet de ce récepteur sur la recherche de plaisir. De plus, l'administration de baclofen dans le septum latéral diminue les effets anorexigènes du stress et augmente la quantité de sucrose ingérée [407] confirmant ces effets. D'autre part, l'activation septale (septum médian) des récepteurs GABA_B semble nécessaire à la mémoire de travail (mesurée chez le rat dans le labyrinthe à 8 branches) [408]. Pour finir, des effets électrophysiologiques de l'activation des récepteurs GABA_B septaux sur l'activité du réseau septo-hippocampal ont été mis en évidence [409] [410] ce qui renforce encore l'hypothèse selon laquelle ces récepteurs pourraient être impliqués dans les effets ocytocinergiques et vasopressinergiques que nous avons décrit.

Les évènements synaptiques GABAergiques

Nous avons montré que dans les conditions de l'enregistrement, la grande majorité des évènements synaptiques reçus par les neurones septaux sont des évènements GABAergiques. On considère souvent les évènements synaptiques GABAergiques comme étant hyperpolarisants et inhibiteurs de l'activité électrique. Néanmoins, ceci dépend du potentiel d'équilibre du chlore. En effet, les évènements synaptiques GABAergiques sont dus à l'activation des récepteurs GABA_A, des récepteurs canaux qui, lorsqu'ils sont activés, s'ouvrent. Ces récepteurs-canaux sont perméables aux ions chlorures mais le sens de passage de ces ions est déterminé par leur potentiel d'équilibre électro-chimique lui-même dépendant de l'expression et de l'activité relative des pompes KCC2 (faisant sortir les ions chlorure, son activité hyperpolarise le potentiel d'équilibre des ions chlorure) et NKCC1 (les faisant rentrer, son activité dépolarise le potentiel d'équilibre des ions chlorure). Il est bien connu que dans l'hippocampe, au cours du développement précoce, l'expression et l'activité de NKCC1 est importante et celle de KCC2 plus faible. Ceci résulte en une action dépolarisante du GABA. En revanche, plus tard, les tendances s'inversent et le GABA devient hyperpolarisant [275][278]. Néanmoins, l'étude de ce ratio dans les autres structures cérébrales n'a pas été systématique et les quelques études menées ont permis de montrer que le GABA pouvait être dépolarisant chez l'adulte (neurones magnocellulaires vasopressinergiques [411]) et que l'impact dépolarisant ou hyperpolarisant du GABA pouvait varier en fonction des conditions physiologiques (dans les neurones magnocellulaires ocytocinergiques au cours de la lactation [412], dans le cadre d'une prise importante de sels dans les neurones vasopressinergiques [413], dans l'aire CA1 de l'hippocampe de manière activité-dépendante [414]).

Une étude du potentiel d'équilibre du chlore dans les 3 catégories cellulaires décrites ainsi que chez les animaux Magel2KO pourrait nous faire avancer sur la compréhension du mode de communication entre les neurones du septum latéral. Pour cela, nous pourrions réaliser du patch perforé [415].

Dans notre étude, nous avons utilisé une solution intra-cellulaire menant le potentiel d'équilibre des ions chlorure à -50mV pour étudier les effets électriques d'applications de TGOT et/ou de vasopressine mais ceci a été choisi de manière arbitraire puisqu'aucune expérience ne visant à déterminer la valeur du potentiel d'équilibre n'a été réalisée. Néanmoins, notons que lors des expériences réalisées afin de déterminer l'abondance d'évènements synaptiques excitateurs et inhibiteurs, la définition de l'appartenance du neurone enregistré à l'une ou l'autre des 3 catégories neuronales décrite a été effectuée avec un potentiel d'équilibre du chlore à -80mV. Les proportions de neurones classés dans chacune des 3 catégories décrites semble indépendante du potentiel d'équilibre du chlore.

Inhibition de la fonction ocytocinergique/vasopressinergique via l'utilisation d'outils pharmacologiques ou optogénétiques

Spécificité des outils pharmacologiques utilisés in vivo

Dans cette étude, nous avons décidé d'utiliser des outils pharmacologiques pour moduler, *in vivo*, l'activation des récepteurs septaux de l'ocytocine et/ou de la vasopressine. Les problèmes dus à la faible spécificité des outils pharmacologique ont été adressés via l'utilisation d'antagonistes inhibant préférentiellement l'un ou l'autre des systèmes. Les résultats obtenus étant différents, nous pouvons conclure quant à la spécificité de l'action des outils utilisés pour inhiber ou activer les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine.

Spécificité des outils pharmacologiques utilisés ex vivo

En ce qui concerne les expériences d'électrophysiologie en tranche, nous avons utilisé de fortes doses d'agoniste ocytocinergique (TGOT) et de vasopressine mais les résultats indiquent que même à cette concentration, la spécificité est maintenue. En effet, la TGOT est sans effet sur les neurones activés par la vasopressine tandis que la vasopressine est sans effet sur les neurones activés par la TGOT.

Utilisation des outils pharmacologiques in vivo et durée de leur action

Les antagonistes utilisés *in vivo* sont dé-aminés et sont donc protégés de la dégradation. Nous ne connaissons pas la demi vie de ces peptides dans les conditions expérimentales utilisées et il est donc difficile de connaître la durée de leur effet. Néanmoins, nous avons observé des effets différents lorsque les administrations ont eu lieu au cours de la première ou de la 3^{ème} interaction ce qui suggère que la dégradation de ces peptides est effective au cours de l'expérience.

Problèmes induits par l'utilisation de l'outil optogénétique

L'utilisation de la technique d'optogénétique pose plusieurs problèmes. Dans le cadre de l'utilisation de l'halorhodopsine, une pompe à ions chlorure est exprimée à la membrane des neurones ocytocinergiques et son activation par la lumière au niveau des terminaisons neuronales induit leur hyperpolarisation qui devrait empêcher la libération septale d'ocytocine mais également des autres peptides et neurotransmetteurs contenus dans ces fibres. De plus, avec cette technique, nous faisons exprimer aux neurones ocytocinergiques une protéine qu'ils n'expriment normalement pas ce qui pourrait moduler leur activité et leur phénotype (bien que les neurones infectés expriment encore l'ocytocine). Notons que les effets comportementaux induits par l'inhibition optogénétique de la libération septale d'ocytocine et par l'inhibition pharmacologique des récepteurs septaux de l'ocytocine se rejoignent ce qui permet d'écarter l'hypothèse d'un artefact expérimental.

Les limites liées à l'utilisation du modèle murin Magel2 KO seront discutées dans la partie 3 de cette discussion.

1.3. Le septum chez l'Homme

Ces études ont été réalisées chez la souris mais le septum est une structure cérébrale conservée chez l'Homme [416] et qui a été impliquée dans la régulation des processus mnésiques ainsi que dans les troubles neurodéveloppementaux tels que la schizophrénie ou l'autisme [333]. Des récepteurs de l'ocytocine [405] ayant été décrits dans le septum humain, il est fortement possible que cette modulation ocytocinergique et vasopressinergique soit conservée chez l'Homme et qu'elle joue un rôle dans la physiopathologie des troubles sociaux (voir introduction).

2. Perspectives de recherche fondamentale

Les résultats obtenus au cours de cette thèse supportent 3 théories:

- L'ocytocine et la vasopressine sont complémentaires pour la régulation des comportements sociaux (séquentiels dans le cadre de notre étude) et forment un système qui doit être considéré dans son ensemble : on parle d'ailleurs de la « balance vasopressine-ocytocine »
- L'activation et/ou l'inhibition des neurones du septum par ces deux neuropeptides est essentielle à la régulation des comportements sociaux

- Au cours du développement périnatal, l'ocytocine joue un rôle essentiel pour le développement du système ocytocinergique et l'altération précoce de la fonction ocytocinergique (ou la délétion du gène *Magel2*) altère le développement de ce système.

Au-delà des expériences actuellement en cours qui ont déjà été évoquées et afin d'aller plus loin dans le développement de ces théories, plusieurs études sont possibles et nous décrivons, dans cette partie, 3 d'entre elles, chacune permettant d'étayer les théories mentionnés ci-dessus.

2.1. Régulation des effets séquentiels de la vasopressine et de l'ocytocine

Nous avons montré que la vasopressine et l'ocytocine agissent séquentiellement sur le septum latéral de manière à réguler les interactions sociales mais nous n'avons pas étudié les mécanismes responsables de cette séquence. Une hypothèse est que la vasopressine et l'ocytocine exerceraient un contrôle l'une sur l'autre. Ainsi, il est possible que la réponse ocytocine dépendante soit conditionnée par l'activation préalable des récepteurs vasopressinergiques septaux.

Afin de tester cette hypothèse, il faudrait tout d'abord montrer quelles sont les combinaisons d'hormones sécrétées dans le septum latéral et leurs dynamiques lors du test de reconnaissance/discrimination sociale. Pour cela, nous pourrions utiliser un système de microdialyse et mesurer les taux d'ocytocine et de vasopressine libérés dans le septum :

- lors de la première interaction afin de confirmer les résultats obtenus dans les précédentes études [143]
- lors du processus d'habituation afin de compléter les résultats des études précédentes qui avaient montré une augmentation de la libération septale d'ocytocine lors de la rencontre avec une souris déjà rencontrée auparavant mais qui n'avaient pas mesuré la vasopressine [144]

Ensuite, il faudrait manipuler, de manière définie dans le temps, l'activité de ces deux systèmes simultanément.

Pour cela, on peut envisager d'utiliser des outils optogénétiques. En effet, les avancées dans ce domaine ont permis de générer des outils dérivés de la channelrhodopsine activables avec des longueurs d'ondes différentes. De plus, l'utilisation de virus permet d'adresser des gènes à un sous type cellulaire spécifique (dans notre cas, les neurones ocytocinergiques et/ou vasopressinergiques) via l'utilisation de

promoteurs spécifiques du type cellulaire souhaité. La structure cible, elle, est déterminée par les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour l'injection des virus comme cela a été le cas dans notre étude.

Ainsi, en adressant :

- une channelrhodopsine classique (activée par la lumière bleue) dans les neurones ocytocinergiques projetant jusqu'au septum latéral et une channelrhodopsine modifiée (activée par la lumière rouge [417]) dans les neurones vasopressinergiques projetant vers le septum latéral
- ou une channelrhodopsine classique dans les neurones ocytocinergiques et une halorhodopsine dans les neurones vasopressinergiques
- ou une channelrhodopsine classique dans les neurones vasopressinergiques et une halorhodopsine dans les neurones ocytocinergiques

il serait possible de contrôler, en même temps, l'activité de ces deux systèmes.

Plusieurs expériences pourraient alors être réalisées afin de répondre à des hypothèses spécifiques :

Hypothèse	Expérience	Résultats attendus	Interprétation
La fonction de la vasopressine est de désinhiber les neurones sensibles à l'ocytocine	Inhibition des fibres vasopressinergiques au cours de la 1 ^{ère} rencontre	L'activation des fibres ocytocinergiques au cours de la 3 ^{ème} rencontre n'empêche pas les troubles induits	La fonction de la vasopressine est directe
	VS Inhibition des fibres vasopressinergiques au cours de la 1 ^{ère} rencontre et activation des fibres ocytocinergiques lors de la 3 ^{ème} rencontre	par l'inhibition des fibres vasopressinergiques au cours de la 1 ^{ère} rencontre OU Elle l'empêche	OU le rôle pro-social de la vasopressine passe par une désinhibition du système ocytocinergique
La fonction de l'ocytocine passe par une inhibition de l'activité du système vasopressinergique	Inhibition des fibres ocytocinergiques au cours de la 3 ^{ème} rencontre	L'activation des fibres vasopressinergiques n'empêche pas les troubles sociaux induits par l'inhibition	La fonction de l'ocytocine est directe
	VS		OU Son rôle prosocial passe par l'inhibition

	Inhibition des fibres ocytocinergiques et activation des fibres vasopressinergiques au cours de la 3 ^{ème} rencontre	des fibres ocytocinergiques au cours de la 3 ^{ème} rencontre OU Elle l'empêche	de l'activité du système vasopressinergique
L'habituation sociale est due à la co- activation du système ocytocinergique et du système vasopressinergique septal	Activation des fibres ocytocinergiques et des fibres vasopressinergiques lors de la 1 ^{ère} rencontre sociale	La co-activation est sans impact OU elle induit une diminution du temps d'interaction au cours de la première rencontre	L'habituation sociale n'est pas seulement due à la coïncidence d'activité des systèmes ocytocinergiques et vasopressinergiques OU Elle l'est

Ces expériences nous permettraient de mieux comprendre comment l'activation du système vasopressinergique et du système ocytocinergique dans le septum s'agencent et/ou se modulent, l'un avec l'autre.

Dans le cadre des expériences proposées ci-dessus, nous ne tenons pas compte d'une éventuelle régulation au niveau des structures afférentes. En effet, il est connu que les neurones ocytocinergiques du PVN projettent sur le BNST et que l'ocytocine peut moduler l'activité des neurones du BNST [418] [419] [420]. De plus, l'administration intra-BNST d'antagoniste des récepteurs ocytocinergiques empêche la discrimination sociale [420] ce qui rappelle l'impact de l'administration intra-septale d'un tel antagoniste. Il est donc possible que l'ocytocine empêche l'activation des neurones vasopressinergiques du BNST bien que nous n'ayons pas testé cette hypothèse.

2.2. Détermination des neurones septaux activés par l'interaction et l'habituation sociale et de leurs rôles respectifs dans la régulation des comportements sociaux

Des stratégies virales ont été mises en place afin de faire exprimer une protéine de notre choix (protéine fluorescente par exemple) en réponse à l'activation d'un « immediate early gene » (IEG). Les IEG sont des gènes dont l'expression est induite dans les neurones après leur activation. C'est notamment le cas de c-Fos ou Arc. Dans plusieurs études, ces gènes ont été utilisés afin de déterminer les populations cellulaires activées dans une situation donnée. Ainsi, lors de l'interaction sociale, une expression du gène c-fos a lieu dans différentes structures cérébrales telles que l'amygdale ou le noyau du lit de la strie terminale. En faisant exprimer aux neurones de l'animal étudié une GFP placée sous le contrôle du promoteur de c-fos, l'activation de ce promoteur induira l'expression de la protéine GFP ce qui permettra la visualisation des neurones qui ont été activés. Afin de contrôler, dans le temps, le moment où le système peut être actif, une technique appelée TRAP (Targeted Recombination in Active Populations) a été développée [421]. Cette technique combine l'utilisation des IEG à la technique d'induction de la cre-recombinase par le tamoxifène. En effet, une cre-recombinase modifiée (cre-ER), inactive, mais qui peut être activée par l'utilisation de tamoxifène est utilisée. Une fois activée, la cre-ER pourra avoir une action de type « cre-recombinase » au niveau de sites LoxP. Ainsi, en l'absence de tamoxifène, la cre n'est pas exprimée.

La technique de TRAP nécessite donc l'utilisation de deux transgènes :

- l'un permettant l'expression de la cre-ER sous le contrôle du promoteur de l'IEG choisi
- l'autre permettant l'expression du gène d'intérêt de façon cre-dépendante (séquence entourée de sites loxP)

Lorsque le tamoxifène est administré de manière systémique ou locale, celui-ci permet l'activation de la cre pendant une durée de quelques heures et les cellules exprimant les IEG pendant cette période subiront une recombinaison (définitive) induisant une expression du gène d'intérêt.

Cette stratégie pourrait être utilisée afin de répondre à trois questions :

1. Quelle est la nature des neurones septaux activés suite à une interaction sociale ?
2. L'activation de ces neurones est-elle essentielle à la régulation des interactions sociales ?
3. Y a-t-il une séquence d'activation de ces neurones pendant le comportement ?

Pour répondre à la première question, nous utiliserions, comme gène d'intérêt un gène codant pour une protéine fluorescente (GFP par exemple). Le transgène permettant l'expression de ce gène d'intérêt serait adressé au septum latéral via l'utilisation de virus qui seraient administrés par stéréotaxie. Ainsi, après avoir administré le tamoxifène, les animaux seraient séparés en 3 groupes :

- Condition 1 : Les animaux seraient placés dans l'arène mais aucun juvénile ne leur serait présenté
- Condition 2 : Les animaux seraient placés dans l'arène et une interaction avec un juvénile d'une durée de 5 minutes aurait lieu
- Condition 3 : Les animaux seraient placés dans l'arène et 4 interactions successives d'une durée de 5 minutes auraient lieu avec le même juvénile.

Ainsi, nous pourrions déterminer les neurones activés par le contexte (condition 1), ceux activés par une interaction sociale (condition 2) et ceux activés par le phénomène d'habituation sociale (condition 3). Des expériences d'électrophysiologie en tranche pourraient alors être réalisées et les neurones exprimant la GFP seraient enregistrés et leur réponse électrique à l'application de TGOT et de vasopressine serait évaluée. Ceci nous permettrait de déterminer la nature des neurones du septum latéral répondant à l'interaction sociale ou à l'habituation sociale et de tester une partie des hypothèses évoquées en figure 28.

Afin de répondre à la seconde question, le gène d'intérêt utilisé serait une halorhodopsine. Les 3 conditions décrites plus haut seraient utilisées. Cette stratégie nous permettrait de cibler l'halorhodopsine afin qu'elle soit exprimée :

- par les cellules activées par le contexte (condition 1). Dans cette condition, nous activerions l'halorhodopsine au cours de la première interaction sociale, ou au cours de la 3^{ème} interaction sociale, et cette expérience constituerait l'expérience contrôle. Dans ce cas, nous ne nous attendrions pas à un impact comportemental des inhibitions optogénétiques
- par les cellules activées au cours de la première interaction (condition 2). Ainsi, nous pourrions tester l'hypothèse suivante : l'activation de neurones du septum au cours de la première interaction sociale est nécessaire à l'habituation sociale. Pour ce faire, nous inhiberions, par optogénétique, l'activité de ces neurones. Si l'inhibition induit une altération de l'habituation, cela montre que l'activation de ces neurones est essentielle à cette habituation.
- par les cellules activées au cours de l'habituation sociale (condition 3). Ainsi, nous pourrions tester l'hypothèse suivante : l'activation de neurones du septum au cours de l'habituation sociale est nécessaire au regain d'intérêt induit par la présentation d'un nouveau juvénile. Pour ce faire, nous inhiberions, par optogénétique, l'activité de ces neurones. Si l'inhibition empêche le regain d'intérêt

induit par la présentation d'un nouveau congénère, cela montre que l'activation de ces neurones est essentielle à ce regain d'intérêt.

La réponse à la 3^{ème} question découlerait des conclusions établies suite à la réalisation de ces expériences. Ces expériences, ainsi que celles que nous avons déjà réalisées, permettraient de démontrer le lien entre la modulation de l'activité électrique induite par l'ocytocine et la vasopressine sur les neurones du septum latéral et la modulation comportementale induite par ces deux peptides.

2.3. Mode d'action de la modulation, par l'administration précoce d'ocytocine, du développement du système ocytocinergique

Jusqu'ici, bon nombre d'études se sont intéressés aux effets à long terme de modulations précoces de l'activité du système ocytocinergique chez des animaux sauvages et des animaux malades. Pour cela, les chercheurs ont utilisés des administrations périphériques (intra-péritonéales [165][422], sous cutanées [254][255] ou intra nasale [423]) et massives d'ocytocine ou d'antagonistes des récepteurs de l'ocytocine. Bien qu'au cours de la petite enfance, la barrière hémato-encéphalique existe, il semble qu'elle laisse passer certaines molécules [70] [77].

Une étude réalisée par MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation) a permis de montrer, après administration sous cutanée d'ocytocine à P0, une augmentation de la concentration en ocytocine centrale [255] mais cette étude ne montre pas que l'ocytocine administrée est celle qui est retrouvée centralement. En effet, comme chez l'adulte, 3 mécanismes sont envisageables

- l'ocytocine injectée pénètre directement dans le cerveau
- l'ocytocine injectée se retrouve en partie dans le liquide cérébro-rachidien et via une action sur les structures circumventriculaires active la production endogène d'ocytocine
- l'ocytocine injectée agit en périphérie et une conséquence de cette action est, indirectement, la libération centrale d'ocytocine

Pour montrer que l'ocytocine administrée pénètre le cerveau des animaux, il faudrait que la molécule injectée soit modifiée et discernable de l'ocytocine endogène (ocytocine deutérée par exemple).

Ainsi, il n'a pas été montré clairement que l'ocytocine centrale joue, chez le nouveau-né, un rôle essentiel à la mise en place des réseaux neuronaux régulant les comportements sociaux.

L'utilisation d'outils chémogénétique permettrait une telle démonstration. En effet, en adressant des DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs) [424] aux neurones ocytocinergiques via le croisement d'une souris exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de l'ocytocine (OT-cre) et d'une souris dont le génome comprendrait le gène hM3Dq entre deux séquences loxP et orienté inversement à son promoteur. Ainsi, dans les neurones ocytocinergiques seulement, l'expression de la cre-recombinase aurait lieu, la séquence hM3Dq serait recombinaée ce qui rendrait son expression possible. De cette manière, les neurones ocytocinergiques exprimeraient ce récepteur couplé à la protéine Gq. L'administration périphérique du ligand de ce récepteur (Clozapine N-Oxyde) induirait l'activation des neurones ocytocinergiques et la libération centrale (et périphérique) d'ocytocine endogène. Ceci permettrait une libération plus contrôlée. Ainsi, nous pourrions étudier l'impact d'un tel traitement sur la restauration des troubles sociaux des souris Magel2KO.

Une stratégie similaire mais utilisant hM4Di, un récepteur couplé à la protéine Gi permettrait d'étudier l'impact d'une inhibition précoce de l'activité des neurones ocytocinergiques. De cette manière, l'impact de la modulation du système vasopressinergique (non négligeable en pharmacologie du fait de la faible spécificité des outils utilisés) sur les effets décrits suite à l'administration périphérique de fortes doses d'ocytocine ou d'antagoniste des récepteurs de l'ocytocine pourrait être mis en évidence ce qui permettrait des conclusions plus justes. Ces expériences sont d'autant plus importantes que l'administration d'ocytocine chez les bébés est actuellement en cours dans des essais cliniques. Une bonne compréhension des mécanismes mis en jeu est essentielle afin de limiter les risques de ces traitements. En effet, les études chez l'Homme mettent des années et chez la souris, il a été montré que l'impact d'un traitement périnatal n'est parfois visible que chez l'adulte. La découverte d'effets secondaires pourrait avoir lieu dans 10 ans ou plus et afin de limiter les risques d'une mauvaise surprise, l'origine des effets bénéfiques observés doit être mieux comprise.

3. Origine des troubles induits par la déficience en Magel2

Comme discuté dans la partie « problématique et stratégie expérimentale », l'utilisation du modèle murin Magel2KO est avantageux car :

- ce modèle, génétique, est un bon modèle du syndrome de Schaaf Yang (isomorphe, homologue et à priori prédictif [425]).
- les troubles ne sont pas induits par une altération directe du système ocytocinergique ce qui permet d'étudier des mécanismes ocytocinergiques sans introduire un biais.

Néanmoins, le mécanisme à l'origine des troubles sociaux est incompris tout comme le lien entre la délétion du gène *Magel2* et l'altération de la fonction ocytocinergique.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, le gène *Magel2* est un gène à empreinte (dont seul l'allèle paternel s'exprime) codant pour une protéine dont la fonction exacte reste méconnue mais qui augmente l'activité ubiquitine ligase et régule le transport rétrograde.

3.1. Les gènes de la famille MAGE codent pour des protéines impliquées dans la régulation du système ubiquitine/protéasome et leur délétion induit des syndromes semblables

Des études menées sur d'autres gènes de la famille MAGE ont également montré un lien avec l'ocytocine et les troubles sociaux. C'est le cas du gène *MAGED1*, un gène non associé au syndrome de Prader Willi mais qui possède de grandes homologies avec les gènes *NECDIN* et *MAGEL2*. La protéine *MAGED1* est également impliquée dans la régulation du système ubiquitine-protéasome [426].

Les souris *MAGED1* KO présentent des troubles rappelant le syndrome de Prader Willi avec notamment une diminution de l'interaction sociale, une altération de la discrimination sociale, une anxiété accrue, une altération de la fonction sexuelle, une diminution du poids à 4 semaines et une obésité tardive (à 1 an). L'altération du système ocytocinergique passe par une diminution de l'ocytocine mesurée dans l'hypothalamus chez l'adulte (sans altération de la vasopressine), une augmentation de la présence de formes immatures dans le PVN traduisant une altération de la maturation de ce peptide, et une amélioration aigüe des troubles sociaux induits par une administration sous cutanée d'ocytocine [427].

Dans ce modèle, ainsi que dans les souris déficientes pour le gène *NECDIN* [253], une altération de la fonction sérotoninergique a également été mise en évidence et dans ce modèle, cette altération est liée à une augmentation de l'ubiquitination du transporteur à la sérotonine SERT [426].

Ces résultats suggèrent que l'altération de la fonction des gènes MAGE conduit à des troubles similaires mettant en jeu une altération de la fonction ocytocinergique et/ou de la fonction sérotoninergique. Cette similitude d'effets suggère que ceux-ci sont dépendants de la fonction des gènes de la famille MAGE en tant que régulateurs du système ubiquitine/protéasome.

3.2. Fonction du système ubiquitine/protéasome et troubles sociaux

L'implication des troubles de la fonction du système ubiquitine/protéasome dans les troubles sociaux et les troubles du spectre autistique a été mise en évidence dans le cadre d'une étude du génome réalisée sur une cohorte de 859 patients atteints d'ASD et 1409 enfants non malades [428]. Dans cette étude, environ 550.000 SNP (single nucleotide polymorphisms) ont été étudiés afin de déterminer ceux qui sont préférentiellement associés aux ASD. Parmi les familles de gènes de susceptibilité, on retrouve

- des gènes codants pour les molécules d'adhésion cellulaire neuronales
- des gènes impliqués dans la voie de l'ubiquitination.

Une hypothèse suggère que les troubles du spectre autistique sont liés à une altération de l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique [429], ces deux processus étant physiologiquement finement régulés. En effet, parmi les gènes de susceptibilité étudiés, on retrouve des gènes impliqués dans la traduction (FMR1 est l'exemple le plus étudié du fait de son implication dans le syndrome du X-fragile) et des gènes impliqués dans la dégradation protéique (dont UBE3A est l'exemple le plus étudié du fait de son implication dans le syndrome d'Angelman).

Le système ubiquitin/protéasome a d'abord été étudié dans le cadre du syndrome d'Angelman, un syndrome d'origine génétique rare (prévalence de 1/15.000) causé par un déficit d'expression d'Ube3A [430] [431]. Le syndrome est caractérisé par un déficit intellectuel sévère, un retard de développement (moteur notamment), une hyperactivité et une quasi-absence de langage. Les patients présentent souvent des troubles épileptiques, des anomalies EEG (qui sont utilisées pour l'établissement du diagnostic [432]) et des troubles dysmorphiques. Les troubles du spectre autistique constituent une co-morbidité fréquente dans ce syndrome. Les modèles animaux de la pathologie ont permis de mettre en évidence que l'absence d'expression d'Ube3a est responsable d'une altération de la fonction synaptique [433] [434] [391] rappelant les troubles induits par la mutation du gène FMRP. Notons que le gène codant pour Ube3a est situé sur le chromosome 15 chez l'Homme et plus particulièrement au niveau du locus q11-q13 qui est également le locus associé au syndrome de Prader Willi et dans lequel on retrouve notamment le gène Magel2. L'association de ce locus aux troubles autistiques et à des défauts de l'activité EEG est marquée [435].

Ainsi, le lien entre la délétion du gène Magel2 et la génération de troubles sociaux de type autistique pourrait résulter d'une mauvaise connectivité neuronale associée à une altération de la balance entre synthèse et dégradation protéique dépendante, dans ce cas, du système ubiquitine/protéasome. Il serait

possible que, chez les souris Magel2KO, l'ubiquitination des récepteurs de l'ocytocine soit augmentée dans le septum latéral (expliquant la diminution de la liaison au récepteur de l'ocytocine).

3.3. Une altération de la fonction ocytocinergique

Les troubles induits par la mutation de gènes de la famille MAGE et d'autres gènes impliqués dans la synthèse/dégradation des protéines (comme Ube3A) sont des syndromes hypothalamiques. Les troubles induits peuvent s'expliquer par des altérations de la fonction hormonale.

Les hormones doivent être produites en très grande quantité et les cellules endocrines sont donc très sensibles à une altération de la balance synthèse/dégradation. Une étude a permis de montrer que dans le cadre d'une obésité prolongée, le système ubiquitine/protéasome est dépassé et ne permet plus de maintenir un taux adéquat de recyclage protéique et ceci mène à une accumulation des protéines ubiquitinées. De plus, une inhibition du protéasome induit, chez la souris, une accélération de la prise de poids en réponse à un régime riche en gras [436]. Ainsi, une dysfonction du système ubiquitine protéasome peut induire une sensibilité aux facteurs environnementaux menant à des troubles hypothalamiques. Ceci est probablement à l'origine des troubles observés dans le syndrome de Schaaf Yang, d'Angelman ou de Prader Willi (bien que dans le cas de ce dernier, la pathologie soit d'origine multigénique ce qui complique les interprétations).

Dans le cadre d'une perte d'expression du gène Magel2, le système ocytocinergique est particulièrement touché. En effet, bien que le rôle de Magel2 spécifiquement dans la fonction ocytocinergique soit méconnu, nous savons que sa délétion induit, chez la souris :

- une altération précoce et transitoire de la maturation de l'ocytocine
- une diminution de l'expression des récepteurs de l'ocytocine dans le septum latéral chez l'adulte
- une augmentation de l'immunomarquage des fibres ocytocinergiques dans différentes structures cérébrales dont le noyau moteur dorsal du nerf vague, l'amygdale médiale et le septum latéral.
- une augmentation de la proportion de neurones répondant à l'ocytocine dans le septum (nos résultats)

De plus, les troubles alimentaires présents à la naissance chez les souris Magel2KO et les troubles sociaux présents chez souris Magel2KO mâles sont améliorés par l'administration périnatale d'un traitement sous cutané à l'ocytocine (injection quotidienne de 20uL d'ocytocine à une concentration de 10^{-4} M) [255].

Le lien entre la fonction d'ubiquitination et le système ocytocinergique n'est pas connu. On peut tout de même faire des hypothèses dont la suivante : dans le cadre d'une dysfonction du système

ubiquitine/protéasome, la fonction des cellules endocrines est altérée. Les cellules endocrines responsables de la production d'ocytocine sont les neurones ocytocinergiques. Ces derniers ont également une fonction neuro-modulatrice essentielle à la régulation des comportements sociaux. Ainsi, s'ils sont touchés, les fonctions sociales qu'ils régulent sont altérées.

Bien sûr, les troubles du spectre autistiques mis en évidence dans les pathologies évoquées ne sont probablement pas dépendants uniquement d'une altération de la fonction ocytocinergique. Néanmoins, un traitement précoce avec l'ocytocine restaure une grande partie des troubles chez l'animal [254][255][427][107] et potentiellement chez l'Homme [264] suggérant un rôle particulier de l'ocytocine dans le cadre des pathologies sociales. En combinant l'étude d'un réseau septal sensible à l'ocytocine et le développement du système ocytocinergique endocrine, nos résultats suggèrent un rôle particulier des projections PVN-LS pour la régulation des comportements sociaux. Notons que dans ces structures, Magel2 est fortement exprimé [273] [437].

Afin de mieux comprendre le lien entre la déficience de Magel2 et les troubles sociaux induits dans le cadre de ce modèle animal, il est essentiel de décrire l'impact d'une délétion de Magel2 uniquement dans les neurones ocytocinergiques. En effet, ceci permettra de comprendre si les troubles ocytocinergiques sont dus à la déficience en Magel2 ou à la conséquence de cette délétion sur la fonction hormonale (modulation de la vasopressine, de la ghréline ou d'autres systèmes endocrines dont la fonction est liée à celle de l'ocytocine). Au contraire, nous pourrions restaurer l'expression du gène Magel2 dans les neurones ocytocinergiques du PVN de souris Magel2KO à l'aide d'un virus cre-dépendant. Cette stratégie nous permettrait de savoir si l'expression de Magel2 dans cette structure est suffisante pour restaurer les troubles sociaux.

4. Exploitations des résultats pour le traitement des pathologies

4.1. Du modèle souris Magel2KO aux troubles du spectre autistique

Le modèle animal Magel2KO a été utilisé dans cette étude car il a permis d'étudier, sur une population homogène, l'impact d'un des gènes de susceptibilité à l'autisme sur la modulation, par la vasopressine et l'ocytocine, d'un réseau septal impliqué dans la régulation des comportements sociaux. D'autre part, il nous a permis de mettre en évidence qu'il est essentiel d'étudier en parallèle le système ocytocine et le système vasopressine même dans le cas où l'un des systèmes semble plus perturbé. En effet,

dans ce cas, les troubles ocytocinergiques sont plus marqués mais l'altération de la fonction septale passe notamment par une diminution de la sensibilité des neurones septaux à la vasopressine.

Les troubles du spectre autistique sont complexes et c'est pourquoi il est question de « spectre ». L'étude de la population autistique dans son ensemble n'a, jusqu'ici, pas permis d'arriver à un traitement efficace. En comprenant mieux l'étiologie de certaines sous classes d'autisme (cas du syndrome de Schaaf Yang par exemple...), nous pourrions mieux comprendre les voies de signalisation communes mises en jeu dans les altérations des troubles sociaux. En effet, l'étude du syndrome du X fragile a permis de mettre en évidence une altération de la traduction protéique et l'étude du syndrome d'Angelman ou du syndrome de Schaaf Yang suppose une altération du système ubiquitine/ligase. Bien que les voies de signalisation mises en jeu soient différentes, un mécanisme physiologique commun est touché ce qui permet de réconcilier la grande diversité des étiologies à des symptômes plus homogènes.

4.2. Traitement des troubles induits par l'altération de la fonction du réseau septal sensible à l'ocytocine et/ou à la vasopressine

L'étude de l'impact d'une modulation septale de la fonction ocytocinergique et/ou vasopressinergique sur la régulation des troubles sociaux induits chez les animaux Magel2KO nous permettra de mieux comprendre l'origine des troubles dans ce modèle. Néanmoins, ceci ne nous permettra pas, dans l'immédiat, d'envisager un traitement. En effet, nous tentons de restaurer les troubles en stimulant, à un moment choisi, la fonction ocytocinergique et/ou vasopressinergique qui fait défaut. Cette stratégie ne sera efficace qu'à condition que le système de réponse à l'ocytocine et à la vasopressine soit présent (ce qui est indiqué par les résultats obtenus lors des expériences d'électrophysiologie sur tranche) et que les troubles trouvent leur origine dans un défaut de libération d'ocytocine et/ou de vasopressine induite par les comportements sociaux. Si tel est le cas, un traitement chronique chez l'adulte ne permettra pas de restaurer les comportements sociaux car il ne permettra pas la coïncidence entre l'activation de la voie ocytocinergique et/ou vasopressinergique et l'interaction sociale.

Les traitements envisageables se doivent d'être plus précoces et d'agir en amont de l'apparition des troubles via un effet bénéfique sur le développement du système ocytocine/vasopressine. En effet, il semble exister une période critique neuro-développementale au cours de laquelle l'ocytocine est essentielle (voir introduction de cette thèse). C'est ainsi que le traitement péri-natal à l'ocytocine, qui normalise des paramètres d'activité des neurones ocytocinergiques, se pose comme un traitement très prometteur. L'étude de la fonction du réseau septal chez des animaux Magel2KO traités à la naissance à l'ocytocine nous

permettra de déterminer s'il permet effectivement de retrouver une fonction « normale » (ou compensée) des réseaux régulant les comportements sociaux.

4.3. Utilisation des résultats pour la classification des troubles autistiques

Comme nous l'avons évoqué, les troubles du spectre autistiques sont complexes et il est probable qu'un traitement donné n'ait un effet bénéfique que sur une sous-catégorie de patients. Ainsi, si le traitement à l'ocytocine agit sur les troubles induisant une altération de la réponse septale à l'ocytocine et à la vasopressine (dans le cadre de la délétion de *Magel2*), il est intéressant de pouvoir détecter de telles altérations. Dans cette étude, nous avons montré que l'analyse de l'activité EEG en réponse à une interaction sociale permet de déterminer l'existence de troubles de la modulation ocytocinergique de la fonction septale.

L'EEG est un outil diagnostique déjà envisagé dans le cadre des ASD [216]. En effet, chez l'Homme, la réalisation d'un EEG est un acte non invasif qui peut être réalisé très tôt (sur des patients de moins d'un an) avant que les troubles comportementaux ne soient importants [438]. De tels outils diagnostiques permettraient une détection précoce de la pathologie ce qui rendrait possible les traitements périnataux.

L'utilisation de modèles animaux a déjà permis de montrer, dans le cadre du syndrome du X fragile, que les altérations de la fonction EEG observées chez l'Homme le sont aussi dans le modèle animal [439] suggérant un lien clair entre l'altération génétique à l'origine du troubles et les changements d'activité EEG. Ainsi, l'étude chez l'Homme et notamment dans le cadre du syndrome de Prader Willi (syndrome dans lequel le gène *Magel2*, entre autres, n'est pas exprimé) permettrait d'étudier la trace EEG que nous avons décrite dans notre étude. Si celle-ci est conservée, elle pourrait constituer un outil diagnostique intéressant. Ceci est d'autant plus pertinent que des études de patients présentant des duplications de la région q11-q13 du chromosome 15 [435] ont déjà permis de montrer des anomalies EEG. L'inclusion d'une tâche comportementale sociale permettrait de faire émerger des endophénotypes et fourniraient un aspect fonctionnel en lien avec l'activité sociale.

Une application clinique des résultats de cette étude est ainsi envisageable dès lors que les résultats obtenus chez les animaux *Magel2*KO seront reproduits chez l'Homme dans le cadre des syndromes de Schaaf Yang ou de Prader Willi.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. Page, W. F. McCool, and M. Guidera, "Examination of the Pharmacology of Oxytocin and Clinical Guidelines for Use in Labor," *J. Midwifery Womens Health*, vol. 62, no. 4, pp. 425–433, Jul. 2017.
- [2] J. Danziger and M. L. Zeidel, "Osmotic homeostasis," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN*, vol. 10, no. 5, pp. 852–862, May 2015.
- [3] M. Lozić, O. Šarenac, D. Murphy, and N. Japundžić-Žigon, "Vasopressin, Central Autonomic Control and Blood Pressure Regulation," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 20, no. 2, p. 11, Feb. 2018.
- [4] R. Ivell, H. Schmale, and D. Richter, "Vasopressin and oxytocin precursors as model preprohormones," *Neuroendocrinology*, vol. 37, no. 3, pp. 235–240, Sep. 1983.
- [5] J. P. Rose, C. K. Wu, C. D. Hsiao, E. Breslow, and B. C. Wang, "Crystal structure of the neurophysin-oxytocin complex," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 3, no. 2, pp. 163–169, Feb. 1996.
- [6] C. H. Nickel, R. Bingisser, and N. G. Morgenthaler, "The role of copeptin as a diagnostic and prognostic biomarker for risk stratification in the emergency department," *BMC Med.*, vol. 10, p. 7, Jan. 2012.
- [7] J. K. Kim and R. W. Schrier, "Vasopressin processing defects in the Brattleboro rat: implications for hereditary central diabetes insipidus in humans?," *Proc. Assoc. Am. Physicians*, vol. 110, no. 5, pp. 380–386, Oct. 1998.
- [8] P. A. Fields, R. K. Eldridge, A.-R. Fuchs, R. F. Roberts, and M. J. Fields, "HUMAN PLACENTAL AND BOVINE CORPORA LUTEAL OXYTOCIN," *Endocrinology*, vol. 112, no. 4, pp. 1544–1546, Apr. 1983.
- [9] F. Stormshak, "Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum," *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE*, vol. 1, p. 92, Nov. 2003.
- [10] D. L. Lefebvre, R. Lariviere, and H. H. Zingg, "Rat amnion: a novel site of oxytocin production," *Biol. Reprod.*, vol. 48, no. 3, pp. 632–639, Mar. 1993.
- [11] E. Grazzini *et al.*, "Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 449, pp. 325–334, 1998.
- [12] M. Altstein and H. Gainer, "Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 8, no. 11, pp. 3967–3977, Nov. 1988.
- [13] N. Gassanov *et al.*, "Functional activity of the carboxyl-terminally extended oxytocin precursor Peptide during cardiac differentiation of embryonic stem cells," *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 26, no. 1, pp. 45–54, Jan. 2008.
- [14] B. A. Danalache, J. Gutkowska, M. J. Slusarz, I. Berezowska, and M. Jankowski, "Oxytocin-Gly-Lys-Arg: a novel cardiomyogenic peptide," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, p. e13643, Oct. 2010.
- [15] J. A. Amico and J. Hempel, "An oxytocin precursor intermediate circulates in the plasma of humans and rhesus monkeys administered estrogen," *Neuroendocrinology*, vol. 51, no. 4, pp. 437–443, Apr. 1990.
- [16] M. Tsujimoto and A. Hattori, "The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1751, no. 1, pp. 9–18, Aug. 2005.
- [17] S. Nomura *et al.*, "Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1751, no. 1, pp. 19–25, Aug. 2005.
- [18] H. Matsumoto *et al.*, "Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides," *Eur. J. Biochem.*, vol. 268, no. 11, pp. 3259–3266, Jun. 2001.
- [19] W. B. Mens, A. Witter, and T. B. van Wimersma Greidanus, "Penetration of neurohypophyseal hormones from plasma into cerebrospinal fluid (CSF): half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF," *Brain Res.*, vol. 262, no. 1, pp. 143–149, Feb. 1983.
- [20] V. A. Tobin *et al.*, "Oxytocinase in the female rat hypothalamus: a novel mechanism controlling oxytocin neurones during lactation," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 26, no. 4, pp. 205–216, Apr. 2014.
- [21] J. Hernández *et al.*, "Stress influences brain enkephalinase, oxytocinase and angiotensinase activities: a new hypothesis," *Neuropsychobiology*, vol. 59, no. 3, pp. 184–189, 2009.

- [22] L. Gouzènes, G. Dayanithi, and F. C. Moos, "Vasopressin(4-9) fragment activates V1a-type vasopressin receptor in rat supraoptic neurones," *Neuroreport*, vol. 10, no. 8, pp. 1735–1739, Jun. 1999.
- [23] J. J. Dreifuss, "A review on neurosecretory granules: their contents and mechanisms of release," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 248, pp. 184–201, Feb. 1975.
- [24] R. P. Rubin, "The Role of Calcium in the Release of Neurotransmitter Substances and Hormones," *Pharmacol. Rev.*, vol. 22, no. 3, pp. 389–428, Sep. 1970.
- [25] A. Dutton and R. E. Dyball, "Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis," *J. Physiol.*, vol. 290, no. 2, pp. 433–440, May 1979.
- [26] M. Cazalis, G. Dayanithi, and J. J. Nordmann, "The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe," *J. Physiol.*, vol. 369, pp. 45–60, Dec. 1985.
- [27] M. B. Jackson, A. Konnerth, and G. J. Augustine, "Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 2, pp. 380–384, Jan. 1991.
- [28] V. Grinevich, M. G. Desarménien, B. Chini, M. Tauber, and F. Muscatelli, "Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders," *Front. Neuroanat.*, vol. 8, 2015.
- [29] M. D. Mitchell, D. L. Kraemer, S. P. Brennecke, and R. Webb, "Pulsatile release of oxytocin during the estrous cycle, pregnancy and parturition in sheep," *Biol. Reprod.*, vol. 27, no. 5, pp. 1169–1173, Dec. 1982.
- [30] M. J. Freund-Mercier *et al.*, "Role of central oxytocin in the control of the milk ejection reflex," *Brain Res. Bull.*, vol. 20, no. 6, pp. 737–741, Jun. 1988.
- [31] M. J. Brimble and R. E. J. Dyball, "Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation," *J. Physiol.*, vol. 271, no. 1, pp. 253–271, Sep. 1977.
- [32] T. Onaka, "Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 16, no. 4, pp. 308–312, Apr. 2004.
- [33] P. K. Olszewski, C. Ulrich, N. Ling, K. Allen, and A. S. Levine, "A non-peptide oxytocin receptor agonist, WAY-267,464, alleviates novelty-induced hypophagia in mice: Insights into changes in c-Fos immunoreactivity," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 124, pp. 367–372, Sep. 2014.
- [34] S. Stock and K. Uvnäs-Moberg, "Increased plasma levels of oxytocin in response to afferent electrical stimulation of the sciatic and vagal nerves and in response to touch and pinch in anaesthetized rats," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 132, no. 1, pp. 29–34, Jan. 1988.
- [35] M. Eliava *et al.*, "A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing," *Neuron*, vol. 89, no. 6, pp. 1291–1304, Mar. 2016.
- [36] J. A. Barraza and P. J. Zak, "Empathy toward strangers triggers oxytocin release and subsequent generosity," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1167, pp. 182–189, Jun. 2009.
- [37] R. J. Windle and M. L. Forsling, "Variations in oxytocin secretion during the 4-day oestrous cycle of the rat," *J. Endocrinol.*, vol. 136, no. 2, pp. 305–311, Feb. 1993.
- [38] N. Ohno, "Pulsatile arginine vasopressin release from the rat hypothalamo neurohypophyseal system during osmotic stimulation," *Acta Med. Okayama*, vol. 35, no. 3, pp. 205–213, Jun. 1981.
- [39] A. Reaux, M. C. Fournie-Zaluski, and C. Llorens-Cortes, "Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure," *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, vol. 12, no. 4, pp. 157–162, Jun. 2001.
- [40] M. Iovino *et al.*, "Role of central and peripheral chemoreceptors in vasopressin secretion control," *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, vol. 13, no. 3, pp. 250–255, Sep. 2013.
- [41] G. Gimpl and F. Fahrenholz, "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation," *Physiol. Rev.*, vol. 81, no. 2, pp. 629–683, Apr. 2001.

- [42] P. Arthur, M. J. Taggart, and B. F. Mitchell, "Oxytocin and parturition: a role for increased myometrial calcium and calcium sensitization?," *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 12, pp. 619–633, Jan. 2007.
- [43] A. M. Blanks and S. Thornton, "The role of oxytocin in parturition," *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 110 Suppl 20, pp. 46–51, Apr. 2003.
- [44] W. R. Crowley, "Neuroendocrine regulation of lactation and milk production," *Compr. Physiol.*, vol. 5, no. 1, pp. 255–291, Jan. 2015.
- [45] A. González-Hernández *et al.*, "Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons," *Pain*, vol. 158, no. 11, pp. 2117–2128, Nov. 2017.
- [46] Y. Nersesyan *et al.*, "Oxytocin Modulates Nociception as an Agonist of Pain-Sensing TRPV1," *Cell Rep.*, vol. 21, no. 6, pp. 1681–1691, Nov. 2017.
- [47] M. Birnbaumer, "Vasopressin receptors," *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, vol. 11, no. 10, pp. 406–410, Dec. 2000.
- [48] T. Koshimizu, K. Nakamura, N. Egashira, M. Hiroyama, H. Nonoguchi, and A. Tanoue, "Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems," *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 4, pp. 1813–1864, Oct. 2012.
- [49] R. W. Schrier, V. Briner, and C. Caramelo, "Cellular action and interactions of arginine vasopressin in vascular smooth muscle: mechanisms and clinical implications," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 4, no. 1, pp. 2–11, Jul. 1993.
- [50] N. L. Ostrowski, S. J. Lolait, and W. S. Young 3rd, "Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature," *Endocrinology*, vol. 135, no. 4, pp. 1511–1528, Oct. 1994.
- [51] S. J. Lolait *et al.*, "Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 15, pp. 6783–6787, Jul. 1995.
- [52] M. Busnelli, E. Bulgheroni, M. Manning, G. Kleinau, and B. Chini, "Selective and potent agonists and antagonists for investigating the role of mouse oxytocin receptors," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 346, no. 2, pp. 318–327, Aug. 2013.
- [53] S. L. Bealer, W. E. Armstrong, and W. R. Crowley, "Oxytocin release in magnocellular nuclei: neurochemical mediators and functional significance during gestation," *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 299, no. 2, pp. R452–R458, Aug. 2010.
- [54] J. A. Russell, G. Leng, and A. J. Douglas, "The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 24, no. 1, pp. 27–61, Jan. 2003.
- [55] J.-J. Koksma, J.-M. Fritschy, V. Mack, R. E. Van Kesteren, and A. B. Brussaard, "Differential GABAA receptor clustering determines GABA synapse plasticity in rat oxytocin neurons around parturition and the onset of lactation," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 28, no. 1, pp. 128–140, Jan. 2005.
- [56] R. A. Nemenoff, "Vasopressin signaling pathways in vascular smooth muscle," *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 3, pp. d194-207, Feb. 1998.
- [57] T. Koshimizu *et al.*, "V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 20, pp. 7807–7812, May 2006.
- [58] T. Aoyagi *et al.*, "Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 295, no. 1, pp. F100-107, Jul. 2008.
- [59] J. Lv, Y. Xin, W. Zhou, and Z. Qiu, "The epigenetic switches for neural development and psychiatric disorders," *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao*, vol. 40, no. 7, pp. 339–346, Jul. 2013.
- [60] M. H. Puglia, T. S. Lillard, J. P. Morris, and J. J. Connelly, "Epigenetic modification of the oxytocin receptor gene influences the perception of anger and fear in the human brain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 11, pp. 3308–3313, Mar. 2015.
- [61] R. Kumsta, E. Hummel, F. S. Chen, and M. Heinrichs, "Epigenetic regulation of the oxytocin receptor gene: implications for behavioral neuroscience," *Front. Neurosci.*, vol. 7, 2013.

- [62] M. R. Dadds *et al.*, "Methylation of the oxytocin receptor gene and oxytocin blood levels in the development of psychopathy," *Dev. Psychopathol.*, vol. 26, no. 1, pp. 33–40, Feb. 2014.
- [63] H. Harony-Nicolas, S. Mamrut, L. Brodsky, H. Shahar-Gold, L. Barki-Harrington, and S. Wagner, "Brain region-specific methylation in the promoter of the murine oxytocin receptor gene is involved in its expression regulation," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 39, pp. 121–131, Jan. 2014.
- [64] S. Mamrut *et al.*, "DNA methylation of specific CpG sites in the promoter region regulates the transcription of the mouse oxytocin receptor," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56869, 2013.
- [65] B. W. Haas *et al.*, "Epigenetic modification of OXT and human sociability," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 27, pp. E3816–3823, 05 2016.
- [66] C. Murgatroyd, "Epigenetic programming of neuroendocrine systems during early life," *Exp. Physiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 62–65, Jan. 2014.
- [67] C. Murgatroyd *et al.*, "Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress," *Nat. Neurosci.*, vol. 12, no. 12, pp. 1559–1566, Dec. 2009.
- [68] C. Murgatroyd and D. Spengler, "Epigenetic programming of the HPA axis: Early life decides," *Stress*, vol. 14, no. 6, pp. 581–589, Nov. 2011.
- [69] M. Arango-Lievano *et al.*, "Topographic Reorganization of Cerebrovascular Mural Cells under Seizure Conditions," *Cell Rep.*, vol. 23, no. 4, pp. 1045–1059, Apr. 2018.
- [70] Y. Serlin, I. Shelef, B. Knyazer, and A. Friedman, "Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 38, pp. 2–6, Feb. 2015.
- [71] D. A. Durham, W. A. Banks, and A. J. Kastin, "Carrier-mediated transport of labeled oxytocin from brain to blood," *Neuroendocrinology*, vol. 53, no. 5, pp. 447–452, May 1991.
- [72] W. A. Banks, A. J. Kastin, A. Horvath, and E. A. Michals, "Carrier-mediated transport of vasopressin across the blood-brain barrier of the mouse," *J. Neurosci. Res.*, vol. 18, no. 2, pp. 326–332, 1987.
- [73] B. V. Zlokovic *et al.*, "Transport, uptake, and metabolism of blood-borne vasopressin by the blood-brain barrier," *Brain Res.*, vol. 590, no. 1, pp. 213–218, Sep. 1992.
- [74] A. J. Carman, J. H. Mills, A. Krenz, D.-G. Kim, and M. S. Bynoe, "Adenosine Receptor Signaling Modulates Permeability of the Blood–Brain Barrier," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 37, pp. 13272–13280, Sep. 2011.
- [75] F. Marques, J. C. Sousa, N. Sousa, and J. A. Palha, "Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease," *Mol. Neurodegener.*, vol. 8, p. 38, Oct. 2013.
- [76] P. A. Johansson, K. M. Dziegielewska, S. A. Liddelow, and N. R. Saunders, "The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity," *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 30, no. 3, pp. 237–248, Mar. 2008.
- [77] N. R. Saunders, S. A. Liddelow, and K. M. Dziegielewska, "Barrier mechanisms in the developing brain," *Front. Pharmacol.*, vol. 3, p. 46, 2012.
- [78] K. D. Rochfort and P. M. Cummins, "The blood-brain barrier endothelium: a target for pro-inflammatory cytokines," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 43, no. 4, pp. 702–706, Aug. 2015.
- [79] A. J. Jiménez, M.-D. Domínguez-Pinos, M. M. Guerra, P. Fernández-Llebrez, and J.-M. Pérez-Fígares, "Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption," *Tissue Barriers*, vol. 2, Mar. 2014.
- [80] H. S. Knobloch and V. Grinevich, "Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 8, p. 31, 2014.
- [81] W. J. Schwartz and S. M. Reppert, "Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 5, no. 10, pp. 2771–2778, Oct. 1985.
- [82] R. Landgraf and I. D. Neumann, "Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 25, no. 3–4, pp. 150–176, Dec. 2004.

- [83] G. J. De Vries and R. M. Buijs, "The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum," *Brain Res.*, vol. 273, no. 2, pp. 307–317, Aug. 1983.
- [84] H. C. Cormier, V. Della-Maggiore, I. N. Karatsoreos, M. M. Koletar, and M. R. Ralph, "Suprachiasmatic vasopressin and the circadian regulation of voluntary locomotor behavior," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 41, no. 1, pp. 79–88, Jan. 2015.
- [85] R. Y. Moore, "The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system," *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 119, pp. 1–28, 2013.
- [86] V. A. Tobin *et al.*, "An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition," *Nature*, vol. 464, no. 7287, pp. 413–417, Mar. 2010.
- [87] G. J. de Vries and M. A. Miller, "Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain," *Prog. Brain Res.*, vol. 119, pp. 3–20, 1998.
- [88] J. C. Compaan, R. M. Buijs, C. W. Pool, A. J. De Ruiter, and J. M. Koolhaas, "Differential lateral septal vasopressin innervation in aggressive and nonaggressive male mice," *Brain Res. Bull.*, vol. 30, no. 1–2, pp. 1–6, 1993.
- [89] R. M. Buijs and D. F. Swaab, "Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat," *Cell Tissue Res.*, vol. 204, no. 3, pp. 355–365, 1979.
- [90] B. D. Rood and G. J. De Vries, "Vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain and spinal cord," *J. Comp. Neurol.*, vol. 519, no. 12, pp. 2434–2474, Aug. 2011.
- [91] H. S. Knobloch *et al.*, "Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response," *Neuron*, vol. 73, no. 3, pp. 553–566, Feb. 2012.
- [92] V. Grinevich, H. S. Knobloch-Bollmann, M. Eliava, M. Busnelli, and B. Chini, "Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain," *Biol. Psychiatry*, vol. 79, no. 3, pp. 155–164, Feb. 2016.
- [93] A. S. Smith, S. K. Williams Avram, A. Cymerblit-Sabba, J. Song, and W. S. Young, "Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory," *Mol. Psychiatry*, vol. 21, no. 8, pp. 1137–1144, Aug. 2016.
- [94] M. Ludwig, D. Apps, J. Menzies, J. C. Patel, and M. E. Rice, "Dendritic Release of Neurotransmitters," *Compr. Physiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 235–252, Dec. 2016.
- [95] M. J. Freund-Mercier and M. E. Stoeckel, "Somatodendritic autoreceptors on oxytocin neurones," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 395, pp. 185–194, 1995.
- [96] D. J. Berlove and D. T. Piekut, "Co-localization of putative vasopressin receptors and vasopressinergic neurons in rat hypothalamus," *Histochemistry*, vol. 94, no. 6, pp. 653–657, 1990.
- [97] D. T. Theodosis, "Oxytocin-immunoreactive terminals synapse on oxytocin neurones in the supraoptic nucleus," *Nature*, vol. 313, no. 6004, pp. 682–684, Feb. 1985.
- [98] R. C. Lambert, F. C. Moos, and P. Richard, "Action of endogenous oxytocin within the paraventricular or supraoptic nuclei: a powerful link in the regulation of the bursting pattern of oxytocin neurons during the milk-ejection reflex in rats," *Neuroscience*, vol. 57, no. 4, pp. 1027–1038, Dec. 1993.
- [99] Y.-F. Wang, T. A. Ponzio, and G. I. Hatton, "Autofeedback effects of progressively rising oxytocin concentrations on supraoptic oxytocin neuronal activity in slices from lactating rats," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 290, no. 5, pp. R1191–1198, May 2006.
- [100] I. Neumann, E. Koehler, R. Landgraf, and J. Summy-Long, "An oxytocin receptor antagonist infused into the supraoptic nucleus attenuates intranuclear and peripheral release of oxytocin during suckling in conscious rats," *Endocrinology*, vol. 134, no. 1, pp. 141–148, Jan. 1994.
- [101] M. Ludwig and G. Leng, "Intrahypothalamic vasopressin release. An inhibitor of systemic vasopressin secretion?," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 449, pp. 163–173, 1998.
- [102] M. Ueno, I. Akiguchi, M. Hosokawa, H. Kotani, K. Kanenishi, and H. Sakamoto, "Blood-brain barrier permeability in the periventricular areas of the normal mouse brain," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 99, no. 4, pp. 385–392, Apr. 2000.

- [103] A. Chong *et al.*, "ADP ribosyl-cyclases (CD38/CD157), social skills and friendship," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 78, pp. 185–192, Apr. 2017.
- [104] H. Higashida, S. Yokoyama, M. Kikuchi, and T. Munesue, "CD38 and its role in oxytocin secretion and social behavior," *Horm. Behav.*, vol. 61, no. 3, pp. 351–358, Mar. 2012.
- [105] H. Higashida *et al.*, "Social memory, amnesia, and autism: brain oxytocin secretion is regulated by NAD⁺ metabolites and single nucleotide polymorphisms of CD38," *Neurochem. Int.*, vol. 61, no. 6, pp. 828–838, Nov. 2012.
- [106] N. Sabatier *et al.*, "Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates oxytocin release from the dendrites of hypothalamic neurons while inhibiting oxytocin release from their terminals in the neurohypophysis," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 23, no. 32, pp. 10351–10358, Nov. 2003.
- [107] O. Peñagarikano *et al.*, "Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the Cntnap2 mouse model of autism," *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 271, p. 271ra8, Jan. 2015.
- [108] M. Valstad *et al.*, "The correlation between central and peripheral oxytocin concentrations: A systematic review and meta-analysis," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 78, pp. 117–124, Jul. 2017.
- [109] K. Motoki *et al.*, "Are Plasma Oxytocin and Vasopressin Levels Reflective of Amygdala Activation during the Processing of Negative Emotions? A Preliminary Study," *Front. Psychol.*, vol. 7, Apr. 2016.
- [110] A. Lefevre, R. Mottolèse, M. Dirheimer, C. Mottolèse, J.-R. Duhamel, and A. Sirigu, "A comparison of methods to measure central and peripheral oxytocin concentrations in human and non-human primates," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17222, Dec. 2017.
- [111] D. S. Quintana, G. A. Alvares, I. B. Hickie, and A. J. Guastella, "Do delivery routes of intranasally administered oxytocin account for observed effects on social cognition and behavior? A two-level model," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 49, pp. 182–192, Feb. 2015.
- [112] G. Leng and M. Ludwig, "Intranasal Oxytocin: Myths and Delusions," *Biol. Psychiatry*, vol. 79, no. 3, pp. 243–250, Feb. 2016.
- [113] I. D. Neumann, R. Maloumy, D. I. Beiderbeck, M. Lukas, and R. Landgraf, "Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 10, pp. 1985–1993, Oct. 2013.
- [114] O. Dal Monte, P. L. Noble, J. Turchi, A. Cummins, and B. B. Averbeck, "CSF and blood oxytocin concentration changes following intranasal delivery in macaque," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e103677, 2014.
- [115] E. Tribollet, C. Barberis, S. Jard, M. Dubois-Dauphin, and J. J. Dreifuss, "Localization and pharmacological characterization of high affinity binding sites for vasopressin and oxytocin in the rat brain by light microscopic autoradiography," *Brain Res.*, vol. 442, no. 1, pp. 105–118, Feb. 1988.
- [116] A. Hurbin *et al.*, "The V1a and V1b, but not V2, vasopressin receptor genes are expressed in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, and the transcripts are essentially colocalized in the vasopressinergic magnocellular neurons," *Endocrinology*, vol. 139, no. 11, pp. 4701–4707, Nov. 1998.
- [117] N. Sabatier, I. Shibuya, and G. Dayanithi, "Intracellular calcium increase and somatodendritic vasopressin release by vasopressin receptor agonists in the rat supraoptic nucleus: involvement of multiple intracellular transduction signals," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 16, no. 3, pp. 221–236, Mar. 2004.
- [118] V. Tobin, L.-A. Gouty, F. C. Moos, and M. G. Desarménien, "A store-operated current (SOC) mediates oxytocin autocontrol in the developing rat hypothalamus," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 400–404, Jul. 2006.
- [119] P. Richard, F. Moos, G. Dayanithi, L. Gouzènes, and N. Sabatier, "Rhythmic activities of hypothalamic magnocellular neurons: autocontrol mechanisms," *Biol. Cell*, vol. 89, no. 9, pp. 555–560, Dec. 1997.
- [120] L. Gouzènes, M. G. Desarménien, N. Hussy, P. Richard, and F. C. Moos, "Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 18, no. 5, pp. 1879–1885, Mar. 1998.

- [121] F. Moos *et al.*, "New aspects of firing pattern autocontrol in oxytocin and vasopressin neurones," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 449, pp. 153–162, 1998.
- [122] E. R. Gillard *et al.*, "Vasopressin autoreceptors and nitric oxide-dependent glutamate release are required for somatodendritic vasopressin release from rat magnocellular neuroendocrine cells responding to osmotic stimuli," *Endocrinology*, vol. 148, no. 2, pp. 479–489, Feb. 2007.
- [123] K. M. Dumais and A. H. Veenema, "Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 40, pp. 1–23, Jan. 2016.
- [124] M. Mitre *et al.*, "A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors," *J. Neurosci.*, vol. 36, no. 8, pp. 2517–2535, Feb. 2016.
- [125] M. Corbani *et al.*, "Neuroanatomical distribution and function of the vasopressin V1B receptor in the rat brain deciphered using specific fluorescent ligands," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 258, pp. 15–32, Mar. 2018.
- [126] T. Raam, K. M. McAvoy, A. Besnard, A. H. Veenema, and A. Sahay, "Hippocampal oxytocin receptors are necessary for discrimination of social stimuli," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 2001, Dec. 2017.
- [127] Y. F. Guzmán *et al.*, "Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors," *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 9, pp. 1185–1187, Sep. 2013.
- [128] D. Huber, P. Veinante, and R. Stoop, "Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala," *Science*, vol. 308, no. 5719, pp. 245–248, Apr. 2005.
- [129] K. M. Dumais, R. Bredewold, T. E. Mayer, and A. H. Veenema, "Sex differences in oxytocin receptor binding in forebrain regions: correlations with social interest in brain region- and sex- specific ways," *Horm. Behav.*, vol. 64, no. 4, pp. 693–701, Sep. 2013.
- [130] M. Dubois-Dauphin *et al.*, "Expression of vasopressin receptors in hamster hypothalamus is sexually dimorphic and dependent upon photoperiod," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 24, pp. 11163–11167, Dec. 1991.
- [131] M. Dubois-Dauphin, C. Barberis, and F. de Bilbao, "Vasopressin receptors in the mouse (*Mus musculus*) brain: sex-related expression in the medial preoptic area and hypothalamus," *Brain Res.*, vol. 743, no. 1–2, pp. 32–39, Dec. 1996.
- [132] R. Ivell and N. Walther, "The role of sex steroids in the oxytocin hormone system," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 151, no. 1, pp. 95–101, May 1999.
- [133] A. Acevedo-Rodriguez, S. K. Mani, and R. J. Handa, "Oxytocin and Estrogen Receptor β in the Brain: An Overview," *Front. Endocrinol.*, vol. 6, p. 160, 2015.
- [134] F. W. van Leeuwen, A. R. Caffè, and G. J. De Vries, "Vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: sex differences and the influence of androgens," *Brain Res.*, vol. 325, no. 1–2, pp. 391–394, Jan. 1985.
- [135] M. Waldherr and I. D. Neumann, "Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 42, pp. 16681–16684, Oct. 2007.
- [136] K. M. Kendrick, E. B. Keverne, C. Chapman, and B. A. Baldwin, "Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, gamma-aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation," *Brain Res.*, vol. 442, no. 1, pp. 171–174, Feb. 1988.
- [137] I. Neumann and R. Landgraf, "Septal and Hippocampal Release of Oxytocin, but not Vasopressin, in the Conscious Lactating Rat During Suckling," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 1, no. 4, pp. 305–308, Aug. 1989.
- [138] K. M. Kendrick, E. B. Keverne, C. Chapman, and B. A. Baldwin, "Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating," *Brain Res.*, vol. 439, no. 1–2, pp. 1–10, Jan. 1988.

- [139] O. J. Bosch, S. L. Meddle, D. I. Beiderbeck, A. J. Douglas, and I. D. Neumann, "Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 25, no. 29, pp. 6807–6815, Jul. 2005.
- [140] O. J. Bosch, S. A. Krömer, P. J. Brunton, and I. D. Neumann, "Release of oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus, but not central amygdala or lateral septum in lactating residents and virgin intruders during maternal defence," *Neuroscience*, vol. 124, no. 2, pp. 439–448, 2004.
- [141] D. I. Beiderbeck, I. D. Neumann, and A. H. Veenema, "Differences in intermale aggression are accompanied by opposite vasopressin release patterns within the septum in rats bred for low and high anxiety," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 26, no. 12, pp. 3597–3605, Dec. 2007.
- [142] K. Ebner, O. J. Bosch, S. A. Krömer, N. Singewald, and I. D. Neumann, "Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids," *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 30, no. 2, pp. 223–230, Feb. 2005.
- [143] M. Lukas, R. Bredewold, R. Landgraf, I. D. Neumann, and A. H. Veenema, "Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 36, no. 6, pp. 843–853, juillet 2011.
- [144] M. Lukas, I. Toth, A. H. Veenema, and I. D. Neumann, "Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: male juvenile versus female adult conspecifics," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 6, pp. 916–926, Jun. 2013.
- [145] L.-L. Bao *et al.*, "The influence of psychological stress on arginine vasopressin concentration in the human plasma and cerebrospinal fluid," *Neuropeptides*, vol. 48, no. 6, pp. 361–369, 2014.
- [146] B. J. Marlin, M. Mitre, J. A. D'amour, M. V. Chao, and R. C. Froemke, "Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition," *Nature*, vol. 520, no. 7548, pp. 499–504, Apr. 2015.
- [147] D.-M. Ellingsen, S. Leknes, G. Løseth, J. Wessberg, and H. Olausson, "The Neurobiology Shaping Affective Touch: Expectation, Motivation, and Meaning in the Multisensory Context," *Front. Psychol.*, vol. 6, Jan. 2016.
- [148] M. T. Pisansky, L. R. Hanson, I. I. Gottesman, and J. C. Gewirtz, "Oxytocin enhances observational fear in mice," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 2102, Dec. 2017.
- [149] K. Ebner, C. T. Wotjak, R. Landgraf, and M. Engelmann, "Forced swimming triggers vasopressin release within the amygdala to modulate stress-coping strategies in rats," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 15, no. 2, pp. 384–388, Jan. 2002.
- [150] F. M. Herisson, J. R. Waas, R. Fredriksson, H. B. Schiöth, A. S. Levine, and P. K. Olszewski, "Oxytocin Acting in the Nucleus Accumbens Core Decreases Food Intake," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 28, no. 4, 2016.
- [151] M. S. Spetter, G. B. Feld, M. Thienel, H. Preissl, M. A. Hege, and M. Hallschmid, "Oxytocin curbs calorie intake via food-specific increases in the activity of brain areas that process reward and establish cognitive control," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 2736, Feb. 2018.
- [152] N. Striepens, F. Schröter, B. Stoffel-Wagner, W. Maier, R. Hurlmann, and D. Scheele, "Oxytocin enhances cognitive control of food craving in women," *Hum. Brain Mapp.*, vol. 37, no. 12, pp. 4276–4285, 2016.
- [153] R. Ivell and D. Richter, "Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, no. 7, pp. 2006–2010, Apr. 1984.
- [154] J. L. Garrison, E. Z. Macosko, S. Bernstein, N. Pokala, D. R. Albrecht, and C. I. Bargmann, "Oxytocin/Vasopressin-Related Peptides Have an Ancient Role in Reproductive Behavior," *Science*, vol. 338, no. 6106, pp. 540–543, Oct. 2012.
- [155] Z. R. Donaldson and L. J. Young, "Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality," *Science*, vol. 322, no. 5903, pp. 900–904, Nov. 2008.

- [156] P.-C. Gwee, C. T. Amemiya, S. Brenner, and B. Venkatesh, "Sequence and organization of coelacanth neurohypophysial hormone genes: Evolutionary history of the vertebrate neurohypophysial hormone gene locus," *BMC Evol. Biol.*, vol. 8, p. 93, Mar. 2008.
- [157] Y. Liu, J. T. Curtis, and Z. Wang, "Vasopressin in the lateral septum regulates pair bond formation in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*)," *Behav. Neurosci.*, vol. 115, no. 4, pp. 910–919, Aug. 2001.
- [158] M. Manning *et al.*, "Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 24, no. 4, pp. 609–628, Apr. 2012.
- [159] Z. Song and H. E. Albers, "Cross-talk among oxytocin and arginine-vasopressin receptors: Relevance for basic and clinical studies of the brain and periphery," *Front. Neuroendocrinol.*, Oct. 2017.
- [160] B. Chini, M. Manning, and G. Guillon, "Affinity and efficacy of selective agonists and antagonists for vasopressin and oxytocin receptors: an 'easy guide' to receptor pharmacology," *Prog. Brain Res.*, vol. 170, pp. 513–517, 2008.
- [161] H. Gainer, "Cell-type specific expression of oxytocin and vasopressin genes: an experimental odyssey," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 24, no. 4, pp. 528–538, Apr. 2012.
- [162] M. Sala *et al.*, "Pharmacologic rescue of impaired cognitive flexibility, social deficits, increased aggression, and seizure susceptibility in oxytocin receptor null mice: a neurobehavioral model of autism," *Biol. Psychiatry*, vol. 69, no. 9, pp. 875–882, May 2011.
- [163] C. D. Guoynes, T. C. Simmons, G. M. Downing, S. Jacob, M. Solomon, and K. L. Bales, "Chronic Intranasal Oxytocin has Dose-dependent Effects on Central Oxytocin and Vasopressin Systems in Prairie Voles (*Microtus ochrogaster*)," *Neuroscience*, vol. 369, pp. 292–302, Jan. 2018.
- [164] C. Vaccari, S. J. Lolait, and N. L. Ostrowski, "Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain," *Endocrinology*, vol. 139, no. 12, pp. 5015–5033, Dec. 1998.
- [165] K. L. Bales *et al.*, "Neonatal oxytocin manipulations have long-lasting, sexually dimorphic effects on vasopressin receptors," *Neuroscience*, vol. 144, no. 1, pp. 38–45, Jan. 2007.
- [166] J. Curley, C. Jensen, R. Mashoodh, and F. Champagne, "Social Influences on Neurobiology and Behavior: Epigenetic Effects During Development," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 36, no. 3, pp. 352–371, Apr. 2011.
- [167] Z. V. Johnson and L. J. Young, "Oxytocin and vasopressin neural networks: Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 76, no. Pt A, pp. 87–98, May 2017.
- [168] C. Lieberwirth and Z. Wang, "Social bonding: regulation by neuropeptides," *Front. Neurosci.*, vol. 8, p. 171, 2014.
- [169] J.-P. Gouin *et al.*, "Plasma vasopressin and interpersonal functioning," *Biol. Psychol.*, vol. 91, no. 2, pp. 270–274, Oct. 2012.
- [170] N. Wu, Z. Li, and Y. Su, "The association between oxytocin receptor gene polymorphism (OXTR) and trait empathy," *J. Affect. Disord.*, vol. 138, no. 3, pp. 468–472, May 2012.
- [171] F. Uzefovsky *et al.*, "Oxytocin receptor and vasopressin receptor 1a genes are respectively associated with emotional and cognitive empathy," *Horm. Behav.*, vol. 67, pp. 60–65, Jan. 2015.
- [172] K. Nishina, H. Takagishi, M. Inoue-Murayama, H. Takahashi, and T. Yamagishi, "Polymorphism of the Oxytocin Receptor Gene Modulates Behavioral and Attitudinal Trust among Men but Not Women," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, p. e0137089, 2015.
- [173] F. Krueger *et al.*, "Oxytocin receptor genetic variation promotes human trust behavior," *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 6, p. 4, 2012.
- [174] B. A. Tabak, M. E. McCullough, C. S. Carver, E. J. Pedersen, and M. L. Cuccaro, "Variation in oxytocin receptor gene (OXTR) polymorphisms is associated with emotional and behavioral reactions to betrayal," *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.*, vol. 9, no. 6, pp. 810–816, Jun. 2014.
- [175] M. Manière, *Etude des propriétés fonctionnelles de variants de polymorphisme du récepteur V1B de la vasopressine détectés dans les troubles affectifs*. Montpellier, 2015.

- [176] H. Walum *et al.*, “Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 37, pp. 14153–14156, Sep. 2008.
- [177] Y. Apter-Levi, O. Zagoory-Sharon, and R. Feldman, “Oxytocin and vasopressin support distinct configurations of social synchrony,” *Brain Res.*, vol. 1580, pp. 124–132, Sep. 2014.
- [178] K. J. Michalska *et al.*, “Genetic imaging of the association of oxytocin receptor gene (OXTR) polymorphisms with positive maternal parenting,” *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 8, p. 21, 2014.
- [179] R. Feldman *et al.*, “Sensitive parenting is associated with plasma oxytocin and polymorphisms in the OXTR and CD38 genes,” *Biol. Psychiatry*, vol. 72, no. 3, pp. 175–181, Aug. 2012.
- [180] A. M. Kelly and J. L. Goodson, “Hypothalamic oxytocin and vasopressin neurons exert sex-specific effects on pair bonding, gregariousness, and aggression in finches,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 16, pp. 6069–6074, Apr. 2014.
- [181] X. Qiao *et al.*, “Sociality and oxytocin and vasopressin in the brain of male and female dominant and subordinate mandarin voles,” *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, vol. 200, no. 2, pp. 149–159, Feb. 2014.
- [182] J. N. Ferguson, J. M. Aldag, T. R. Insel, and L. J. Young, “Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 21, no. 20, pp. 8278–8285, Oct. 2001.
- [183] C. J. W. Smith, J. N. Mogavero, M. T. Tulimieri, and A. H. Veenema, “Involvement of the oxytocin system in the nucleus accumbens in the regulation of juvenile social novelty-seeking behavior,” *Horm. Behav.*, vol. 93, pp. 94–98, Jul. 2017.
- [184] G. Dölen, A. Darvishzadeh, K. W. Huang, and R. C. Malenka, “Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin,” *Nature*, vol. 501, no. 7466, pp. 179–184, Sep. 2013.
- [185] I. F. Bielsky, S.-B. Hu, K. L. Szegda, H. Westphal, and L. J. Young, “Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice,” *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 29, no. 3, pp. 483–493, Mar. 2004.
- [186] R. Landgraf *et al.*, “Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 18, no. 2, pp. 403–411, Jul. 2003.
- [187] M. Timmer, M. I. Cordero, Y. Sevelinges, and C. Sandi, “Evidence for a role of oxytocin receptors in the long-term establishment of dominance hierarchies,” *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 36, no. 11, pp. 2349–2356, Oct. 2011.
- [188] A. H. Veenema, R. Bredewold, and G. J. De Vries, “Sex-specific modulation of juvenile social play by vasopressin,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 11, pp. 2554–2561, Nov. 2013.
- [189] R. A. I. Bethlehem, J. van Honk, B. Auyeung, and S. Baron-Cohen, “Oxytocin, brain physiology, and functional connectivity: A review of intranasal oxytocin fMRI studies,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 7, pp. 962–974, Jul. 2013.
- [190] C. F. Zink and A. Meyer-Lindenberg, “Human neuroimaging of oxytocin and vasopressin in social cognition,” *Horm. Behav.*, vol. 61, no. 3, pp. 400–409, Mar. 2012.
- [191] C. F. Zink, J. L. Stein, L. Kempf, S. Hakimi, and A. Meyer-Lindenberg, “Vasopressin modulates medial prefrontal cortex-amygdala circuitry during emotion processing in humans,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 30, no. 20, pp. 7017–7022, May 2010.
- [192] C. F. Zink, L. Kempf, S. Hakimi, C. A. Rainey, J. L. Stein, and A. Meyer-Lindenberg, “Vasopressin modulates social recognition-related activity in the left temporoparietal junction in humans,” *Transl. Psychiatry*, vol. 1, p. e3, Apr. 2011.
- [193] M. Kanat, M. Heinrichs, and G. Domes, “Oxytocin and the social brain: Neural mechanisms and perspectives in human research,” *Brain Res.*, Nov. 2013.

- [194] P. A. Bos, J. Panksepp, R.-M. Bluthé, and J. van Honk, "Acute effects of steroid hormones and neuropeptides on human social–emotional behavior: A review of single administration studies," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 33, no. 1, pp. 17–35, Jan. 2012.
- [195] H. Huang *et al.*, "Chronic and Acute Intranasal Oxytocin Produce Divergent Social Effects in Mice," *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, Nov. 2013.
- [196] K. L. Bales *et al.*, "Chronic intranasal oxytocin causes long-term impairments in partner preference formation in male prairie voles," *Biol. Psychiatry*, vol. 74, no. 3, pp. 180–188, Aug. 2013.
- [197] F. Calcagnoli, N. Meyer, S. F. de Boer, M. Althaus, and J. M. Koolhaas, "Chronic enhancement of brain oxytocin levels causes enduring anti-aggressive and pro-social explorative behavioral effects in male rats," *Horm. Behav.*, vol. 65, no. 4, pp. 427–433, Apr. 2014.
- [198] "WHO | Autism spectrum disorders," WHO. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/autism-spectrum-disorders/en/>. [Accessed: 15-Apr-2018].
- [199] *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*. Fifth edition. Arlington, VA : American Psychiatric Publishing, [2013] ©2013, 2013.
- [200] B. S. Abrahams and D. H. Geschwind, "Connecting genes to brain in the autism spectrum disorders," *Arch. Neurol.*, vol. 67, no. 4, pp. 395–399, Apr. 2010.
- [201] J. Peça and G. Feng, "Cellular and synaptic network defects in autism," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 22, no. 5, pp. 866–872, Oct. 2012.
- [202] J. Chen, S. Yu, Y. Fu, and X. Li, "Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, p. 276, 2014.
- [203] A. M. Gruber, "Environmental Factors in Autism," *Front. Psychiatry*, vol. 3, Jan. 2013.
- [204] J. Hallmayer *et al.*, "Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism," *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 68, no. 11, pp. 1095–1102, Nov. 2011.
- [205] S. J. Gotts, W. K. Simmons, L. A. Milbury, G. L. Wallace, R. W. Cox, and A. Martin, "Fractionation of social brain circuits in autism spectrum disorders," *Brain J. Neurol.*, vol. 135, no. Pt 9, pp. 2711–2725, Sep. 2012.
- [206] G. Righi, A. L. Tierney, H. Tager-Flusberg, and C. A. Nelson, "Functional connectivity in the first year of life in infants at risk for autism spectrum disorder: an EEG study," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e105176, 2014.
- [207] R. W. Emerson *et al.*, "Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age," *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, no. 393, Jun. 2017.
- [208] J. Piven, S. Arndt, J. Bailey, S. Haverkamp, N. C. Andreasen, and P. Palmer, "An MRI study of brain size in autism," *Am. J. Psychiatry*, vol. 152, no. 8, pp. 1145–1149, Aug. 1995.
- [209] R. Sacco, S. Gabriele, and A. M. Persico, "Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis," *Psychiatry Res.*, vol. 234, no. 2, pp. 239–251, Nov. 2015.
- [210] E. Courchesne, "Abnormal early brain development in autism," *Mol. Psychiatry*, vol. 7 Suppl 2, pp. S21–23, 2002.
- [211] H. C. Hazlett *et al.*, "Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder," *Nature*, vol. 542, no. 7641, pp. 348–351, 15 2017.
- [212] E. Courchesne, K. Campbell, and S. Solso, "Brain Growth Across the Life Span in Autism: Age-Specific Changes in Anatomical Pathology," *Brain Res.*, vol. 1380, pp. 138–145, Mar. 2011.
- [213] B. Egaas, E. Courchesne, and O. Saitoh, "Reduced size of corpus callosum in autism," *Arch. Neurol.*, vol. 52, no. 8, pp. 794–801, Aug. 1995.
- [214] S. Yamasaki *et al.*, "Reduced gray matter volume of pars opercularis is associated with impaired social communication in high-functioning autism spectrum disorders," *Biol. Psychiatry*, vol. 68, no. 12, pp. 1141–1147, Dec. 2010.

- [215] I. Mohammad-Rezazadeh, J. Frohlich, S. K. Loo, and S. S. Jeste, "Brain Connectivity in Autism Spectrum Disorder," *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 29, no. 2, pp. 137–147, Apr. 2016.
- [216] C. O'Reilly, J. D. Lewis, and M. Elsabbagh, "Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies," *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0175870, 2017.
- [217] S. D. Rubeis *et al.*, "Synaptic, transcriptional, and chromatin genes disrupted in autism," *Nature*, vol. 515, no. 7526, p. 209, Nov. 2014.
- [218] D. Ebrahimi-Fakhari and M. Sahin, "Autism and the synapse: emerging mechanisms and mechanism-based therapies," *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 28, no. 2, pp. 91–102, Apr. 2015.
- [219] R. Galvez and W. T. Greenough, "Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome," *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 135, no. 2, pp. 155–160, Jun. 2005.
- [220] A. W. Grossman *et al.*, "Developmental characteristics of dendritic spines in the dentate gyrus of Fmr1 knockout mice," *Brain Res.*, vol. 1355, pp. 221–227, Oct. 2010.
- [221] A. W. Grossman, N. M. Elisseou, B. C. McKinney, and W. T. Greenough, "Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines," *Brain Res.*, vol. 1084, no. 1, pp. 158–164, Apr. 2006.
- [222] A. Cruz-Martín, M. Crespo, and C. Portera-Cailliau, "Delayed Stabilization of Dendritic Spines in Fragile X Mice," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 23, pp. 7793–7803, Jun. 2010.
- [223] F. Pan, G. M. Aldridge, W. T. Greenough, and W.-B. Gan, "Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 41, pp. 17768–17773, Oct. 2010.
- [224] R. Zhang, H.-F. Zhang, J.-S. Han, and S.-P. Han, "Genes Related to Oxytocin and Arginine-Vasopressin Pathways: Associations with Autism Spectrum Disorders," *Neurosci. Bull.*, vol. 33, no. 2, pp. 238–246, Mar. 2017.
- [225] B. Ruggeri, U. Sarkans, G. Schumann, and A. M. Persico, "Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 231, no. 6, pp. 1201–1216, Mar. 2014.
- [226] C. Modahl *et al.*, "Plasma oxytocin levels in autistic children," *Biol. Psychiatry*, vol. 43, no. 4, pp. 270–277, Feb. 1998.
- [227] L. Green, D. Fein, C. Modahl, C. Feinstein, L. Waterhouse, and M. Morris, "Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms," *Biol. Psychiatry*, vol. 50, no. 8, pp. 609–613, Oct. 2001.
- [228] D. S. Carson *et al.*, "Arginine Vasopressin Is a Blood-Based Biomarker of Social Functioning in Children with Autism," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132224, 2015.
- [229] A. L. Bey and Y. Jiang, "Overview of mouse models of autism spectrum disorders," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 66, p. 5.66.1-26, Sep. 2014.
- [230] O. Peñagarikano, "Oxytocin in animal models of autism spectrum disorder," *Dev. Neurobiol.*, vol. 77, no. 2, pp. 202–213, 2017.
- [231] T. M. Kazdoba, P. T. Leach, M. Yang, J. L. Silverman, M. Solomon, and J. N. Crawley, "Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics," *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, vol. 28, pp. 1–52, 2016.
- [232] K. L. Bales *et al.*, "Long-term exposure to intranasal oxytocin in a mouse autism model," *Transl. Psychiatry*, vol. 4, p. e480, Nov. 2014.
- [233] E. Anagnostou *et al.*, "Intranasal oxytocin in the treatment of autism spectrum disorders: a review of literature and early safety and efficacy data in youth," *Brain Res.*, vol. 1580, pp. 188–198, Sep. 2014.
- [234] A. Preti, M. Melis, S. Siddi, M. Vellante, G. Doneddu, and R. Fadda, "Oxytocin and autism: a systematic review of randomized controlled trials," *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.*, vol. 24, no. 2, pp. 54–68, Mar. 2014.
- [235] Y. Okamoto, M. Ishitobi, Y. Wada, and H. Kosaka, "The Potential of Nasal Oxytocin Administration for Remediation of Autism Spectrum Disorders," *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, vol. 15, no. 5, pp. 564–577, 2016.

- [236] R. Tyzio *et al.*, "Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring," *Science*, vol. 343, no. 6171, pp. 675–679, Feb. 2014.
- [237] G. A. Alvares, D. S. Quintana, and A. J. O. Whitehouse, "Beyond the hype and hope: Critical considerations for intranasal oxytocin research in autism spectrum disorder," *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 25–41, Jan. 2017.
- [238] A. Järvinen, J. R. Korenberg, and U. Bellugi, "The social phenotype of Williams syndrome," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 23, no. 3, pp. 414–422, Jun. 2013.
- [239] B. R. Pober, "Williams-Beuren syndrome," *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no. 3, pp. 239–252, Jan. 2010.
- [240] L. Dai, C. S. Carter, J. Ying, U. Bellugi, H. Pournajafi-Nazarloo, and J. R. Korenberg, "Oxytocin and vasopressin are dysregulated in Williams Syndrome, a genetic disorder affecting social behavior," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. e38513, 2012.
- [241] C. N. Henrichsen *et al.*, "Using transcription modules to identify expression clusters perturbed in Williams-Beuren syndrome," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. e1001054, Jan. 2011.
- [242] B. W. Haas and A. K. Smith, "Oxytocin, vasopressin, and Williams syndrome: epigenetic effects on abnormal social behavior," *Front. Genet.*, vol. 6, p. 28, 2015.
- [243] S. S. Hall, A. A. Lightbody, B. E. McCarthy, K. J. Parker, and A. L. Reiss, "Effects of intranasal oxytocin on social anxiety in males with fragile X syndrome," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 37, no. 4, pp. 509–518, Apr. 2012.
- [244] V. A. Holm *et al.*, "Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria," *Pediatrics*, vol. 91, no. 2, pp. 398–402, Feb. 1993.
- [245] C. Bar, G. Diene, C. Molinas, E. Bieth, C. Casper, and M. Tauber, "Early diagnosis and care is achieved but should be improved in infants with Prader-Willi syndrome," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 12, no. 1, p. 118, Jun. 2017.
- [246] M. A. Angulo, M. G. Butler, and M. E. Cataletto, "Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 38, no. 12, pp. 1249–1263, Dec. 2015.
- [247] N. E. Bakker *et al.*, "Growth Hormone Treatment in Children With Prader-Willi Syndrome: Three Years of Longitudinal Data in Prepubertal Children and Adult Height Data From the KIGS Database," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 102, no. 5, pp. 1702–1711, May 2017.
- [248] S. Allas *et al.*, "AZP-531, an unacylated ghrelin analog, improves food-related behavior in patients with Prader-Willi syndrome: A randomized placebo-controlled trial," *PLoS One*, vol. 13, no. 1, p. e0190849, 2018.
- [249] C. K. Cheon, "Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome," *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 21, no. 3, pp. 126–135, Sep. 2016.
- [250] Y.-H. Hao *et al.*, "Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1051–1064, Feb. 2013.
- [251] T. M. Wijesuriya *et al.*, "The Prader-Willi syndrome proteins MAGEL2 and necdin regulate leptin receptor cell surface abundance through ubiquitination pathways," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 26, no. 21, pp. 4215–4230, Nov. 2017.
- [252] S. Lee *et al.*, "Essential role for the Prader-Willi syndrome protein necdin in axonal outgrowth," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 5, pp. 627–637, Mar. 2005.
- [253] V. Matarazzo *et al.*, "Necdin shapes serotonergic development and SERT activity modulating breathing in a mouse model for Prader-Willi syndrome," *eLife*, vol. 6, Oct. 2017.
- [254] F. Schaller, F. Watrin, R. Sturny, A. Massacrier, P. Szepetowski, and F. Muscatelli, "A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted Magel2 gene," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 24, pp. 4895–4905, Dec. 2010.
- [255] H. Meziane *et al.*, "An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for Magel2, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism," *Biol. Psychiatry*, vol. 78, no. 2, pp. 85–94, Jul. 2015.

- [256] S. V. Kozlov *et al.*, “The imprinted gene *Magel2* regulates normal circadian output,” *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 10, pp. 1266–1272, Oct. 2007.
- [257] S. Lee, C. L. Walker, and R. Wevrick, “Prader-Willi syndrome transcripts are expressed in phenotypically significant regions of the developing mouse brain,” *Gene Expr. Patterns GEP*, vol. 3, no. 5, pp. 599–609, Oct. 2003.
- [258] D. F. Swaab, J. S. Purba, and M. A. Hofman, “Alterations in the hypothalamic paraventricular nucleus and its oxytocin neurons (putative satiety cells) in Prader-Willi syndrome: a study of five cases,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 80, no. 2, pp. 573–579, Feb. 1995.
- [259] M. Tauber *et al.*, “Oxytocin may be useful to increase trust in others and decrease disruptive behaviours in patients with Prader-Willi syndrome: a randomised placebo-controlled trial in 24 patients,” *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 6, p. 47, Jun. 2011.
- [260] J. L. Miller *et al.*, “Oxytocin treatment in children with Prader-Willi syndrome: A double-blind, placebo-controlled, crossover study,” *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 173, no. 5, pp. 1243–1250, May 2017.
- [261] L. J. Rice, S. L. Einfeld, N. Hu, and C. S. Carter, “A review of clinical trials of oxytocin in Prader-Willi syndrome,” *Curr. Opin. Psychiatry*, vol. 31, no. 2, pp. 123–127, Mar. 2018.
- [262] R. J. Kuppens, S. H. Donze, and A. C. S. Hokken-Koelega, “Promising effects of oxytocin on social and food-related behavior in young children with Prader-Willi Syndrome: a randomized, double-blind, controlled crossover trial,” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, Aug. 2016.
- [263] S. L. Einfeld *et al.*, “A double-blind randomized controlled trial of oxytocin nasal spray in Prader Willi syndrome,” *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 164A, no. 9, pp. 2232–2239, Sep. 2014.
- [264] M. Tauber *et al.*, “The Use of Oxytocin to Improve Feeding and Social Skills in Infants With Prader-Willi Syndrome,” *Pediatrics*, Jan. 2017.
- [265] C. P. Schaaf *et al.*, “Truncating mutations of *MAGEL2* cause Prader-Willi phenotypes and autism,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 11, pp. 1405–1408, Nov. 2013.
- [266] M. D. Fountain *et al.*, “The phenotypic spectrum of Schaaf-Yang syndrome – 18 new affected individuals from 14 families,” *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.*, vol. 19, no. 1, pp. 45–52, Jan. 2017.
- [267] K. F. Tacer and P. R. Potts, “Cellular and disease functions of the Prader-Willi Syndrome gene *MAGEL2*,” *Biochem. J.*, vol. 474, no. 13, pp. 2177–2190, 16 2017.
- [268] M. D. Fountain and C. P. Schaaf, “Prader-Willi Syndrome and Schaaf-Yang Syndrome: Neurodevelopmental Diseases Intersecting at the *MAGEL2* Gene,” *Diseases*, vol. 4, no. 1, Jan. 2016.
- [269] J. M. Bischof, C. L. Stewart, and R. Wevrick, “Inactivation of the mouse *Magel2* gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 22, pp. 2713–2719, Nov. 2007.
- [270] A. A. Kamaludin *et al.*, “Muscle dysfunction caused by loss of *Magel2* in a mouse model of Prader-Willi and Schaaf-Yang syndromes,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 25, no. 17, pp. 3798–3809, 01 2016.
- [271] M. D. Fountain, H. Tao, C.-A. Chen, J. Yin, and C. P. Schaaf, “*Magel2* knockout mice manifest altered social phenotypes and a deficit in preference for social novelty,” *Genes Brain Behav.*, vol. 16, no. 6, pp. 592–600, Jul. 2017.
- [272] R. E. Mercer and R. Wevrick, “Loss of *magel2*, a candidate gene for features of Prader-Willi syndrome, impairs reproductive function in mice,” *PLoS One*, vol. 4, no. 1, p. e4291, 2009.
- [273] S. Lee *et al.*, “Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-Willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, no. 12, pp. 1813–1819, Jul. 2000.
- [274] T. N. Wiesel and D. H. Hubel, “Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens,” *J. Neurophysiol.*, vol. 28, no. 6, pp. 1060–1072, Nov. 1965.
- [275] Y. Ben-Ari, “Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 3, no. 9, pp. 728–739, Sep. 2002.

- [276] R. Tyzio *et al.*, “Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery,” *Science*, vol. 314, no. 5806, pp. 1788–1792, Dec. 2006.
- [277] M. Leonzino, M. Busnelli, F. Antonucci, C. Verderio, M. Mazzanti, and B. Chini, “The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2,” *Cell Rep.*, vol. 15, no. 1, pp. 96–103, Apr. 2016.
- [278] M. Watanabe and A. Fukuda, “Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, p. 371, 2015.
- [279] O. Marín, “Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders,” *Nat. Med.*, vol. 22, no. 11, pp. 1229–1238, 2016.
- [280] S. F. Gilbert, “Mechanisms for the environmental regulation of gene expression: ecological aspects of animal development,” *J. Biosci.*, vol. 30, no. 1, pp. 65–74, Feb. 2005.
- [281] T. Renoir, T. Y. Pang, and A. J. Hannan, “Effects of environmental manipulations in genetically targeted animal models of affective disorders,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 57, pp. 12–27, Sep. 2013.
- [282] T. Y. C. Pang and A. J. Hannan, “Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity,” *Neuropharmacology*, vol. 64, pp. 515–528, Jan. 2013.
- [283] N. Liu, S. He, and X. Yu, “Early natural stimulation through environmental enrichment accelerates neuronal development in the mouse dentate gyrus,” *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e30803, 2012.
- [284] K. L. Bales, E. Boone, P. Epperson, G. Hoffman, and C. S. Carter, “Are behavioral effects of early experience mediated by oxytocin?,” *Front. Psychiatry*, vol. 2, p. 24, 2011.
- [285] R. M. Buijs, D. N. Velis, and D. F. Swaab, “Ontogeny of vasopressin and oxytocin in the fetal rat: early vasopressinergic innervation of the fetal brain,” *Peptides*, vol. 1, no. 4, pp. 315–324, 1980.
- [286] V. Chevaleyre, F. C. Moos, and M. G. Desarménien, “Correlation between electrophysiological and morphological characteristics during maturation of rat supraoptic neurons,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 13, no. 6, pp. 1136–1146, Mar. 2001.
- [287] V. Chevaleyre, F. C. Moos, and M. G. Desarménien, “Interplay between presynaptic and postsynaptic activities is required for dendritic plasticity and synaptogenesis in the supraoptic nucleus,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 22, no. 1, pp. 265–273, Jan. 2002.
- [288] E. Tribollet, M. Goumaz, M. Raggenbass, and J. J. Dreifuss, “Appearance and transient expression of vasopressin and oxytocin receptors in the rat brain,” *J. Recept. Res.*, vol. 11, no. 1–4, pp. 333–346, 1991.
- [289] A. Malek, E. Blann, and D. R. Mattison, “Human placental transport of oxytocin,” *J. Matern. Fetal Med.*, vol. 5, no. 5, pp. 245–255, Oct. 1996.
- [290] A. H. Veenema, D. I. Beiderbeck, M. Lukas, and I. D. Neumann, “Distinct correlations of vasopressin release within the lateral septum and the bed nucleus of the stria terminalis with the display of intermale aggression,” *Horm. Behav.*, vol. 58, no. 2, pp. 273–281, Jul. 2010.
- [291] J. P. Curley, S. Davidson, P. Bateson, and F. A. Champagne, “Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice,” *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 3, 2009.
- [292] M. Lukas, R. Bredewold, I. D. Neumann, and A. H. Veenema, “Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats,” *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 1, pp. 78–87, Jan. 2010.
- [293] G. J. Boer, “Vasopressin and brain development: studies using the Brattleboro rat,” *Peptides*, vol. 6 Suppl 1, pp. 49–62, 1985.
- [294] S. Ripamonti *et al.*, “Transient oxytocin signaling primes the development and function of excitatory hippocampal neurons,” *eLife*, vol. 6, p. e22466, Feb. 2017.
- [295] T. P. Nelissen *et al.*, “CD38 is Required for Dendritic Organization in Visual Cortex and Hippocampus,” *Neuroscience*, vol. 372, pp. 114–125, Feb. 2018.

- [296] A. Palanisamy *et al.*, "Oxytocin alters cell fate selection of rat neural progenitor cells in vitro," *PLoS One*, vol. 13, no. 1, p. e0191160, 2018.
- [297] B. Leuner, J. M. Caponiti, and E. Gould, "Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids," *Hippocampus*, vol. 22, no. 4, pp. 861–868, Apr. 2012.
- [298] J.-J. Zheng *et al.*, "Oxytocin mediates early experience-dependent cross-modal plasticity in the sensory cortices," *Nat. Neurosci.*, vol. 17, no. 3, pp. 391–399, Mar. 2014.
- [299] A. Gutnick *et al.*, "The Hypothalamic Neuropeptide Oxytocin Is Required for Formation of the Neurovascular Interface of the Pituitary," *Dev. Cell*, vol. 21, no. 4, pp. 642–654, Oct. 2011.
- [300] E. A. D. Hammock and P. Levitt, "Modulation of parvalbumin interneuron number by developmentally transient neocortical vasopressin receptor 1a (V1aR)," *Neuroscience*, vol. 222, pp. 20–28, Oct. 2012.
- [301] A. Spoljaric *et al.*, "Vasopressin excites interneurons to suppress hippocampal network activity across a broad span of brain maturity at birth," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 50, pp. E10819–E10828, Dec. 2017.
- [302] K. S. Evers and S. Wellmann, "Arginine Vasopressin and Copeptin in Perinatology," *Front. Pediatr.*, vol. 4, p. 75, 2016.
- [303] Y. Yamamoto, C. S. Carter, and B. S. Cushing, "Neonatal manipulation of oxytocin affects expression of estrogen receptor alpha," *Neuroscience*, vol. 137, no. 1, pp. 157–164, Jan. 2006.
- [304] K. M. Kramer, S. Yoshida, E. Papademetriou, and B. S. Cushing, "The organizational effects of oxytocin on the central expression of estrogen receptor α and oxytocin in adulthood," *BMC Neurosci.*, vol. 8, p. 71, Sep. 2007.
- [305] J. L. Eaton *et al.*, "Organizational effects of oxytocin on serotonin innervation," *Dev. Psychobiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 92–97, Jan. 2012.
- [306] F. Hashemi, K. Tekes, R. Laufer, P. Szegi, L. Tóthfalusi, and G. Csaba, "Effect of a Single Neonatal Oxytocin Treatment (Hormonal Imprinting) on the Biogenic Amine Level of the Adult Rat Brain: Could Oxytocin-Induced Labor Cause Pervasive Developmental Diseases?," *Reprod. Sci.*, vol. 20, no. 10, pp. 1255–1263, Oct. 2013.
- [307] M. M. DeMayo, Y. J. C. Song, I. B. Hickie, and A. J. Guastella, "A Review of the Safety, Efficacy and Mechanisms of Delivery of Nasal Oxytocin in Children: Therapeutic Potential for Autism and Prader-Willi Syndrome, and Recommendations for Future Research," *Paediatr. Drugs*, vol. 19, no. 5, pp. 391–410, Oct. 2017.
- [308] R. C. Meibach and A. Siegel, "Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods," *Brain Res.*, vol. 119, no. 1, pp. 1–20, Jan. 1977.
- [309] O. J. Andy and H. Stephan, "The septum in the human brain," *J. Comp. Neurol.*, vol. 133, no. 3, pp. 383–409, Jul. 1968.
- [310] C. Müller and S. Remy, "Septo-hippocampal interaction," *Cell Tissue Res.*, Dec. 2017.
- [311] C. Zhao, B. Eisinger, and S. C. Gammie, "Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: a double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e73750, 2013.
- [312] P. Y. Risold and L. W. Swanson, "Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus," *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 24, no. 2–3, pp. 91–113, Sep. 1997.
- [313] G. Raisman, "The connexions of the septum," *Brain J. Neurol.*, vol. 89, no. 2, pp. 317–348, Jun. 1966.
- [314] P. Sweeney and Y. Yang, "An Inhibitory Septum to Lateral Hypothalamus Circuit That Suppresses Feeding," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 36, no. 44, pp. 11185–11195, Nov. 2016.
- [315] L. C. Wong *et al.*, "Effective Modulation of Male Aggression through Lateral Septum to Medial Hypothalamus Projection," *Curr. Biol. CB*, vol. 26, no. 5, pp. 593–604, Mar. 2016.
- [316] K. R. Urstadt and B. G. Stanley, "Direct hypothalamic and indirect trans-pallidal, trans-thalamic, or trans-septal control of accumbens signaling and their roles in food intake," *Front. Syst. Neurosci.*, vol. 9, p. 8, 2015.

- [317] R. Menon *et al.*, "Oxytocin Signaling in the Lateral Septum Prevents Social Fear during Lactation," *Curr. Biol. CB*, vol. 28, no. 7, p. 1066–1078.e6, Apr. 2018.
- [318] S.-C. Lin, R. E. Brown, M. G. Hussain Shuler, C. C. H. Petersen, and A. Kepecs, "Optogenetic Dissection of the Basal Forebrain Neuromodulatory Control of Cortical Activation, Plasticity, and Cognition," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 35, no. 41, pp. 13896–13903, Oct. 2015.
- [319] W. Li *et al.*, "Cortical network switching: Possible role of the lateral septum and cholinergic arousal," *Brain Stimulat.*, vol. 8, no. 1, pp. 36–41, 2015.
- [320] S. V. Mahler and G. S. Aston-Jones, "Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 32, no. 38, pp. 13309–13326, Sep. 2012.
- [321] "The Human Brain Atlas at Michigan State University." [Online]. Available: <https://msu.edu/~brains/brains/human/index.html>. [Accessed: 17-Apr-2018].
- [322] S. M. Sunkin *et al.*, "Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Database issue, pp. D996–D1008, Jan. 2013.
- [323] L. Teles-Grilo Ruivo and J. Mellor, "Cholinergic modulation of hippocampal network function," *Front. Synaptic Neurosci.*, vol. 5, 2013.
- [324] M. G. Baxter, D. J. Bucci, L. K. Gorman, R. G. Wiley, and M. Gallagher, "Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats," *Behav. Neurosci.*, vol. 127, no. 5, pp. 619–627, Oct. 2013.
- [325] M. Engelmann, M. Ludwig, and R. Landgraf, "Microdialysis administration of vasopressin and vasopressin antagonists into the septum during pole-jumping behavior in rats," *Behav. Neural Biol.*, vol. 58, no. 1, pp. 51–57, Jul. 1992.
- [326] M. Engelmann, "Vasopressin in the septum: not important versus causally involved in learning and memory--two faces of the same coin?," *Prog. Brain Res.*, vol. 170, pp. 389–395, 2008.
- [327] T. Butler *et al.*, "Volume of the human septal forebrain region is a predictor of source memory accuracy," *J. Int. Neuropsychol. Soc. JINS*, vol. 18, no. 1, pp. 157–161, Jan. 2012.
- [328] T. Sakamoto, R. Kwak, Y. Okudaira, and J. Suzuki, "Effects of bilateral septal lesions on lever pressing for food reward in the rabbit," *Confin. Neurol.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 249–255, 1975.
- [329] P. Sweeney and Y. Yang, "An excitatory ventral hippocampus to lateral septum circuit that suppresses feeding," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 10188, Dec. 2015.
- [330] I. E. Monosov and O. Hikosaka, "Selective and graded coding of reward uncertainty by neurons in the primate anterodorsal septal region," *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 6, pp. 756–762, Jun. 2013.
- [331] D. I. Beiderbeck, I. D. Neumann, and A. H. Veenema, "Differences in intermale aggression are accompanied by opposite vasopressin release patterns within the septum in rats bred for low and high anxiety," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 26, no. 12, pp. 3597–3605, Dec. 2007.
- [332] T. E. Anthony, N. Dee, A. Bernard, W. Lerchner, N. Heintz, and D. J. Anderson, "Control of stress-induced persistent anxiety by an extra-amygdala septohypothalamic circuit," *Cell*, vol. 156, no. 3, pp. 522–536, Jan. 2014.
- [333] T. P. Sheehan, R. A. Chambers, and D. S. Russell, "Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry," *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 46, no. 1, pp. 71–117, Aug. 2004.
- [334] M. L. Bauman and T. L. Kemper, "Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions," *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.*, vol. 23, no. 2–3, pp. 183–187, May 2005.
- [335] P. Kotagiri, S. A. Chance, F. G. Szele, and M. M. Esiri, "Subventricular zone cytoarchitecture changes in autism," *Dev. Neurobiol.*, vol. 74, no. 1, pp. 25–41, Jan. 2014.
- [336] E. Fliers, S. E. Guldenaar, N. van de Wal, and D. F. Swaab, "Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis," *Brain Res.*, vol. 375, no. 2, pp. 363–367, Jun. 1986.

- [337] M. L. Boccia, P. Petrusz, K. Suzuki, L. Marson, and C. A. Pedersen, "Immunohistochemical localization of oxytocin receptors in human brain," *Neuroscience*, vol. 253, pp. 155–164, Dec. 2013.
- [338] F. Loup, E. Tribollet, M. Dubois-Dauphin, and J. J. Dreifuss, "Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study," *Brain Res.*, vol. 555, no. 2, pp. 220–232, Aug. 1991.
- [339] K. Ebner, C. T. Wotjak, F. Holsboer, R. Landgraf, and M. Engelmann, "Vasopressin released within the septal brain area during swim stress modulates the behavioural stress response in rats," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 997–1002, Mar. 1999.
- [340] K. Ebner, C. T. Wotjak, R. Landgraf, and M. Engelmann, "A single social defeat experience selectively stimulates the release of oxytocin, but not vasopressin, within the septal brain area of male rats," *Brain Res.*, vol. 872, no. 1–2, pp. 87–92, Jul. 2000.
- [341] I. Zocicas, D. A. Slattery, and I. D. Neumann, "Brain oxytocin in social fear conditioning and its extinction: involvement of the lateral septum," *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 39, no. 13, pp. 3027–3035, Dec. 2014.
- [342] M. Raggenbass, M. Dubois-Dauphin, E. Tribollet, and J. J. Dreifuss, "Direct excitatory action of vasopressin in the lateral septum of the rat brain," *Brain Res.*, vol. 459, no. 1, pp. 60–69, Aug. 1988.
- [343] G. Allaman-Exertier, I. Reymond-Marron, E. Tribollet, and M. Raggenbass, "Vasopressin modulates lateral septal network activity via two distinct electrophysiological mechanisms," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 26, no. 9, pp. 2633–2642, Nov. 2007.
- [344] M. Joëls and I. J. Urban, "Topographic organization of fimbria-fornix fibers projecting to the lateral septum of rats: a single and field response analysis," *Exp. Neurol.*, vol. 87, no. 3, pp. 474–486, Mar. 1985.
- [345] P. van den Hooff, I. J. Urban, and D. de Wied, "Vasopressin maintains long-term potentiation in rat lateral septum slices," *Brain Res.*, vol. 505, no. 2, pp. 181–186, Dec. 1989.
- [346] P. Van den Hooff and I. J. Urban, "Vasopressin facilitates excitatory transmission in slices of the rat dorso-lateral septum," *Synap. N. Y. N.*, vol. 5, no. 3, pp. 201–206, 1990.
- [347] Z. Wang, C. F. Ferris, and G. J. De Vries, "Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*)," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 1, pp. 400–404, Jan. 1994.
- [348] Y. F. Guzmán *et al.*, "Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 231, no. 10, pp. 2097–2105, May 2014.
- [349] I. Mesic *et al.*, "Double Dissociation of the Roles of Metabotropic Glutamate Receptor 5 and Oxytocin Receptor in Discrete Social Behaviors," *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 40, no. 10, pp. 2337–2346, Sep. 2015.
- [350] R. Dantzer, G. F. Koob, R. M. Bluthé, and M. Le Moal, "Septal vasopressin modulates social memory in male rats," *Brain Res.*, vol. 457, no. 1, pp. 143–147, Aug. 1988.
- [351] P. Popik, P. E. Vos, and J. M. Van Ree, "Neurohypophyseal hormone receptors in the septum are implicated in social recognition in the rat," *Behav. Pharmacol.*, vol. 3, no. 4, pp. 351–358, Aug. 1992.
- [352] M. Engelmann and R. Landgraf, "Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats," *Physiol. Behav.*, vol. 55, no. 1, pp. 145–149, Jan. 1994.
- [353] R. Landgraf *et al.*, "V1 vasopressin receptor antisense oligodeoxynucleotide into septum reduces vasopressin binding, social discrimination abilities, and anxiety-related behavior in rats," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 15, no. 6, pp. 4250–4258, Jun. 1995.
- [354] I. F. Bielsky, S.-B. Hu, X. Ren, E. F. Terwilliger, and L. J. Young, "The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study," *Neuron*, vol. 47, no. 4, pp. 503–513, Aug. 2005.

- [355] A. H. Veenema, R. Bredewold, and G. J. De Vries, "Vasopressin regulates social recognition in juvenile and adult rats of both sexes, but in sex- and age-specific ways," *Horm. Behav.*, vol. 61, no. 1, pp. 50–56, Jan. 2012.
- [356] Z. Wu *et al.*, "An obligate role of oxytocin neurons in diet induced energy expenditure," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, p. e45167, 2012.
- [357] J. A. Harris *et al.*, "Anatomical characterization of Cre driver mice for neural circuit mapping and manipulation," *Front. Neural Circuits*, vol. 8, p. 76, 2014.
- [358] Y. Ben-Barak, J. T. Russell, M. H. Whitnall, K. Ozato, and H. Gainer, "Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 5, no. 1, pp. 81–97, Jan. 1985.
- [359] G. Alonso, E. Bribes, and N. Chauvet, "Survival and regeneration of neurons of the supraoptic nucleus following surgical transection of neurohypophysial axons depend on the existence of collateral projections of these neurons to the dorsolateral hypothalamus," *Brain Res.*, vol. 711, no. 1, pp. 34–43, Mar. 1996.
- [360] "Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates - 4th Edition." [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391057-8>. [Accessed: 01-May-2018].
- [361] L. A. Gunaydin *et al.*, "Natural neural projection dynamics underlying social behavior," *Cell*, vol. 157, no. 7, pp. 1535–1551, Jun. 2014.
- [362] E. A. D. Hammock and P. Levitt, "Oxytocin receptor ligand binding in embryonic tissue and postnatal brain development of the C57BL/6J mouse," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 7, p. 195, 2013.
- [363] G. Guillon, D. Butlen, B. Cantau, T. Barth, and S. Jard, "Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla: relation to adenylate cyclase activation," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 85, no. 3–4, pp. 291–304, Dec. 1982.
- [364] M. Manning, S. Stoev, B. Chini, T. Durroux, B. Mouillac, and G. Guillon, "Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents," in *Progress in Brain Research*, vol. 170, I. D. Neumann and R. Landgraf, Eds. Elsevier, 2008, pp. 473–512.
- [365] L. S. Leung, L. A. Martin, and D. J. Stewart, "Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum," *Hippocampus*, vol. 4, no. 2, pp. 136–147, Apr. 1994.
- [366] N. Ognjanovski *et al.*, "Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation," *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 15039, Apr. 2017.
- [367] Y. Zhang, Y. Zhang, H. Yu, Y. Yang, W. Li, and Z. Qian, "Theta-gamma coupling in hippocampus during working memory deficits induced by low frequency electromagnetic field exposure," *Physiol. Behav.*, vol. 179, pp. 135–142, Oct. 2017.
- [368] J. P. Gallagher, F. Zheng, H. Hasuo, and P. Shinnick-Gallagher, "Activities of neurons within the rat dorsolateral septal nucleus (DLSN)," *Prog. Neurobiol.*, vol. 45, no. 5, pp. 373–395, Apr. 1995.
- [369] M. J. Twery, K. D. Phelan, and J. P. Gallagher, "Spontaneous bursting and non-bursting activity in morphologically identified neurons of the rat dorsolateral septal nucleus, in vitro," *Neuroscience*, vol. 46, no. 3, pp. 669–679, 1992.
- [370] B. Carette, P. Poulain, and O. Doutrelant, "Electrical properties of neurons in the mediolateral part of the lateral septum: intracellular recordings from guinea-pig brain slices," *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Experimentation Cérébrale*, vol. 91, no. 1, pp. 105–114, 1992.
- [371] O. Doutrelant, P. Poulain, B. Carette, and J. C. Beauvillain, "Light- and electron-microscopic study of electrophysiologically characterized neurons in the mediolateral part of the lateral septum of the guinea-pig," *Cell Tissue Res.*, vol. 275, no. 3, pp. 543–553, Mar. 1994.
- [372] I. J. Urban and D. De Wied, "Effect of vasopressin, oxytocin and peptides derived from these hormones on field potential induced in lateral septum of rats by stimulation of the fimbria fornix," *Neuropeptides*, vol. 7, no. 1, pp. 41–49, Jan. 1986.

- [373] I. J. Urban, "Arginine-vasopressin enhances the responses of lateral septal neurons in the rat to excitatory amino acids and fimbria-fornix stimuli," *Brain Res.*, vol. 311, no. 2, pp. 201–209, Oct. 1984.
- [374] M. Joëls and I. J. Urban, "The effect of microiontophoretically applied vasopressin and oxytocin on single neurones in the septum and dorsal hippocampus of the rat," *Neurosci. Lett.*, vol. 33, no. 1, pp. 79–84, Nov. 1982.
- [375] M. Raggenbass, E. Tribollet, and J. J. Dreifuss, "Electrophysiological and autoradiographical evidence of V1 vasopressin receptors in the lateral septum of the rat brain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 21, pp. 7778–7782, Nov. 1987.
- [376] I. J. Urban, "Intraseptal administration of vasopressin and oxytocin affects hippocampal electroencephalogram in rats," *Exp. Neurol.*, vol. 74, no. 1, pp. 131–147, Oct. 1981.
- [377] H. J. V. Rutherford *et al.*, "Intranasal oxytocin decreases cross-frequency coupling of neural oscillations at rest," *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.*, vol. 123, pp. 143–151, Jan. 2018.
- [378] A. Perry *et al.*, "Intranasal oxytocin modulates EEG mu/alpha and beta rhythms during perception of biological motion," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 35, no. 10, pp. 1446–1453, Nov. 2010.
- [379] S. A. Kodirov, M. Wehrmeister, and L. V. Colom, "Modulation of HCN channels in lateral septum by nicotine," *Neuropharmacology*, vol. 81, pp. 274–282, Jun. 2014.
- [380] M. Funahashi, Y. Mitoh, A. Kohjitani, and R. Matsuo, "Role of the Hyperpolarization-Activated Cation Current (I_h) in Pacemaker Activity in Area Postrema Neurons of Rat Brain Slices," *J. Physiol.*, vol. 552, no. Pt 1, pp. 135–148, Oct. 2003.
- [381] K. D. Phelan, H. Hasuo, M. J. Twery, and J. P. Gallagher, "Projection neurons in the rat dorsolateral septal nucleus possess recurrent axon collaterals," *Neurosci. Lett.*, vol. 97, no. 3, pp. 259–265, Feb. 1989.
- [382] K. D. Phelan, M. J. Twery, and J. P. Gallagher, "Morphological and electrophysiological evidence for electrotonic coupling of rat dorsolateral septal nucleus neurons in vitro," *Synap. N. Y. N.*, vol. 13, no. 1, pp. 39–49, Jan. 1993.
- [383] R. L. Jakab, F. Naftolin, and C. Leranth, "Convergent vasopressinergic and hippocampal input onto somatospiny neurons of the rat lateral septal area," *Neuroscience*, vol. 40, no. 2, pp. 413–421, 1991.
- [384] P. van den Hooff, I. J. Urban, and D. de Wied, "Vasopressin maintains long-term potentiation in rat lateral septum slices," *Brain Res.*, vol. 505, no. 2, pp. 181–186, Dec. 1989.
- [385] J. Mairesse *et al.*, "Activation of presynaptic oxytocin receptors enhances glutamate release in the ventral hippocampus of prenatally restraint stressed rats," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 62, pp. 36–46, Dec. 2015.
- [386] S. F. Owen, S. N. Tunçdemir, P. L. Bader, N. N. Tirko, G. Fishell, and R. W. Tsien, "Oxytocin enhances hippocampal spike transmission by modulating fast-spiking interneurons," *Nature*, vol. 500, no. 7463, pp. 458–462, Aug. 2013.
- [387] L. W. Hung *et al.*, "Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area," *Science*, vol. 357, no. 6358, pp. 1406–1411, 29 2017.
- [388] J. S. Wiegert, M. Mahn, M. Prigge, Y. Printz, and O. Yizhar, "Silencing Neurons: Tools, Applications, and Experimental Constraints," *Neuron*, vol. 95, no. 3, pp. 504–529, Aug. 2017.
- [389] A. Tendler and S. Wagner, "Different types of theta rhythmicity are induced by social and fearful stimuli in a network associated with social memory," *eLife*, vol. 4, 2015.
- [390] M. M. Riccomagno and A. L. Kolodkin, "Sculpting Neural Circuits by Axon and Dendrite Pruning," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 31, no. 1, pp. 779–805, 2015.
- [391] P. Valnegri *et al.*, "RNF8/UBC13 ubiquitin signaling suppresses synapse formation in the mammalian brain," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 1271, Nov. 2017.
- [392] F. R. Weis, R. Markello, B. Mo, and P. Bochiechio, "Cardiovascular effects of oxytocin," *Obstet. Gynecol.*, vol. 46, no. 2, pp. 211–214, Aug. 1975.

- [393] K. V. Northcutt and J. S. Lonstein, "Social contact elicits immediate-early gene expression in dopaminergic cells of the male prairie vole extended olfactory amygdala," *Neuroscience*, vol. 163, no. 1, pp. 9–22, Sep. 2009.
- [394] A. E. Perkins, E. R. Woodruff, L. E. Chun, R. L. Spencer, E. Varlinskaya, and T. Deak, "Analysis of c-Fos induction in response to social interaction in male and female Fisher 344 rats," *Brain Res.*, vol. 1672, pp. 113–121, Oct. 2017.
- [395] Y. Kim *et al.*, "Mapping Social Behavior-Induced Brain Activation at Cellular Resolution in the Mouse," *Cell Rep.*, vol. 10, no. 2, pp. 292–305, Jan. 2015.
- [396] M. Vandecasteele *et al.*, "Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 37, pp. 13535–13540, Sep. 2014.
- [397] K. L. Bales, L. A. Pfeifer, and C. S. Carter, "Sex differences and developmental effects of manipulations of oxytocin on alloparenting and anxiety in prairie voles," *Dev. Psychobiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 123–131, Mar. 2004.
- [398] C. Ahumada *et al.*, "Amphetamine treatment affects the extra-hypothalamic vasopressinergic system in a sex- and nucleus-dependent manner," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 29, no. 4, Apr. 2017.
- [399] S. J. O'Dell, L. M. Feinberg, and J. F. Marshall, "A neurotoxic regimen of methamphetamine impairs novelty recognition as measured by a social odor-based task," *Behav. Brain Res.*, vol. 216, no. 1, pp. 396–401, Jan. 2011.
- [400] A. K. Beery and D. Kaufer, "Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents," *Neurobiol. Stress*, vol. 1, pp. 116–127, Oct. 2014.
- [401] K. Ebner, C. T. Wotjak, R. Landgraf, and M. Engelmann, "A single social defeat experience selectively stimulates the release of oxytocin, but not vasopressin, within the septal brain area of male rats," *Brain Res.*, vol. 872, no. 1–2, pp. 87–92, Jul. 2000.
- [402] A. S. Fox, J. A. Oler, D. P. M. Tromp, J. L. Fudge, and N. H. Kalin, "Extending the amygdala in theories of threat processing," *Trends Neurosci.*, vol. 38, no. 5, pp. 319–329, May 2015.
- [403] J. Sadino and Z. Donaldson, "Prairie voles as a model for understanding the genetic and epigenetic regulation of attachment behaviors," *ACS Chem. Neurosci.*, Mar. 2018.
- [404] T. R. Insel, Z. X. Wang, and C. F. Ferris, "Patterns of brain vasopressin receptor distribution associated with social organization in microtine rodents," *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 9, pp. 5381–5392, Sep. 1994.
- [405] M. L. Boccia, P. Petrusz, K. Suzuki, L. Marson, and C. A. Pedersen, "Immunohistochemical localization of oxytocin receptors in human brain," *Neuroscience*, vol. 253, pp. 155–164, Dec. 2013.
- [406] A. Mitra, C. Lenglos, and E. Timofeeva, "Activation of GABAA and GABAB receptors in the lateral septum increases sucrose intake by differential stimulation of sucrose licking activity," *Behav. Brain Res.*, vol. 273, pp. 82–88, Oct. 2014.
- [407] A. Mitra, C. Lenglos, and E. Timofeeva, "Inhibition in the lateral septum increases sucrose intake and decreases anorectic effects of stress," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 41, no. 4, pp. 420–433, Feb. 2015.
- [408] R. W. Stackman and T. J. Walsh, "Baclofen produces dose-related working memory impairments after intraseptal injection," *Behav. Neural Biol.*, vol. 61, no. 2, pp. 181–185, Mar. 1994.
- [409] L. S. Leung and B. Shen, "GABAB receptor blockade enhances theta and gamma rhythms in the hippocampus of behaving rats," *Hippocampus*, vol. 17, no. 4, pp. 281–291, 2007.
- [410] G. F. Turi, G. Wittmann, R. M. Lechan, and A. Losonczy, "Ambient GABA modulates septo-hippocampal inhibitory terminals via presynaptic GABA_B receptors," *Neuropharmacology*, vol. 88, pp. 55–62, Jan. 2015.
- [411] J. Haam *et al.*, "GABA is excitatory in adult vasopressinergic neuroendocrine cells," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 32, no. 2, pp. 572–582, Jan. 2012.
- [412] S. W. Lee *et al.*, "GABAergic inhibition is weakened or converted into excitation in the oxytocin and vasopressin neurons of the lactating rat," *Mol. Brain*, vol. 8, p. 34, 2015.

- [413] K. Y. Choe *et al.*, “High salt intake increases blood pressure via BDNF-mediated downregulation of KCC2 and impaired baroreflex inhibition of vasopressin neurons,” *Neuron*, vol. 85, no. 3, pp. 549–560, Feb. 2015.
- [414] B. Yang, R. Tadavarty, J.-Y. Xu, and B. R. Sastry, “Activity-mediated plasticity of GABA equilibrium potential in rat hippocampal CA1 neurons,” *Exp. Neurol.*, vol. 221, no. 1, pp. 157–165, Jan. 2010.
- [415] R. Tyzio, G. L. Holmes, Y. Ben-Ari, and R. Khazipov, “Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings,” *Epilepsia*, vol. 48 Suppl 5, pp. 96–105, 2007.
- [416] O. J. Andy and H. Stephan, “The septum in the human brain,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 133, no. 3, pp. 383–409, Jul. 1968.
- [417] J. Y. Lin, P. M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld, and R. Y. Tsien, “ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation,” *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1499–1508, Oct. 2013.
- [418] L. A. Martinez, M. J. Levy, and A. Petruilis, “Endogenous oxytocin is necessary for preferential Fos expression to male odors in the bed nucleus of the stria terminalis in female Syrian hamsters,” *Horm. Behav.*, vol. 64, no. 4, pp. 653–664, Sep. 2013.
- [419] N. Duque-Wilckens *et al.*, “Oxytocin Receptors in the Anteromedial Bed Nucleus of the Stria Terminalis Promote Stress-Induced Social Avoidance in Female California Mice,” *Biol. Psychiatry*, vol. 83, no. 3, pp. 203–213, Feb. 2018.
- [420] K. M. Dumais, A. G. Alonso, M. A. Immormino, R. Bredewold, and A. H. Veenema, “Involvement of the oxytocin system in the bed nucleus of the stria terminalis in the sex-specific regulation of social recognition,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 64, pp. 79–88, Feb. 2016.
- [421] C. J. Guenther, K. Miyamichi, H. H. Yang, H. C. Heller, and L. Luo, “Permanent Genetic Access to Transiently Active Neurons via TRAP: Targeted Recombination in Active Populations,” *Neuron*, vol. 78, no. 5, pp. 773–784, Jun. 2013.
- [422] Y. Yamamoto, B. S. Cushing, K. M. Kramer, P. D. Epperson, G. E. Hoffman, and C. S. Carter, “Neonatal manipulations of oxytocin alter expression of oxytocin and vasopressin immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in a gender-specific manner,” *Neuroscience*, vol. 125, no. 4, pp. 947–955, Jan. 2004.
- [423] J.-L. Rault, C. S. Carter, J. P. Garner, J. N. Marchant-Forde, B. T. Richert, and D. C. Lay, “Repeated intranasal oxytocin administration in early life dysregulates the HPA axis and alters social behavior,” *Physiol. Behav.*, vol. 112–113, pp. 40–48, Mar. 2013.
- [424] B. L. Roth, “DREADDs for Neuroscientists,” *Neuron*, vol. 89, no. 4, pp. 683–694, Feb. 2016.
- [425] C. Belzung and M. Lemoine, “Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression,” *Biol. Mood Anxiety Disord.*, vol. 1, p. 9, Nov. 2011.
- [426] A. Mouri *et al.*, “MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 32, no. 13, pp. 4562–4580, Mar. 2012.
- [427] C. Dombret *et al.*, “Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 21, pp. 4703–4717, Nov. 2012.
- [428] J. T. Glessner *et al.*, “Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes,” *Nature*, vol. 459, no. 7246, pp. 569–573, May 2009.
- [429] S. R. Louros and E. K. Osterweil, “Perturbed proteostasis in autism spectrum disorders,” *J. Neurochem.*, vol. 139, no. 6, pp. 1081–1092, Dec. 2016.
- [430] S. S. Margolis, G. L. Sell, M. A. Zbinden, and L. M. Bird, “Angelman Syndrome,” *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, vol. 12, no. 3, pp. 641–650, Jul. 2015.
- [431] L. M. Bird, “Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects,” *Appl. Clin. Genet.*, vol. 7, pp. 93–104, 2014.

- [432] M. Leyser, P. S. Penna, A. C. de Almeida, M. M. Vasconcelos, and O. J. M. Nascimento, "Revisiting epilepsy and the electroencephalogram patterns in Angelman syndrome," *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*, vol. 35, no. 5, pp. 701–705, May 2014.
- [433] M. Pignatelli *et al.*, "Changes in mGlu5 receptor-dependent synaptic plasticity and coupling to homer proteins in the hippocampus of Ube3A hemizygous mice modeling angelman syndrome," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 34, no. 13, pp. 4558–4566, Mar. 2014.
- [434] P. L. Greer *et al.*, "The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc," *Cell*, vol. 140, no. 5, pp. 704–716, Mar. 2010.
- [435] N. Urraca *et al.*, "The Interstitial Duplication 15q11.2-q13 Syndrome Includes Autism, Mild Facial Anomalies and a Characteristic EEG Signature," *Autism Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 268–279, Aug. 2013.
- [436] L. M. Ignacio-Souza *et al.*, "Defective regulation of the ubiquitin/proteasome system in the hypothalamus of obese male mice," *Endocrinology*, vol. 155, no. 8, pp. 2831–2844, Aug. 2014.
- [437] S. M. Sunkin *et al.*, "Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Database issue, pp. D996–D1008, Jan. 2013.
- [438] G. Righi, A. L. Tierney, H. Tager-Flusberg, and C. A. Nelson, "Functional connectivity in the first year of life in infants at risk for autism spectrum disorder: an EEG study," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e105176, 2014.
- [439] J. W. Lovelace, I. M. Ethell, D. K. Binder, and K. A. Razak, "Translation-relevant EEG phenotypes in a mouse model of Fragile X Syndrome," *Neurobiol. Dis.*, vol. 115, pp. 39–48, Mar. 2018.