



HAL
open science

Circuits neuronaux sous-tendant la régulation émotionnelle par le système ocytocinergique

Stéphanie Goyon

► **To cite this version:**

Stéphanie Goyon. Circuits neuronaux sous-tendant la régulation émotionnelle par le système ocytocinergique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ046 . tel-02124545

HAL Id: tel-02124545

<https://theses.hal.science/tel-02124545>

Submitted on 9 May 2019

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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THÈSE présentée par :

Stéphanie GOYON

soutenue le : **10 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Circuits neuronaux sous-tendant la
régulation émotionnelle par le système
ocytocinergique**

THÈSE dirigée par :

M. CHARLET Alexandre CR, CNRS, INCI, UPR3212.

Co-dirigée par :

M. DARBON Pascal MCF, Université de Strasbourg, INCI, CNRS UPR3212.

RAPPORTEURS :

Mme LE MERRER Julie CR, IFCE, INRA UMR0085, CNRS UMR7247.

M. DESARMENIEN Michel DR, CNRS, IGF, UMR5203.

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme SIMONNEAUX Valérie DR, CNRS, INCI, UPR3212.

M. STOOP Ron PU, Université de Lausanne, Unité de recherche sur la Neurobiologie de l'anxiété.

A. REMERCIEMENTS

Après à peine trois ans, cette thèse s'achève enfin. Elle a pu être faite grâce au soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier de tout cœur, car sans elles, je ne suis pas certaine que j'aurais pu achever cette aventure ! Et croyez-moi, ça été une vraie aventure !!

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble de mon jury à savoir : le Docteur Julie Le Merrer, les directeurs de recherche Michel Desarmenien et Valérie Simmoneaux ainsi que le Professeur Ron Stoop, d'avoir sans hésiter accepté d'évaluer mes travaux en tant que membres du jury.

Je veux également remercier mes directeurs de thèse, le Docteur Alexandre Charlet et le Docteur Pascal Darbon de m'avoir laissée l'opportunité de réaliser cette thèse et de m'avoir faite confiance. Merci Pascal pour ta « ZENitude » en toutes circonstances. Je remercie également le Professeur Pierrick Poisbeau de m'avoir accueilli dans son équipe.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du 4^{ème} pour son bon esprit, ses conseils précieux ainsi que son aide dans mes travaux. Je remercie spécialement Virginie Chavant qui a été ma maman du labo et avec qui j'ai pu partager toutes mes émotions (petite référence au sujet de cette thèse). Merci également au docteur Meggane Melchior avec qui j'ai tout partagé ! Sciences évidemment mais également fous rires, pleures, pause-café, soirées... ou encore mon bureau (au temps où j'en avais encore un) ! J'ai été ravi de te rencontrer ! Au passage, Griset te remercie également pour les nombreuses fois où tu t'es bien occupée d'elle ce qui m'a permis de rentrer chez moi quand je voulais (tu sais de quoi je parle) ! Merci également à Géraldine Gazzo pour son soutien sans faille et pour les repas sushis, ainsi que Damien Kerspern pour nos discussions scientifiques et personnelles. Maintenant que je pars, tu ne m'entendras plus rouspéter à cause de l'état de la paillasse, mais je suis certaine que cela va te manquer Damien.

Par soucis de temps et de place, je ne peux pas tous vous remercier individuellement mais je remercie également tous les gens du 3^{ème} étage pour m'avoir supportée durant la rédaction de cette thèse ! Un grand merci au Docteur Perrine Inquimbert également, toujours souriante et bienveillante ! Cela a été un réel plaisir de te rencontrer ! Et je suis obligée de finir par remercier la future Docteure Fanny Cusey avec qui j'ai tant partagé depuis notre escapade aux States et avec qui j'ai pu partager les galères de fin de thèse, de rédaction du manuscrit... Un énorme merci à toi (et ton mari également !). Rencontrer en fin de thèse, merci Livya pour ton sourire et ta bonne humeur en toute occasion. Merci également à mes amis doctorants ou non, d'ici ou d'ailleurs, qui m'ont également soutenue et changer les idées notamment après les journées éprouvantes d'électrophy !

Merci également à toutes les personnes qui se sont occupées des animaux au laboratoire dont notamment le Docteur Dominique Ciocca sans qui je n'aurais pas pu manipuler les week-ends ! Tu fais un travail formidable, ne change rien !

Avant de terminer ces remerciements, je tiens à remercier du fond du cœur le Docteur Xavier Fioramonti et Fabienne Lienard ! Mon premier stage avec vous a été un peu un coup du destin si je puis dire mais pas le second. Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée ! Et même si je n'ai pu continuer avec vous, je ne vous oublie pas !

Enfin, je voudrais terminer par ma famille en commençant par mes parents qui m'ont laissée faire mes propres choix et qui m'ont toujours soutenue malgré les épreuves et dieu sait qu'elles ont été nombreuses ainsi que ma sœur et Romain. Ces trois années de thèse se finissent bien malgré tout ! Merci également à Christian et Anne, Gilles et Célia, Maddy, Jean-Pierre pour les distractions et repas dominicaux.

Mes derniers remerciements seront pour toi, mon amour ! J'ai pas mal critiqué Strasbourg mais finalement, j'y ai fait la plus belle des rencontres ! Merci à toi d'avoir été là et d'être encore là malgré les épreuves, et une nouvelle vie va commencer ! Et promis, j'essaie de trouver où poser nos valises afin de réaliser nos rêves (rapidement pour certains)! Je t'aime pour toujours ♥

B. TABLE DES MATIERES

A. REMERCIEMENTS	1
B. TABLE DES MATIERES	3
C. RESUME ETENU EN FRANÇAIS	6
D. LISTE DE FIGURES	11
E. LISTE DES TABLEAUX	13
F. LISTE DES ANNEXES	13
G. LISTE DES ABREVIATIONS	14
H. INTRODUCTION	16
1. GENERALITES SUR L'OCYTOCINE	16
1.1. Histoire de la découverte de l'ocytocine	16
1.2. Phylogénie.....	17
1.2.1. <i>Evolution de l'ocytocine et de son analogue (vasopressine)</i>	17
1.2.1.1. Ocytocine et vasopressine : un ancêtre commun.....	18
1.2.1.2. Conservation et adaptation des fonctions de l'ocytocine	19
1.2.1.3. Conservation et adaptation des zones contenant les neurones ocytocinergiques et morphologie de ces neurones	20
1.2.2. <i>Evolution du récepteur de l'ocytocine</i>	22
1.3. Ocytocine et son récepteur : du gène à la molécule	23
1.3.1. <i>Ocytocine : synthèse et régulation</i>	23
1.3.1.1. Régulation en amont du gène de l'ocytocine.....	25
1.3.1.2. Régulation en aval du gène de l'ocytocine.....	27
1.3.2. <i>Récepteur de l'ocytocine : du gène à la protéine</i>	28
1.3.2.1. Régulation du gène codant pour le récepteur de l'ocytocine.....	29
1.3.2.2. Importance du cholestérol et des ions divalents pour le récepteur de l'ocytocine ...	30
1.3.3. <i>Récepteur de l'ocytocine</i>	31
1.3.3.1. Interaction ligand-récepteur.....	31
1.3.3.2. Dimérisation du récepteur de l'ocytocine.....	32
1.3.3.3. Signalisation intracellulaire	34
1.4. Neurones ocytocinergiques	37
1.4.1. <i>Noyaux ocytocinergiques hypothalamiques</i>	38
1.4.1.1. Noyaux accessoires	38
1.4.1.2. Noyaux supraoptiques	38
1.4.1.3. Noyaux paraventriculaires.....	39
1.4.2. <i>Neurones ocytocinergiques</i>	40

1.4.2.1. Neurones parvocellulaires	41
1.4.2.2. Neurones magnocellulaires	41
1.4.3. Libération de l'ocytocine	43
1.4.3.1. Libération dendritique de l'ocytocine.....	43
1.4.3.1. Libération axonale de l'ocytocine	43
1.4.4. Projections des neurones ocytocinergiques	46
1.4.5. Cartographie du récepteur de l'ocytocine	49
1.4.6. Existence des neurones ocytocinergiques non hypothalamiques ?	52
1.4.7. Les neurones ocytocinergiques sécrètent-ils uniquement de l'ocytocine ?.....	53
2. FONCTIONS DE L'OCYTOCINE	55
2.1. Généralités.....	55
2.1.1. Fonction cardiaque et activité motrice	56
2.1.2. Fonction d'osmorégulation.....	57
2.1.3. Prise alimentaire	57
2.1.4. Reproduction.....	59
2.1.5. Comportement social : lien de couple, interaction sociale, comportement maternel	61
2.1.6. Anxiété et stress.....	64
2.1.7. Douleur	65
2.1.8. Peur.....	67
2.2. Emotions.....	69
2.3. Peur/Anxiété.....	70
2.3.1. Circuit de la peur	70
2.3.2. Neurones ocytocinergiques et amygdale.....	73
2.3.3. Conditionnement de peur	75
3. RECRUTEMENT DU SYSTEME OCYTOCINERGIQUE	76
3.1. Au niveau intra-hypothalamique	76
3.2. Au niveau extra-hypothalamique	78
3.2.1. Recrutement via un peptide.....	78
3.2.1.1. Cholecystokinine	78
3.2.1.2. Relaxine.....	79
3.2.1.3. Neuropeptide S	79
3.2.2. Recrutement via une molécule non-peptidergique	80
3.2.2.1. Entrées opioïdergiques	80
3.2.2.2. Entrées noradrénergiques	80
3.2.2.3. Entrées dopaminergiques.....	81
3.2.2.4. Entrées sérotoninergiques.....	82
4. OBJECTIFS DE LA THESE	83

4.1. Caractérisation des conséquences d'un conditionnement de peur sur le système ocytocinergique	83
4.2. Recrutement du système ocytocinergique	84
4.2.1. Via un peptide : le neuropeptide S	84
4.2.2. Via des neurotransmetteurs classiques	84
I. RESULTATS	86
1. Article 1 : Fear memory engram and its plasticity in the hypothalamic oxytocin system.....	86
1.1. Vue d'ensemble.....	86
1.2. Article 1	90
2. Article 2 : Neuropeptide S activates paraventricular oxytocin neurons to induce anxiolysis	147
2.1. Vue d'ensemble.....	147
2.2. Article 2.....	149
3. Article 3 : Données préliminaires.....	161
J. DISCUSSION GENERALE	178
1. Considérations éthiques et réglementaires	179
2. Modèle animal : le rat.....	180
2.1. Variabilité inter-espèce.....	180
2.2. Variabilité intra-espèce.....	180
2.3. Sexe de l'espèce	181
3. Une si petite population de neurones ocytocinergiques recrutée lors de la peur ?	182
3.1. Système vGATE.....	182
3.2. Réexposition au contexte de peur et implication des neurones ocytocinergiques.....	183
3.3. Switch fonctionnel entre ocytocine et glutamate.....	184
4. Développement du système ocytocinergique et conséquences d'une exposition à un contexte de peur à différents stades de la vie.....	185
5. Peur et anxiété : émotions étroitement liées avec des systèmes assez bien distincts.....	187
6. Effets de l'ocytocine au niveau périphérique lors d'une peur	188
7. De nouvelles voies thérapeutiques grâce à l'ocytocine et le neuropeptide S ?	189
8. <i>Zona incerta</i> , neurones dopaminergiques, plusieurs comportements ?.....	190
9. Neurones ocytocinergiques spontanément actifs.....	192
K. CONCLUSIONS	194
L. REFERENCES	195
M. ANNEXES	230
1. ANNEXE 1 : Aperçu des voies de signalisation ocytocine-récepteur ocytocinergique	230
2. ANNEXE 2 : Publication en lien non direct avec ma thèse	231
3. ANNEXE 3 : Publication en lien non direct avec ma thèse	239

C. RESUME ETENDU EN FRANÇAIS

1. INTRODUCTION DU SUJET DE THESE

Il y a plus d'un siècle, Sir Henry Dales identifie à partir d'extrait de glande pituitaire, une hormone présentant des propriétés utérotoniques chez des mammifères (Dale, 1906). Cette substance sera purifiée vers la fin des années 20 (Kamm et al., 1928) et elle sera nommée ocytocine.

L'ocytocine (OT), neuropeptide constituée de 9 acides aminés, est synthétisée au niveau du système nerveux central par trois noyaux hypothalamiques : les noyaux paraventriculaires (PVN), supraoptiques (SON) et accessoires. Ces neurones OT sont classés en deux populations distinctes : les parvocellulaires et les magnocellulaires. Ces deux types de neurones diffèrent de par leurs tailles, leurs propriétés électriques et surtout par leurs sites de projections. Ainsi, seuls les neurones magnocellulaires projettent au niveau de la posthypophyse afin de sécréter l'OT dans la circulation sanguine : l'OT est alors considérée comme une neurohormone. Les neurones parvOT quant à eux sont localisés uniquement dans les PVN et ne projettent pas dans la posthypophyse mais dans d'autres structures cérébrales telles que l'amygdale, le cortex frontal associatif, le tronc cérébral ou la moelle épinière (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Ceci confère donc également à l'OT une fonction de neurotransmetteur.

De par ses nombreuses fonctions dans des comportements sexuels (choix du partenaire sexuel, orgasme, érection...), la presse populaire et certains scientifiques attribueront à l'OT le nom de « molécule de l'amour ». Mais diverses études montrent l'implication de l'OT dans de nombreuses émotions à valence positive telles que les interactions sociales, la confiance en soi ; comme à valence négative telles que la douleur, l'anxiété ou la peur. Si l'on sait aujourd'hui que le système OT peut moduler de nombreuses fonctions physiologiques et comportements, il est encore difficile de dire s'il existe des sous-ensembles bien distincts de neurones OT. De la même manière, les mécanismes cellulaires, circuits neuronaux et les potentielles plasticités sous-jacentes aux fonctions du système OT restent obscures. Lors de ma thèse, je me suis donc attachée à mieux comprendre ces différents points.

En premier lieu, je me suis intéressée à l'impact d'une expérience de peur conditionnée sur le système OT. Bien que ses rôles de modulateurs sur la peur ou l'anxiété aient déjà bien été

décrits (Amico et al., 2004 ; Knobloch et al., 2012), nous ne savions pas quels neurones OT étaient impliqués dans la réponse à la peur, ni si cette expérience induisait un changement anatomo-fonctionnel du système OT. L'utilisation d'une approche combinant infections virales, permettant le marquage et la manipulation spécifiques des neurones OT activés lors d'une peur conditionnée, électrophysiologie *ex vivo* et comportement m'a permis d'y répondre. En second lieu, je me suis attachée à comprendre comment les neurones OT sont recrutés de manière fine afin de moduler spécifiquement certaines émotions. Pour ce faire plusieurs candidats ont été retenus : d'abord un peptide peu connu, le neuropeptide S, puis des neurotransmetteurs non-peptidergiques, la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine.

2. RESULTATS SCIENTIFIQUES

2.1. Implication du système OT dans la réponse induite par un contexte de peur

Des études montrent qu'il est possible de moduler le comportement de peur, le freezing chez le rongeur, en stimulant les fibres des neurones OT (Knobloch et al., 2012 ; Toth et al., 2012 ; Modi et al., 2016). Afin de marquer puis manipuler spécifiquement les neurones OT du PVN, nous avons utilisé une approche virale permettant l'expression d'une protéine d'intérêt (ChR2, Venus...) sous le contrôle du promoteur de l'OT. Nous avons ensuite analysé *ex vivo* l'effet de la libération d'OT sur la fréquence des courants inhibiteurs post-synaptiques au niveau de l'amygdale centrale médiale chez des animaux naïfs ou ayant été soumis à un conditionnement de peur. Les résultats obtenus montrent que la stimulation optique a les mêmes effets globaux quel que soit le groupe expérimental, suggérant que le conditionnement de peur ne modifie pas la réponse induite par l'optostimulation des fibres OT. Cependant, nous avons pu mettre en évidence qu'un switch fonctionnel entre l'OT et le glutamate a lieu après un conditionnement de peur : la réponse chez des animaux naïfs est principalement médiée par une libération d'OT tandis que chez des animaux ayant été soumis au conditionnement de peur, elle est principalement médiée par une libération de glutamate. L'observation neuroanatomique de la sur-expression de vGluT2 sur les axones OT après un conditionnement de peur est venue renforcer ces résultats.

Jusqu'à-là, la construction virale utilisée permettait de marquer sans distinction les neurones OT du PVN. Afin de comprendre quels neurones OT sont impliqués dans la modulation du comportement de peur, nous avons utilisé un outil viral complexe vGATE (virus-delivered Genetic Activity-induced Tagging of Ensembles) permettant de marquer et de manipuler de

façon spécifique les neurones OT activés pendant le conditionnement de peur. Nous avons alors observé que seuls environ 10 % des neurones OT sont activés lors d'un comportement de peur. Des expériences complémentaires électrophysiologiques, neuroanatomiques et comportementales ont pu montrer que cette sous-population de neurones OT du PVN est à la fois nécessaire et suffisante pour supporter une modification de ce comportement.

Afin de déterminer si ces 10 % environ constituent un ensemble fixe, responsable de la modulation de la peur de manière générale, nous avons exposé les animaux à une seconde exposition à un même contexte, ou à un nouveau contexte. Nous avons montré que les neurones parvOT recrutés au moment d'un comportement de peur sont systématiquement réactivés. Ces neurones contactent alors des neurones magnOT et en mobilisent d'autant plus que l'expérience d'une peur est répétée, qu'elle soit identique ou différente de la première expérience. En conclusion, il existerait un ensemble stable et défini de neurones parvOT sensibles à l'expérience de peur, à l'origine du recrutement d'une population plus grande mais moins spécifique de neurones magnOT.

En conclusion, nous avons déterminé que seule une portion des neurones OT était activée par un contexte de peur. De plus, le switch OT vers glutamate observé au niveau des neurones de l'amygdale représente une potentielle adaptation nécessaire face un contexte de peur. Il est également important de noter que tous les neurones OT ne sont pas réactivés de la même façon : ceci dépend à la fois de leur localisation (PVN ou SON) et du contexte (nouveau ou répété). Ces résultats font l'objet d'une publication présentée ici (Article 1).

2.2. Recrutement des neurones OT

2.2.1. via un neuromodulateur peptidergique

En collaboration avec l'équipe du Pr. Inga Neumann (université de Regensburg, Allemagne), nous nous sommes intéressés au neuropeptide S (NPS). Le NPS est un peptide de 20 acides aminés synthétisé principalement dans l'amygdale ou le *locus caeruleus*. Il partage de nombreuses fonctions avec l'OT, en particulier son implication dans la modulation de l'anxiété. Aussi, nous avons cherché à définir l'interaction entre NPS et OT et avons commencé par confirmer l'expression des récepteurs du NPS par les neurones OT du PVN. Puis par imagerie calcique confocale *ex vivo*, nous avons montré qu'environ 20 % des neurones OT sont activés par le NPS, de manière dépendante de son récepteur. Enfin, nous avons montré que l'effet anxiolytique du NPS est intégralement bloqué par l'ajout d'un antagoniste des récepteurs OT.

L'ensemble des résultats permet de mettre en évidence que l'effet anxiolytique du NPS nécessite le recrutement du système OT. Ces résultats ont été à l'origine d'une publication présentée ici (Article 2).

2.2.1. via des neurotransmetteurs non-peptidergiques

Différentes études montrent que plusieurs neurotransmetteurs sont capables de moduler l'activité des neurones OT. Nous avons alors émis l'hypothèse de l'existence de plusieurs ensembles de neurones OT recrutés de manière spécifique par différents neurotransmetteurs. Nos résultats, obtenus par imagerie calcique des neurones OT du PVN, montrent l'existence de sous-ensembles distincts de neurones OT en fonction de leurs différentes réponses à l'un ou l'autre de ces neurotransmetteurs (NA, DA, 5-HT). Nous cherchons à présent à déterminer les circuits neuronaux sous-jacents à ces ensembles distincts. Par souci d'efficacité, nous nous sommes en premier lieu intéressés à la *zona incerta* (ZI) qui serait la source majeure de DA sur les neurones OT du PVN. Après avoir validé les outils viraux nécessaires à la suite de l'étude, nous procédons actuellement à une caractérisation neuroanatomique plus fine des projections ZI vers le PVN et à l'analyse des réponses calciques et électrophysiologiques des neurones OT du PVN en réponse à une stimulation des fibres afférentes de la ZI. Les résultats de ce projet nous permettront de statuer sur l'existence d'ensemble de neurones OT distincts de par leurs afférences et leurs fonctions. Bien que les résultats ne soient que préliminaires, ils seront présentés ici sous la forme d'une publication (Article 3).

3. LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Article scientifique en qualité de premier auteur

Titre : Fear memory engram and its plasticity in the hypothalamic oxytocin system.

Auteurs : Hasan M.*, **Goyon S.***, Althammer F.*, Silva da Gouveia M.*, Eliava M., Jain A., Raftogianni A., Wahis J., Knobloch-Bollmann S., Chavant V., Goumon Y., Weislogel JM., Hurlemann R., Darbon P., Poisbeau P., Larkum M., Sprengel R., Bading H., Charlet A., Grinevich V. (**représente les premiers auteurs*)

Journal : Neuron, en révision.

Articles scientifiques co-signés

Titre : Neuropeptide S activates paraventricular oxytocin neurons to induce anxiolysis.

Auteurs : Grund T., **Goyon S.**, Li Y., Eliava M., Liu H., Charlet A., Grinevich V., Neumann I.
Journal : Journal of neuroscience (2017).

Titre : Favoring inhibitory synaptic drive mediated by GABAA receptors in the basolateral nucleus of the amygdala efficiently reduces pain symptoms in neuropathic mice.

Auteurs : Zeitler A., Kamoun N., **Goyon S.**, Wahis J., Charlet A., Poisbeau P., Darbon P.

Journal : European Journal of Neuroscience (2016).

Titre : Oxytocin acts on astrocytes in the central amygdala to promote comfort.

Auteurs : Wahis J., Kerspern D., Althammer M., **Goyon S.**, Hagiwara D., Boury-Jamot B., Bellanger B., Abatis M., da Silva Gouveia M., Benusiglio D., Eliava M., Rozov A., Weinsanto I., Knobloch-Bollmann HS., Wang H., Pertin M., Inquimbert P., Siemens J., Goumon Y., Boutrel B., Lamy CM., Décosterd I., Chatton JY., Stoop R., Poisbeau P., Grinevich V., Charlet A.

Journal : Cell, en révision.

4. COMMUNICATIONS ORALES

- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2017).** Présentation faite lors d'un séminaire européen en neuropsychopharmacologie à Nice, France.
- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2017).** Présentation faite lors 42^{ème} colloque de la société de neuroendocrinologie à Dijon, France.

5. COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2017).** S. Goyon, F.Althammer, M. da Silva Gouveia, E. Marina, P. Poisbeau, V. Grinevich, A. Charlet. Présenté au « séminaire européen en neuropsychopharmacologie » à Nice, France.
- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2017).** S. Goyon, F.Althammer, M. da Silva Gouveia, E. Marina, P. Poisbeau, V. Grinevich, A. Charlet. Présenté au congrès « Bordeaux NeuroFrance » à Bordeaux, France.
- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2017).** S. Goyon, F.Althammer, M. da Silva Gouveia, E. Marina, P. Poisbeau, V. Grinevich, A. Charlet. Présenté au 42^{ème} colloque de la société de neuroendocrinologie à Dijon, France.
- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2017).** S. Goyon, F.Althammer, M. da Silva Gouveia, E. Marina, P. Poisbeau, V. Grinevich, A. Charlet. Présenté au congrès annuel de la « Society for Neurosciences » à Washington, Etats-Unis.
- **The unexpected level of plasticity of the oxytocinergic system (2018).** S. Goyon, F.Althammer, M. da Silva Gouveia, E. Marina, P. Poisbeau, V. Grinevich, A. Charlet. Présenté au 11^{ème} forum de la FENS à Berlin, Allemagne.

D. LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Structures de l'OT et de ses analogues dans différentes espèces animales.	17
FIGURE 2 : Comparaison de la structure primaire et secondaire de l'OT et de l'AVP.	18
FIGURE 3 : Distribution anatomique des neurones magnOT chez les vertébrés basaux et avancés.	20
FIGURE 4 : Evolution phylogénétique des voies de transmission ocytocinergique.	21
FIGURE 5 : Evolution des systèmes OT et AVP chez les vertébrés.	22
FIGURE 6 : Représentation schématique des gènes de l'OT et de l'AVP chez l'Homme.	23
FIGURE 7 : Propriétés cellulaires et moléculaires d'un neurone peptidergique.	25
FIGURE 8 : Eléments régulateurs à proximité de la région 5' du gène de l'OT.	26
FIGURE 9 : Structure du gène de l'OTR chez l'Homme.	28
FIGURE 10 : OTR et sites de liaison.	31
FIGURE 11 : Représentation 2D de l'OT et d'un ligand bivalent.	33
FIGURE 12 : Transduction du signal lors de la fixation de l'OT sur son récepteur.	36
FIGURE 13 : Représentation schématique du système ocytocinergique.	37
FIGURE 14 : Illustration des sous-populations OT et AVP du PVN et du SON.	39
FIGURE 15 : Reconstruction 3D du PVN et de ses 8 sous-régions.	40
FIGURE 16 : Voies de libération de l'OT dans le cerveau des vertébrés.	44
FIGURE 17 : Modification du couplage OT/OTR selon la concentration en OT.	46
FIGURE 18 : Projections de neurones OT dans le système nerveux central.	49
FIGURE 19 : Autoradiographie des OTR sur une coupe transversale de rats.	50
FIGURE 20 : Profil d'expression des OTR chez la souris femelle (nullipares ou non) et chez le mâle.	52
FIGURE 21 : Illustration de deux modes de libération synaptique : co-libération et co-transmission.	54
FIGURE 22 : Augmentation du nombre de publications recensées sur Pubmed ayant pour mot clé « ocytocine ».	55

FIGURE 23 : Mécanismes de l'effet analgésique périphérique de l'OT.	67
FIGURE 24 : Circuit de la peur.	70
FIGURE 25 : Cartographie des différents noyaux constituant l'amygdale chez le rat.	72
FIGURE 26 : Les microcircuits de l'amygdale centrale.	73
FIGURE 27 : Représentation du protocole de conditionnement de peur.	76
FIGURE 28 : Connexions anatomiques et fonctionnelles entre les neurones OT du PVN et du SON.	78

E. LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Constantes d'affinité (K_i , en nM) de l'AVP et de l'OT pour leurs récepteurs, chez l'Homme.	32
TABLEAU 2 : Distribution et intensité des fibres OT marquées avec Venus au niveau de diverses régions extra-hypothalamiques.	47
TABLEAU 3 : Expression de l'ARNm de l'OTR et les niveaux de liaison avec son ligand dans les structures supra-spinales.....	51
TABLEAU 4 : Effets comportementaux de l'OT.	56

F. LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Aperçu des voies de signalisation OT/OTR.	230
ANNEXE 2 : Publication en lien non direct avec ma thèse.....	231
ANNEXE 3 : Publication en lien non direct avec ma thèse.....	239

G. LISTE DES ABREVIATIONS

- 5-HT : Sérotonine
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- AN : Noyaux accessoires
- ANP : Peptide natriurétique atrial
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- AVP : Arginine-vasopressine
- AVPR : Récepteur de la vasopressine
- BNST : Noyau du lit de la strie terminale
- BRET : Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
- CCK : Cholecystokinine
- CeA : Amygdale centrale
- CeL : Partie latérale de l'amygdale centrale
- CeM : Partie médiale de l'amygdale centrale
- CNO : Clozapine-N-oxyde
- CRH : Corticolibérine
- CVD : Complexe vagal dorsal
- DA : Dopamine
- DMV : Noyau dorsal du nerf vague
- DRG : Ganglion de la racine dorsale
- EPM : Labyrinthe en croix surélevé
- FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
- GABA : Acide γ -aminobutyrique
- GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
- hM4D : Récepteur muscarinique humain modifié
- icv : Intra-cérébro-ventriculaire
- ip : Intra-péritonéale
- IPSC : Courants post-synaptiques inhibiteurs
- IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
- iv : Intra-veineuse
- Kd : Constante de dissociation
- Ki : Constante d'inhibition

- KO : Knock-out
- LCR : Liquide céphalo-rachidien
- MagnOT : Magnocellulaire
- NA : Noradrénaline
- NPS : Neuropeptide S
- NPSR : Récepteur du NPS
- NTS : Noyau du tractus solitaire
- OT : Ocytocine
- OTR : Récepteur de l'ocytocine
- P-LAP : Leucine aminopeptidase placentaire
- PAG : Substance grise périaqueducale
- ParvOT : Parvocellulaire
- PKA : Protéine kinase A
- PKC : Protéine kinase C
- PVN : Noyaux paraventriculaires
- rAAV : Virus recombinant adéno-associé
- RCPG : Récepteur couplé à des protéines G
- SNC : Système nerveux central
- SON : Noyaux supraoptiques
- TGOT : [Thr4, Gly7] OT
- VGluT2 : Transporteur du glutamate
- VMH : Hypothalamus ventro-médial
- WT : Wild type
- ZI : *Zona incerta*

INTRODUCTION

H. INTRODUCTION

1. GENERALITES SUR L'OCYTOCINE

1.1. Histoire de la découverte de l'ocytocine

En 1906, Sir Henry Dale, physiologiste et pharmacologiste révèle au grand jour que des extraits de lobes nerveux d'hypophyse induisent des contractions utérines chez des mammifères notamment des chattes enceintes (Dale, 1906). Ce ne sera qu'une vingtaine d'années plus tard que ce composé urotonique ne sera isolé (Kamm et al., 1928). Il sera alors nommé ocytocine, du grec $\omega\chi\nu\xi$ = rapide, $\tau\omicron\chi\omicron\xi$ = naissance.

En 1953, la nature biochimique de l'ocytocine (OT) sera décrite par un biochimiste américain Vincent du Vigneaud (Du Vigneaud et al., 1953). Il réussira à déterminer entièrement la séquence polypeptidergique de l'OT et à la synthétiser sous forme active (Du Vigneaud, 1956 ; Du Vigneaud et al., 1954). A la même période, une équipe française fera de même avec la vasopressine (AVP), peptide de structure moléculaire très proche de celle de l'OT (Asher et al., 1954). Pour l'ensemble de son travail et plus particulièrement pour ses recherches sur les composés soufrés nécessaires pour la première synthèse d'une hormone polypeptidique, l'OT, Du Vigneaud recevra en 1955 le prix Nobel de chimie.

L'OT est un peptide composé de 9 acides aminés : Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH₂. Les deux composés cystéines sont reliés par un pont disulfure. De par sa structure et son gène d'origine, l'OT est très similaire à l'AVP. En effet, les résidus isoleucine en position 3 et leucine en position 8 de l'OT soit deux résidus au caractère neutre, sont remplacés dans l'AVP par un résidu phénylalanine et un résidu arginine (résidu basique), respectivement en position 3 et 8 (Gimpl et Farenholz, 2001). Ceci entraîne une différence de polarité entre ces deux résidus ce qui serait responsable de l'interaction de ces deux peptides avec leurs récepteurs spécifiques (Barberis et al., 1998).

Au cours de l'évolution, ces homologies entre l'OT et l'AVP ainsi qu'entre leurs récepteurs ont été montrées et ce chez de nombreuses espèces : invertébrés, poissons, amphibiens, reptiles ou oiseaux (Grinevich et al., 2015) (FIGURE 1). L'hypothèse avancée est que les gènes de l'OT et de l'AVP proviennent d'un ancêtre commun, la vasotocine, qui au cours de l'évolution se

serait spécialisée dans la synthèse d'analogue de l'OT ou l'AVP. Il en serait de même pour leurs récepteurs. Il est important de noter que chez l'ensemble des espèces possédant ces deux neuropeptides, leurs fonctions seraient conservées au cours de l'évolution notamment leurs implications dans le comportement sexuel (Garrion et al., 2012).

Peptide	Sequence	Vertebrates among which peptide is found
Oxytocin-Like Peptides		
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Oxytocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly (NH ₂)	Placentals Some marsupials
Mesotocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly (NH ₂)	Lungfishes Nonmammalian tetrapods Marsupials
Seritocin	Cys-Tyr-Ile-Gln- Ser -Cys-Pro-Ile-Gly (NH ₂)	Lungfishes <i>Bufo regularis</i>
Isotocin	Cys-Tyr-Ile- Ser -Asn-Cys-Pro-Ile-Gly (NH ₂)	Bony fishes
Glumitocin	Cys-Tyr-Ile- Ser -Asn-Cys-Pro- Gln -Gly (NH ₂)	Rays
Valitocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro- Val -Gly (NH ₂)	Spiny dogfish
Aspargtocin	Cys-Tyr-Ile- Asn -Asn-Cys-Pro-Leu-Gly (NH ₂)	Spiny dogfish
Asvatocin	Cys-Tyr-Ile- Asn -Asn-Cys-Pro- Val -Gly (NH ₂)	Spotted dogfish
Phasvatocin	Cys- Phe -Ile- Asn -Asn-Cys-Pro- Val -Gly (NH ₂)	Spotted dogfish
Vasopressin-Like Peptides		
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Vasopressin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly (NH ₂)	Mammals
Lysipressin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro- Lys -Gly (NH ₂)	Pig Macropodids Didelphids Peramelids
Phenypressin	Cys- Phe -Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly (NH ₂)	Macropodids
Vasotocin	Cys-Tyr- Ile -Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly (NH ₂)	Nonmammalian vertebrates

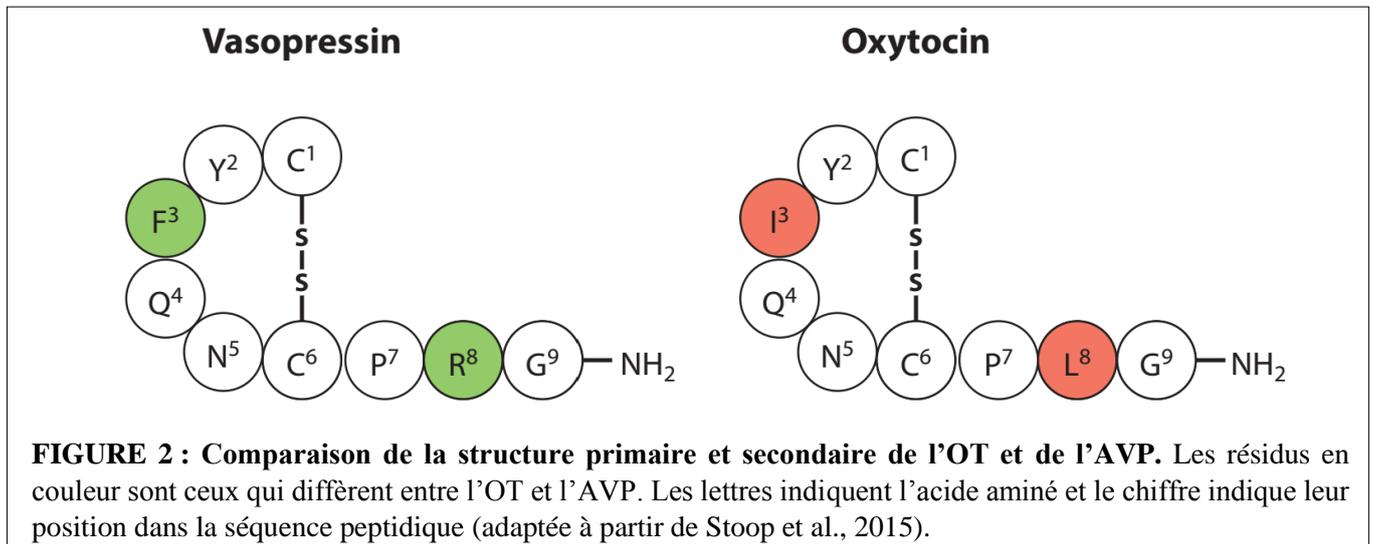
FIGURE 1 : Structures de l'OT et de ses analogues dans différentes espèces animales (adaptée à partir de McEwen, 2004).

1.2. Phylogénie

1.2.1. Evolution de l'OT et de son analogue (vasopressine)

Chez les mammifères, les gènes codant pour l'OT et pour l'AVP sont situés sur le même chromosome et sont séparés par une région intergénique d'environ 12 kb. L'OT et l'AVP partagent une séquence en acides aminés très similaire. En effet, ils ne se différencient que par

deux acides aminés (FIGURE 2). En position 3, l'isoleucine de l'OT est remplacée par une phénylalanine dans l'AVP modifiant ainsi la polarité des acides aminés et conférant ainsi la spécificité de l'interaction avec leurs récepteurs respectifs. En ce qui concerne l'acide aminé en position 8 de l'OT, la leucine (composé neutre), il est remplacé par une arginine (composé basique) (Barberis et al., 1998 ; Gimpl et Fahrenholz, 2001).



1.2.1.1. Ocytocine et vasopressine : un ancêtre commun

L'OT et l'AVP sont deux neuropeptides étroitement liés, retrouvés chez de nombreuses espèces mais sous différentes variantes (Feldman et al., 2016). Ils datent de plus de 700 millions d'années et ils ont été conservés au cours de l'évolution (Donalson et Young, 2008). En effet, la famille OT/AVP provient d'un peptide ancestral apparu avant la séparation des deutérostomiens et des protostomiens. Etant donné la similitude des séquences ainsi que la localisation chromosomique proche de l'OT et de l'AVP, tout semble indiquer qu'ils proviennent de la duplication en tandem d'un gène ancestral codant pour la vasotocine (Yamashita et Kitano, 2013). A quelques exceptions près, les invertébrés ne possèdent qu'un seul homologue de l'OT et de l'AVP (Beets et al., 2013). Les différents membres de l'OT et de l'AVP sont résumés avec leurs séquences d'acides aminés dans la FIGURE 1 (Gimpl et Fahrenholz, 2001). De façon générale, depuis la duplication du gène ancestral, la famille OT/AVP est restée hautement conservée (Banerjee et al., 2017), notamment parmi les mammifères euthériens (Wallis, 2012). Une étude frappante montre que l'introduction du gène de l'isotocine du poisson téléostéen *Fugu* chez le rat et la souris entraîne son expression dans les neurones OT. De plus, la réponse du gène de l'OT à un stimulus osmotique a pu également

être mimée (Gilligan et al., 2003 ; Venkatesh et al., 1997). Ces résultats indiquent que les régions régulatrices des gènes OT et istococine sont pratiquement inchangées dans leur fonction, et ce au moins depuis la divergence tétrapode/poisson.

1.2.1.2. Conservation et adaptation des fonctions de l'ocytocine

Au sein de toutes les espèces et ce malgré l'évolution de l'OT et de ses analogues, il est intéressant de noter que l'OT conserve un rôle fondamental dans la régulation des fonctions vitales allant de l'homéostasie du corps jusqu'à la fonction de reproduction. Par exemple, une des fonctions de base de l'OT est son implication dans la reproduction notamment au niveau de la contraction utérine. Cette fonction est observée chez les mammifères jusque chez les sangsues chez lesquelles, l'analogue de l'OT produit des contractions, comportement stéréotypé lié à la reproduction (Wagenaar et al., 2010) mais aussi chez *C. elegans* (Garrison et al., 2012).

Mais chez les mammifères, l'OT régule aussi d'autres fonctions complexes, comme des comportements sociaux (Donaldson et al., 2008). Il a été émise une hypothèse générale intéressante concernant l'attribution de nouvelles fonctions à l'évolution d'anciens systèmes, tels que l'OT/AVP. Les systèmes ancestraux seraient en fait dupliqués et réutilisés pour soutenir des comportements sociaux plus compliqués (Chang et al., 2013). Prenons le cas de l'OT chez les mammifères : ses fonctions physiologiques sur la reproduction, c'est-à-dire l'initiation de la parturition et de la lactation, sont conservées. Mais l'OT induit aussi un comportement maternel chez les rats (Pedersen et al., 1982) et module le comportement social relativement complexe chez les humains (Heinrichs et al., 2009) ; ces comportements étant nécessaires à une éducation réussie pour la progéniture (Feldman et al., 2016). Cela vient étayer l'hypothèse que le rôle de l'OT et de ses analogues dans la régulation de la reproduction est conservé au cours de l'évolution et qu'il est « réorienté » pour moduler les comportements spécifiques en lien avec la reproduction des espèces (Lee et al., 2009). Une autre étude aborde aussi la conservation de la fonction reproductrice de l'OT/AVP au cours de l'évolution en comparant ces deux systèmes et leurs fonctions entre les invertébrés (nématodes) et les vertébrés (mammifères) (Beets et al., 2013).

1.2.1.3. Conservation et adaptation des zones contenant les neurones oxytocinergiques et morphologie de ces neurones

En parallèle de la conservation des séquences et des fonctions de l'OT/AVP développées précédemment, un certain degré de conservation a aussi été retrouvé au niveau des centres cérébraux et des types cellulaires produisant et sécrétant ces neuropeptides. Chez les mammifères, l'OT et l'AVP sont synthétisés dans les noyaux paraventriculaires, supraoptiques et accessoires (abrégés respectivement par PVN, SON, AN) de l'hypothalamus. Ils contiennent entre autres, des neurones neurosécrétoires dits magnocellulaires (magnOT) qui projettent dans l'hypophyse postérieure afin de sécréter l'OT et l'AVP dans la circulation sanguine (McEwen, 2004). Chez les invertébrés, les analogues de l'OT et de l'AVP sont synthétisés par des neurones dont les corps cellulaires résident dans les ganglions cérébraux et périphériques (Beets et al., 2013). Chez les vertébrés basaux (les anamniés), les neurones magnOT exprimant des analogues de l'OT sont distribués aléatoirement dans la zone préoptique (Herget et al., 2014), adjacente au 3^{ème} ventricule. Chez les vertébrés avancés (les amniotes), la distribution des neurones magnOT est mieux définie, limitée entre le PVN, le SON et l'AN. Une description précise accompagnée d'une discussion autour de l'évolution de la distribution anatomique des neurones magnOT chez les vertébrés basaux et avancés peuvent être trouvées dans la revue de Knobloch et Grinevich (2014) à partir de laquelle la FIGURE 3 est extraite.

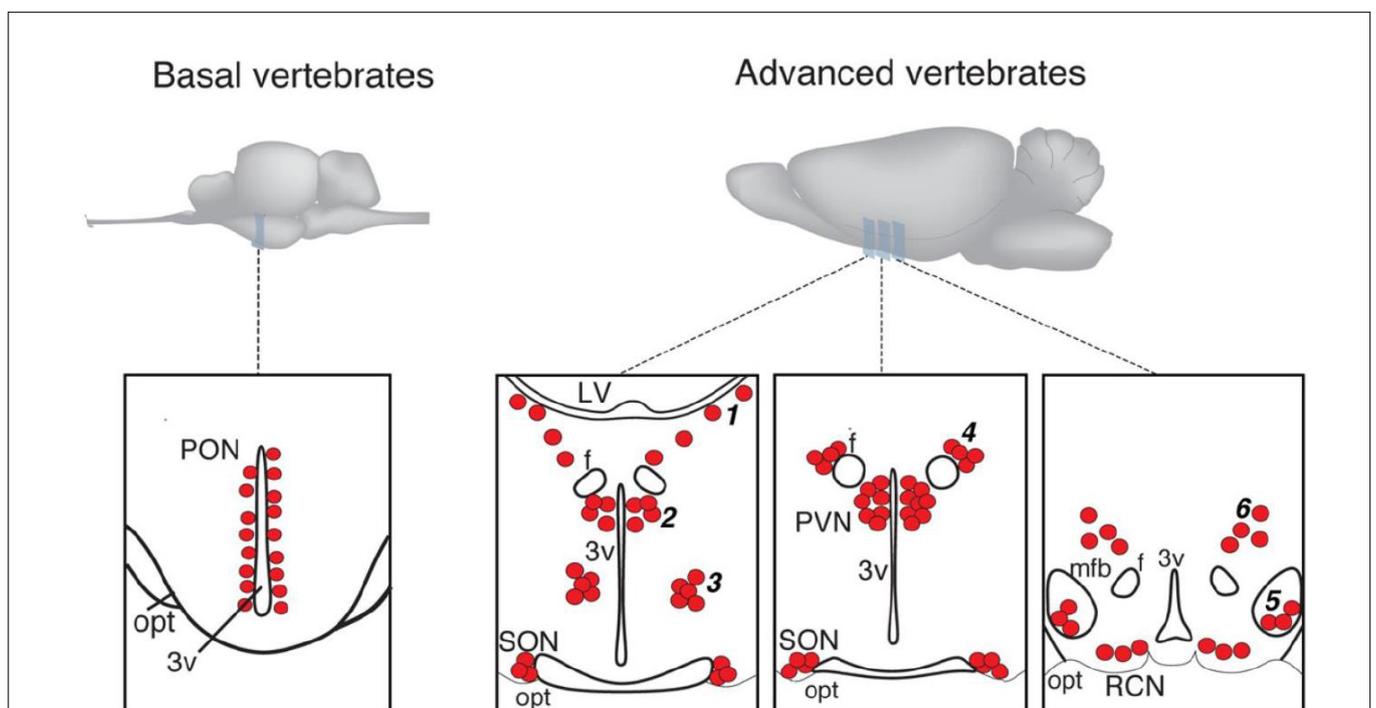


FIGURE 3 : Distribution anatomique des neurones magnOT chez les vertébrés basaux et avancés. Abréviations : 3v, third ventricle ; F, columns of fornix ; LV, lateral ventricle ; MFB, medial forebrain bundle ; OC, optic chiasm ; OT, optic tract ; PON, preoptic nucleus ; PVN, paraventricular nucleus ; SON, supraoptic nucleus. Accessory nuclei (1-6) : 1-extrahypothalamic ; 2-anterior commissural ; 3- circular ; 4-fornical ; 5-nucleus of the medial forebrain bundle ; 6-dorsolateral (adaptée à partir de Knobloch et Grinevich, 2014).

Un autre point intéressant concerne l'évolution de la morphologie des cellules OT et de ses analogues. Chez *C. elegans*, les neurones exprimant la nématocine ont des processus ciliés favorisant la libération des granules contenant de la nématocine dans le liquide pseudocœlomique (Beets et al., 2013). Chez les vertébrés basaux, les cils sont également présents au niveau des dendrites des neurones magnOT et ils font saillie dans le 3^{ème} ventricule permettant la libération de neuropeptides dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Cette caractéristique se retrouve dans le cerveau des mammifères même si elle est plus diffuse chez ces derniers (Knobloch et Grinevich, 2014). Conservée tout au long de l'arbre phylogénétique des vertébrés, les neurones magnOT ont gardé la capacité de sécréter des molécules de façon endocrine et ce grâce à des contacts axones-circulation sanguine dans l'hypophyse postérieure. Cette caractéristique commune aux vertébrés est retrouvée jusque chez les poissons à nageoires rayonnées (plus communément appelés poissons) (Egorova et al., 2003). Au cours de l'évolution, il semblerait qu'une « neuronalisation » des cellules OT se soit produite, ce qui signifie qu'il y a eu une évolution d'un neurone primitif uni- ou bi-polaire de type glandulaire vers un neurone multipolaire avec un arbre dendritique beaucoup plus riche. Cette évolution a permis aux neurones magnOT de libérer des neuropeptides au niveau des dendrites par exocytose (Pow et Morris, 1989), permettant une communication paracrine à l'intérieur des noyaux hypothalamiques, et selon toute vraisemblance permettant aussi une diffusion de l'OT dans le 3^{ème} ventricule, comme chez les vertébrés basaux. Chez les vertébrés avancés, les neurones OT projettent leurs axones à longue distance (Grinevich et al., 2016). Ces projections pourraient être nécessaires pour une régulation précise des fonctions plus complexes régulées par l'OT/AVP, telles que la régulation du comportement maternel et la reconnaissance sociale (Marlin et al., 2015 ; Oettl et al., 2016). Un résumé schématique des changements de position et de la morphologie des neurones magnOT tout au long de l'évolution des vertébrés est illustré sur la FIGURE 4.

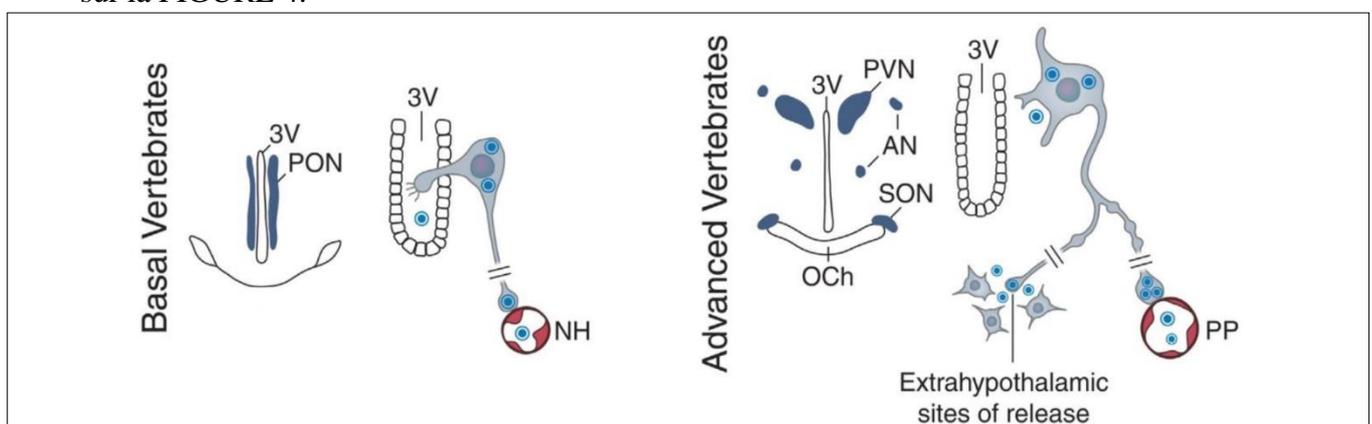
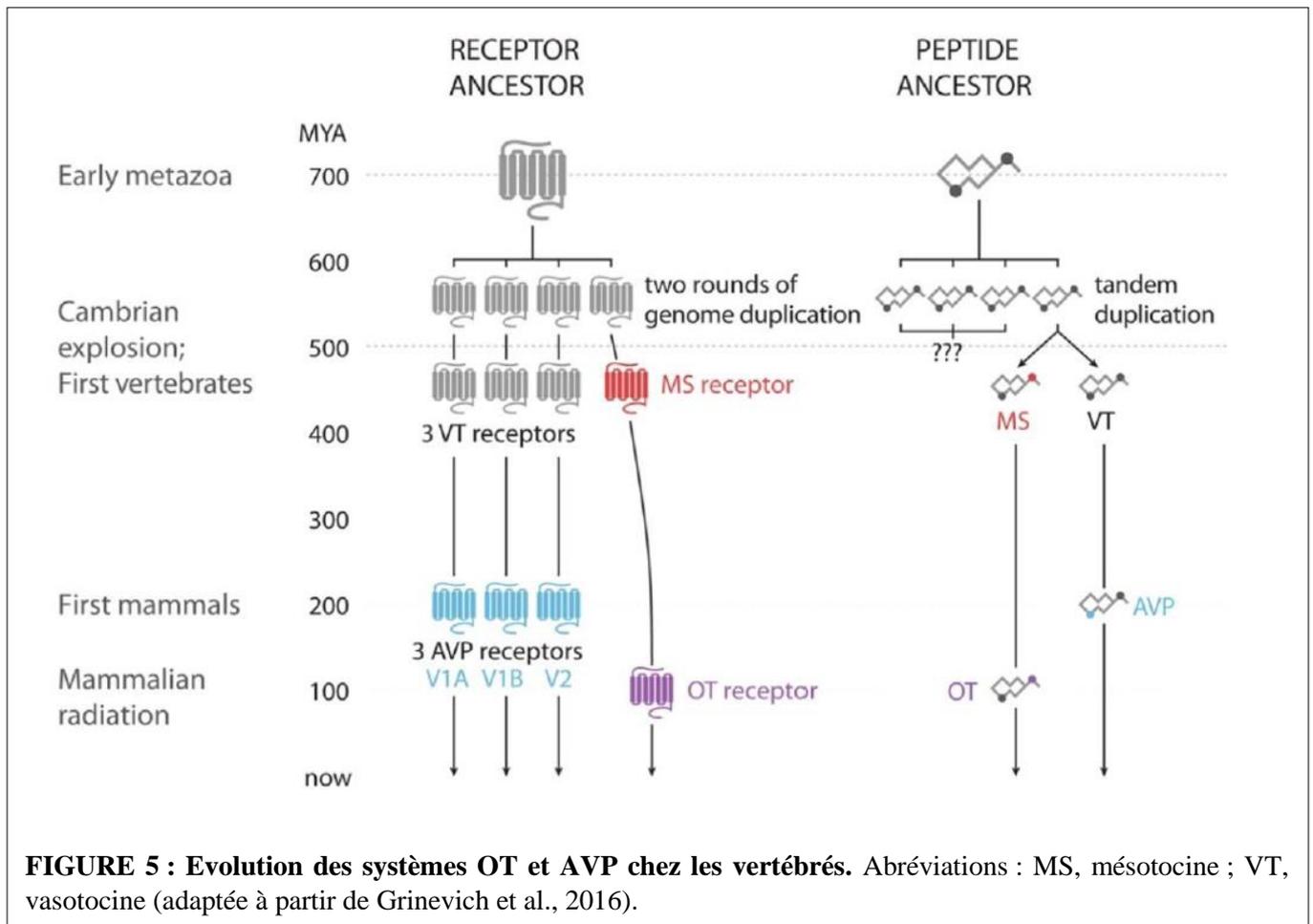


FIGURE 4 : Evolution phylogénétique des voies de transmission ocytocinergique. Complexification du noyau préoptique contenant les neurones magnOT chez les vertébrés de base en PVN, SON et AN chez les vertébrés avancés. De plus, l'évolution de la morphologie des neurones magnOT est représentée ainsi que leur distribution autour du 3^{ème} ventricule. Au cours de l'évolution, les neurones magnOT ont développés des collatérales qui projettent vers des régions extrahypothalamiques. Abréviations en anglais : OCh, optic chiasm ; NH, neurohypophysis ; PP, posterior pituitary lobe (adaptée à partir de Grinevich et al., 2016).

1.2.2. Evolution du récepteur de l'ocytocine

Tout comme pour les neuropeptides OT et AVP, leurs récepteurs semblent descendre directement d'un récepteur ancestral commun, le récepteur de la vasotocine. Au moment de la duplication du gène ancestral de la vasotocine, la séquence de son récepteur a également subi des duplications donnant naissance à quatre récepteurs de la vasotocine. Les gènes de ces quatre récepteurs ont alors évolué afin d'être retrouvés chez les mammifères sous la forme de trois récepteurs AVP (AVPR) V1a, V1b, V2 et un récepteur OT (OTR), comme le montre la FIGURE 5 (Grinevich et al., 2016 ; Yamashita et Kitano, 2013).



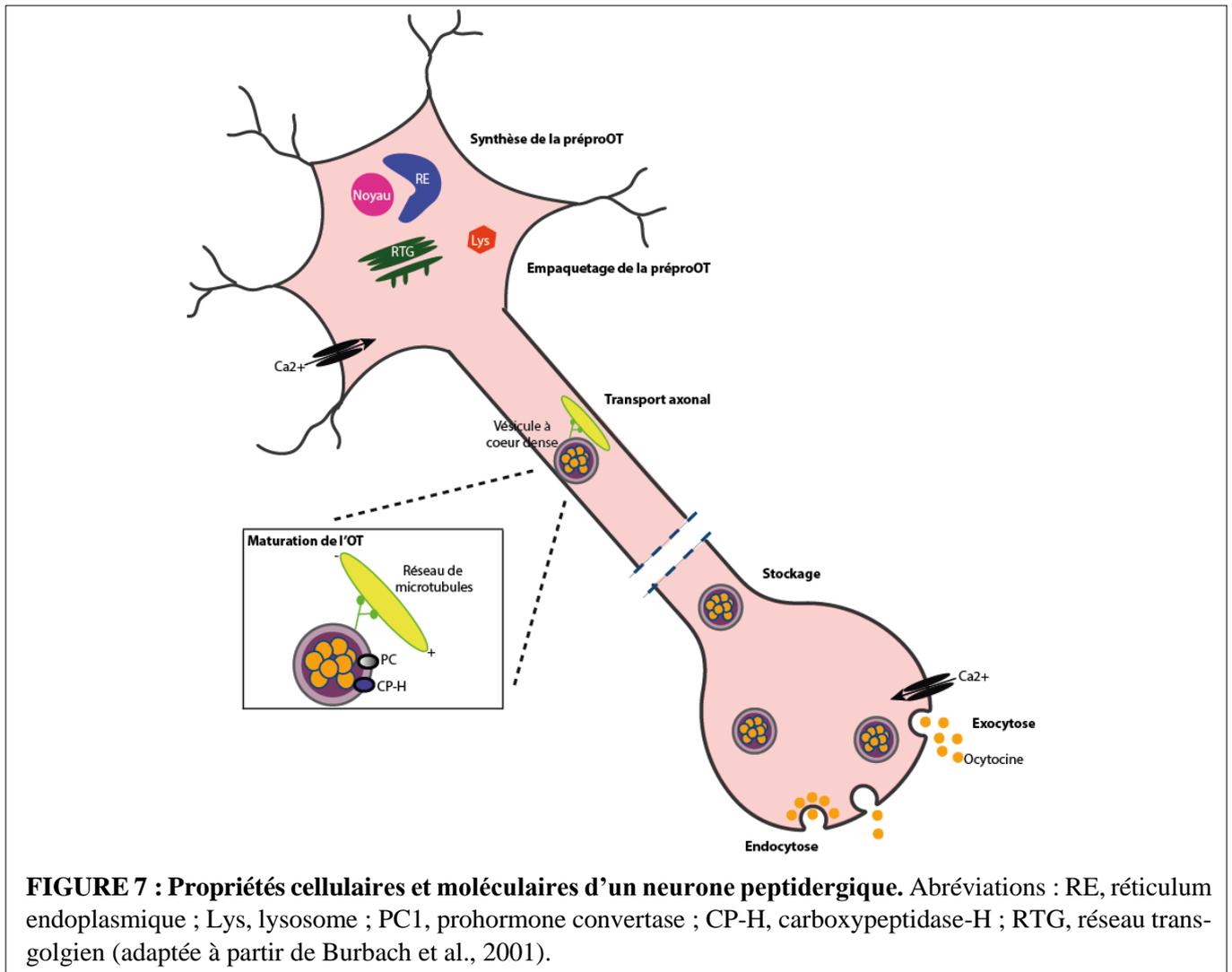
Il semblerait que chez les mammifères placentaires, le gène de l'OTR ait été soumis à une contrainte évolutive, ce qui ne serait pas le cas pour l'AVPR (Paré et al., 2016). Chez les singes du nouveau monde, il semblerait que de nouvelles formes des gènes de l'OT et de l'OTR aient été détectées et qu'ils aient évolué de façon conjointe. Ceci semble corrélé avec les changements comportementaux observés lors des soins parentaux masculins (Vargas-Pinilla et al., 2015).

En amont de la séquence codante de l'OT, se situe la séquence dite promotrice. Elle permet de contrôler la transcription du gène. Il semblerait que la séquence promotrice de l'OT puisse être stimulée par les oestrogènes, les hormones thyroïdiennes ou encore l'acide rétinoïque (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Lors de ce travail de thèse, divers construits viraux ont été utilisés mais tous étaient sous la direction du promoteur de l'OT afin de permettre l'expression du construit viral spécifiquement dans les neurones OT.

La biosynthèse de l'OT et de son analogue (AVP) n'est pas différente de celle des autres neuropeptides. L'OT est synthétisée dans les corps cellulaires en tant que pré-propeptide contenant une protéine chaperonne, la neurophysine 1, ainsi qu'un peptide signal. Ce pré-propeptide sera ensuite clivé lors de son transport axonal en un pro-peptide puis en peptide lui-même toujours associé à sa protéine chaperonne, la neurophysine 1. L'association OT-neurophysine1 forme un dimère qui sera ensuite traité et transporté comme toutes les protéines dans la cellule. La dissociation de ce dimère OT-neurophysine 1 a lieu dans les vésicules contenant des prohormones convertases (de type 5 pour les neurones OT et de type 1/3 pour les neurones AVP) et des carboxypeptidases. L'OT dissociée de sa protéine chaperonne va être libérée dans le plasma ou dans le liquide céphalo-rachidien. A partir de là, l'OT pourra se fixer alors sur ses récepteurs (Blumenstein et al., 1979 ; Breslow and Burman, 1990).

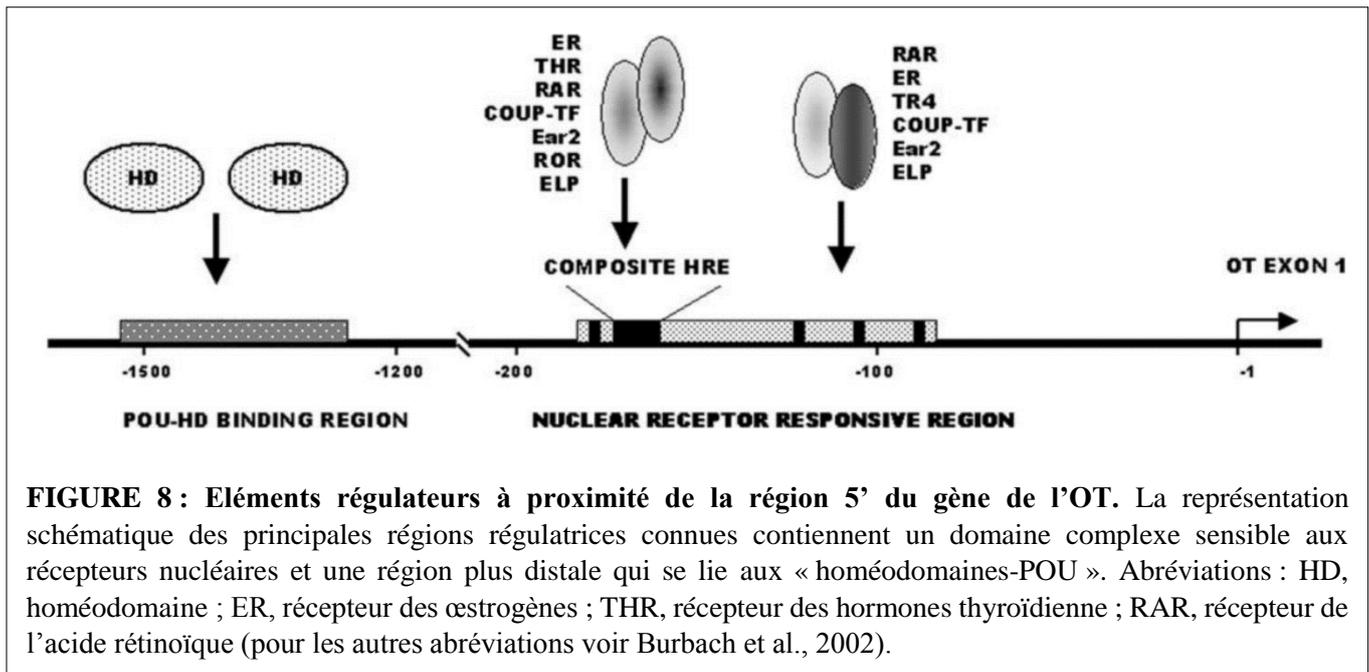
Il est important de souligner le rôle des vésicules à cœur dense dans la maturation de l'OT (et de l'AVP), dans leur transport, dans leur stockage au niveau dendritique ou axonal et enfin dans leur sécrétion. Les vésicules à cœur dense contiennent une grande quantité de protéines et peptides ce qui les rend opaque donc visible en microscopie électronique (Castel et al., 1984). Le pH intravésiculaire acide (de 5 à 6) stabilise le contenu de ces vésicules dont notamment l'association OT-neurophysine 1 (idem pour l'AVP). La libération du dimère OT-neurophysine 1 des vésicules à cœur dense dans la zone extraneuronale entraîne sa dissociation en raison de la faible stabilité de liaison du dimère dans des environnements plus basiques (Blumenstein et al., 1979). Ces vésicules à cœur dense sont formées dans le système trans-golgien puis transportées par le réseau de microtubules de façon antérograde. Les vésicules à cœur dense sont alors stockées dans les terminaisons axonales au niveau de la post-hypophyse. Elles seront sécrétées sous l'effet de potentiels d'action. Néanmoins, certaines vésicules à cœur denses sont retrouvées au niveau des corps cellulaires et des dendrites, où elles pourront être sécrétées de façon calcium-dépendante comme c'est le cas lors de la lactation (Ludwig, 1998). Chaque vésicule à cœur dense peut contenir entre 60 000 et 85 000 molécules

d'OT (van den Pol, 2012). L'ensemble de ce paragraphe a été illustré afin d'en faciliter la compréhension des différentes étapes mentionnées ici (FIGURE 7).



1.3.1.1. Régulation en amont du gène de l'ocytocine

L'expression du gène de l'OT est fortement régulée, notamment au niveau transcriptionnel (FIGURE 8).



Les œstrogènes

Une des premières observations faite sur la régulation de l'expression génique de l'OT montre que cette dernière est stimulée par les œstrogènes (McCarthy, 1995). A la fin de la grossesse, la concentration d'œstrogènes augmente entraînant une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'OT. A environ 160 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription du gène codant pour l'OT se trouve une séquence hautement conservée et étroitement liée aux motifs d'éléments de réponse des récepteurs des œstrogènes (ERE) située au niveau de la région adjacente 5' du gène de l'OT chez le rat et chez l'Homme. Ce motif est appelé « Hormone Response Element » (HRE) en raison de sa forte ressemblance avec les ERE (Stedronsky et al., 2002). La présence d'une telle séquence en complément de l'élément ERE chez le rat indique la possibilité pour de nombreux membres de la famille des récepteurs nucléaires et des récepteurs nucléaires orphelins de réguler l'expression du gène de l'OT. Dans le cas du gène humain de l'OT, l'œstradiol induit l'expression de l'OT dans des cultures de cellules (Richard et Zingg, 1990) tandis qu'une administration unique d'œstrogène chez les femmes entraîne une augmentation de la concentration plasmatique d'OT (Chiodera et al., 1991). Dans les neurones OT, il a été montré qu'il n'y a pas d'expression des récepteurs aux œstrogènes de type α (Axelson et Leeuwen, 1990 ; Shughrue et al., 1997) à l'inverse des récepteurs de type β (Alves et al., 1998 ; Hrabovszky et al., 2004). Des études suggèrent que l'œstradiol agit sur les récepteurs β des œstrogènes ce qui serait responsable de la régulation

positive ou négative du gène de l'OT au niveau de l'hypothalamus (Nomura et al., 2002 ; Patisaul et al., 2003 ; Shughrue et al., 2002).

Les hormones thyroïdiennes et dérivés de la vitamine A

Les hormones thyroïdiennes sont capable de réguler légèrement l'expression du gène de l'OT au niveau de l'hypothalamus du rat (Adan et al., 1992). Les dérivés de la vitamine A notamment l'acide rétinoïque semblent réguler positivement ou négativement l'expression du gène de l'OT dans des cellules non cérébrales (Larcher et al., 1995 ; Lipkin et al., 1992).

Les récepteurs nucléaires orphelins

Il a été montré que les récepteurs nucléaires orphelins régulent l'expression du gène de l'OT. Plusieurs études ont mis en évidence le double rôle de ces récepteurs nucléaires orphelins : un contrôle traductionnel direct et un indirect via la modulation de l'activité hormonale du gène de l'OT (Burbach, 2002 ; Koohi et al., 2005 ; Stedronsky et al., 2002).

Facteurs de transcription à homéodomaine

A environ 1300 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription du gène codant pour l'OT se trouve un « homéodomaine POU ». Cet élément cis-régulateur met en évidence des régulations complexes de la transcription du gène de l'OT (Burbach, 2002). Cette région semble être impliquée dans la régulation cellule-spécifique de l'expression du gène de l'OT.

1.3.1.2. Régulation en aval du gène de l'ocytocine

Afin de mettre en évidence l'importance des séquences en aval du gène de l'OT, le recours à des souris transgéniques ainsi qu'à des cultures organotypiques d'hypothalamus ont été nécessaires. Tout d'abord, l'utilisation de ces souris transgéniques a permis d'étudier l'influence de la délétion des éléments cis-régulateurs du gène de l'OT et a révélé l'importance des séquences en aval du gène dans une sous-population de neurones OT hypothalamiques (Murphy et Wells, 2003 ; Young et Gainer, 2003). En parallèle, des études utilisant la transfection virale des neurones magnOT de cultures organotypiques d'hypothalamus ont montré que les séquences amplificatrices en aval de l'OT et de l'AVP étaient assez similaires au niveau de leur séquence (Fields et al., 2003). La communication entre ces deux séquences amplificatrices n'affecte en aucun cas les niveaux d'expression de l'OT et de l'AVP (Gainer,

2012) suggérant la possibilité que l'ensemble des éléments régulateurs de l'expression du gène de l'OT serait en fait tous localisés dans la région 5' en amont de ce gène. Le recours à l'utilisation de vecteurs viraux afin d'identifier les principaux éléments régulateurs semble être un nouvel outil très puissant. Actuellement, les études se poursuivent pour étudier et comprendre les séquences précises nécessaires à la bonne expression de l'OT et de l'AVP dans divers tissus (Gainer, 2012). Notons d'ores et déjà, que de tels vecteurs viraux permettant l'expression spécifique d'une protéine d'intérêt dans les neurones OT ont également été utilisés au cours de mes travaux de thèse.

1.3.2. Récepteur de l'ocytocine : du gène à la protéine

Le récepteur de l'OT (OTR) appartient à la classe A de la famille des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG). Il est donc composé de 7 domaines transmembranaires. Le gène codant pour l'OTR a été localisé sur le chromosome 6 chez la souris (Kubota et al., 1996), sur le chromosome 4 chez le rat (Rozen et al., 1995) et sur le chromosome 3 chez l'Homme au niveau du locus 3p25-3p26 (Simons et al., 1995 ; Michelini et al., 1995 ; Kimura et al., 1992). Le gène de l'OTR mesure 17 kb de long et contient 3 introns et 4 exons (FIGURE 9). Les exons 1 et 2 codent pour la partie non codante en 5' tandis que les exons 3 et 4 eux codent pour les 389 acides aminés de l'OTR. En 1992, l'ADN codant pour l'OTR a été cloné pour la première fois (Kimura et al., 1992).

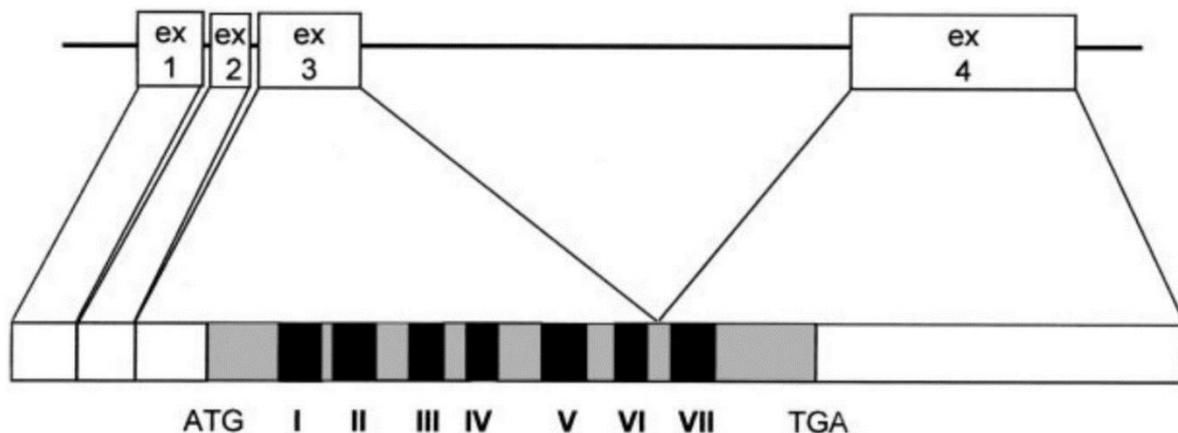


FIGURE 9 : Structure du gène de l'OTR chez l'Homme. La séquence initiateur (ATG) et la séquence stop (TGA) sont représentées tout comme les régions codantes pour les sept régions transmembranaires (en noir) (adaptée à partir de Gimpl et Fahrenholz, 2001).

1.3.2.1. Régulation du gène codant pour le récepteur de l'ocytocine

Plusieurs régions régulatrices ont été trouvées dans la région 5' adjacente au gène codant pour l'OTR. Dans le gène de l'OTR chez le rat, différents éléments sont retrouvés dont notamment un ERE dit classique, un élément de réponse semi-stéroïdien et un élément sensible à l'AMPc (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Ceci indique donc le rôle essentiel des œstrogènes, de les protéines kinases A et C (PKA et PKC respectivement) dans la régulation de l'expression du gène codant pour l'OTR (Bale et Dorsa, 1997). En effet, l'utilisation de cellules en culture de lapin ou humaines traitées avec de la forskoline, activateur de l'adénylate cyclase, ont permis de montrer une régulation positive de l'expression de l'OTR soulignant la possibilité que les voies liées à la PKA et PKC pouvaient induire l'expression du gène de l'OTR (Bale et Dorsa, 1998 ; Jeng et al., 1998).

La régulation du gène de l'OTR par les stéroïdes sexuels semble un peu particulière. En effet, les œstrogènes sont capables d'augmenter la quantité d'ARNm codant pour des OTR, de stabiliser cet ARNm et également d'augmenter la quantité des sites de liaison des OTR tandis que la progestérone elle a un unique effet sur la disponibilité du site de liaison de l'OTR indiquant qu'elle agit sur les OTR eux-mêmes (Grazzini et al., 1998 ; Zingg et al., 1998). Cependant, les effets de la progestérone sur la régulation des OTR sont controversés (Ivell et al., 2001). Bien que le récepteur α des œstrogènes (mais pas β) soit un inducteur de la liaison de l'OT sur ses OTR dans le cerveau, chez des souris KO pour le récepteur α des œstrogènes, les OTR sont toujours présents (Patisaul et al., 2003 ; Young et al., 1998), suggérant que d'autres mécanismes sont capables de réguler l'expression des OTR (Gimpl et al., 2001 ; Ivell et Walther, 1999). De plus, des études de transfection utilisant des protéines de fusion contenant la région promotrice du gène de l'OTR suivie du gène rapporteur n'ont pas réussi à exprimer la construction lors de l'application des œstrogènes (Kimura et al., 2003). L'ensemble des études s'intéressant à la régulation de l'expression des OTR par les stéroïdes indique que ces derniers régulent de façon positive et indirecte l'expression des OTR (Fleming et al., 2006 ; Ivell et Walther, 1999 ; Ivell et al., 2001). Il semble que le gène codant pour l'OTR serait constitutivement actif (Ivell et al., 1998) suggérant que la répression du promoteur pourrait être un acteur clé dans le contrôle de l'expression de l'OTR. Des études rapportent des degrés de méthylation différents au niveau des introns 1 et 3 dans différents tissus, et que par conséquent la suppression de la transcription des OTR par des mécanismes d'épigénétique semble être l'élément clé de l'expression des OTR de façon tissu-spécifique (Kimura et al., 2003 ; Kusui et

al., 2001). Divers niveaux de méthylation du promoteur du gène de l'OTR contrôlent en effet les différents niveaux d'ARNm de l'OTR dans différentes régions du cerveau chez la souris (Harony-Nicolas et al., 2014). Enfin chez l'Homme, différents niveaux de méthylation du gène de l'OTR sont associés à différents modèles d'activité cérébrale dans le traitement des émotions et la perception sociale (Puglia et al., 2015) ainsi que dans des troubles mentaux tels que l'autisme (Kumsta et al., 2013).

1.3.2.2. Importance du cholestérol et des ions divalents pour le récepteur de l'ocytocine

Une autre propriété particulière de l'OTR est sa dépendance fonctionnelle au cholestérol et aux cations divalents. Il existe une relation claire entre la disponibilité du cholestérol et l'affinité de l'OT pour son récepteur : la constante de dissociation (K_d) passe d'environ 1 nM à plus de 130 nM en absence de cholestérol (Klein et al., 1995). Cette propriété du cholestérol est spécifique de l'OTR et elle n'est pas liée au changement de la fluidité membranaire (Gimpl et al., 1997). D'autres études ont permis d'identifier des domaines de liaison spécifique du cholestérol sur l'OTR ; ceux-ci sont représentés sur la FIGURE 10. Il a alors été proposé que le cholestérol agisse comme stabilisateur d'un état de haute affinité de l'OTR pour l'OT et faciliterait l'expression de l'OTR. L'addition de cholestérol dans un milieu de culture de cellules d'insectes (faible teneur en cholestérol à l'état naturel) augmente l'expression de l'OTR de haute affinité mettant ainsi en évidence l'importance du cholestérol pour la fixation de l'OT sur son récepteur (Gimpl et al., 1995). Une autre proposition faite est que le cholestérol protégerait les OTR contre la dégradation thermique et protéolytique (Gimpl et Fahrenholz, 2002). A température physiologique et dans une lignée cellulaire HEK, les OTR sont plus stables dans les microdomaines plasmiques riches en cholestérol, retardant ainsi l'inactivation des OTR (Gimpl et Fahrenholz, 2000). L'adressage des OTR aux radeaux lipidiques est lui-même capable de modifier les effets de l'activation des OTR. Par exemple, lors de l'adressage des OTR, la présence de cavéoline permet de passer d'un état d'inhibition à un état de prolifération cellulaire (Guzzi et al., 2002). L'ensemble de ces données pourrait expliquer les découvertes des différentes populations d'OTR à haute et à faible affinité dans les cellules utérines (Crankshaw et al., 1990 ; Plieika et al., 1986) comme étant des OTR localisés dans des portions de membrane plasmique avec des quantités de cholestérol différentes.

Les ions divalents tels que le magnésium, le zinc mais aussi le nickel, le manganèse et le cobalt favorisent la liaison OT/OTR (Gimpl et Fahrenholz, 2001 ; Liu et al., 2005 ; Antoni et Chadio 1989 ; Pearlmutter et Soloff, 1979) et ce grâce à deux mécanismes : *i*) en augmentant l'affinité de liaison entre l'OT et son récepteur (Antoni et Chadio, 1989 ; Pearlmutter et Soloff, 1979) *ii*) en induisant un changement conformationnel de la structure de l'OT facilitant ainsi sa liaison avec son OTR (Liu et al., 2005).

1.3.3. Récepteur de l'ocytocine

1.3.3.1. Interaction ligand-récepteur

L'interaction ligand-récepteur pour l'OT a été largement étudiée grâce à plusieurs approches. Ainsi, l'extrémité N-terminale extracellulaire et les deux premières boucles extracellulaires du domaine transmembranaire constituent les sites d'interactions spécifiques entre l'OT et son récepteur. L'extrémité N-terminale de l'OTR semble se lier à une grande variété d'agonistes des OTR, sans distinction entre eux (Wesley et al., 2002). La spécificité du site de liaison de l'OT réside dans les régions E2 et E3, représentées sur la FIGURE 10 ci-dessous (Fanelli et al., 1999).

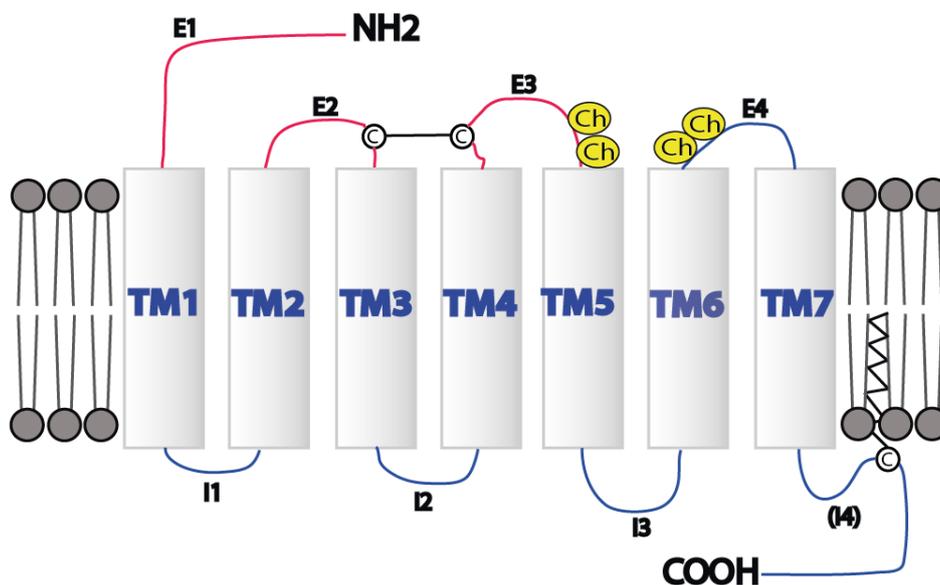


FIGURE 10 : OTR et sites de liaison. En rouge sont représentés les sites de liaison de l'OT et correspondent aux domaines extracellulaires (E1-3). « Ch » (en jaune) indique les sites de liaisons pour le cholestérol. (adaptée à partir de Gimpl et al., 2008).

Chose importante à rappeler, l'OT et l'AVP ont une séquence peptidique très proche ce qui a pour conséquence de permettre la fixation de l'OT et de l'AVP sur les OTR et sur les AVPR

avec toutefois des affinités différentes. En effet, l'OT et l'AVP présentent tous les deux une forte affinité pour les OTR (Akerlund et al., 1999 ; Kiss et Mikkelsen, 2005) avec cependant une légère différence d'affinité (OT : $K_i = 0.79$ nM pour OTR ; AVP : $K_i = 1.7$ nM pour OTR). L'AVP agit donc comme un agoniste partiel de l'OT (Chini et al., 1996). Ce profil de sélectivité particulier a conduit au développement de nombreux agonistes et antagonistes sélectifs de l'OTR mais aussi des récepteurs AVP. En effet, au cours de ces dernières décennies, au moins un millier de peptides synthétiques ont été développés et testés pour leur capacité à se lier et activer les différents récepteurs OT et AVP (Busnelli et al., 2013 ; Manning et al., 2012). Il convient de noter ici que l'OT se lie aux récepteurs de l'AVP ($K_i = 120$ nM pour V_{1A} , > 1000 nM pour les autres récepteurs), mais avec une affinité nettement plus faible que l'AVP

	$V_{1a}R$	$V_{1b}R$	$V_{2}R$	OTR
OT	120	1782	1544	0.79
AVP	1.1	0.68	1.2	1.7

TABEAU 1 : Constantes d'affinité (K_i , en nM) de l'AVP et de l'OT pour leurs récepteurs, chez l'Homme. (adapté à partir de Chini et al., 1996).

pour l'OTR ($K_i = 1,7$ nM). L'ensemble des constantes d'affinité est résumé dans le TABLEAU 1.

Cependant, pour les recherches visant à mieux comprendre le phénomène lié aux OTR dans les tissus ou cellules exprimant également les récepteurs de l'AVP, il est recommandé de favoriser l'utilisation d'agonistes synthétiques avec un profil de sélectivité élevé pour l'OTR, comme par exemple le [Thr4, Gly7]OT chez les rats, noté TGOT ($K_i = 6.6$ nM pour l'OTR et >300 pour les différents AVPR) (Elands et al., 1988a ; Manning et al., 2012).

1.3.3.2. Dimérisation du récepteur de l'ocytocine

La capacité des RCPG à s'associer afin de former des homo-/hétéro- dimères et des oligomères a été bien documentée (Bouvier, 2001 ; Ferre et al., 2014) par des techniques biochimiques et biophysiques telles que la co-immunoprécipitation et le transfert d'énergie par résonance BRET et FRET (pour *Bioluminescence* ou *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Angers et al., 2000 ; Maurel et al., 2004).

Les OTR ne font pas exception et sont capables de former des homo- ou hétéro-dimères (Cottet et al., 2010). Peu d'études ont testé l'existence d'une telle association OTR/RCPG :

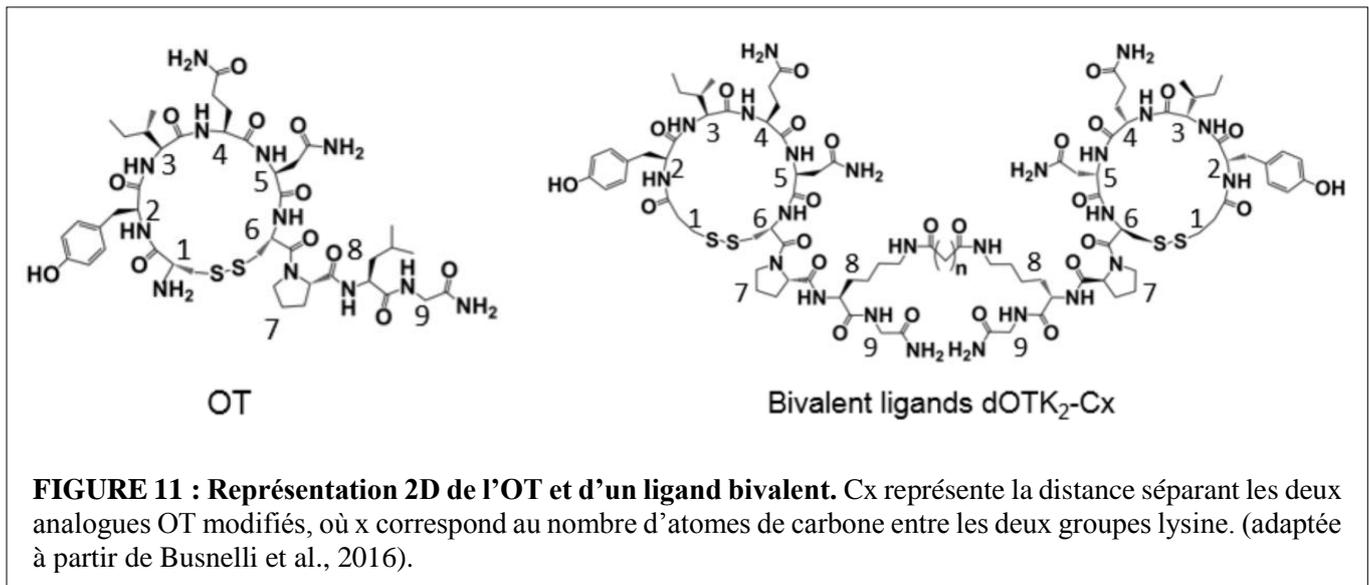
- *In vitro* : durant la biosynthèse, les OTR et les récepteurs de l'AVP forment des homo- et hétéro- dimères (Terrillon et al., 2003).

- *In vitro* : dans les cellules myométriales, existence d'hétérodimère OTR/récepteur adrénergique (β_2) (Wrzal et al., 2012a, 2012b).

- *In vivo* : dans les glandes mammaires de rats, homodimères OTR à la surface des cellules (Albizu et al., 2010).

- *In vivo* : au niveau du noyau *accumbens*, hétérodimère OTR/récepteur dopamine (D2) (Romero-Fernandez et al., 2012).

La pertinence physiologique de tels complexes d'OTR (homo- ou hétéro- dimères) a été testée. En effet, différents ligands homobivalents ont été conçus et représentés sur la FIGURE 11.



Tout d'abord, la capacité de différents ligands homobivalents à se lier aux homodimères OTR a été montrée par BRET. Comme mentionné précédemment, les OTR existent dans deux états d'affinité (haute et basse affinité). Il a été montré que les OTR à faible affinité réagissent de la même façon face à l'OT ou face à un nouveau ligand homobivalent, dOTK-C8, tandis que les OTR à haute affinité ont des réponses de type « superagoniste » lorsqu'ils se lient avec ce ligand homobivalent de longueur approprié (8 carbones). Le dOTK-C8 est un ligand homodivalent obtenu à partir de la fusion de deux molécules d'OT modifiée comme suit : l'OT

est désaminée au niveau de son extrémité N-terminale et le résidu leucine situé en position 8 est remplacé par un résidu lysine. Dans la même étude, l'effet de dOTK-C8, ligand homobivalent le plus puissant qu'ils aient conçus, a été testé *in vivo*. Des tests comportementaux mesurant la sociabilité des animaux et où l'effet de l'OT étaient bien caractérisés – soit le test à trois chambres chez la souris, soit le comportement en banc chez le poisson-zèbre – ont été utilisés pour tester l'effet du ligand homobivalent. Il a été montré que dans ces deux tests, l'OT est capable de favoriser la socialisation des animaux. L'administration en icv de dOTK-C8 augmente également le niveau de socialisation de ces animaux et ce dans les deux tests, avec une puissance augmentée de 40 à 100 fois par rapport à l'OT (ou isotocine chez les poissons) (Busnelli et al., 2016).

Ces résultats sont donc cohérents avec l'existence d'OTR dimérisés au niveau du SNC et ce chez au moins deux types de vertébrés très différents. Les rôles de tels dimères dans la modification des différentes réponses cellulaires suite à l'activation de l'OTR restent à être explorés.

1.3.3.3. Signalisation intracellulaire

OTR : un récepteur couplé aux protéines G (RCPG)

Les boucles intracellulaires du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire C-terminal des RCPG sont liées aux complexes hétérotrimériques des protéines G sur leur côté intracellulaire. Chaque complexe est composé de trois sous-unités de la protéine G : G_α , G_β , G_γ . Lorsque le ligand se fixe sur son RCPG, un changement conformationnel du récepteur s'opère entraînant l'échange d'une guanine diphosphate liée à la protéine G_α en une guanine triphosphate. La sous-unité G_α se dissocie du reste du complexe $G_{\beta\gamma}$ (Marinissen et Gutkind, 2001). Le complexe dimérique $G_{\beta\gamma}$ diffuse alors latéralement dans la membrane plasmique activant divers effecteurs tandis que la sous-unité G_α diffuse afin d'aller cibler d'autres effecteurs en fonction du type de la sous-unité G_α . Ensuite, différents seconds messagers de la voie de signalisation des RCPG sont activés, amplifiant le signal, et modulant de nombreuses fonctions cellulaires. Le RCPG est ensuite recyclé à la membrane ou dégradé par diverses voies cellulaires. Le couplage d'un RCPG donné avec différents sous-types de G_α n'est pas fixe comme il était admis auparavant. Il dépend en réalité de nombreux facteurs comme par exemple le type cellulaire dans lequel il s'exprime. Dans le cas des OTR, ils ont été décrits pour être couplés à divers sous-types de G_α , tels que $G_{q/11}$, $G_{i/o}$, G_h ou éventuellement G_s (Gimpl et al.,

2001 ; Reversi et al., 2005a). Ces différents couplages peuvent exister au sein d'un même type cellulaire (Gravati et al., 2010) ce qui pourrait être favorisé par la localisation des OTR dans différents microdomaines de la membrane plasmique (Rimoldi et al., 2003). De façon intéressante, certains agonistes et antagonistes des OTR peuvent activer spécifiquement des OTR liés à un sous-type particulier G_α donné. L'agoniste ou antagoniste qui possède cette propriété est qualifié de « biaisé » (Luttrell et al., 2015).

Agonistes biaisés de l'OT

La fonction première de l'OT et qui lui a valu son nom, est rappelons-le son rôle dans la contraction utérine. Au niveau des cellules myométriales, la fixation de l'OT sur son récepteur conduit à l'activation de la sous-unité $G_{q/11}$ activant la phospholipase C (PLC) conduisant à la production d'inositol triphosphate et de diacylglycérol. L'inositol triphosphate permet alors l'ouverture des canaux calciques du réticulum endoplasmique entraînant *in fine* la contraction des cellules myométriales. Afin d'éviter les contractions avant le terme de la grossesse, cause d'un accouchement prématuré, un antagoniste des OTR a été développé et a été appelé atosiban (Thornton et al., 2001). L'atosiban est un antagoniste des OTR mais uniquement si le RCPG est lié à une sous-unité $G_{q/11}$. Dans le cas où il est lié à un RCPG couplé à une sous-unité G_i , l'atosiban agit en tant qu'agoniste. L'atosiban est donc considéré comme un agoniste biaisé (Reversi et al., 2005b). Des agonistes biaisés des OTR couplés à la voie G_q ont également été développés dont la carbétocine. Initialement, la carbétocine était un analogue de l'OT avec une demi-vie plasmatique plus longue que cette dernière (Barth et al., 1974) et ayant un effet prolongé sur l'activité utérine *post-partum* chez la femme (Amsalem et al., 2014). Mais chez le rat, OT et carbétocine ont des effets bien différents voir opposés (Klenerova et al., 2009a, 2009b). Ces effets différents s'expliquent par le fait que la carbétocine est en réalité un agoniste biaisé de l'OTR couplé à la voie G_q (Passoni et al., 2016a).

Rôle du complexe $G_{\beta\gamma}$ avec l'OTR

Le rôle de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ lors de l'activation de l'OTR n'a pas été étudié de manière approfondie même si ce complexe $G_{\beta\gamma}$ semble impliqué dans la voie de signalisation de l'OTR. Par exemple, la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires peut être modulée par l'activation des OTR/protéine G_i (Hoare et al., 1999). Enfin, les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ des RCPG de sous-type G_q couplées aux OTR sont impliquées de manière cruciale dans la décharge en salve provoquée par les neurones OT chez des rats en période de lactation (Wang et Hatton, 2007a).

Effecteurs des protéines G liées aux OTR

Les voies de signalisation intracellulaires par les OTR sont nombreuses et variées. Le diagramme en FIGURE 12 illustre ces différentes voies de signalisation suite à l'activation des différents types de G_α (Viero et al., 2010). Pour une vue encore plus complète de tous les effecteurs connus des OTR, se référer à l'annexe 1 (Chatterjee et al., 2016).

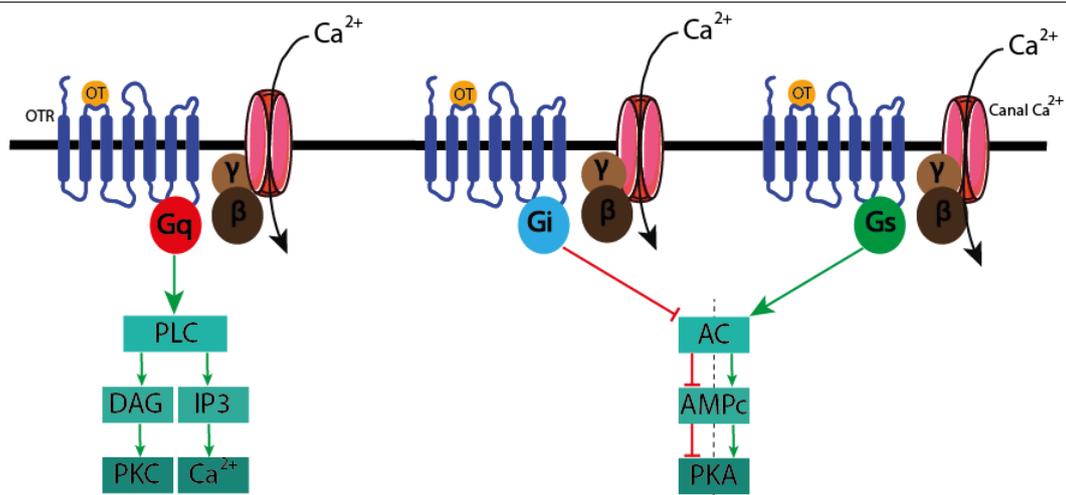


FIGURE 12 : Transduction du signal lors de la fixation de l'OT sur son récepteur. Les flèches rouges représentent des inhibitions tandis qu'en vert, sont représentées les activations.

Internalisation des récepteurs et inactivation

De façon générale, après de multiples stimulations, un RCPG peut être désensibilisé. Ce phénomène semble être médié par la phosphorylation des RCPG ainsi que par la présence des β -arrestines qui inactivent le récepteur (Wolfe et Trejo, 2007). Cela conduit à l'endocytose, l'internalisation ou la séquestration du récepteur (Moore et al., 2007). Les récepteurs peuvent alors être dégradés dans les lysosomes ou bien recyclés à la membrane (Drake et al., 2006).

C'est également le cas pour les OTR. L'exposition prolongée des cellules myométriales à l'OT conduit à une diminution d'environ 10 fois du taux de liaison OT/OTR ainsi qu'une réduction de l'expression de l'ARNm de l'OTR (Phaneuf et al., 1997 ; Plested et Bernal, 2001). De plus, l'exposition prolongée d'OT sur une culture de cellules obtenue à partir de biopsies de myomètres humain entraîne une diminution significative du taux de la réponse de ces cellules suite à une nouvelle application d'OT, illustrée par une diminution de l'élévation de calcium intracellulaire (Robinson et al., 2003). Cette désensibilisation des récepteurs est probablement due à l'internalisation de ces derniers qui semble se produire 30 minutes après l'application d'un agoniste (Guzzi et al., 2002). La désensibilisation des OTR se produit via l'action de le

protéine kinase GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2) qui favorise la fixation de la β -arrestine bloquant ainsi l'interaction OT/OTR et l'endocytose à travers des puits recouverts de clathrine (Hasbi et al., 2004 ; Smith et al., 2006). Il a été rapporté que les OTR interagissent de façon stable avec la β -arrestine (Oakley et al., 2001) ce qui indique que les OTR ne sont pas recyclés rapidement vers la membrane mais ils sont soit dégradés dans les lysosomes soit lentement recyclés. Cependant, une étude démontre l'inverse : les OTR dans les cellules HEK sont recyclés à la membrane plasmique après leur internalisation à travers un cycle court (environ 4 heures) (Conti et al., 2009).

De façon intéressante, les agonistes des OTR peuvent induire des mécanismes de désensibilisation différents. Déjà cité précédemment en temps qu'agoniste biaisé des OTR, l'atosiban n'induit aucune association OTR/ β -arrestine et aucune endocytose des OTR n'est observée même après une exposition prolongé à l'atosiban (Busnelli et al., 2012). La carbétocine quant à elle, favorise l'internalisation des OTR par une voie indépendante de la β -arrestine, et aucun recyclage des OTR n'est observé après une exposition prolongée à cet agoniste biaisé (Passoni et al., 2016b).

1.4. Neurones ocytocinergiques : noyaux et sous-types de neurones OT

L'OT est synthétisée principalement au niveau de l'hypothalamus par les noyaux paraventriculaires (PVN), supraoptique (SON) et accessoires (AN) (Swanson et Sawchenko, 1983). Deux populations cellulaires distinctes produisent et libèrent de l'OT : les neurones magnOT et les neurones parvOT. Les neurones magnOT du PVN et du SON projettent dans l'hypophyse postérieure et sont la source majeure d'OT libérée dans la circulation sanguine. L'OT est aussi synthétisée

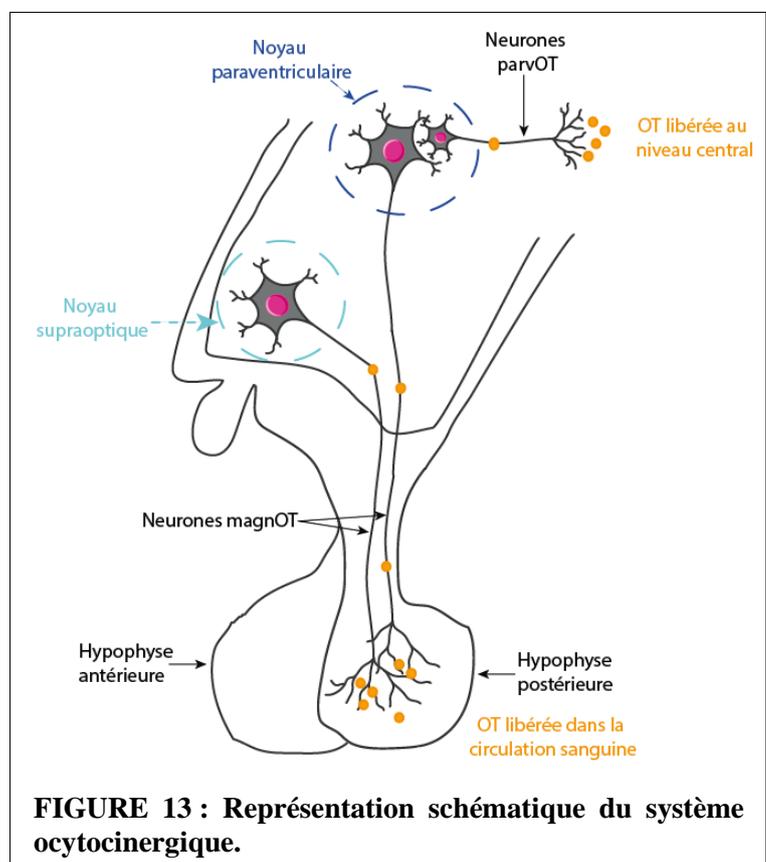


FIGURE 13 : Représentation schématique du système ocytocinergique.

par les neurones parvOT du PVN. Ces neurones parvOT quant à eux, projettent et libèrent l'OT dans différentes régions cérébrales dont l'amygdale (FIGURE 13).

1.4.1. Noyaux ocytocinergiques hypothalamiques

1.4.1.1. Noyaux accessoires

On estime que les AN, situés entre les PVN et les SON, contiennent environ 1/3 des neurones magnOT, et sont une source importante de projections vers d'autres régions cérébrales dont l'amygdale (Knobloch et al., 2012 ; Rhodes et al., 1981). Six noyaux accessoires ont été décrits : antérocommissural, circulaire, fornique, dorsolatéral, ventrolatéral (ou noyau du faisceau médian du prosencéphale) et extra-hypothalamique (voir 1.4.2.3) (Grinevich et Polenov, 1998 ; Knobloch et Grinevich, 2014). Ces différents groupes de neurones constituant l'AN ont été illustrés chez les vertébrés dits avancés (voir FIGURE 4).

1.4.1.2. Noyaux supraoptiques

Les SON sont situés de part et d'autre du chiasma optique et contiennent des corps cellulaires, des fibres ainsi que des terminaisons axonales et des cellules gliales. La différence principale entre le SON et le PVN est l'absence totale de neurones parvOT dans le SON. En effet, le SON est constitué exclusivement par des neurones magnOT. Il a été démontré que quasiment toutes les cellules du SON projettent vers l'hypophyse postérieure. L'utilisation d'un traceur rétrograde dans l'hypophyse postérieure a permis le marquage de toutes les cellules du SON (Hatton, 1990). De plus, dans les SON, il a été retrouvé des neurones AVP et OT qui semblent à l'inverse du PVN, être moins bien séparés. Les neurones AVP semblent plus concentrés dans la partie postéro-ventrale du SON, tandis que les neurones magnOT résident principalement dans la partie antéro-dorsale, comme illustré sur la FIGURE 14. (Swaab et al., 1975 ; Vandesande et Dierickx, 1975 ; Hou-Yu et al., 1986).

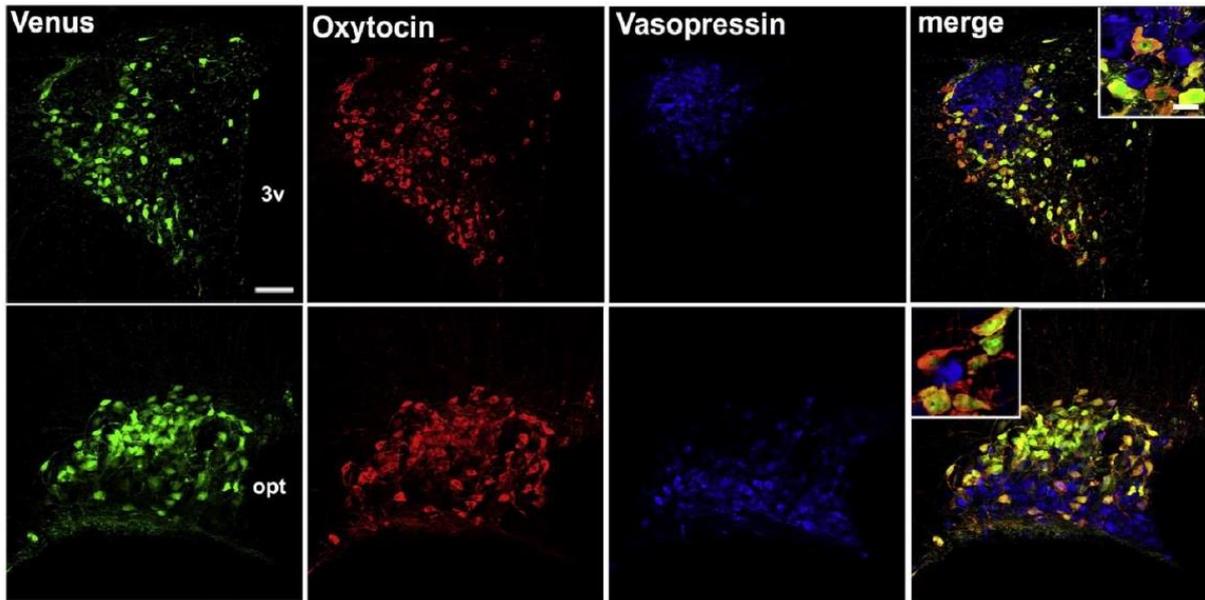


FIGURE 14 : Illustration des sous-populations OT et AVP du PVN (au-dessus) et du SON (en-dessous). Microphotographie confocale de coupes coronales de cerveau illustrant les neurones exprimant la protéine fluorescente Venus sous la direction du promoteur de l'OT (en vert), la révélation immunohistochimique de l'OT (en rouge) et de l'AVP (en bleu). La photo de droite (Merge) est la superposition des images précédentes (2 et 3) au niveau du PVN et du SON. Barre d'échelle : 10 μm (adaptée à partir de Knobloch et al., 2012).

1.4.1.3. Noyaux paraventriculaires

Chez l'Homme, les PVN représentent un volume de 6 mm^3 et contiennent environ 56 000 neurones. La moitié d'entre eux synthétise l'OT tandis que la seconde moitié synthétise l'AVP (Swaab et al., 1993). Chez le rat, les PVN représentent un volume d'environ 1 mm^3 situé de part et d'autre du 3^{ème} ventricule et ils contiennent environ 8 000 neurones OT.

Les PVN sont subdivisés en 8 sous-régions dont 3 contiennent principalement des neurones magnOT et les 5 autres contiennent les neurones parvOT. Swanson et Kuypers ont décrit l'organisation des neurones OT comme suit : « Chez le rat, le PVN peut être vu plus simplement comme trois groupes denses de neurones magnOT noyés dans une plus grande couche de neurones parvOT composé de 5 groupes » (FIGURE 15) (Swanson et Kuypers, 1980). D'autres auteurs vont encore plus loin en décrivant le PVN comme constitué de 11 subdivisions (Simmons et Swanson, 2008). Cependant, tous s'accordent sur le fait que les neurones magnOT et les neurones AVP sont plus ou moins bien séparées, comme le montre la FIGURE 14. Par exemple dans le PVN, les parties antérieures et médiales sont composées presque exclusivement de neurones OT tandis que les différentes subdivisions de la partie postérieure

du PVN, contiennent autant de neurones OT que de neurones AVP (Swanson et Sawchenko, 1983).

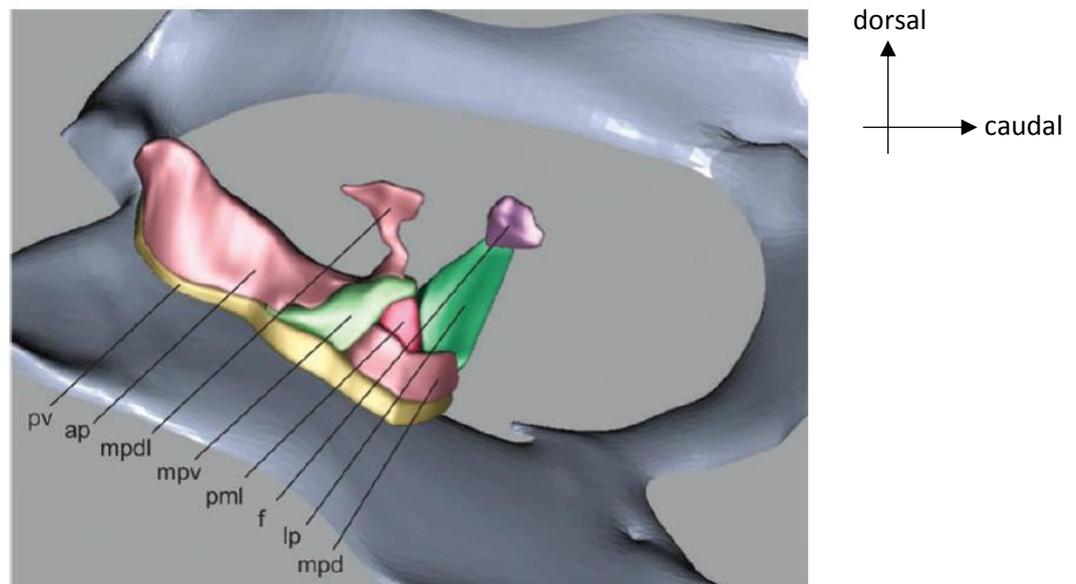


FIGURE 15 : Reconstruction 3D du PVN et de ses 8 sous-régions. Chaque fragment de couleur représente une sous-région du PVN. Abréviations en anglais des 8 sous-régions du PVN : pv, periventricular part ; ap, anterior parvicellular ; mpdl, lateral wing of mpd ; mpv, ventral zone of medial parvicellular ; pml, lateral zone of posterior magnocellular ; f, forniceal ; lp, lateral parvicellular ; mpd, dorsal zone of medial parvicellular. (adaptée à partir de Simmons et Swanson., 2016).

Pour ce travail de thèse, je me suis principalement focalisée sur les noyaux paraventriculaires qui contiennent à la fois des neurones parvOT et à la fois des neurones magnOT.

1.4.2. Neurones ocytocinergiques

Les neurones OT sont composés de deux types de neurones : des neurones parvOT, de petite taille (diamètre du soma : 10-12 μm) et des neurones magnOT de plus grande taille (diamètre du soma : 20-35 μm). Dans le cerveau humain, le nombre de neurones magnOT est estimé à 100 000 (Manaye et al., 2005) tandis que chez le rat, ils sont au nombre de 10 000 (Rhodes et al., 1981). Les neurones parvOT et magnOT sont facilement identifiables à partir de leurs caractéristiques morphologiques, anatomiques, fonctionnelles... mais surtout de par leurs sites de projection.

Même s'il est classiquement admis que seuls deux types de neurones OT existent, ceci semble de moins en moins évident. En effet, une étude récente rapporte l'existence de quatre

types de neurones OT bien distincts, basée sur la séparation de ces neurones OT en fonction de l'expression de plusieurs marqueurs génétiques (Romanov et al., 2017) et le nombre de sous-population de neurones OT est largement discuté dans une autre étude (Athammer et Grinevich, 2017).

1.4.2.1. Neurones parvocellulaires

Les neurones parvOT sont présents uniquement dans le PVN, et plus précisément dans la partie caudale (Swanson et Kuypers, 1980 ; Swanson et Sawchenko, 1983) et ne projettent pas dans l'hypophyse postérieure contrairement aux neurones magnOT (voir 1.4.2.2). De nos jours, il est bien établi que les neurones parvOT projettent leurs axones dans différentes régions cérébrales (amygdale, *locus caeruleus*, *zona incerta*...), le tronc cérébral et la moelle épinière et ce dans le but de moduler une multitude de fonctions vitales et physiologiques (Baskerville et Douglas, 2008 ; Kita et al., 2006 ; Atasoy et al., 2012) ainsi que différentes émotions (Shamay-Tsoory et al., 2009 ; Van Ijzendoorn et al., 2011). Il est important de noter que ces neurones parvOT orchestrent et contrôlent l'activité des neurones magnOT via des connections PVN-SON (Eliava et al., 2016). Une fois libérée au niveau central, l'OT va se fixer sur ses récepteurs exprimés dans de nombreuses régions cérébrales. Dans la plupart des cas, la distribution des OTR correspond aux régions de projections des neurones OT comme c'est le cas par exemple pour la substance grise périaqueducale (PAG) (Nasanbuyan et al., 2018), le tronc cérébral (Blevins et al., 2004 ; Meddle et al., 2007) ou la moelle épinière (Eliava et al., 2016 ; Juif et al., 2013 ; Juif et Poisbeau, 2013 ; Triollet et al., 1997) chez les rongeurs et les primates. Des doutes persistent sur le fait que les neurones parvOT projettent exclusivement dans une seule région cérébrale ou s'ils projettent vers plusieurs régions en formant des collatérales.

1.4.2.2. Neurones magnocellulaires

En plus d'être neurotransmetteur, l'OT est aussi qualifié de neurohormone. Les fonctions neuroendocrines de l'OT sont médiées par la neurosécrétion d'OT par les neurones magnOT du PVN, du SON et des AN (Burbach et al., 2001 ; Sofroniew, 1983 ; Swanson et Sawchenko, 1983). Ces neurones magnOT projettent leurs axones dans le lobe hypophysaire postérieur, où ils libèrent l'OT dans la circulation sanguine (FIGURE 13) (Brownstein et al., 1980). Les neurones magnOT peuvent être séparés en deux populations distinctes : ceux exprimant l'OT et ceux exprimant l'AVP (FIGURE 14) (van Leeuwen et Swaab, 1977 ; Vandesande et

Dierickx, 1975) avec des propriétés électrophysiologiques différentes (Armstrong, 1995 ; Renaud et Bourque, 1991). Cependant, une faible population de neurones magnOT exprime les deux (1 à 5 %), tandis que d'autres études suggèrent que l'ensemble des neurones magnOT expriment l'OT et l'AVP mais avec un biais énorme dans la quantité synthétisée (Glasgow et al., 1999 ; Kiyama et Emson, 1990 ; Xi et al., 1999).

Dans les neurones magnOT, la première étape pour la neurosécrétion est la synthèse du pré-propeptide OT dans le réticulum endoplasmique rugueux. Après clivage du peptide signal et formation des ponts disulfures, le pré-propeptide est transporté dans l'appareil de Golgi. Le pré-propeptide est alors séquestré dans des vésicules liées à la membrane appelées granules de sécrétion. Lors du transport de ces vésicules vers les terminaisons axonales dans l'hypophyse, des modifications post-traductionnelles s'opèrent. Après stimulation des neurones résultant une entrée de calcium au niveau des terminaisons axonales, la neurophysine-OT est sécrétée par exocytose dans la circulation sanguine. Une nouvelle dissociation a alors lieu et elle est nécessaire afin que l'OT puisse aller agir sur son récepteur (Burbach et al. 2001 ; McEwen, 2004).

Une fois dans la circulation sanguine, l'OT a un temps de demi-vie estimé entre 3 et 8 minutes chez l'Homme et chez le rat (Morin et al., 2008 ; Rydén et Sjöholm, 1969) comparativement à celle retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien chez le rat qui semblerait être de l'ordre de 19 minutes (Mens et al., 1983). L'OT est éliminée du sang au travers de sa dégradation chimique dans le foie et les reins (Claybaugh et Uyehara, 1993). Il existe des peptidases hautement régulées capables d'hydrolyser et de cliver l'OT, notamment l'ocytocinase aussi appelée leucine aminopeptidase placentaire, P-LAP en raison de sa présence dans le placenta. Par exemple, la concentration de P-LAP est régulée positivement au milieu et à la fin de la grossesse afin de permettre de mener à terme la grossesse, et une diminution de P-LAP est responsable d'un travail prématuré (Nomura et al., 2005 ; Yamahara et al., 2000). En effet, les souris déficientes en P-LAP présentent une hypersensibilité à l'OT entraînant un déclenchement du travail prématuré (Ishii et al., 2009). Cependant, il est important de noter que le P-LAP ne dégrade pas seulement l'OT mais également l'AVP, l'angiotensine et les endorphines rendant alors son action non spécifique de l'OT (Tsujimoto et Hattori, 2005). De plus, il semblerait que les P-LAP aient un rôle particulier dans la modulation de l'effet de l'OT dans les réponses liées au stress au niveau de l'amygdale (Hernández et al., 2009).

Même si les neurones magnOT libèrent l'OT dans la circulation sanguine, la présence de fibres OT de ces neurones a également été décrite dans des études pionnières faites sur les systèmes neuroendocriniens. Les axones des neurones OT ont été observés notamment dans l'amygdale, l'hippocampe, le noyau du lit de la strie terminale, la zone septale (Buijs, 1978 ; Sofroniew, 1980 ; Knobloch et al., 2012 ; Duque-Wickens et al., 2017). Ces observations faites chez des rats sont retrouvées chez les primates non humains (Wang et al., 1997) et aussi chez les humains (Fliers et al., 1986).

1.4.3. Libération de l'ocytocine

1.4.3.1. Libération dendritique de l'ocytocine

L'évolution a permis aux neurones magnOT de libérer des neuropeptides au niveau de leurs dendrites par exocytose (Pow et Morris, 1989) permettant une communication paracrine à l'intérieur des noyaux hypothalamiques, et selon toute vraisemblance permettant aussi une diffusion de l'OT dans le 3^{ème} ventricule. Chez les rongeurs, certains neurones OT projettent directement dans le 3^{ème} ventricule libérant l'OT directement dans le liquide céphalo-rachidien, en synergie avec la diffusion d'OT dans la matrice extracellulaire voisine (Landgraf et Neumann, 2004). La concentration d'OT dans le LCR au niveau du SON est 100 à 1000 fois supérieure à celle mesurée dans le sang mettant ainsi en évidence une libération dendritique indépendante de la libération axonale (Ludwig et Leng, 2006).

De plus, l'activité synchrone et en burst des neurones OT semblent due à la libération somato-dendritique d'OT induite par l'OT elle-même, se fixant alors sur les OTR de cette même cellule ou bien sur une cellule proche. Ceci confère alors à l'OT des modes d'action de type autocrine et paracrine (Lambert et al., 1993). La libération d'OT au niveau dendritique permet ainsi l'autorégulation de l'activité des neurones OT et semble permettre une régulation plus durable dans le temps.

1.4.3.2. Libération axonale de l'ocytocine

Les grandes quantités d'OT libérées dans l'hypothalamus (Ludwig et Leng, 2006) ainsi que la répartition différentielle des axones OT au niveau central (Sofroniew, 1980, 1983) suggèrent que l'OT pourrait agir par transmission volumique (Fuxe et al., 2012), par diffusion simple à partir des noyaux OT et par libération d'OT dans le liquide céphalo-rachidien au

niveau du 3^{ème} ventricule. En conditions basales, les études de microdialyse ont mesuré 4 pg d'OT dans le SON et 2 pg pour le PVN. Dans des régions cérébrales situées à proximité, telles que l'amygdale, le septum latéral ou encore l'hippocampe dorsal, les concentrations d'OT sont 2 à 4 fois plus faibles qu'au niveau du SON (Wotjak et al., 2008). Ces valeurs sont en accord avec la concentration d'OT dans le liquide extracellulaire (Leng et Ludwig, 2008) et correspondent à l'affinité de liaison de l'OT pour son récepteur. Plusieurs études suggèrent que l'OT pourrait agir par sa diffusion dans le liquide céphalo-rachidien : *i*) 80% des régions exprimant l'OTR sont situées à proximité du liquide céphalo-rachidien, des ventricules ou de l'espace sous-arachnoïdien (Veening et al., 2010) *ii*) la plupart des recherches pionnières s'intéressant aux effets de l'OT au niveau central ont utilisé des injections icv. Cependant, les niveaux d'OT dans le liquide céphalo-rachidien ne sont pas toujours corrélés avec ceux retrouvés dans le plasma (Amico et al., 1990), suggérant une modulation différentielle (Veening et al., 2010). En effet, L'OT peut être libérée au niveau somato-dendritique sans être neurosécrétée et vice versa. De plus, la demi-vie de l'OT dans le liquide céphalo-rachidien est beaucoup plus longue que dans le sang d'où des concentrations d'OT différentes entre le liquide céphalo-rachidien et le plasma. Chez les rongeurs, certains neurones OT projettent directement dans le 3^{ème} ventricule libérant l'OT directement dans le liquide céphalo-rachidien, en synergie avec la diffusion d'OT dans la matrice extracellulaire voisine (Landgraf et Neumann, 2004). Point intéressant à noter : la libération dendritique d'OT dans le 3^{ème} ventricule est une ancienne propriété évolutive des neurones magnOT qui diminue au cours de l'arbre phylogénétique (FIGURE 16).

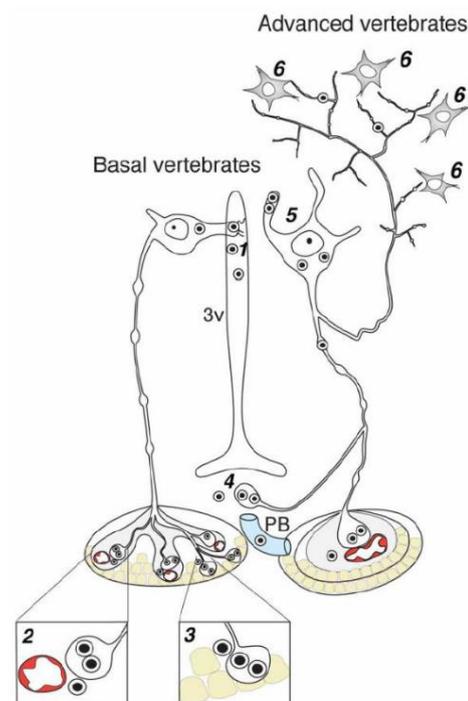


FIGURE 16 : Voies de libération de l'OT dans le cerveau des vertébrés. 1- voie dendro-ventriculaire ; 2- voie axo-hypophyse postérieure (libération dans la circulation sanguine systémique) ; 3- voie axo-hypophyse antérieure (action paracrine) ; 4- contacts axo-hypophyse avec la veine porte ; 5- libération somato-dendritique ; 6- libération axonale. Abréviations : 3v, 3^{ème} ventricule ; PB, veine porte (adaptée à partir de Knobloch et Grinevich, 2014).

Etant donné que l'OT plasmatique ne peut pas atteindre le liquide céphalo-rachidien, certains chercheurs soutiennent l'idée que la concentration importante d'OT au niveau central provient de la libération massive au niveau des dendrites des neurones OT et non de la libération et diffusion de l'OT au niveau des terminaisons axonales. De telles concentrations pourraient facilement activer les zones cérébrales proches des ventricules par diffusion à partir du liquide céphalo-rachidien (Veening et al., 2010). Aussi, les neurones parvOT projettent sur un nombre restreint de régions cérébrales par comparaison au nombre de régions exprimant des OTR, ce qui va dans le sens de l'hypothèse de diffusion passive de l'OT (Ludwig et Leng, 2006). Cependant, cette différence de localisation entre les neurones OT et les OTR a été récemment remise en question via la cartographie de nouvelles projections OT (Knobloch et al., 2012 ; Ross et al., 2009). Une explication raisonnable semble être que ces deux mécanismes sont importants et complémentaires où chacun a un rôle (Landgraf et Neumann, 2004). La diffusion de l'OT pourrait agir durant une longue période de temps sur des zones spatiales très larges tandis que la libération axonale d'OT permettrait une régulation de façon plus localisée, rapide mais aussi plus contraignante au niveau cellulaire et des microcircuits (Stoop, 2012).

En fait, l'effet axonal évoqué n'est pas aussi rapide qu'une libération synaptique. La stimulation des neurones OT sur des coupes de cerveaux *ex vivo* entraînent des réponses post-synaptiques non pas de l'ordre de la milliseconde comme on pourrait s'y attendre mais de l'ordre de plusieurs secondes voir plusieurs dizaines de secondes (Knobloch et Grinevich, 2014). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'OT libérée localement va pouvoir aller agir par diffusion à plusieurs micromètres. De plus, les vésicules d'OT ne sont pas souvent localisées dans la terminaison synaptique du SON ou du noyau *accumbens*, mais sont présentes tout au long des axones (Knobloch et Grinevich, 2014 ; Ross et al., 2009), indiquant que les axones des neurones OT pourraient libérer l'OT par un mécanisme dit « en passant ». Cette idée de libération de peptides tout le long de l'axone du neurone avait déjà été proposée dans le passé (Morris et Pow, 1991).

Même si la concentration d'OT est élevée au niveau central, des disparités de concentrations ont été observées entre les différentes régions cérébrales (Russell et al., 1992). Une première explication serait due à la régulation du taux d'ocytocinase (voir 1.4.2.2) mais cela ne permet pas d'expliquer que la concentration d'OT puisse, dans certaines conditions, atteindre des concentrations cent fois plus élevées que dans des conditions basales, dans une seule région spécifique du cerveau (Beyer et al., 2010 ; Ebner et al., 2005). Une autre explication

plus simple expliquant ces disparités de concentration d'OT est que la libération axonale d'OT est finement régulée et elle serait localisée à un noyau donné. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs résultats indiquant un effet cellulaire et comportemental précis suite à la stimulation des axones OT *in vivo* et *in vitro* (Knobloch et al., 2012 ; Mitre et al., 2016a ; Oetl et al., 2016). Enfin, en fonction de la concentration en OT, le couplage avec différentes protéines G pourrait être favorisé : à forte concentration d'OT, le couplage OT avec une $G_{i/o}$ est favorisé tandis qu'à faible concentration, le couplage OT avec une G_q est favorisé (FIGURE 17) (Busnelli et al., 2012 ; Busnelli et Chini, 2017 ; Grinevich et al., 2016). Cela signifie que l'OT pourrait avoir des effets opposés ou mixtes au niveau des réseaux cellulaires et ce dans une zone donnée.

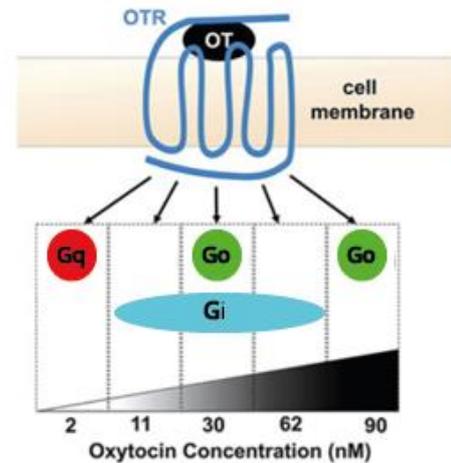
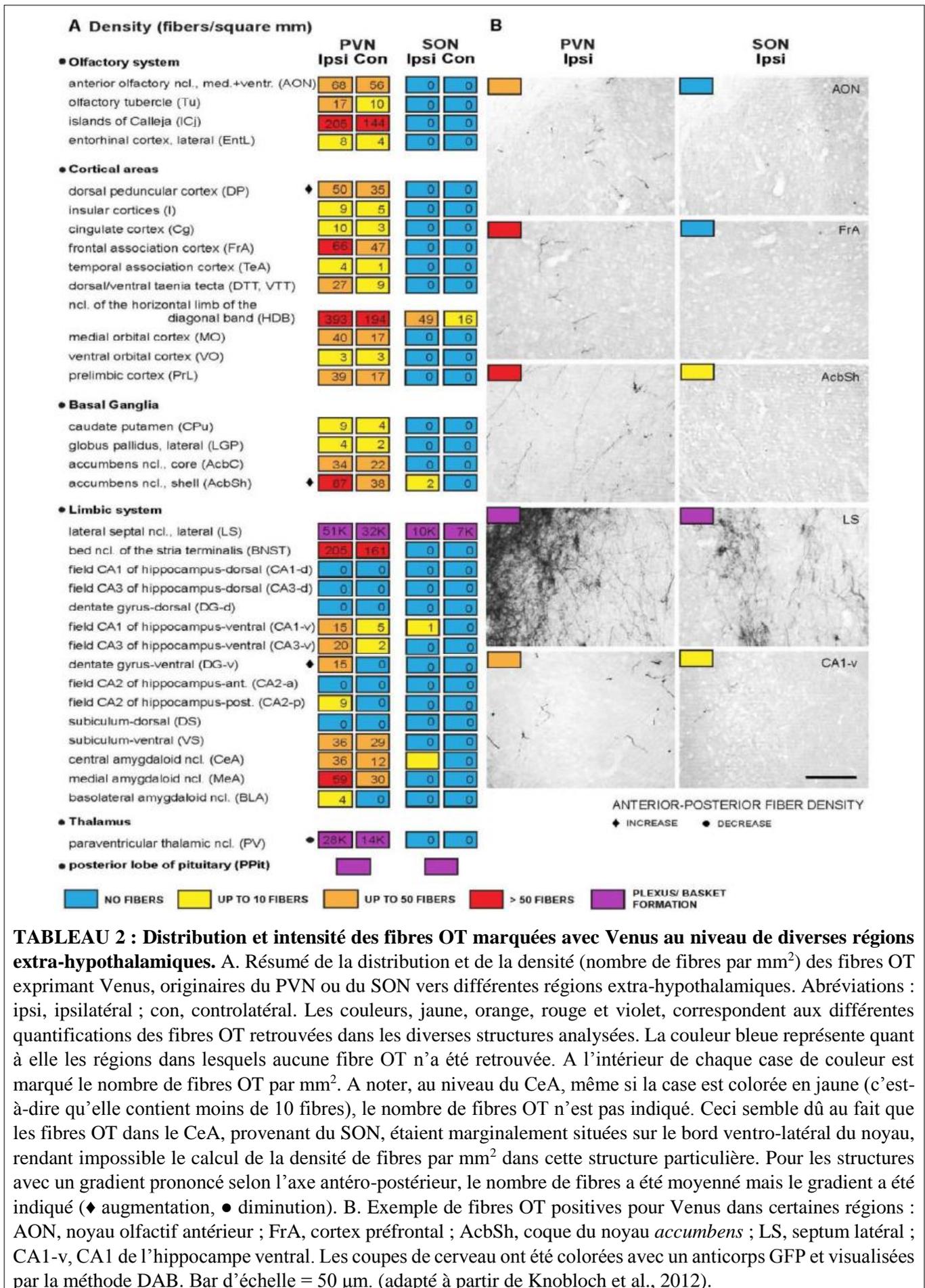


FIGURE 17 : Modification du couplage OT/OTR selon la concentration en OT. La concentration en OT définit sur quel sous-type de RCPG cette dernière va se fixer. (adaptée à partir de Busnelli et al., 2012).

1.4.4. Projections des neurones ocytocinergiques

Au niveau du SNC

Dans les années 80, de nombreuses études anatomiques se sont intéressées à cartographier les projections des neurones OT dans différentes régions cérébrales en utilisant des approches immunohistochimique (Buijs, 1983 ; Sofroniew, 1980, 1983) même si elles n'ont pas toujours pu déterminer avec précision à partir de quels noyaux les fibres OT provenaient. Mais plus récemment, une nouvelle méthode de cartographie a été utilisée : la transfection virale. Elle permet d'exprimer spécifiquement dans les neurones d'intérêt, la protéine fluorescente soluble, Venus, ici sous la direction du promoteur de l'OT permettant ainsi de marquer et cartographier spécifiquement les neurones OT dans le cerveau de rats femelles (Knobloch et al., 2012). Les résultats sont en accord avec les données obtenues par immunohistochimie mais avec de meilleurs marquages des fibres OT. Grâce à la transfection virale au sein d'un seul noyau, il a été possible de définir précisément le noyau d'origine de chaque fibre OT, et ainsi cartographier l'origine de toutes les fibres OT (TABLEAU 2).



Contrairement à ce qui était admis jusque-là c'est-à-dire que seuls les neurones parvOT projetaient au niveau central, ils ont montré des projections OT provenant du SON, or ce noyau est composé uniquement de neurones magnOT. Pour prouver la nature magnocellulaire de ces projections, ils ont montré que les neurones projetant dans l'amygdale centrale (CeA), projettent également dans l'hypophyse. Cette découverte rejoint le résultat obtenu avec un autre modèle animal. Chez les campagnols des prairies, le marquage rétrograde des fibres OT innervant le noyau *accumbens* proviennent à la fois du PVN et à la fois du SON et projettent simultanément dans l'hypophyse (Ross et al., 2009).

En plus de la cartographie des projections des neurones OT, Knobloch et ses collègues ont démontré que la stimulation des axones OT présents dans le CeA (qui n'est pas la région la plus innervée du SNC) était suffisante pour provoquer une modification de l'activité électrophysiologique *in vitro*, et ce au travers des OTR et des récepteurs glutamatergiques (de type AMPA). Ils ont aussi prouvé que les axones OT projetant dans le CeA proviennent de l'ensemble des noyaux OT et que ces axones possèdent des varicosités uniquement dans le CeL. Enfin *in vivo*, la stimulation des axones OT au niveau du CeA est suffisante pour réduire le comportement de freezing chez des rats conditionnés à la peur (Knobloch et al., 2012).

Au vue de toutes ces découvertes, il est maintenant clair que les neurones parvOT ne sont pas les seuls neurones OT à projeter au niveau central. L'idée que les neurones magnOT projettent donc à la fois au niveau central et à la fois dans l'hypophyse va dans le sens d'un rôle neuromodulateur de l'OT, à travers sa libération axonale de façon localisée et finement régulée. Une carte schématique représentant l'ensemble des aires cérébrales innervées par l'OT a été récemment proposée (FIGURE 18).

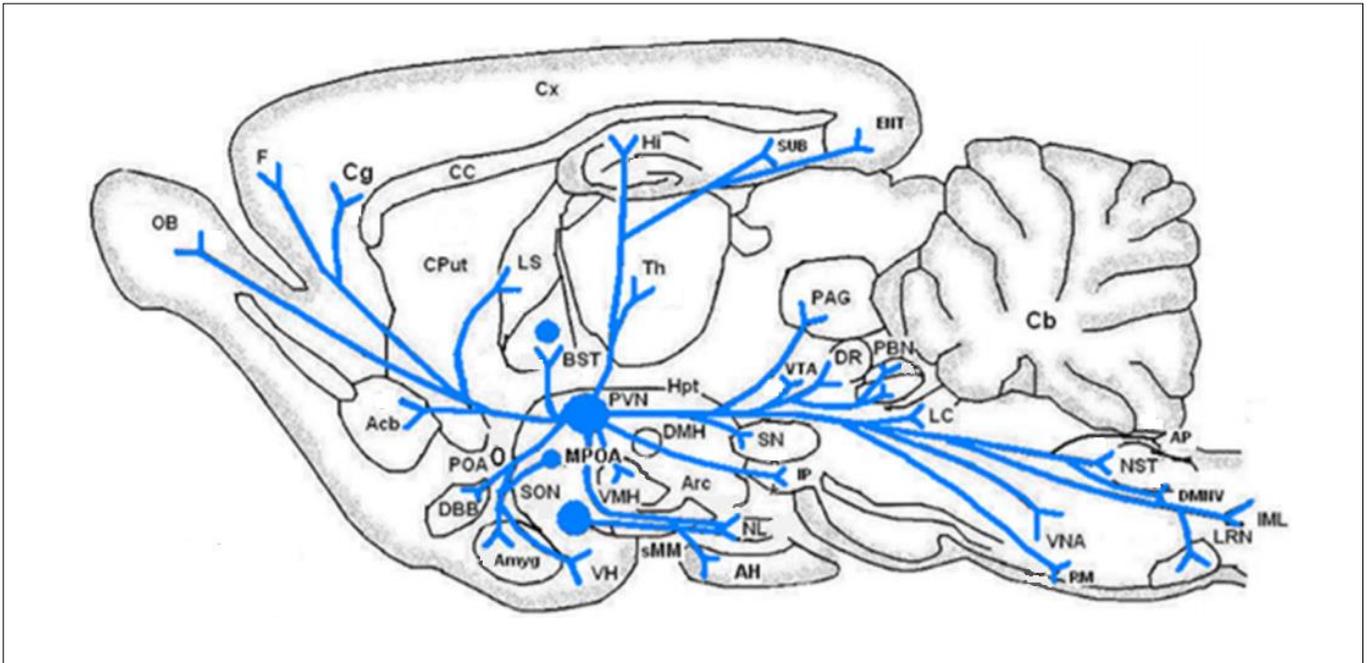


FIGURE 18 : Projections de neurones OT dans le système nerveux central. Les cercles bleus représentent la localisation des corps cellulaires des neurones OT, les lignes représentent leurs projections. Abréviations : Acb, *accumbens* ; Amyg, amygdala ; AP, area postrema ; Arc, arcuate nucleus ; BST, bed nucleus stria terminalis ; Cb, cerebellum ; Cg, cingulate cortex ; Cput, caudate and putamen ; Cx, cortex ; DBB, Broca's diagonal band ; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus ; DMNV ; dorsomedial vagus nucleus ; DR, dorsal raphe nucleus ; ENT, entorhinal cortex ; F, frontal cortex ; Hi, hippocampus ; Hpt, hypothalamus ; IML, intermediolateral column autonomic neurons ; IP, interpeduncular nucleus ; LC, *locus coeruleus* ; LRN, nucleus reticularis lateral ; LS, lateral septum ; sMM, supramammillary nucleus ; NL, neural lobe ; NST, nucleus solitary tract ; OB, olfactory bulb ; OFC, orbitofrontal cortex ; cPAG, periaqueductal gray ; PBN, parabrachial nucleus ; mPFC, medial prefrontal cortex ; POA, preoptic area ; PVN, hypothalamic paraventricular nucleus ; RM, raphe magnocellularis ; RN, raphe nucleus ; SON, supraoptic nucleus ; SN, substantia nigra ; SU, subiculum ; Th, thalamus ; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus ; VMN, ventromedial nucleus of the thalamus ; VP, ventral pallidum ; VTA, ventral tegmental area (adaptée à partir de Vergas-Martinez et al., 2014).

1.4.5. Cartographie du récepteur de l'ocytocine

Au niveau du SNC

La cartographie de l'expression des OTR au niveau du SNC a débuté chez les rongeurs et mammifères dans les années 80. L'outil de choix a été le recours à des ligands des OTR radiomarqués et le premier utilisé a été une version tritiée de l'OT (FIGURE 19).

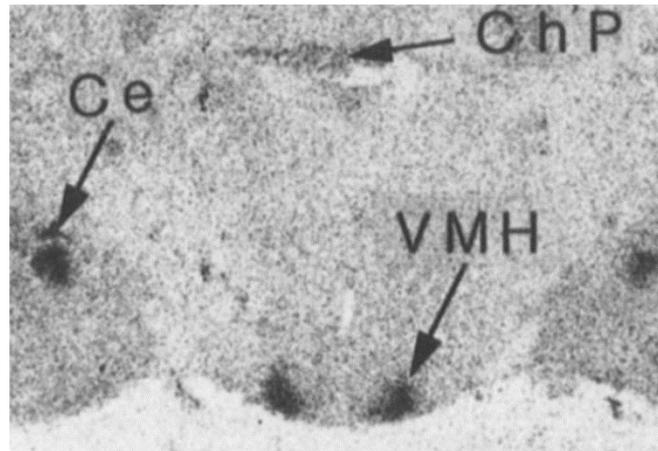


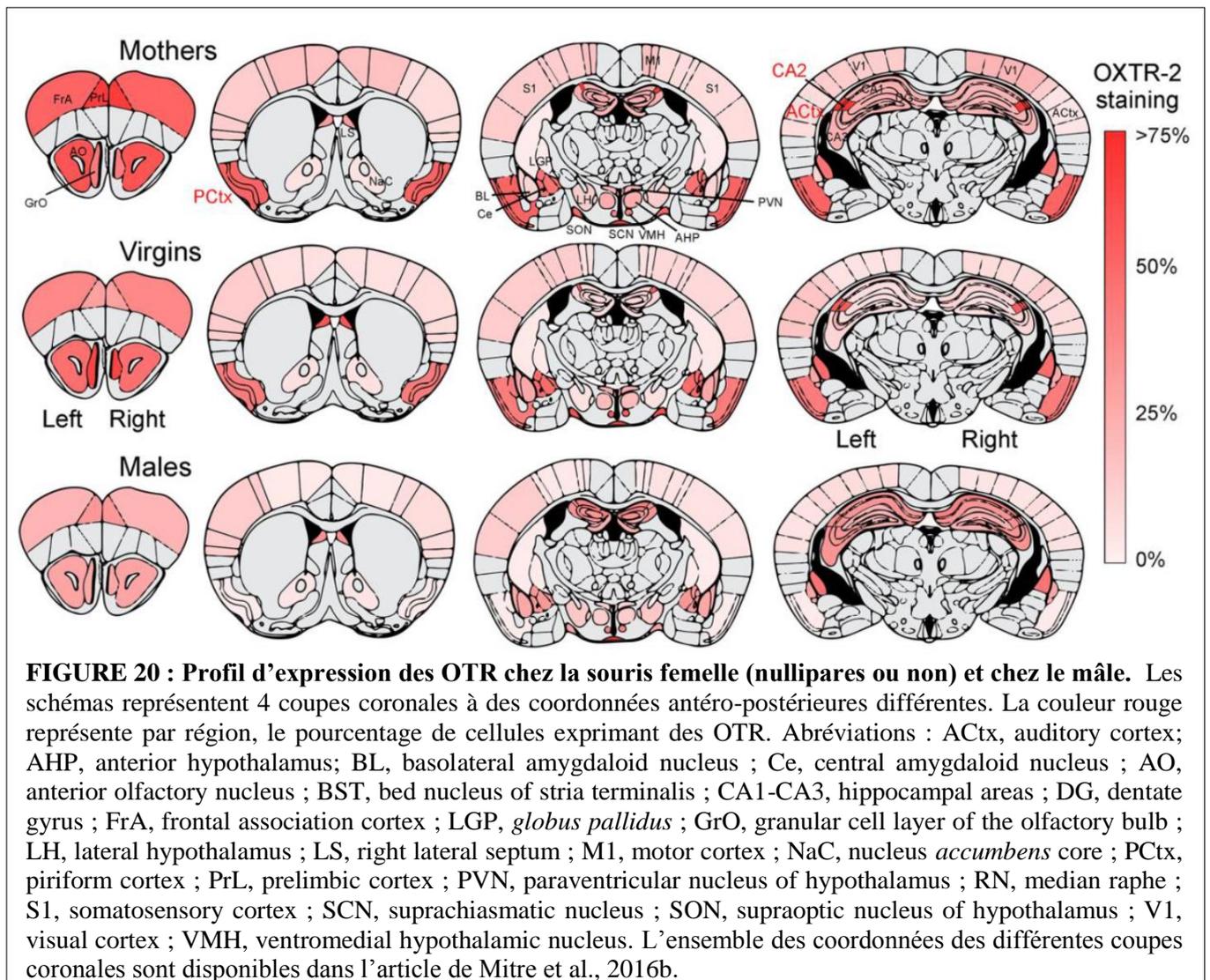
FIGURE 19 : Autoradiographie des OTR sur une coupe transversale de rats. Abréviations : Ce, central amygdala ; VMH, ventro-médial hypothalamus ; Ch'P, ventral part of *subiculum* (adaptée à partir de Freund-Mercier et al., 1987).

Cependant, le problème de la fixation potentielle de l'OT sur les récepteurs de l'AVP a vite été soulevé, en plus du fait que les composés tritiés nécessitent une longue période d'exposition. Le développement de nouveau ligand radiomarqué pour les OTR a alors été nécessaire. Basé sur le marquage radioactif à l'iode 125, « ^{125}I -ornithine vasotocin analogue » a un profil hautement sélectif (Elands et al., 1988b) qui a permis une cartographie efficace des OTR chez des rongeurs. Même si cet outil est encore utilisé, plusieurs laboratoires tendent à développer des agonistes des OTR qui seraient capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, de nature non-peptidiques et marqués par fluorescence (Karpenko et al., 2015). Il convient de noter que la cartographie des OTR dans le cerveau de primates grâce au ligand radioactif à base d'iode a tout d'abord échoué à cause de la perte de spécificité pour les OTR. Pour faire face à ce problème, l'autoradiographie a été optimisée pharmacologiquement en se basant sur une liaison compétitive des molécules radiomarquées avec l'OTR. Le manque de spécificité de la technique a ainsi été surmonté et utilisé chez plusieurs espèces de primates non humains (Freeman et Young, 2016 ; Freeman et al., 2014a, 2014b). La quantification de l'ARNm des OTR chez les rats ainsi que le niveau de liaison OT/OTR chez le rat et chez l'Homme ont été résumés dans le TABLEAU 3 (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Il est intéressant de noter que les patterns de liaison avec l'OT ou l'AVP ne se chevauchent quasiment jamais (Gimpl et Fahrenholz, 2001), et lorsque les deux récepteurs sont présents dans une même région cérébrale, ils sont séparés spatialement comme c'est le cas par exemple dans l'amygdale. En effet, dans le CeA, les OTR et les récepteurs de l'AVP sont ségrégués : la partie latérale du CeA (notée CeL) contient les OTR tandis que la partie médiane du CeA (notée CeM), les récepteurs de l'AVP (Huber et al., 2005 ; Stoop, 2012).

Brain Regions	Rat			Human
	mRNA	OT binding (infant)*	OT binding (adult)*	OT binding
Olfactory system				
Olfactory bulb	+	?	?	ND
Anterior olfactory nucleus	+++	++	++	?
Olfactory tubercle	+++	?	++	?
Islands of Calleja	ND	ND	+++	+
Piriform cortex	++	?	?	?
Entorhinal/perirhinal area	+	+	+	ND
Cortical areas				
Peduncular cortex	?	++	+++	(+)
Insular cortex	?	+	+	?
Cingulate cortex	+	+++	ND	?
Retrosplenial cortex	?	+++	ND	?
Frontal cortex	++	?	(+)	ND
Temporal cortex	(+)	?	+	ND
Taenia tecta	+++	?	(+)	?
Diagonal band of Broca	+	?	?	+
Basal nucleus of Meynert	ND	ND	ND	+++
Basal ganglia				
Caudoputamen	+++	+++	++	ND
Ventral pallidum cell groups	++	ND	+++	++
Globus pallidus	ND	+++	ND	++
Nucleus accumbens	+	?	+	ND
Limbic system				
Lateral septal nucleus	+	+	+	+++
Bed nucleus of stria terminalis (BNST)	+++	++	+++	ND
Amygdaloid-hippocampal area	+++	+	+	ND
Central amygdaloid nucleus	+++	++	+++	ND
Medial amygdaloid nucleus	++	+	+	ND
Basolateral amygdaloid nucleus	+++	+	+	ND
Parasubiculum and presubiculum	ND	++	++	ND
Dorsal subiculum	+++	+++	(+)	ND
Ventral subiculum	+++	+	+++	ND
Thalamus and hypothalamus				
Anteroventral thalamic nucleus	ND	+	ND	ND
Paraventricular thalamic nucleus	++	++	+	+
Ventromedial hypothalamic nucleus ^b	+++	ND	++	ND
Anterior medial preoptic area	+++	ND	ND	++
Supraoptic nucleus (SON)	+++	ND	(+)	ND
Paraventricular nucleus (PVN)	++	ND	(+)	ND
Medial tuberal nucleus	ND	++	++	+
Posterior hypothalamic area	+	ND	ND	++
Supramammillary nucleus	++	+	+	ND
Lateral mammillary nucleus	ND	+++	+	++
Medial mammillary nucleus	ND	+++	ND	+
Brain stem				
Substantia nigra pars compacta	++	ND	ND	+++
Ventral and dorsal tegmental area	++	ND	ND	ND
Central gray	+	ND	ND	+
Dorsal raphe nucleus	+	ND	ND	+
Reticular nuclei	+	ND	ND	ND
Medial vestibular nucleus	+	ND	ND	ND
Hypoglossus nucleus	++	ND	ND	++
Nucleus of the solitary tract	ND	ND	(+)	+++
Dorsal motor nucleus of the vagus nerve	+++	+	+	+
Inferior olive nucleus	ND	+	+	(+)
Substantia gelatinosa of trigeminal nucleus	+	+++	+	+++
Pituitary gland	ND	+	+	ND

TABLEAU 3 : Expression de l'ARNm de l'OTR et les niveaux de liaison avec son ligand dans les structures supra-spinales. Les symboles correspondent à la semi-quantification des niveau d'expression : +, faible ; ++, modéré ; +++, élevé ; ND, non détecté ; (+), détection limite et/ou non détecté par tous les scientifiques ; ?, non enregistré (adapté à partir de Gimpl et Fahrenholz, 2001).

Plus récemment, un nouvel anticorps dirigé contre les OTR a été proposé et utilisé afin de cartographier l'expression des OTR chez la souris cette fois-ci. Les résultats obtenus sont illustrés sur la FIGURE 20 (Mitre et al., 2016b) et corroborent avec les résultats cartographiques des OTR obtenus à partir d'une lignée de souris knock-in pour la protéine fluorescente Venus dans les OTR (Yoshida et al., 2009).



1.4.6. Existence de neurones ocytocinergiques non hypothalamiques ?

Comme décrit précédemment, les corps cellulaires des neurones OT sont localisés majoritairement dans trois noyaux hypothalamiques : PVN, SON, AN. Cependant, il pourrait exister d'autres lieux de synthèse de l'OT. Une étude montre la présence d'ARNm de l'OT dans d'autres régions cérébrales comme le noyau du lit de la strie terminale, noté BNST (Chung et al., 1991). Grâce à des marquages d'immunohistologie contre la neurophysine-OT ou l'OT, des corps cellulaires ont été retrouvés dans le noyau triangulaire du septum et le BNST chez le rat

(Ingram et Moos, 1992 ; Sofroniew et Weind, 1978). Cependant, le rôle précis de ces cellules reste encore mal compris ou peu étudié (Kiss et Mikkelsen, 2005).

L'OT peut aussi être synthétisée en périphérie par différents tissus, dont voici une liste non exhaustive :

- les ovaires (Wathes et Swann, 1982 ; Wathes et al., 1982)
- le *corpus luteum* et placenta (Fields et al., 1983)
- l'utérus (Arrowsmith et Wray, 2014)
- le tractus génital masculin (Gimpl et al., 2001 ; Guldenaar et Pickering, 1985)
- les tissus cardiovasculaires (Gutkowska et al., 2014)
- la peau (Denda et al., 2012 ; Gonzalez-Hernandez et al., 2017)
- le thymus (Geenen et al., 1986)
- les os (Colaïanni et al., 2014)

Cependant, les concentrations d'OT mesurées sont en général 100 à 1 000 fois plus faibles au niveau des organes périphériques comparativement aux noyaux hypothalamiques synthétisant l'OT. Ceci peut donc indiquer un rôle paracrine ou autocrine, par opposition au rôle endocrinien médié par l'OT neurosécrétée (Banerjee et al., 2017).

1.4.7. Les neurones ocytocinergiques sécrètent-ils uniquement de l'ocytocine ?

La réponse est non. Les neurones OT ne sécrètent pas que de l'OT mais également de nombreuses autres substances actives dont voici une liste non exhaustive ci-dessous :

- neuropeptide Y (Larsen et al., 1993).
- tyrosine hydroxylase (Skutella et al., 1993).
- corticotropin releasing hormone (CRH) (Pretel et Piekut, 1990).
- thyrotropin-releasing hormone (Tsuruo et al., 1988).
- galanine (Landry et Hökfelt, 1998; Landry et al., 1991).
- glutamate (Knobloch et al., 2012 ; Eliava et al., 2016 ; Ponzio et al., 2006)
- ...

Focus sur le glutamate

Les neurones OT expriment les transporteurs du glutamate (Hrabovszky et Liposits, 2008 ; Ponzio et al., 2006) tout comme les neurones AVP (Kawasaki et al., 2006). Lorsque les

neurones OT sont stimulés, il semblerait qu'ils libèrent en plus de l'OT, du glutamate (Knobloch et al., 2012). Il est alors probable que les neurones OT soient capables de libérer plusieurs molécules bioactives. Dans une cellule, la coexistence de neuropeptides avec de plus petits neurotransmetteurs comme le glutamate ou le GABA est connue depuis les années 1980. Neuropeptides et neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules différentes au niveau des terminaisons axonales, leurs libérations sont qualifiées de « co-transmission ». Une hypothèse émise est que la libération des neuropeptides nécessite l'arrivée de plusieurs potentiels d'action contrairement aux petites vésicules des neurotransmetteurs qui peuvent être sécrétées par exocytose suite à un seul potentiel d'action (Albers, 2015 ; Hökfelt, 1991). Cette régulation différentielle en fonction de l'activité cellulaire permet une régulation fine des circuits neuronaux. Cependant, différents neuropeptides et neurotransmetteurs peuvent être stockés dans une même vésicule et libérés ensemble, en même temps par exocytose de la vésicule : on parle alors de « co-libération ». Une comparaison de ces deux modes de libération des différentes substances neuroactives a été proposée (FIGURE 21) (Vaaga et al., 2014). Il est important de noter que très peu de données concernant les mécanismes de co-transmission ou co-libération par les neurones OT d'OT et d'autres substances neuroactives ne sont disponibles. Cependant, il a été montré que les neurones OT peuvent libérer l'OT tout le long de leurs axones et la co-libération avec le glutamate ne peut se faire qu'au niveau de la terminaison synaptique (Meeker et al., 1991 ; Navone et Di Gioia, 1988 ; Ross et al., 2009).

Pour la suite de mon travail, l'idée de co-libération OT/glutamate sera un point très important. Nous verrons que la libération d'OT après un conditionnement de peur sera modifiée (Article 1).

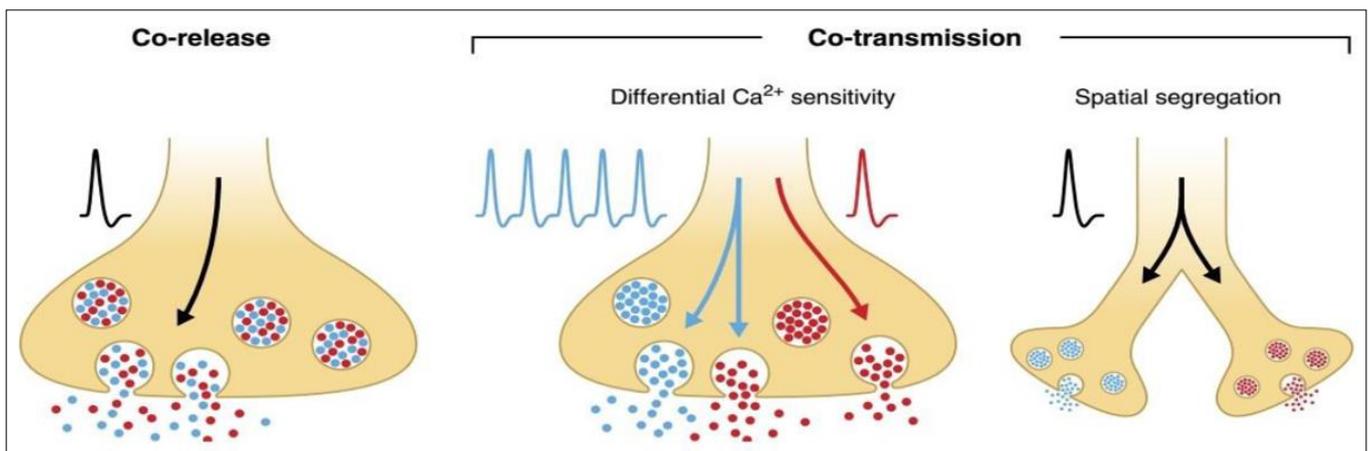


FIGURE 21 : Illustration de deux modes de libération synaptique : co-libération et co-transmission. La co-libération consiste en la libération de plusieurs molécules neuroactives à partir d'une même vésicule synaptique. Dans le cas de la co-transmission, les molécules neuroactives sont contenues dans des vésicules distinctes, permettant soit une libération différentielle des molécules selon leur sensibilité aux concentrations de calcium soit une libération des molécules neuroactives au niveau de boutons synaptiques différents (ségrégation spatiale) (adaptée à partir de Vaaga et al., 2014).

2. FONCTION DE L'OCYTOCINE

2.1. Généralités

L'OT est une molécule clé qui est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions importantes dans la survie et la propagation des espèces : interactions sociales, comportement sexuel, accouchement et éjection de lait, comportement protecteur de la descendance... Mais l'OT régule également des fonctions biologiques telles que la régulation osmotique, la fonction cardiaque... et des émotions. On peut alors aisément comprendre que les études sur l'OT ne cessent d'augmenter (FIGURE 22) et qu'une revue s'intitule même « The great facilitator of life » (Lee et al., 2009).

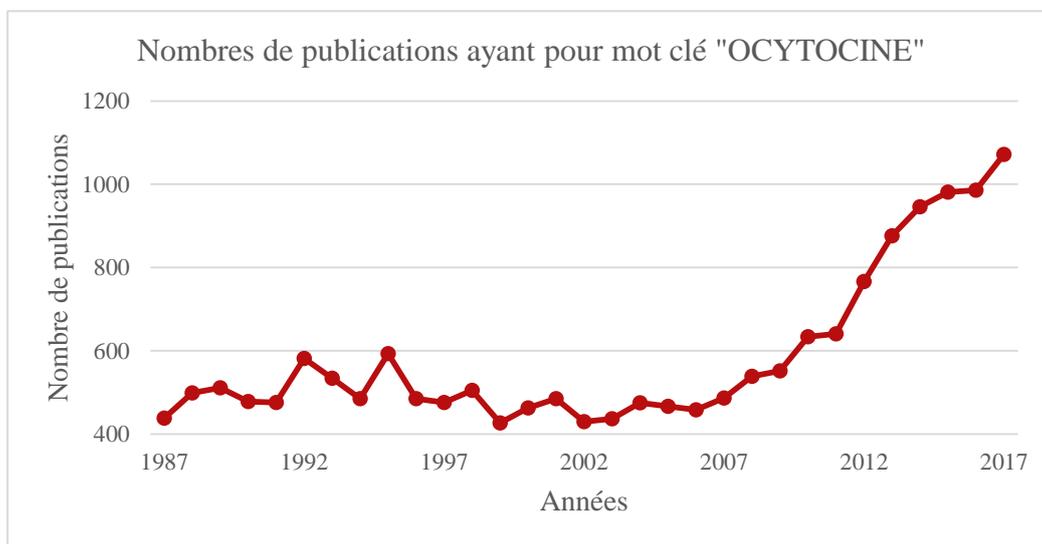


FIGURE 22 : Augmentation du nombre de publications recensées sur Pubmed ayant pour mot clé « **ocytocine** ». Depuis les années 2010, les études sur l'OT en cesse d'augmenter. Ce graphe a été obtenu grâce à l'outil d'Alexandru Dan Corlan disponible sur internet (<http://www.webcitation.org/65RkD48SV>).

Dans cette partie, certaines fonctions et émotions seront décrites brièvement, tandis qu'un tableau récapitulatif mais non exhaustif des fonctions centrales de l'OT chez différentes espèces est présenté (TABLEAU 4).

Behavioral classes	Behaviors	Effects of Oxt in rodents	Effects of Oxt in humans
<i>Social behaviors</i>			
Social memory	Social recognition	-↑ odor processing in olfactory bulb -↑ social memory -↓ social recognition in Oxt KO mice - abnormal Bruce effect in female Oxt KO mice	-↓ amygdalar activation to social stimuli -↑ memory for faces
Affiliation	Sexual behavior	-↑ erections (with T) and ejaculation frequency in males -↑ receptivity (with E) in females	-↑ arousal in men and women -↑ uterine contractions at parturition
	Paternal behavior	-↓ parental behavior with concomitant Avp/Oxt antagonism -↓ adult paternal behavior with Oxt antagonist on PND1	no known effect
	Maternal behavior	- ↑ Oxt throughout the brain with onset of maternal behavior - necessary for lactation - induces full repertoire of maternal behaviors (in presence of E) - ↓ pup retrieval and pup survival in Oxt KO	no known effect
Aggression	Female aggression	-↑ Oxt levels in CeA correlated with aggression	no known effect
	Male aggression	- may have organizational effect during prenatal period	-↑ plasma Oxt levels in males with conduct disorder
<i>Non-social behaviors</i>			
Learning and memory	Non-spatial memory	-↓ memory in passive avoidance tasks	-↓ episodic memory in men and women -↓ verbal recall of certain categories of words
	Spatial memory	-↑ memory when injected into hippocampus - ↓ memory when injected into NBM	no known effect
Anxiety and depression	Anxiety	-↓ anxiety following Oxt administration -↑ anxiety in some Oxt KO mice; sexually dimorphic	-↓ amygdalar response to threatening stimuli -↓ anxiety to social stressors
	Depression	-↑ active/coping behaviors with i.p. Oxt administration	- ↓ plasma Oxt associated with major depression

TABLEAU 4 : Effets comportementaux de l'OT. Ce tableau compile les effets principaux de l'OT dans certains comportements chez des rongeurs mais également chez des humains (adapté à partir de Lee et al., 2009).

2.1.1. Fonctions cardiaques et activité motrice

Les axones des neurones parvOT font des connections réciproques avec plusieurs noyaux du tronc cérébral et la moelle épinière qui sont impliqués dans des fonctions autonomes, notamment le contrôle cardio-vasculaire (Palkovits, 1999). Les neurones OT projetant au niveau de la partie postérieure du cerveau et de la partie thoracique supérieure de la moelle épinière peuvent augmenter le rythme cardiaque (Coote, 2005). Les projections des neurones OT au niveau du noyau du tractus solitaire sont impliquées dans la limitation de l'augmentation du rythme cardiaque suite à un effort (Braga et al., 2000). Ces mêmes projections permettent également de moduler le contrôle réflexe du cœur en facilitant la sortie vagale et le ralentissement du cœur (Higa et al., 2002). L'OT via une action neuroendocrine, favorise la libération de peptide natriurétique atrial (ANP) dans le cœur entraînant une diminution du rythme cardiaque (Gutkowska et al., 1997). De façon générale, l'OT permet de réguler les activités dites autonomes modulant alors la respiration ou la miction... (Yang et al., 2013).

Concernant la motricité, l'administration en périphérie d'OT augmente l'activité motrice en interagissant avec les hormones stéroïdes (Petersson et al., 1998). Cet effet est également observé suite à une injection centrale d'OT (Bodnar et al., 1984) même si ces résultats sont controversés. Une étude montre que le traitement avec de faibles doses d'OT entraîne une diminution de l'activité locomotrice tout comme l'administration de doses croissantes d'OT a

un effet sédatif caractérisé par une suppression de l'activité locomotrice (Uvnas-Moberg et al., 1994). Au cours de la contraction musculaire, la pression sanguine et la fréquence cardiaque augmentent rejoignant alors le fait que l'OT joue donc un rôle dans la régulation cardiovasculaire mais aussi dans la locomotion (Lee et al., 1997 ; Richard et al., 1991).

2.1.2. Fonctions d'osmorégulation

Chez les mammifères, le système OT (et vasopressinergique) est impliqué dans le contrôle de l'osmolalité plasmatique (Margatho et al., 1993). Les neurones OT et AVP peuvent être qualifiés d'osmorécepteurs, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à la concentration en électrolytes contenue dans le sang. Ainsi une hyperosmolalité induit une stimulation des neurones OT entraînant une augmentation de la sécrétion d'OT. L'OT sécrétée va alors agir (avec l'AVP) au niveau du rein et va promouvoir l'anti-diurèse et la natriurèse (Verbalis et al., 1991 ; Ozaki et al., 2004 ; Bourque et Oliet, 1997). Une injection ip d'une solution saline hypertonique active les neurones OT ce qui se manifeste par une augmentation de l'expression de c-fos dans le PVN et SON (Pirnik et al., 2004). L'absorption par voie orale d'une solution à 2 % de sel entraîne une augmentation des niveaux de l'ARNm codant pour l'OT dans le PVN et le SON (Lightman et Young, 1987) et une augmentation de la sécrétion d'OT dans le sang (Meister et al., 1990). Une hyperosmolalité chronique augmente le nombre de neurones co-exprimant OT/AVP (Kiyama et Emson 1990). Dans cette condition de déshydratation, la queue polyA des ARNm codant pour l'OT et pour l'AVP s'allonge de quelques centaines de résidus (Carter et Murphy, 1991) tandis qu'une hypo-osmolalité n'a aucun effet (Svane et al., 1995). Notons l'importance des astrocytes dans l'osmosensibilité des neurones OT. En effet, lors d'une hyperosmolalité, les astrocytes libèrent moins de taurine. Or la taurine est un inhibiteur puissant agissant sur les récepteurs inhibiteurs de la glycine conduisant alors à la désinhibition des neurones magnOT (Prager-Khoutorsky et Bourque, 2015).

2.1.3. Prise alimentaire

Les neurones OT ainsi que leurs projections permettent de moduler la prise alimentaire et les fonctions gastriques. L'injection d'OT au niveau du noyau dorsal du nerf vague (DMV) augmente la sécrétion d'acide gastrique (Rogers et Hermann, 1985). Les projections des neurones OT dans ce même noyau ont pour effets de diminuer le tonus gastrique et la motilité, et ce, soit par une inhibition des neurones cholinergiques du DMV qui se projettent dans le tractus gastrique ou soit par une activation des neurones inhibiteurs NANC (non adrénergiques

et non cholinergiques) qui se projettent également dans le tractus gastrique (Holmes et al., 2013).

L'OT au niveau central est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et dans le contrôle de la balance énergétique. Suite à une prise alimentaire, la concentration plasmatique d'OT augmente (Verbalis et al, 1986). L'injection centrale ou périphérique d'OT chez des rats entraîne une diminution de la prise alimentaire de façon dose-dépendante (Arletti et al., 1989). L'approche pharmacologique montre que l'injection au niveau central d'un antagoniste de l'ocytocine augmente la prise alimentaire (Arletti et al., 1989 ; Olson et al., 1991). Ces études mettent en évidence le rôle satiétogène de l'OT. Même s'il est montré que les neurones OT sont nécessaires pour le comportement alimentaire, les projections des fibres OT le sont tout autant. En effet, une lésion des projections des neurones OT au niveau du cerveau postérieur conduit à une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel chez les rats (Shor-Posner et al., 1985 ; Sims et Lorden, 1986). La libération d'OT et l'augmentation de l'activité des neurones OT sont corrélées avec la fin de la prise alimentaire. L'effet satiétogène est médié par un effet endocrinien via les neurones magnOT et un effet central via les neurones parvOT projetant dans le tronc cérébral. Les neurones parvOT reçoivent des projections de neurones synthétisant de la leptine, de la ghréline, des neuropeptides Y et de la pro-opiomélanocortine, entres autres. Or toutes ces populations de neurones sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. Les projections des neurones parvOT vers l'hypophyse sont également importantes pour contrôler la libération de plusieurs classes d'hormones régulant la prise alimentaire.

Il est possible d'imaginer que les projections réciproques intra-hypothalamiques des neurones OT permettent de potentialiser l'effet satiétogène des neurones parvOT. La libération endocrine d'OT par les neurones magnOT pourrait être contrôlée par la libération de CCK au niveau du duodénum suite à l'ingestion de nourriture, et ce au travers des projections des neurones noradrénergiques provenant du groupe de cellules A2 (Onaka et al., 2012).

Un point de vue intéressant a été développé dans une étude récente. Il est proposé que l'effet anorexigène attribué à l'OT n'est en fait pas lié au maintien de la balance énergétique mais plutôt à des paramètres indépendants de la prise alimentaire associés à la consommation : distension excessive de l'estomac, osmolalité plasmatique élevée et l'évitement des aliments dangereux (Klockars et al. 2015).

L'étude de l'implication de l'OT dans la prise alimentaire a été renforcée grâce à l'utilisation de souris KO pour le gène de l'OT ou pour celui du récepteur de l'OT. Chez des souris déficientes pour le gène codant pour l'OT (Camerino, 2009) ou codant pour l'OTR (Takayanagi et al., 2008), la prise alimentaire n'est pas modifiée. Cependant, ces souris KO présentent une prise de poids élevée accompagnée d'une augmentation de leur masse grasse abdominale (Camerino, 2009 ; Takayanagi et al., 2008). Il est intéressant de noter aussi que les souris KO pour le gène codant pour l'OTR consomment significativement plus de nourriture à chaque repas mais le nombre de repas est diminué (Leng et al., 2008). Chez l'Homme sain, l'effet satiétogène de l'OT n'a jamais été formellement démontré. Par contre, l'injection intranasale d'OT chez des sujets atteints d'obésité diminue la prise alimentaire (Thienel et al., 2016). Dans le syndrome de Prader-Willi, les patients souffrent d'hyperphagie conduisant à une obésité morbide. Chez ces patients, les neurones OT dans les PVN sont significativement moins nombreux (Swaab et al., 1995). Connaissant l'implication de l'OT dans la prise alimentaire, l'hyperphagie des femmes observée au cours de la grossesse semble donc s'expliquer par une inhibition du système OT (Douglas et al., 2007).

2.1.4. Reproduction

L'OT est clairement impliquée dans le contrôle des fonctions reproductrices au niveau central et périphérique allant de la pulsion sexuelle jusqu'aux contractions utérines. Tout d'abord, il est important de mentionner que l'OT est impliquée dans le contrôle central du cycle menstruel et ce grâce à son interaction avec les hormones de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH ; Caligioni et al., 2007 ; Salehi et al., 2017) : l'OT neurosécrétée module la durée du cycle œstral en influençant la lutéinisation folliculaire (Johnston et al., 1990). Dans l'ovaire, l'OT influence également la production d'hormones stéroïdiennes ovariennes (McCracken et al., 1996), elles-mêmes agissant sur les neurones OT.

Pendant l'accouplement, l'OT est cruciale dans les réflexes somatiques au niveau des organes génitaux. L'injection d'OT en icv diminue le temps de latence de l'éjaculation chez des rats mâles tandis que l'injection d'un antagoniste à l'OT en icv bloque l'éjaculation (Clément et al., 2013). De plus, la lésion du PVN réduit la concentration d'OT dans la moelle épinière entraînant une diminution de la quantité de sperme mais sans affecter l'éjaculation elle-même (Truitt et Coolen, 2002). L'injection d'antagoniste d'OT au niveau de la lombaire 6 de la moelle épinière (et non T13) réduit les contractions des muscles bulbo-spongieux et par

conséquence l'éjaculation (Clément et al., 2008). Comme développé précédemment, les neurones magnOT libèrent de l'OT à la fois au niveau central et à la fois au niveau périphérique. Des études montrent que les neurones parvOT sont affectés par l'OT qui à terme facilite le réflexe génital via les noyaux parasymphatiques sacrés de la moelle épinière. La libération d'OT dans la circulation sanguine est également impliquée dans la facilitation de l'éjaculation tandis que l'OT centrale semble être plus impliquée dans l'érection (Kita et al., 2006 ; Veening et al., 2015). Les concentrations plasmatiques d'OT augmentent tout au long de la relation amoureuse jusqu'à atteindre une concentration maximale lors de l'orgasme. Cette concentration maximale d'OT pourrait être à l'origine de la contraction des fibres musculaires lisses du système reproducteur (Carmichael et al., 1987).

Chez la femelle, l'injection icv d'OT favorise la position de lordose (Caldwell et al., 1986) mais cet effet dépend du site d'injection de l'OT et il semble dépendre aussi de l'activité de l'hypothalamus ventro-médial (VMH). L'effet de l'OT semble en interaction étroite avec l'œstradiol et la progestérone. L'ensemble de ces données pourrait expliquer le lien entre le cycle œstral et le comportement de lordose chez le rat. De plus, le VMH qui reçoit des afférences provenant de diverses régions pourrait servir de relais pour les comportements sexuels (Veening et al., 2015). Comme chez le mâle, les fibres OT projetant sur les parties lombo-sacrées de la moelle épinière sont impliquées dans le contrôle des organes pelviens lors de la copulation. Toujours chez la femelle, l'expression et la sécrétion d'OT sont fortement modifiées durant la grossesse, la parturition et l'allaitement. Durant la grossesse, l'accumulation d'OT dans les neurones magnOT est due à différents facteurs : la polyadénylation des ARNm, l'augmentation de l'expression du peptide et l'inhibition de la libération de l'OT (Zingg et al., 1989 ; Zingg et Lefebvre 1988 ; Douglas et al., 1993). Lors de la parturition, la libération massive d'OT est due à l'augmentation de la production de prostaglandines par l'utérus. En effet, les prostaglandines provoquent une chute de la production de progestérone ayant pour conséquence une augmentation de l'expression des OTR dans l'utérus et des contractions des cellules myométriales (Leng et al., 2005). Les contractions utérines transmettent le signal via les nerfs vague et pelvien au niveau du noyau du tractus solitaire, dans lequel les neurones noradrénergiques (A2) projettent sur les neurones OT (Douglas et al., 2001). Ainsi le NA libéré dépolarise les neurones OT permettant la libération d'OT. Un rétrocontrôle positif est donc établi entre les contractions utérines et les neurones OT (Leng et al., 2005).

L'implication de l'OT dans la reproduction n'est donc plus à démontrer même si des différences sexe-spécifiques ont été mises en évidence. L'injection d'OT en icv entraîne une érection pénienne (Argiolas et al., 1987 ; Argiolas et al., 1985), une augmentation des performances copulatrices (Arletti et al., 1985) tandis que des lésions du PVN induisent une diminution de l'effet pro-érectile de l'OT (Argiolas et al., 1987 ; Argiolas et al., 1993). Comme développé précédemment, chez la femelle, l'injection d'OT favorise la lordose (Arletti et Bertolini, 1985) mais aussi la réceptivité sexuelle (Caldwell et al., 1986) et la maturation sexuelle. L'ajout d'un antagoniste des OTR en ip entraîne un retard vaginal sans retard de la première période de fertilité (Parent et al., 2008).

Autre point important à noter, un niveau élevé d'OT au niveau central pourrait avoir des effets opposés et pourrait contribuer à des sentiments de satisfactions sexuelles chez les mâles. L'OT ne semble pas exercer ses effets seule. Par exemple, la testostérone est nécessaire pour que l'OT ait ses effets sur l'érection tout comme la synthèse de monoxyde d'azote. Enfin, il existe une interaction étroite entre le système OT et les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques (Lee et al., 2009).

2.1.5. Comportement social : lien de couple, interaction sociale, comportement maternel

Lien de couple

Jusque-là, nous avons pu voir l'implication de l'OT dans le contrôle des organes génitaux pour l'accouplement mais l'OT a également un rôle clair dans l'établissement du lien de couple (Veening et al., 2015 ; Insel et al., 1998). Comme développé ci-dessus, la distribution des OTR est différente selon les espèces. Au sein des différentes espèces des campagnols, la distribution des OTR (et récepteurs AVP) est différente et celle-ci est corrélée avec la fidélité du partenaire (Young et al., 1999 ; Young et al., 1998). Ces liens de couple envers un partenaire ou envers sa progéniture peuvent être très forts et la rupture de ce lien peut avoir des conséquences néfastes pour l'individu. Le meilleur terme pour décrire en fait ce lien est le sentiment « d'amour » et même si ce terme ne semble pas scientifique, il est parfaitement défini. L'amour n'est donc pas « seulement » une émotion mais un processus biologique impliquant les réseaux neuronaux (Carter et Porges, 2012). Chez les campagnols des prairies femelles donc monogames, l'OT facilite les liens de couple, probablement due à sa libération durant l'accouplement (Lee et al., 2009a). L'administration d'antagoniste de l'OT au niveau central empêche la préférence de

partenaire chez les campagnols de prairie (Cho et al., 1999). De plus, la capacité de l'OT à favoriser ce lien dépend de sa concentration (Bales et al., 2007a). Chez l'Homme, le rôle de l'OT dans l'établissement de ce lien est moins clair. Les études montrent soit une facilitation ou soit aucun effet sur la préférence des partenaires ce qui laisse supposer l'implication de plus importante du système AVP ou une interaction des systèmes OT/AVP plus complexe (Bales et al., 2007b ; Lee et al., 2009a).

Interaction sociale et reconnaissance sociale

L'utilisation de souris KO pour l'OT a permis de mettre en évidence l'OT dans le comportement social car l'absence d'OT chez ces souris entraîne des troubles du comportement social (Ferguson et al., 2000). L'OT semble jouer un rôle dans la reconnaissance sociale notamment via la capacité de reconnaissance des odeurs. En effet, l'OT module le contrôle cortical du traitement olfactif qui facilite la reconnaissance sociale (Oettl et al., 2016). Les souris mâles KO pour l'OT ne parviennent pas à développer une mémoire sociale, et la comparaison avec les souris « Wild Type » (WT) a montré que l'activation dans l'amygdale médiale est nécessaire pour cette mémoire. Mais il faut noter que les déficits sont spécifiques à la mémoire sociale et non à la sociabilité en général. Les mêmes observations ont été faites chez des souris KO pour l'OTR (Lee et al., 2009). Chez des souris femelles, des résultats similaires sur le rôle de l'OTR dans l'amygdale médiale dans la modulation de la reconnaissance sociale ont été obtenus (Choleris et al., 2007). Une revue intéressante concernant la modulation des circuits neuronaux pour le comportement social est proposée dans la publication suivante (Marlin et Froemke, 2017).

Afin d'aller interagir avec les autres et avoir confiance en eux, l'Homme doit avoir un certain niveau de confiance en lui. Chez l'Homme, l'injection d'OT par voie intranasale entraîne une augmentation de la confiance en lui (Cardoso et al., 2012) et en les autres (Kosfeld et al., 2005). Une étude basée sur la confiance/trahison entre des joueurs d'argent montre que l'injection d'OT par voie intranasale augmente le montant confié à son partenaire illustrant une augmentation de la confiance en ses partenaires (Kosfeld et al., 2005). Chez des patients atteints d'autisme, la concentration plasmatique d'OT est significativement plus faible comparée à celle de personnes saines (Modhal et al., 1998). En parallèle à cette diminution d'OT, une étude montre une augmentation des niveaux d'OT dit « avec extension » qui semble due à une altération des mécanismes de clivage de l'OT chez ces patients (Green et al., 2001). L'injection

intranasale d'OT chez des patients autistes entraîne une amélioration du comportement social et de la prise de décision en société (Andari et al., 2010 ; Guestella et al., 2016).

Comportement maternel

La libération d'OT au niveau central et périphérique est indispensable pour la lactation, ce qui est illustré par l'absence de lactation chez des souris déficiente en OT (Nishimori et al., 1996). Chez les rats femelles, le comportement maternel n'apparaît qu'après la parturition. L'injection d'OT en icv chez des rates vierges induit un comportement maternel caractérisé par 5 critères : la confection d'un nid, le regroupement, la récupération d'un petit suite à un isolement, le léchage et la prise d'une position d'accroupissement spécifique à côté des jeunes souriceaux (Pedersen et al., 1979). L'injection d'antagoniste de l'OT entraîne une diminution du comportement maternel chez la rate (van Leengoed et al., 1986). Chez des souris KO pour le gène de l'OT, le comportement maternel est fortement altéré (Pedersen et al., 2006). Elles présentent un taux d'infanticide égal à 100 % (Ragnauth et al., 2005). Même si l'OT semble extrêmement importante pour la mise en place du comportement maternel, son implication dans son maintien semble être tout autre. En effet, la lésion du PVN après la mise en place du comportement maternel, ne modifie pas cette relation préalablement mise en place entre la mère et son petit (Kendrick, 2000 ; Insel et Harbauch, 1989).

De plus, le comportement maternel est complexe car il ne comprend pas seulement l'éducation de la progéniture mais entraîne différents changements chez la mère dont des changements dans le système olfactif et auditif afin de permettre la reconnaissance de sa progéniture et de l'écoute de ces petits, changement de comportement sexuel, changement du niveau d'agressivité de la mère afin de protéger ses petits... Tous ces comportements impliquent l'OT en combinaison avec d'autres facteurs. Une étude récente s'est intéressée au rôle de l'OT dans la modulation du cortex auditif. Il a alors été montré que le système OT au niveau du cortex auditif gauche et pas le droit permet la récupération des petits en améliorant la pertinence de leurs appels (Marlin et al., 2015). Il a également été montré chez des souris que les zones cérébrales impliquées dans le comportement maternel expriment davantage d'OTR (Mitre et al., 2016b). Plus de détails sur les modifications du système OT impliquées dans le comportement maternel sont disponibles dans différentes revues (Lee et al., 2009 ; Veening et al., 2015).

Chez l'Homme, la concentration plasmatique d'OT au cours de la grossesse est stable. Cependant, il a été montré que la concentration plasmatique d'OT durant la grossesse était nécessaire afin de préparer le comportement maternel après la naissance. Les futures mères ayant une concentration d'OT importante au début de leur grossesse ou qui présentent une augmentation de cette concentration entre le premier et le dernier trimestre de grossesse développent des processus cognitifs facilitant la mise en place et le développement du comportement maternel et du lien mère-enfant (Feldman et al., 2007 ; Feldman et al., 2010 ; Levine et al., 2007).

2.1.6. Anxiété et stress

De nombreuses observations ont établi un lien entre l'OT et le stress. Tout d'abord, l'OT agit sur l'axe corticotrope, aussi appelé axe du stress (Neumann, 2002 ; Neumann et al., 2000). De façon générale, après un stress physique ou psychologique, différentes hormones telles que des corticoïdes (CRH, ACTH, ...) sont sécrétées afin de faire face à la situation entraînant une augmentation de libération d'OT. En effet, l'administration icv de CRF augmente la concentration plasmatique d'OT sans modifier celle de l'AVP (Bruhn et al., 1986) suggérant ainsi que la CRH peut moduler la sécrétion d'OT. Les neurones OT du PVN possèdent des récepteurs au CRH (Arima et Aguilera, 2000). Ainsi lors d'un stress, il y a augmentation de la sécrétion de CRH entraînant une augmentation de la concentration d'OT. Ceci va alors stimuler la sécrétion d'ACTH agissant à son tour sur les cellules de la corticosurrénale responsable de la libération du cortisol et permettant de réguler le stress.

Deuxièmement, l'OT est un anxiolytique puissant. Les souris KO pour l'OT présentent un niveau d'anxiété plus élevé que les souris ayant le gène de l'OT (Amico et al., 2004). L'injection icv d'OT chez ces souris permet de restaurer le phénotype WT médié par les OTR (Mantella et al., 2003). Par exemple, la libération d'OT lors de l'accouplement chez la souris réduit leur comportement anxieux, effet supprimé par l'administration d'un antagoniste des OTR (Waldherr et Neumann, 2007). La perfusion d'OT dans les PVN a des effets anxiolytiques mesurés à la fois dans le labyrinthe en croix surélevé (EPM) et dans la boîte claire-obscur (Blume et al., 2008). De plus, suite à l'injection iv d'OT, une diminution dose-dépendante de la concentration plasmatique de corticostérone a été observée lors de l'exposition à un stress auditif. L'injection icv d'OT diminue le stress produit par un bruit (Windle et al., 1997) ou l'anxiété induite par un nouvel environnement (Uvnas-Moberg et al., 1994 ; Windle et al.,

1997). De façon intéressante, il a été montré que chez des souris ovariectomisées, l'effet anxiolytique de l'OT est observé mais seulement quand elle est associée avec des œstradiols, mettant une fois de plus en lumière une certaine dépendance de l'OT avec les hormones sexuelles (McCarthy et al., 1996). Enfin, l'OT semble réduire l'anxiété *post-partum* car l'injection dans la PAG d'un antagoniste des OTR augmente l'anxiété chez des rates allaitantes et non chez des rates vierges (Figueira et al., 2008).

Au vue des effets bénéfiques de l'OT chez les rongeurs, il a été testé chez les patients atteints d'anxiété sociale. L'injection intranasale d'OT entraîne une inhibition des régions cérébrales associées à la peur entraînant une diminution de l'anxiété (Jones et al., 2017).

D'intérêt pour le travail qui sera présenté par la suite, l'effet anxiolytique de l'OT est lié à son action dans l'amygdale. Chez des femelles ovariectomisées, l'injection d'OT dans l'amygdale centrale (CeA) entraîne une diminution de l'anxiété et cet effet n'est pas observé lorsque l'OT est injectée dans le VMH (Bale et al., 2001). Ceci démontre le rôle clé de l'OT dans la régulation d'émotions négatives (qui sera développée dans la partie suivante 2.2) par son action dans l'amygdale, en particulier dans le CeA.

2.1.7. Douleur

La douleur a été définie par l'association internationale pour l'étude de la douleur comme suit : « La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée avec des dommages tissulaires potentiels ou réels ». La douleur résulte de l'activation des neurones nociceptifs induite par des stimulations nociceptives périphériques de type mécanique, thermique ou chimique. En effet, ces stimuli douloureux sont détectés en périphérie par les récepteurs nociceptifs localisés au niveau des terminaisons nerveuses de la peau, des viscères... L'information douloureuse est alors transmise à travers les axones des neurones des ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG) jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière qui remonte ensuite jusqu'au cerveau. Ceci constitue la voie ascendante de la douleur tandis que la voie descendante est constituée par les projections du SNC sur différentes zones du cerveau et de la moelle épinière afin de diminuer le signal douloureux. Ces deux voies ne sont pas développées ici (voir Ossipov et al., 2010). L'implication de l'OT dans le contrôle de la douleur sera au centre de cette partie.

Le lien entre OT et douleur n'a pas toujours été si évident. La première étude s'intéressant au rôle de l'OT dans le contrôle de la douleur n'a pas permis de confirmer le lien entre les deux notions (Millan et al., 1984). Mais depuis, il a été montré que l'injection d'OT en ip ou icv a un effet analgésique chez des rats tandis que l'injection d'un antagoniste de l'OT entraîne une hyperalgésie (Uvnas-Moberg et al., 1992 ; Yang et al., 2007a). De plus, dans un modèle neuropathique chez le rat, la stimulation électrique du PVN diminue le seuil douloureux chez ces animaux. Cet effet analgésique est associé à une augmentation de la concentration d'OT que ce soit au niveau plasmatique, au niveau du liquide céphalo-rachidien ou encore au niveau de la concentration protéique en OT dans les tissus de la moelle épinière (Martínez-Lorenzana et al., 2008).

L'OT est donc fortement impliquée dans le contrôle de la douleur mais comment ? De nombreuses études montrent que l'effet analgésique de l'OT est dépendant de l'activation du système opioïdérique. L'injection d'antagoniste des récepteurs à la morphine (opioïdes) diminue l'effet analgésique de l'OT tandis que celle-ci potentialise et prolonge la durée de l'analgésie induite par la morphine (Arletti et al., 1993). L'injection conjointe d'OT avec des antagonistes des récepteurs opioïdériques diminue fortement l'effet analgésique préalablement observé (Yang, 1994 ; Ge et al., 2002 ; Wang et al., 2003). Il a été montré le même résultat dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rongeur (Yu et al., 2003). Plus récemment, une petite population de neurones OT de type parvOT (30 neurones) a été montrée comme étant capable d'inhiber la nociception chez des rats et d'améliorer l'analgésie dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rongeur. Il a été montré que l'analgésie induite par ces 30 neurones se faisait par deux processus distincts : *i*) en projetant sur des neurones « Wide Dynamic-Range » (WDR) localisés dans la moelle épinière et en les inhibant *ii*) en projetant sur des neurones magnOT du SON libérant de l'OT dans la circulation sanguine (Eliava et al., 2016). Une autre étude propose un nouveau site pertinent dans la modulation de la nociception : la peau. Depuis quelques années, il a été montré que l'OT et ses récepteurs sont exprimés dans les kératinocytes de la peau (Denda et al., 2012 ; Gonzalez-Hernandez et al., 2017). L'activation des OTR localisés dans la peau contribue à diminuer l'analgésie (Gonzalez-Hernandez et al., 2017). Une FIGURE illustre l'effet analgésique de l'OT libérée au niveau central (FIGURE 23).

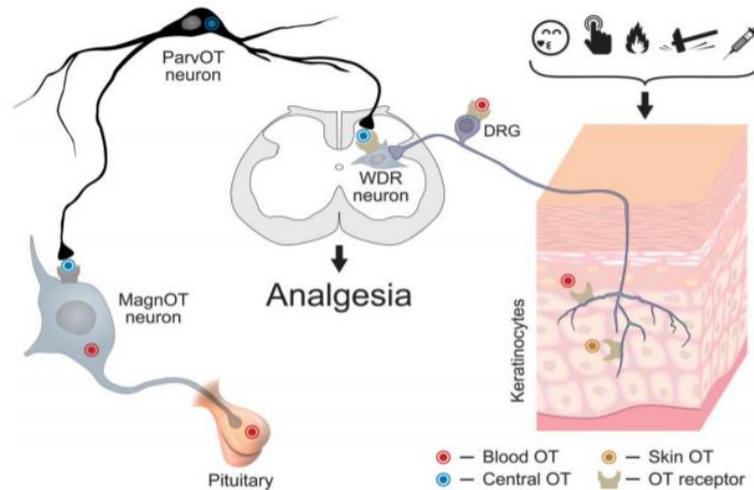


FIGURE 23 : Mécanismes de l'effet analgésique périphérique de l'OT. L'OT peut agir selon trois voies : libération centrale d'OT inhibant directement l'activité des neurones WDR ; libération sanguine d'OT inhibant les neurones DRG ; libération par la peau d'OT inhibant directement l'excitabilité des fibres nociceptives. Abréviations : WDR : Wide dynamic range; DRG : dorsal root ganglion (adaptée à partir de Grinevich et Charlet, 2017).

Cet effet bénéfique de l'OT sur la douleur est également retrouvé dans des études faites chez l'Homme (Paloyelis et al., 2016 ; Tracy et al., 2015). Pour cela, les études faites utilisent principalement comme voie d'administration d'OT la voie intranasale (Paloyelis et al., 2016 ; Zunhammer et al., 2015 ; Rash et Campbell, 2014) même si quelques-unes utilisent l'injection intrathécale (Yang, 1994 ; Eisenach et al., 2015) et une seule l'injection intraveineuse (Louvel et al., 1996). L'injection intranasale d'OT permet de diminuer l'intensité de la douleur (Paloyelis et al., 2016). Dans une autre étude, il a été montré que l'injection intrathécale d'OT chez des patients souffrant de douleur du dos modifie la concentration d'OT dans le liquide cérébro-spinal et plasmatique entraînant une analgésie (Yang, 1994). Quant à l'injection continue d'OT par voie iv, il a été montré qu'elle entraîne une augmentation du seuil de douleur illustrant ainsi l'effet analgésique induit par l'OT (Louvel et al., 1996).

2.1.8. Peur

La peur est une émotion étudiée au cours de mon travail de thèse. Cette émotion sera plus largement développée par la suite dans la partie 2.3.

Le lien entre OT et peur est parfaitement établi. L'OT exerce un effet inhibiteur dans le comportement de peur à travers des mécanismes centraux et périphériques. Chez des rongeurs, l'injection icv d'OT ou une stimulation des neurones OT diminuent le comportement de peur,

illustré par une diminution du temps de freezing (Knobloch et al., 2012 ; Toth et al., 2012 ; Modi et al., 2016). L'administration centrale d'OT entraîne une fixation de l'OT sur ses récepteurs présents dans de nombreuses zones cérébrales dont ceux présent dans le CeL, inhibant ainsi ces neurones projetant eux-mêmes vers d'autres régions cérébrales impliquées dans la régulation de la peur (Viviani et al., 2011 ; Huber et al., 2005). Des lésions de l'amygdale entraînent une diminution du temps de freezing dans un contexte de peur (Goosens and Maren, 2001 ; LeDoux et al., 1990 ; Maren, 1999 ; Wallace et Rosen, 2001). Il en est de même avec une inactivation de la CeA (Wilensky et al., 2006). L'administration périphérique d'OT a été montrée pour réduire l'anxiété mais ne semble pas diminuer spécifiquement le comportement de peur (Uvnas-Moberg et al., 1994 ; Ayers et al., 2011). Cette différence d'efficacité entre l'administration centrale ou périphérique d'OT pourrait s'expliquer par des propriétés pharmacocinétique du neuropeptide différentes selon le compartiment.

Différentes lignées de souris transgéniques ont également permis de mettre en avant l'implication des systèmes OT et AVP dans la régulation de la peur. Cependant, les lignées de souris KO pour les OTR ou pour les AVPR de type 1A ne montrent pas de modification du temps de freezing suite à un comportement de peur. Après le sevrage des souris, la perte des OTR dans la partie cérébrale antérieure entraîne une diminution du freezing chez ces animaux (Pagani et al., 2011). Les OTR et AVPR ont donc une grande importance pour la régulation de la peur (Veinant et Freund-Mercier, 1997). Il est également important de noter que même si l'OT est fortement impliquée dans le comportement de peur, elle n'en modifie pas son apprentissage mais en facilite l'oubli (Toth et al., 2012a).

Ces résultats ont également été retrouvés lors d'études faites chez l'Homme. L'injection intranasale d'OT renforce le phénomène d'oubli (Eckstein et al., 2015 ; Acheson et al., 2013) en inhibant l'amygdale elle-même (Milad et al., 2007 ; Milad et al., 2012), et en renforçant les connexions amygdale-cortex préfrontal, importantes pour la mémoire (Sripada et al., 2012). Cependant, des différences sexe-spécifiques dans les processus de mémorisation des émotions et dans leurs régulations ont été mises en avant (Mackiewicz et al., 2006 ; Domes et al., 2010b). Ces différences semblent s'expliquer par une activation de l'amygdale face à la peur modulée par les progestérones et les œstrogènes (Andreano et al., 2010 ; Goldstein et al., 2005 ; Goldstein et al., 2010).

2.2. Emotions

Même si le terme « émotion » vient du latin *emovere* signifiant mouvement vers l'extérieur, il en existe de nombreuses définitions dont une récente : « Une réaction mentale, ressentie subjectivement comme un ressenti fort, habituellement dirigée vers un objet spécifique et typiquement accompagnée par des changements physiologiques et comportementaux » (Meriam-webster, 2017). Cette définition est basée sur celle définie par un célèbre psychologue Scherer en 1999 : « la peur est processus rapide qui englobe des changements plutôt massifs, interdépendants, se produisant dans de nombreux sous-systèmes organismiques en réponse à un événement perturbant d'un intérêt central pour l'individu ». En d'autres termes, selon Scherer, l'émotion est constituée de cinq facteurs : la réponse neurophysiologique (dans le système nerveux central et autonome), l'expression motrice (faciale, vocale ou gestuelle), la tendance à l'action (en fonction de l'émotion c'est-à-dire la tendance à fuir pour la peur), l'évaluation cognitive de la situation et le sentiment subjectif. Même si l'ensemble des animaux et des humains partage des homologues pour les quatre premiers facteurs, il semble qu'il en est autrement pour le dernier facteur. En effet, le sentiment subjectif semblerait être une particularité de la conscience humaine. Cependant, d'un point de vue évolutif, il semblerait illogique de penser l'existence d'une discontinuité entre les animaux et les humains pour ce facteur seulement. Il est alors possible d'envisager que les animaux aient une autre forme de conscience, différente de la nôtre (McFarland, 1985). De plus, il a été montré que l'ensemble des animaux non-humains possède tous les substrats neurologiques nécessaires à la formation de l'état de conscience (LeDoux, 1996 ; « The Cambridge declaration on consciousness », 2012).

Les émotions sont diverses et variées : joie, peur, anxiété, amour... Elles peuvent être réparties en deux catégories selon l'effet qu'elles procurent. Ainsi une émotion sera dite positive si elle apporte un bénéfice pour l'individu et à l'inverse, elle sera dite négative lorsqu'elle a pour but de faire réagir face à une situation qui est non bénéfique ou dangereuse pour l'individu. Pour parler d'émotions chez les animaux, la valeur de l'émotion est prise en compte. On parlera alors d'émotions à valence positive ou à valences négative.

2.3. Peur/Anxiété

La peur a été une des émotions sur laquelle mon travail de thèse a porté. Tout comme le terme émotion, de nombreuses définitions existent pour la « peur ». Le français usuel définit la peur comme « une émotion qui accompagne la prise de conscience d'un danger, d'une menace » et de nombreux synonymes à la peur existent : affolement, alarme, anxiété, inquiétude, terreur, panique, aversion Cependant, dans le monde scientifique et médical, les définitions sont multiples et variables selon l'angle de vue. Afin de ne négliger aucun aspect de ce terme, la définition retenue est la suivante : la peur est « un état émotionnel négatif, induit par la perception d'un danger réel (peur) ou potentiel (anxiété) qui menace le bien-être de l'individu » (Jones, 1996 ; Boissy et al., 1998). Les termes peur et anxiété, émotions négatives proches, sont ainsi définis de façon distincte.

2.3.1. Circuit de la peur

Face à une situation de peur, le rythme cardiaque s'accélère tout comme la respiration, les poils se dressent... Ces informations sensorielles générées par la peur vont remonter jusqu'au thalamus, zone centrale du cerveau où elles seront analysées par des structures corticales supérieures et par l'hippocampe avant d'être transmises à l'amygdale. Des réponses comportementales vont alors se mettre en place afin de faire face à la situation de peur.

L'ensemble du circuit de la peur a été récemment identifié (FIGURE 24). Ce circuit implique de nombreuses régions cérébrales situées de façon plus ou moins rapprochée. La région au cœur de ce circuit est nommée l'amygdale ou complexe amygdalien (Tovote et al., 2015).

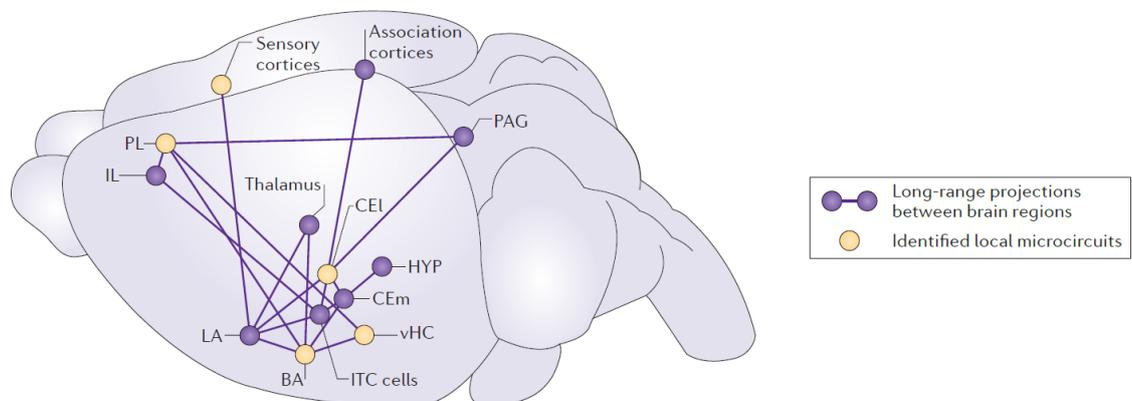


FIGURE 24 : Circuit de la peur. Les états de peur sont médiés par des connexions excitatrices et inhibitrices à longue distance entre de nombreuses aires du cerveau. Des connexions réciproques sont illustrées entre l'amygdale basale (BA) et l'hippocampe ventral ainsi qu'entre BA et le cortex pré-linguistique. Les neurones de l'amygdale centrale projettent à leur tour vers d'autres régions hypothalamiques ou du tronc cérébral permettant d'induire un comportement de peur. Abréviations en anglais : CEL, lateral central amygdala ; BA, basal amygdala ; CEm, medial central amygdala ; HYP, hypothalamus. L'ensemble des abréviations est disponible dans l'article à partir duquel le schéma a été adapté (Tovote et al., 2015).

L'amygdale est composée de plusieurs noyaux centrale, latérale et médiale, la partie centrale étant elle-même divisée en partie médiale (CeM) et partie latérale (CeL) (FIGURE 25, sur la page suivante). L'amygdale est impliquée dans l'acquisition et l'expression de la peur. L'ablation de l'amygdale entraîne une disparition complète des émotions dont la peur (Ranjbar et al., 2017 ; Ranjbar et al., 2016 ; Tippet et al., 2018). Par exemple, la suppression de l'amygdale chez le rat supprime tout comportement de peur lors de son exposition face à un chat (Blanchard et Blanchard, 1972). L'implication de l'amygdale dans le circuit de la peur a également été mise en évidence par une approche pharmacologique et optogénétique. L'inhibition des neurones de l'amygdale entraîne une inhibition de la réponse comportementale de peur tandis que la stimulation de ces neurones par optogénétique entraîne une réaction de peur chez les rongeurs (Tovote et al., 2015).

Même si l'amygdale est au centre du circuit de la peur, elle interagit avec de nombreuses autres régions cérébrales (Davis, 1992 ; Davis et al., 1994 ; LeDoux, 1996 ; Maren et Fanselow, 1996 ; Rosen et Schulkin, 1998 ; Fendt et Fanselow, 1999). Lors d'un stimulus de peur, les noyaux basal et latéral de l'amygdale reçoivent les informations sensorielles par voie directe et par des voies passant par des structures corticales (Aggleton et Mishkin, 1986 ; Campeau et Davis, 1995). L'amygdale basolatérale reçoit également des afférences provenant de l'hippocampe, région impliquée dans le conditionnement de peur lié à un contexte (Phillips et LeDoux, 1992 ; Maren et Fanselow, 1996), et des afférences provenant du télencéphale, région associée à l'état d'attention et de vigilance (Gallagher et Holland, 1994). Tout comme l'amygdale, la strie terminale reçoit des informations sensorielles. Ces deux régions projettent alors vers différentes structures impliquées dans l'expression de la peur. Le CeA projette vers la PAG qui est impliquée dans le comportement de freezing, de fuite ou attaque, et vers la substance grise (Fanselow, 1994 ; Fox et Sorenson, 1994 ; Fendt et Fanselow, 1999 ; Bandler et al., 2000 ; Blanchard et al., 2001). Il projette également via la strie terminale vers les PVN (Aggleton et Mishkin, 1986 ; LeDoux, 1996), vers le cortex préfrontal, vers le cortex sensoriel... (Rosen et Schulkin, 1998).

De façon intéressante, le rôle central de l'amygdale dans le comportement de peur a également été démontré chez l'Homme grâce à un cas clinique très étudié : la maladie d'Urbach-Wiethe a entraîné la destruction bilatérale exclusive et complète de l'amygdale chez une patiente S.M. Elle ne présente alors plus aucune réaction de peur face à des situations terrifiantes pour l'Homme, mettant ainsi en évidence l'importance de l'amygdale dans ce

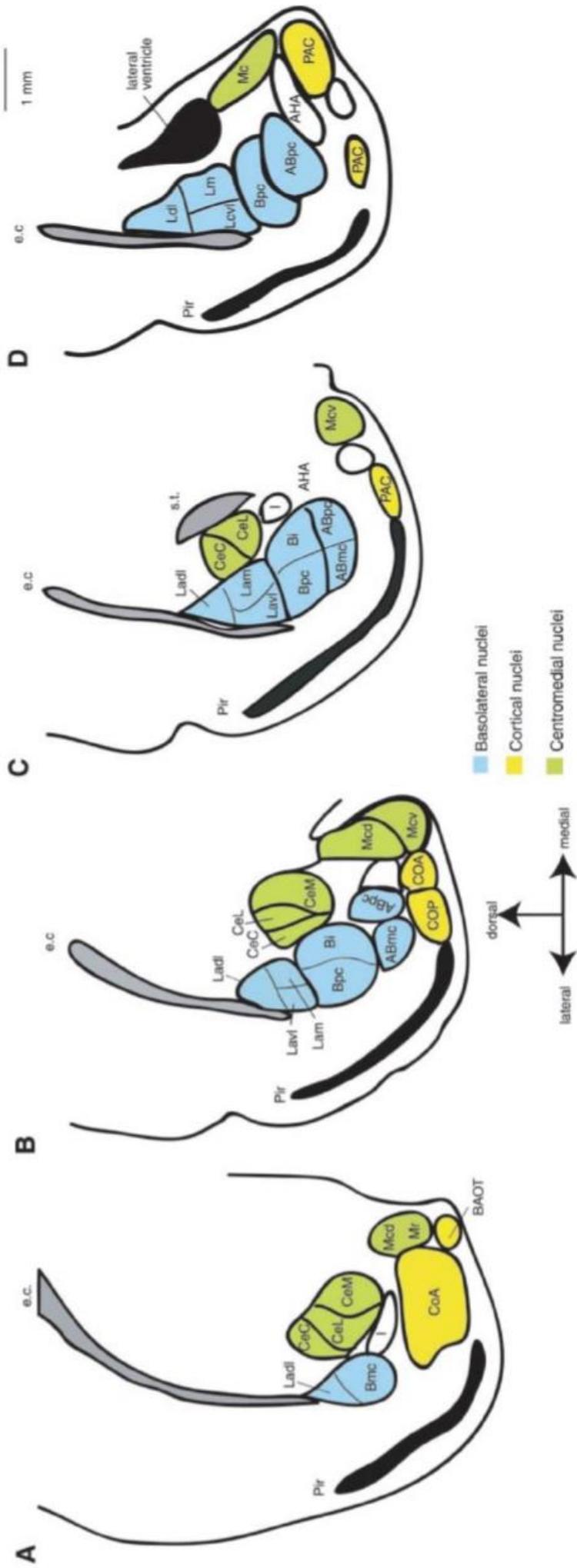


FIGURE 25 : Cartographie des différents noyaux constituant l'amygdale chez le rat. Les coupes coronales ont été dessinées de la partie rostrale (A) vers la partie caudale (D). L'amygdale est divisée en trois groupes comme décrits dans le texte : - en bleu, est représenté le groupe basolatéral de l'amygdale, - en jaune, le groupe cortical - en vert, le groupe centromédial. Abréviations en anglais : ABmc, accessory basal magnocellular subdivision ; ABpc, accessory basal parvocellular subdivision ; Bpc, basal nucleus magnocellular subdivision ; CeC/L/M, capsular, lateral and medial part of central nucleus ; COA(P), anterior and posterior cortical nucleus ; e.c., external capsule ; Ladi, lateral amygdala medial subdivision ; Lavi, lateral amygdala ventrolateral subdivision ; Mcd, medial amygdala ventrolateral subdivision ; Mcd, medial amygdala dorsal subdivision ; Mcv, medial amygdala ventral subdivision ; Mr, medial amygdala rostral subdivision ; PAC, periamygdaloid cortex, Pir, piriform cortex ; s.t., stria terminalis (adaptée à partir de Sah et al., 2003).

Le CeL possède des OTR tandis que le CeM exprime lui, les AVPR (Huber et al., 2005). De plus, l'application d'un agoniste des OTR sur le CeL exprimant des OTR entraîne une augmentation de l'activité des interneurons GABA du CeL, inhibant les neurones du CeM (Huber et al., 2005). L'inhibition des neurones AVP par l'action des neurones OT au sein du CeA pourrait être un exemple d'un mécanisme général d'inhibition de l'OT sur le circuit AVP et pourrait souligner les effets opposés attribués à l'OT et l'AVP dans différents comportements (Stoop, 2014 ; Viviani et Stoop, 2008). Il a également été montré que deux populations de neurones dans le CeM, dont l'une est inhibée par l'action de l'OT dans le CeL et l'autre n'est pas affectée par l'OT, projettent respectivement dans la PAG et le complexe vagal dorsal (CVD). La PAG étant impliquée dans le freezing et le CVD dans la régulation cardiovasculaire, la fréquence cardiaque et la durée du freezing ont alors été mesurées lors d'un conditionnement de peur. Il a alors été montré qu'un agoniste de l'OT inhibe le freezing chez des rongeurs. Il en est de même avec l'application d'un agoniste du GABA. Cependant, la fréquence cardiaque n'est pas modifiée par l'agoniste des OTR mais elle l'est par l'agoniste du GABA (Viviani et al., 2011). Cette étude a également montré que les interneurons du CeL sensibles à l'OT peuvent déclencher des réponses différentes selon le cas étudié, ici la peur, en agissant sur une sous-population de neurones de projection sur le CeM. La pertinence physiologique de la régulation des neurones du CeA par l'OT a aussi été étudiée. L'utilisation de l'optogénétique afin de stimuler spécifiquement les axones des neurones OT, a montré que l'activation de ces axones OT dans le CeL provoque les mêmes réponses dans les neurones GABA du CeA que celles observées suite à l'application d'OT exogène même si un autre composé semble intervenir : le glutamate. En effet, suite à un conditionnement de peur, la stimulation optique des fibres OT entraîne une augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) observée grâce à des enregistrements électrophysiologiques. L'application d'antagonistes des OTR et des récepteurs AMPA bloque entièrement cet effet tandis que l'application d'un antagoniste des récepteurs AMPA seul, le bloque partiellement. Ces résultats suggèrent l'implication de l'OT et du glutamate dans la réponse de freezing suite à un conditionnement de peur (Knobloch et al., 2012). Dans un conditionnement de peur lié à un contexte, la stimulation des axones OT au niveau du CeL réduit le freezing mettant ainsi en évidence que les rares fibres OT innervant le CeL sont suffisantes pour provoquer un changement drastique du comportement de freezing (Knobloch et al., 2012). L'ensemble de ces études montrent un microcircuit inhibiteur de l'amygdale qui permet de réguler le freezing suite à un conditionnement de peur (Haubensak et al., 2010).

L'étude des mécanismes cellulaires des effets de l'OT dans le CeA et comment ils affectent le comportement de peur sera au centre de la première partie de mon travail (ARTICLE 1).

2.3.2. Conditionnement de peur

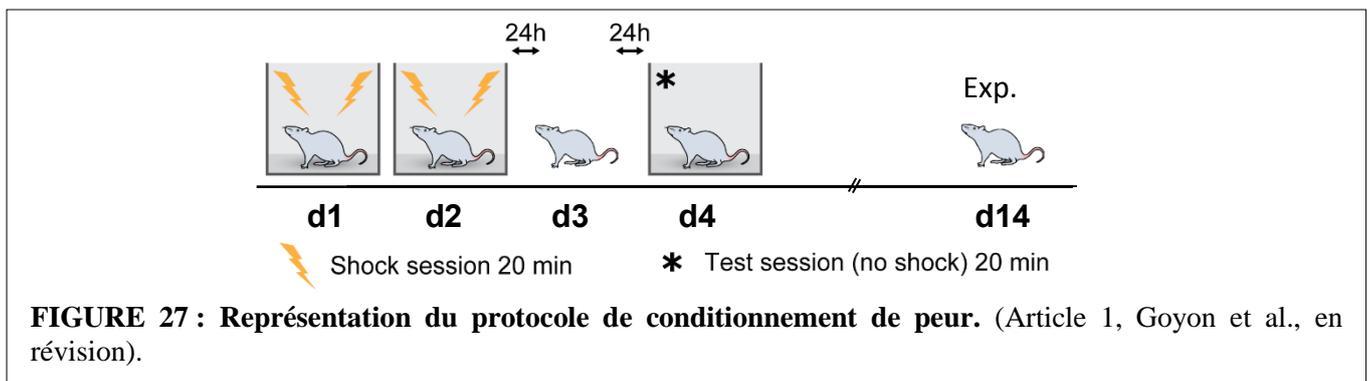
Bien avant le développement des neurosciences, il était considéré que l'esprit créait des idées en formant des associations entre les différents événements rencontrés au cours de la vie. Ces différents événements distincts sont associés soit en raison de leur synchronie temporelle ou spatiale, soit en raison de leur similitude. Deux sortes de conditionnements ont été mises en évidence : d'une part, deux stimuli sont expérimentés en même temps (Pavlov, 1927) et d'autre part quand le comportement est suivi de près par le stimulus (Thorndike, 1898). Ces deux types de conditionnement ont été nommés respectivement le conditionnement classique ou « Pavlovien » et le conditionnement opérant.

Lors de mon travail de thèse, seul le conditionnement classique au contexte a été utilisé, c'est pourquoi ce paragraphe s'intéressera uniquement à ce type de conditionnement (voir la revue de Olds, 1963 pour davantage d'informations concernant le conditionnement opérant).

Dans le conditionnement classique, Pavlov a observé que des chiens commencent à saliver simplement en présence de la personne lui donnant la nourriture et avant même la présentation de la nourriture. Ce phénomène de salivation anticipée a été appelée « sécrétion psychique ». Dans le but de reproduire ses observations, un modèle expérimental a été développé. Pavlov présentait un coup de sifflet juste avant d'apporter la nourriture à l'animal. Après plusieurs répétitions de ce procédé, le coup de sifflet entraîne une salivation en absence de présentation de la nourriture. Ce stimulus est donc associé par l'animal à l'arrivée de la nourriture, signe que le stimulus induit une réponse comportementale chez l'animal. En d'autres termes, le conditionnement est défini comme un processus d'apprentissage actif résultant de la capacité à susciter la réponse conditionnée à chaque présentation du stimulus conditionnant.

Basé sur cette étude, le conditionnement de peur a été développé. « L'expérience du petit Albert » a permis de montrer pour la première fois comment une émotion négative telle que la peur pouvait naître d'un conditionnement de peur. En effet, un rat a été présenté de façon répétée à un bébé. Celui-ci ne présentait alors aucune crainte vis-à-vis de l'animal. Par la suite, la présentation du rat à l'enfant a été associée à un bruit violent et fort et ce durant plusieurs

répétitions. Après cela, la seule présentation du rat suffit à induire un comportement craintif de la part de l'enfant (Watson et Rayner, 1917). Dans le conditionnement de peur, un stimulus initialement neutre (un contexte neutre) est associé avec un stimulus aversif (des chocs électriques). Après l'association de ces deux stimuli, l'animal développe une peur vis-à-vis du stimulus initialement neutre (FIGURE 27).



L'efficacité du conditionnement de peur est classiquement mesuré par la réponse de freezing (Anagnostaras et al., 2010 ; Fanselow et Bolles, 1979). Le freezing est la conséquence de l'activation du comportement de défense. Ce freezing induit par le conditionnement de peur s'accompagne d'autres modifications physiologiques telles qu'une modification du rythme cardiaque, d'une augmentation de la pression artérielle ainsi qu'une modification de la respiration (Fanselow et Wassum, 2015).

Basé sur ce conditionnement de peur lié à un contexte, je me suis intéressée à comprendre quelles étaient les conséquences d'un conditionnement de peur sur le système OT ? Comment le système OT était impliqué dans la peur ? L'ensemble de ce questionnement a fait l'objet d'une publication (Article 1).

3. RECRUTEMENT DU SYSTEME OXYTOCINERGIQUE

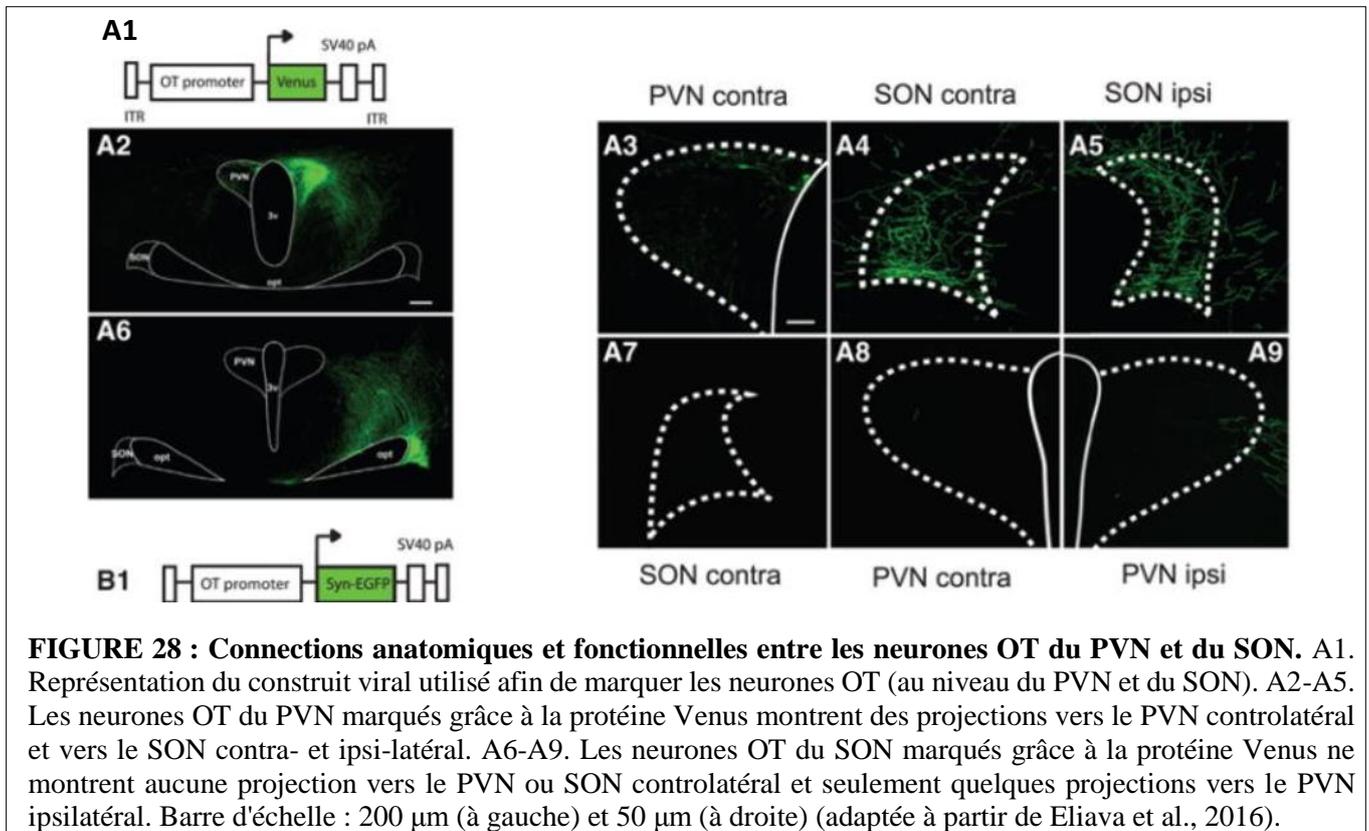
3.1. Au niveau intra-hypothalamique

La question de la facilitation de l'activité des neurones OT par l'OT elle-même, a été soulevée par l'activité synchrone des neurones OT observée lors de la lactation et de la tétée. Comme mentionné précédemment, la concentration plasmatique d'OT augmente

progressivement au cours de la grossesse induisant les contractions utérines uniquement lorsque la quantité d'OTR exprimée par les cellules myométriales est suffisante. Lors de ces contractions utérines, un rétrocontrôle positif se met en place entraînant une augmentation supplémentaire de la sécrétion d'OT. Il semblerait alors que les neurones OT répondent à la contraction utérine elle-même et non à la distension de ce dernier étant donné que la libération d'OT est corrélée avec l'augmentation de la pression intra-utérine et non à la distension utérine. L'activité en bursts des neurones OT observés à l'accouchement ou durant la lactation dure quelques secondes : la fréquence de décharges des neurones OT peut alors atteindre 100 Hz comparé à 0-10 Hz en conditions basales. Chaque burst est habituellement espacé de 5 à 10 minutes et est immédiatement suivi par une période silencieuse. Une des propriétés importantes de ces bursts est qu'ils sont coordonnés par les neurones OT du PVN et du SON (Belin et al., 1984). La synchronisation de ces bursts permet une libération massive d'OT dans la circulation systémique permettant le déclenchement des contractions rythmiques utérines ou de l'éjection de lait. Ce rôle primordial des bursts de l'OT pour la contraction utérine ou l'éjection de lait a également été prouvé par le fait que l'injection de morphine, inhibiteur de la sécrétion d'OT, (Pumford et al., 1993 ; Ruan et al., 2011) peut retarder la parturition (Luckman et al., 1993) et le réflexe d'éjection du lait (Clarke et al., 1979). Ces effets peuvent être contrebalancés par des injections répétées d'OT (Luckman et al., 1993 ; Pumford et al., 1993).

Mais il est alors intéressant de comprendre comment les neurones OT sont synchronisés ? L'activité synchrone et en burst des neurones OT semble due à la libération somato-dendritique d'OT induite par l'OT elle-même, se fixant alors sur les OTR de cette même cellule ou bien sur une cellule proche. Ceci confère alors à l'OT des modes d'action de type autocrine et paracrine (Meddle et al., 2007). La coordination de l'activité des neurones OT a pu être mesurée *in vivo* en enregistrant des paires de neurones localisées à la fois dans le PVN et à la fois dans le SON (Belin et Moos, 2006). Il semblerait que les neurones OT du PVN reçoivent des afférences du PVN contra-latérales mais également provenant du SON ipsi-latérales (Silverman et al., 1981). Ces observations ont été confirmées récemment grâce à l'utilisation d'un construit viral. En effet, l'injection d'un virus recombinant adéno-associé (rAAV) permettant l'expression du gène *venus* spécifiquement dans les neurones OT, a permis d'observer que les neurones OT du PVN projettent sur le PVN contra-latéral mais également sur le SON ipsi- et contra-latéral. Les neurones OT du SON quant à eux projettent uniquement sur le PVN ipsi-latéral mais jamais au niveau contra-latéral ni du SON ni du PVN (FIGURE 28).

Cette notion de connexions intra-hypothalamiques est renforcée par le fait que l'application d'agonistes ou antagonistes de neurones OT dans un noyau hypothalamique (PVN ou SON) modifie l'activité des neurones OT des autres noyaux (Lambert et al., 1993).



3.2. Au niveau extra-hypothalamique

3.2.1 Recrutement via un peptide

3.2.1.1. Cholecystokinine

La cholecystokinine, peptide gastro-intestinal, et ses récepteurs sont abondamment exprimés dans le SNC, notamment dans l'amygdale, le PVN (Vanderhaeghen et al., 1980). Plus précisément, la CCK est retrouvée dans les granules neurosécrétoires contenant l'OT laissant supposer une co-libération CCK et OT (Martin et al., 1983) et le recrutement du système OT. Il a alors été montré que la réponse OT observée suite à l'injection iv de CCK est supprimée en présence d'un antagoniste des récepteurs CCK (Luckman et al., 1993). La CCK a été montrée pour stimuler les neurones OT et ainsi entraîner une augmentation de la sécrétion d'OT (Bondy et al., 1989 ; Verbalis et al., 1991). Cependant, même si la CCK peut directement activer les cellules OT (Chakfe et Bourque, 2000), son action *in vivo* pourrait provenir aussi de son action sur les afférences gastro-vagales exprimant les récepteurs CCK. L'effet périphérique de la CCK

sur les neurones OT est bloqué par iontophorèse au niveau du SON et il est médié par le noyau du tractus solitaire étant donné que ces neurones OT présentent une expression c-fos suite à une administration de CCK au niveau périphérique (Onaka et al., 1995a ; Ueta et al., 1993 ; Zhu et Onaka, 2002).

3.2.1.2. Relaxine

La relaxine, peptide placentaire, a de nombreux rôles physiologiques dont un rôle spécifique dans la gestation tout comme l'OT. Au niveau de la contraction utérine, la relaxine et l'OT ont des effets antagonistes : l'OT cause une augmentation des contractions utérines tandis que la relaxine tend à les diminuer (Goldsmith et al., 1989). *In vivo*, il a été montré que la relaxine n'agit pas seulement au niveau de l'utérus, mais aussi au niveau de l'hypothalamus et probablement sur la partie postérieure de l'hypophyse (O'Byrne et Summerlee, 1985). Grâce à des marquages immunohistochimiques, des fibres ainsi que des axones provenant du *nucleus incertus* ont été retrouvés au niveau du PVN. L'hybridation *in situ* a quant à elle montré, la co-localisation de la relaxine et de l'OT dans le PVN (Kania et al., 2017). Une étude montre que la relaxine n'affecte pas la libération d'OT chez la truie allaitante (Porter et al., 1992) contrairement aux résultats observés chez la rate (O'Byrne et al., 1986). L'injection iv de relaxine permet une action au niveau central en augmentant la concentration plasmatique d'OT (Way et Leng, 1992). Cependant, il a été mis en évidence que la relaxine pouvait avoir différents effets sur la sécrétion d'hormone au niveau post-hypophysaire dont l'OT et l'AVP. En condition basale, la relaxine semble inhiber la libération d'OT et d'AVP tandis que lorsque les terminaisons nerveuses sont dépolarisées, la relaxine potentialise la sécrétion d'OT et d'AVP (Dayanithi et al., 1987). Même si l'injection iv de relaxine augmente la sécrétion d'OT au niveau basal, elle inhibe la sécrétion pulsatile associée à l'éjection de lait (Summerlee et al., 1998).

3.2.1.3. Neuropeptide S

Le neuropeptide S noté NPS, est un peptide découvert il y a quelques années maintenant et qui partage de nombreuses fonctions physiologiques avec l'OT. Le NPS exerce son effet en se fixant sur son récepteur, NPSR, récepteur couplé à une protéine G (Reinscheid et al., 2005). De nombreuses études ont montré l'effet anxiolytique du NPS (Pape et al., 2010 ; Zoicas et al., 2016 ; Xu et al., 2004 ; Jüngling et al., 2008). Chez des souris KO pour le NPSR, l'effet anxiolytique du NPS n'est plus observé suite à l'injection icv de NPS signifiant que les NPSR

sont indispensables pour que le NPS exerce son effet (Zhu et al., 2010). Différentes études ont montré que les neurones NPS ainsi que leurs NPSR sont hautement exprimés au niveau de l'hypothalamus, et plus particulièrement dans le *locus caeruleus*, le PVN et dans l'amygdale et ce, chez le rat (Xu et al., 2007 ; Xu et al., 2004) tandis que chez la souris, la distribution des NPSR est un peu différente (Clark et al., 2011).

Les nombreuses caractéristiques fonctionnelles, anatomiques communes entre OT et NPS laissent penser que malgré des systèmes neuropeptidergiques distincts, des interactions OT/NPS semblent possibles. Cette idée a été confirmée par l'étude menée en collaboration avec Inga Neumann qui montre que les NPSR sont exprimés par les neurones OT laissant supposer un recrutement des neurones OT par le NPS (Article 2, Grund, Goyon et al., 2017).

3.2.2 Recrutement via une molécule non-peptidergique

3.2.2.1. Entrées opioïdergiques

Les neurones OT reçoivent des fibres opioïdergiques provenant du noyau arqué. Durant la grossesse, les opioïdes semblent exercer un effet inhibiteur sur les neurones OT limitant ainsi les accouchements prématurés dues à la libération d'OT induite par un stress comme l'inflammation (Brunton and Russell, 2008 ; Brunton et al., 2006). L'action inhibitrice des opioïdes est médiée par une action directe sur les neurones OT et par une action indirecte via l'inhibition des neurones noradrénergiques (Onaka et al., 1995b ; Ruan et al., 2011).

3.2.2.2. Entrées noradrénergiques

Les neurones OT sont activés par la noradrénaline (NA), neurotransmetteur sécrété durant des situations négatives telles que la peur (Daftary et al, 1998 ; Onaka, 2004). Tout comme le NPS cité précédemment, une des principales sources de projections noradrénergiques est le *locus caeruleus* (Loughlin et al., 1986 ; Flak et al., 2014). L'effet de la NA sur l'activation des neurones OT est dépendant de sa concentration, ce qui est probablement lié à la mise en jeu de récepteurs différents. La libération d'OT semble stimulée par la NA et ce par le biais du récepteur adrénergique $\alpha 1$ (Randle et al., 1986 ; Yamashita et al., 1987). Il a également été montré que chez la souris, l'administration de NA stimule l'expression et la synthèse d'OT au niveau du PVN et du SON (Vacher et al., 2002). Durant la parturition et le réflexe d'éjection de lait lors de la tétée, l'activation des neurones OT par la NA a également été mise en évidence, via les neurones NA du groupe A2 situés dans le noyau du tractus solitaire (noté NTS) (Buller

et Day 1996 ; Luckman, 1995 ; Onaka et al., 1995 ; Rinaman et al., 1995 ; Theodosios, 2002 ; Russell et al., 2003 ; Theodosios et al., 2004 ; Cunningham et Sawchenko, 1988). Pendant la lactation, la libération de NA est augmentée ainsi que le nombre de synapses NA sur les neurones OT (Michaloudi et al., 1997 ; Bealer et Crowley, 1998 ; Lipschitz et al., 2004). Les afférences provenant de l'utérus et du vagin se terminent également dans le NTS (Ortega-Villalobos et al., 1990) et la libération de NA dans les noyaux OT augmente à la fin de la gestation et de la lactation favorisant ainsi la libération d'OT (Bealer et Crowley, 1998) et qui pourrait expliquer l'activité de « burst » des neurones OT observée pendant la lactation et la parturition par un effet direct ou par des actions sur d'autres noyaux tels que le BNST (Bealer et al., 2010 ; Brown et al., 2013).

En plus de relayer les informations concernant le système cardiovasculaire, les projections des neurones NA sur les neurones magnOT peuvent servir à relayer des informations sur le statut osmotique de l'organisme (Bourque, 2008). Le NTS semble projeter directement sur les neurones OT (Raby et Renaud, 1989). Il a été montré *in vivo* que les neurones OT sont contrôlés par le tonus NA puisque l'injection d'un antagoniste des récepteurs $\alpha 1$ directement dans le SON entraîne une diminution de l'excitabilité des neurones OT (Brown et al., 1998). Il est important de noter que les neurones NA du NTS co-expriment divers neuropeptides mais aussi que certains neurones du NTS projetant sur les neurones OT n'expriment pas la NA (Brown et al., 2013).

3.2.2.3. Entrées dopaminergiques

Même si les premiers travaux montrent que les neurones OT peuvent être recrutés par la NA, ils peuvent également être recrutés par d'autres neurotransmetteurs tels que la dopamine, neurotransmetteur libéré durant des émotions positives (Baskerville et Douglas., 2010) tels que la prise alimentaire (Tonelli et Chiaraviglio, 1995 ; Zhang et van den Pol, 2017). Il a été montré que les neurones OT du PVN reçoivent de nombreuses afférences dopaminergiques de la *zona incerta* (Bujis et al., 1984 ; Decavel et al., 1987). Par ailleurs, même si elles sont beaucoup moins nombreuses, des fibres dopaminergiques issues de l'aire tegmentale ventrale et des neurones des groupes A13 du système incerto-hypothalamique et A14 du noyau préoptique antérodorsal contactent également le PVN et le SON (Ijima et Ogawa, 1981 ; Lindvall et al., 1984). Par la suite, il a également été montré que les neurones OT reçoivent quelques afférences dopaminergiques provenant des groupes A9, A10 et A15 (Cheung et al., 1998 ; van Vulpen et

al., 1999). De plus, certains neurones OT possèdent des récepteurs DA (Baskerville et al., 2009) laissant supposer un recrutement de ces neurones par la DA. En effet, il a été observé que la DA entraîne la dépolarisation des neurones magnOT via une activation directe des récepteurs D2 des neurones OT et une action indirecte des récepteurs D4 exprimés dans les cellules glutaminergiques et GABA (Azdad et al., 2003 ; Price et Pittman, 2001 ; Yang et al., 1991). L'ensemble indique une régulation fine par la DA des circuits contrôlant les neurones magnOT. Lors de la parturition, la DA semble exercer un contrôle sur les neurones OT car sa libération est fortement augmentée à la fin de la grossesse (Herbison et al., 1997).

3.2.2.4. Entrées sérotoninergiques

Le PVN et le SON semblent recevoir des projections des neurones sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé, en particulier des groupes B7, B8 et B9 de ce noyau (Sawchenko et al., 1983 ; Larsen et al., 1996). Les projections sérotoninergiques sur les neurones OT semblent éparées ciblant principalement les régions environnantes des noyaux OT. En effet, une étude basée sur des traçages rétrogrades et antérogrades a montré que les régions environnantes du PVN et du SON reçoivent davantage de projections des neurones sérotoninergiques. Ceci laisse penser que la sérotonine agit sur les neurones OT de façon indirecte (Vertes et al., 1999). La 5-HT semble activer la libération d'OT dans la circulation générale. Une étude pharmacologique montre que la 5-HT induit la sécrétion d'OT et cet effet est médié par les récepteurs 5-HT₂ (Saydoff et al., 1991). L'administration d'un inhibiteur de la synthèse de la 5-HT entraîne une diminution de l'expression de l'OT (Vacher et al., 2002).

Les neurones OT peuvent donc être modulés par différents neurotransmetteurs dont la NA, DA et la 5-HT. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il existerait des circuits neuronaux bien distincts qui seraient capables de contrôler spécifiquement les neurones OT dans des comportements différents (« Article 3 »).

4. OBJECTIFS DE LA THESE

Mes travaux de thèse se divisent en deux grands axes de recherche étroitement liés. Le premier axe visait à mieux comprendre les conséquences d'un conditionnement de peur sur le système OT : Peut-on isoler une population spécifique de neurones OT impliquée dans la modulation de la peur ? Ces neurones OT subissent-ils une modification anatomique et/ou fonctionnelle ? Ce premier axe et les résultats qui en sont issus nous ont alors conduits à poser les bases du second axe de recherche, visant à mieux comprendre comment le système OT est recruté afin d'induire une modulation émotionnelle.

Pour mener à bien ce projet, une collaboration étroite entre le laboratoire du professeur Valery Grinevich du DFKZ à Heidelberg en Allemagne et mon laboratoire hôte à Strasbourg a été établie et celle-ci perdure encore actuellement. Les intérêts à travailler en collaboration avec le Pr. Grinevich sont multiples. Les deux équipes de recherche portent un grand intérêt au système OT au niveau du système nerveux central et ont toutes deux une expertise avérée dans le domaine. Elles ont des compétences techniques variées et complémentaires. En effet, le Pr. Grinevich et son équipe sont extrêmement compétents dans les techniques de transgénèse et de traçage anatomique et tandis que notre équipe a une expertise focalisée sur les techniques fonctionnelles d'électrophysiologie, d'imagerie calcique et de comportements.

4.1. Caractérisation des conséquences d'un conditionnement de peur sur le système OT

Bien que le circuit de la peur soit probablement l'un des mieux connu (Tovote et al., 2015), il reste de nombreuses interrogations. Nous savons grâce à des études précédentes que la stimulation des fibres OT entraîne *in vivo* une diminution du comportement de peur chez le rongeur ainsi qu'*in vitro* une modification des paramètres électrophysiologiques (Viviani et al., 2011 ; Knobloch et al., 2012). Cependant, les circuits impliqués dans la mise en place de ce contrôle OT lors d'un conditionnement de peur restent peu claires. Une population spécifique de neurones OT contrôle-t-elle la peur ? Sont-ils similaires indépendamment du stimulus induisant la peur ? Subissent-ils des modifications plastiques lors de l'exposition à un stimulus effrayant ? De plus, la littérature décrit très bien deux types de neurones OT, les magnOT et les parvOT, et ce d'après leurs caractéristiques anatomiques, morphologiques et fonctionnelles. Ces deux types de neurones OT sont-ils activés de la même façon lors d'un conditionnement de peur ?

L'ensemble de ces questions a constitué la base de la première partie de mon travail de thèse. Pour répondre à ces interrogations, nous avons utilisé divers outils tels que l'électrophysiologie et l'optogénétique à la fois *in vitro* mais également *in vivo*. Ces données fonctionnelles ont été confirmées grâce à des données neuroanatomiques obtenues par nos collaborateurs. D'autre part, ce travail repose en partie sur le développement et l'utilisation d'un nouvel outil viral permettant de marquer et de manipuler spécifiquement les neurones OT qui ont été activés lors du conditionnement de peur. Ce système vGATE ainsi que l'intégralité de ce travail sont présentés par la suite (Article 1).

4.2. Recrutement du système ocytocinergique

Si des ensembles spécifiques de neurones OT semblent réguler les comportements de peur (Article 1) et de douleur (Eliava et al., 2016), comment sont-ils recrutés ? Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au recrutement du système OT par un peptide, en particulier le neuropeptide S (NPS). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à une régulation plus générale par des neurotransmetteurs classiques tels que sont la noradrénaline (NA), la dopamine (DA) et la sérotonine (5-HT).

4.2.1. Via un peptide : le NPS

Pourquoi le NPS ? Ce neuropeptide, récemment découvert (Sato et al., 2002), semble être impliqué dans de nombreux comportements incluant la régulation de l'anxiété via un effet qui pourrait être partagé par l'OT. De manière intéressante, son récepteur semble fortement exprimé au niveau du PVN, lieu de synthèse de l'OT. L'ensemble de ces similitudes nous a conduit à émettre l'hypothèse suivante : une libération de NPS conduirait à un recrutement du système OT qui exercerait alors une fonction anxiolytique. Un travail en collaboration avec le Pr. Inga Neumann et son équipe (Regensburg, Allemagne) s'est alors dessiné. Dans ce travail, nous avons apporté notre expertise via l'injection stéréotaxique de construits viraux et l'imagerie calcique *in vitro*. Les autres expériences ont été réalisées par le Pr. Neumann (Article 2).

4.2.2. Via des neurotransmetteurs classiques

Après avoir montré que le système OT pouvait être recruté par un peptide, nous avons voulu savoir s'il en était de même avec des molécules non-peptidergiques tels que la NA, la

DA et le 5-HT. Des études précédentes ont montré que l'application de NA, DA ou 5-HT permettaient de moduler l'activité des neurones OT (Daftary et al, 1998 ; Onaka, 2004 ; Baskerville et Douglas., 2010) sans toutefois ni quantifier cette modulation, ni définir quels neurones OT étaient mobilisés. Notre hypothèse de travail a été la suivante : il existe plusieurs circuits neuronaux qui seraient capables de recruter spécifiquement différents ensembles de neurones OT, eux-mêmes impliqués dans la modulation de différents comportements.

Afin de tester notre hypothèse de travail, nous avons une nouvelle fois utilisée l'imagerie calcique, l'électrophysiologie et la modulation de circuits neuronaux par expression virale d'opsines (Article 3).

RESULTATS

I. RESULTATS

1. ARTICLE 1 : FEAR MEMORY ENGRAM AND ITS PLASTICITY IN THE HYPOTHALAMIC OXYTOCIN SYSTEM.

1.1. Vue d'ensemble

1.1.1. Introduction

Garder en mémoire un souvenir nécessite le recrutement de différents réseaux de neurones localisés au niveau cérébral. Les engrammes, représentations mnésiques des émotions telles que la peur, ont été largement décrits dans différentes régions dites corticales, dont l'amygdale et l'hippocampe. Chez le rongeur, le comportement de peur, que l'on peut étudier comme un conditionnement pavlovien en mesurant le comportement de freezing, ou immobilité temporaire, résulte d'une interaction complexe de différentes régions et circuits du cerveau, y compris le cortex, l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus. Pourtant on ne comprend toujours pas parfaitement les processus neuronaux impliqués dans la mise en place, l'expression ainsi que l'extinction de la peur, notamment impliquant l'hypothalamus.

L'hypothalamus, structure phylogénétiquement conservée, fait partie des structures intégrant le comportement de peur chez les mammifères. Lieu de production de l'OT, nous avons émis l'hypothèse que l'hypothalamus serait capable d'encoder les engrammes de caractéristiques similaires à ceux décrits dans les structures plus corticales.

L'amygdale centrale (CeA), une sous-région de l'amygdale est essentielle pour générer l'expression de la peur et entraîner des réponses physiologiques adaptées à savoir le comportement de freezing. Les sous-divisions latérale (CeL) et médiale (CeM) de la CeA sont composées principalement de neurones inhibiteurs de type GABA impliqués respectivement dans l'acquisition et la réponse à un épisode de peur. En conditions basales, les neurones GABA du CeL inhibent les neurones GABA de sortie du CeM permettant le maintien de la mobilité de l'animal et son comportement d'exploration. Cependant, dans un conditionnement de peur lié à un contexte, les neurones GABA du CeL sont inhibés entraînant une stimulation des neurones GABA du CeM illustré par un comportement de freezing. Les neurones OT hypothalamiques projettent dans le CeL où la libération axonale de l'OT active les neurones GABA du CeL qui à leur tour inhibent les neurones GABA du CeM entraînant une diminution du temps de freezing

en réponse à un épisode de peur. Cependant, le rôle précis des neurones OT ainsi que la projection de leurs axones vers le CeA durant l'apprentissage de la peur reste mal connu. Quelle proportion de neurones OT contribue à l'effet anxiolytique ? Comment ces neurones sont-ils recrutés durant les différents épisodes de peur ? Le circuit amygdale-hypothalamus est-il un système plastique et dépendant d'un contexte ?

Afin de répondre à l'ensemble de ces questions, une méthode spécifique basée sur le promoteur *c-fos* et la combinaison de trois adéno-virus associés (rAAVs) a alors été développée afin de ne marquer que les neurones OT recrutés lors d'un épisode de peur. Ce système est appelé vGATE pour **V**irus-delivered **G**enetic **A**ctivity-induced **T**agging of **E**nsembles.

1.1.2. Résultats

La première étape a été de vérifier la fonctionnalité du système vGATE. L'injection du système vGATE, permettant d'exprimer Venus uniquement dans les neurones OT actifs au moment de l'injection de doxycycline (DOX), directement dans le SON a permis de montrer qu'en conditions basales, sans stimulus particulier, aucun neurone OT n'exprime Venus et ce en présence ou non de DOX. De plus, l'exposition des animaux à une solution saline hypertonique comme eau de boisson pendant deux jours, classiquement utilisée pour activer les neurones OT et AVP, n'induit pas l'expression de Venus en l'absence de DOX. En revanche, l'exposition à la solution hyperosmotique combinée à l'injection de DOX induit le marquage de la quasi-totalité des neurones OT. Ces contrôles, indispensables, montrent ainsi que le vGATE est fiable, spécifique et donc utilisable dans le cadre de notre étude.

Après validation du vGATE, nous avons exposé les animaux vGATE à un conditionnement de peur, et observé que seuls ~10 % des neurones OT, du PVN comme du SON sont marqués (neurones OT Fear⁺). Nous avons ensuite exprimé la ChR2 dans tous les neurones OT, afin de stimuler les axones OT au niveau du CeL et confirmer que la stimulation des neurones OT diminue la réponse de freezing. De plus, nous avons observé qu'une réexposition au contexte de peur a pour conséquence d'amplifier cet effet. Par ailleurs, si seuls les neurones OT Fear⁺ sont activés, la latence observée avant diminution du temps de freezing par une stimulation des neurones OT Fear⁺ est significativement diminuée. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'une deuxième exposition à un même contexte permet de recruter plus de neurones OT tandis que le système vGATE permet de recruter un ensemble de neurones OT capables d'induire une réponse plus efficace.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité d'une plasticité du système OT suite à un conditionnement de peur. Pour cela, nous avons réalisé des marquages neuroanatomiques de neurones OT ainsi que leur axone et observé que si le conditionnement de peur n'entraîne pas de modification de la longueur totale des axones OT au niveau du CeL, vGluT2 semble surexprimé dans les axones OT après conditionnement de peur. Nous avons alors cherché à déterminer *ex vivo* les conséquences fonctionnelles de ces changements en combinant électrophysiologie et optogénétique. La stimulation des axones OT entraîne une augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSCs) des neurones du CeM dans chaque groupe. De façon intéressante, l'application d'un antagoniste des OTR permet de bloquer la réponse induite par la stimulation optique chez le groupe contrôle mais il a un effet moindre chez le groupe vGATE. De plus, l'application d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques bloque la réponse dans le groupe vGATE et a un effet minime chez les contrôles. Pour tester la pertinence comportementale de ces résultats, nous avons stimulé les axones OT via l'implantation préalable d'une fibre optique dans le PVN afin de diminuer le freezing, réponse bloquée par l'injection intra-CeL d'un antagoniste des OTR. Cependant, l'exposition deux semaines après d'un même animal à un deuxième épisode de peur après injection de l'antagoniste des OTR n'a plus d'effet sur le comportement de freezing. L'ensemble des résultats neuroanatomiques, fonctionnels et comportementaux montrent que le conditionnement de peur entraîne un switch OT/glutamate.

Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition des neurones OT des animaux vGATE inhibe l'extinction de la peur spécifiquement dans le contexte où ces neurones ont été activés. Pour cela, des rats ont été injectés avec un virus exprimant le récepteur muscarinique humain modifié hM4D (Gi) sous le contrôle du promoteur OT et soumis à des paradigmes de conditionnement et d'extinction de la peur contextuelle. Afin de regarder uniquement le rôle potentiel de l'OT dans l'extinction de la peur dépendante d'un contexte, un nouveau contexte a été utilisé (contexte B). L'ajout de l'agoniste de hM4D, la clozapine-N-oxyde (CNO), entraîne une augmentation du temps de freezing et ce de façon indépendante du contexte. Nous avons alors utilisé le système vGATE pour exprimer spécifiquement hM4D dans les neurones OT Fear⁺. Les neurones OT Fear⁺ marqués dans le contexte A empêchent l'extinction de la peur dans un même contexte A mais leur activation reste inefficace lors d'une exposition à un contexte B. Ces résultats montrent que l'efficacité des neurones OT est dépendante d'un contexte.

Les marquages neuroanatomiques ayant montré un très faible nombre d'axones OT au niveau de l'amygdale, nous avons cherché à comprendre si une ou plusieurs populations de

neurones OT étaient recrutées spécifiquement lors d'un second épisode de peur en utilisant un contexte de conditionnement identique ou différent du premier. Nous avons montré qu'une seconde exposition à un même contexte conditionnant réactive uniquement les neurones OT du SON, tandis que les neurones OT activés dans le PVN sont majoritairement nouvellement recrutés, bien que le nombre total de neurones OT recrutés lors du second conditionnement soit similaire à celui dénombré lors du premier. Par ailleurs, un second épisode de peur suite à une exposition à un nouveau contexte conditionnant entraîne une activation bien plus importante du système OT aussi bien au niveau du PVN qu'au niveau du SON ce qui se traduit par une forte élévation de la concentration plasmatique d'OT. Etant donné l'existence de deux types de neurones OT, les magnOT et les parvOT, nous avons cherché à définir si le recrutement de ces neurones OT était différent au cours de l'exposition répétée à un même contexte ou dans un nouveau contexte de peur. Pour cela, nous avons administré un traceur rétrograde au niveau systémique permettant de marquer les neurones magnOT. Nous avons ainsi pu montrer que seuls 15 % des neurones magnOT sont réactivés que ce soit au niveau du PVN ou du SON tandis que les neurones parvOT sont tous réactivés.

En conclusion, nous avons montré que :

- 1- le système vGATE marque spécifiquement les neurones OT activés par un contexte.
- 2- la stimulation des axones OT diminue *in vivo* le comportement de freezing.
- 3- l'existence d'un changement plastique du système OT en réponse à un conditionnement de peur, via un switch anatomo-fonctionnel OT/glutamate dans le CeL.
- 4- l'inhibition des neurones OT altère l'extinction de la peur et ce dépendamment du contexte.
- 5- l'activité des neurones OT du SON est dépendante du contexte.
- 6- les neurones parvOT activent les magnOT dans un nouveau contexte.

1.1.3. Contributions personnelles

Cette étude a évidemment été un travail mené par différentes personnes, donc par soucis de clarté, je cite ci-dessous ma contribution personnelle dans ces différentes expériences et analyses :

- conditionnements de peur.
- injections stéréotaxiques afin de marquer les neurones OT du PVN et/ou SON.
- préparation des tranches de cerveau.
- enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* (technique du patch-clamp).

1.2. Article 1 : Fear memory engram and its plasticity in the hypothalamic oxytocin system

2. ARTICLE 2 : NEUROPEPTIDE S ACTIVATES PARAVENTRICULAR OXYTOCIN NEURONS TO INDUCE ANXIOLYSIS.

2.1. Vue d'ensemble

2.1.1. Introduction

L'anxiété est un trouble qui touche environ 28 % de la population mondiale. Pourtant, les traitements disponibles ne sont pas assez satisfaisants, et les mécanismes cellulaires sous-jacents aux troubles de l'anxiété non compris, justifiant une recherche fondamentale active. L'OT possède de nombreuses propriétés anxiolytiques, en faisant ainsi un médicament potentiel important. Récemment, un nouveau candidat peptidergique est apparu grâce à ses nombreuses ressemblances avec l'OT : le neuropeptide S (NPS). Synthétisé dans le *locus caeruleus*, le NPS est constitué de 20 acides aminés. Le NPS tout comme l'OT, a de nombreux effets physiologiques et comportementaux dont un effet anxiolytique. Il est alors important de souligner le rôle central qu'a le PVN dans la coordination de la réponse dans ces divers comportements. En effet, le PVN, principal lieu de synthèse de l'OT, reçoit des afférences de diverses régions du système limbique dont le *locus caeruleus* et projette à son tour vers de nombreuses régions cérébrales responsables de la régulation émotionnelle. De plus, certaines études suggèrent que les récepteurs du NPS (NPSR) sont exprimés entre autres dans les neurones du PVN. Nous avons émis l'hypothèse que **l'effet anxiolytique du NPS impliquerait les neurones OT du PVN.**

2.1.2. Résultats

Grâce à un traceur rétrograde injecté directement dans le PVN révélé - quelques jours plus tard par immunohistochimie - nous avons pu montrer que les neurones synthétisant le NPS du *locus caeruleus* projettent sur le PVN. Nous avons ensuite cherché à déterminer si les NPSR sont exprimés par les neurones OT du PVN. Etant donné qu'il n'existe pas d'anticorps spécifiques pour identifier et localiser les NPSR, nous avons cherché à détecter la présence d'ARNm du NPSR dans les neurones OT. Pour ce faire, un rAAV permettant l'expression de la protéine Venus sous la direction du promoteur de l'ocytocine (AAV_{1/2}OXTpr-Venus) a été injecté dans le PVN. Cela a permis de séparer les neurones OT, Venus positifs des autres, des Venus négatifs, par cytométrie de flux. La quantification des ARNm du NPSR montre que seuls les neurones OT expriment le NPSR. Pour vérifier que le NPS module l'activité des neurones OT, nous avons injecté dans le PVN des animaux un rAAV permettant d'exprimer la GCaMP6s,

un indicateur calcique, uniquement dans les neurones OT (AAV_{1/2} OXTpr-GCaMP6s). L'activité calcique des neurones OT a alors été mesurée *ex vivo* par imagerie calcique confocale à spinning disk. Deux populations de neurones OT ont pu être mises en évidence selon leur activité basale : silencieuse et active. Seule 13 % des neurones OT silencieux répondent à l'application du NPS, traduite par une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire. L'ajout d'un antagoniste des NPSR prévient l'effet de l'application du NPS, démontrant que le NPS exerce son action via le NPSR. En parallèle, nous avons dosé via la microdialyse l'OT libérée en réponse à l'injection au NPS à différentes concentrations. On observe que la libération d'OT est dépendante de la dose injectée de NPS. Nous avons ensuite regardé la pertinence de l'effet du NPS sur les neurones OT au niveau comportemental. Nous avons injecté du NPS en intra-cérébro-ventriculaire (icv) ou intra-PVN. Nous avons alors mesuré le niveau d'anxiété chez ces animaux grâce à deux tests comportementaux (labyrinthe en croix surélevé et open-field). Les deux tests montrent le même résultat : l'injection de NPS a un effet anxiolytique, bloqué par l'injection préalable d'un antagoniste des OTR. De plus, l'injection seule d'un antagoniste des OTR ne modifie pas le comportement anxieux de l'animal. Ces résultats sont confirmés par l'approche chémo-génétique : après injection d'un système DREADD (AAV_{1/2} OXTpr-hM4Di:mCherry) dans le PVN, l'injection de clozapine-N-oxyde (CNO) bloque l'effet anxiolytique du NPS. Ces résultats suggèrent que l'effet anxiolytique observé du NPS passe par le recrutement des neurones OT.

En conclusion, nous avons montré que :

- 1- les neurones NPS du *locus caeruleus* projettent vers les neurones OT du PVN.
- 2- les neurones OT du PVN expriment le NPSR.
- 3- le NPS active les neurones OT du PVN.
- 4- l'activation des neurones OT est nécessaire à l'effet anxiolytique du NPS.

2.1.3. Contributions personnelles

Cette étude a évidemment été un travail mené par différentes personnes, donc par souci de clarté, je cite ci-dessous ma contribution personnelle dans ces différentes expériences et analyses :

- injections stéréotaxiques afin de marquer les neurones OT du PVN et/ou SON
- préparation des tranches de cerveau
- enregistrements imagerie calcique *ex vivo* et pharmacologie

2.2. Article 2 : Neuropeptide S activates paraventricular oxytocin neurons to induce anxiolysis.

Neuropeptide S Activates Paraventricular Oxytocin Neurons to Induce Anxiolysis

Thomas Grund,¹ Stephanie Goyon,² Yuting Li,³ Marina Eliava,⁴ Haikun Liu,³ Alexandre Charlet,^{2,5} Valery Grinevich,^{4*} and Inga D. Neumann^{1*}

¹Department of Behavioral and Molecular Neurobiology, Regensburg Center of Neuroscience, University of Regensburg, 93040 Regensburg, Germany, ²Institute of Cellular and Integrative Neurosciences UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg, France, ³Division of Molecular Neurogenetics, German Cancer Research Center, DKFZ-ZMBH Alliance, Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg 69120, Germany, ⁴Division of Neuropeptides (V078), German Cancer Research Center, Central Institute of Mental Health, CellNetwork Cluster of Excellence, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany, and ⁵University of Strasbourg, Institute for Advanced Study, 67084 Strasbourg, France

Neuropeptides, such as neuropeptide S (NPS) and oxytocin (OXT), represent potential options for the treatment of anxiety disorders due to their potent anxiolytic profile. In this study, we aimed to reveal the mechanisms underlying the behavioral action of NPS, and present a chain of evidence that the effects of NPS within the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) are mediated via actions on local OXT neurons in male Wistar rats. First, retrograde studies identified NPS fibers originating in the brainstem locus coeruleus, and projecting to the PVN. FACS identified prominent NPS receptor expression in PVN-OXT neurons. Using genetically encoded calcium indicators, we further demonstrated that NPS reliably induces a transient increase in intracellular Ca^{2+} concentration in a subpopulation of OXT neurons, an effect mediated by NPS receptor. In addition, intracerebroventricular (i.c.v.) NPS evoked a significant somatodendritic release of OXT within the PVN as assessed by microdialysis in combination with a highly sensitive radioimmunoassay. Finally, we could show that the anxiolytic effect of NPS seen after i.c.v. or intra-PVN infusion requires responsive OXT neurons of the PVN and locally released OXT. Thus, pharmacological blockade of OXT receptors as well as chemogenetic silencing of OXT neurons within the PVN prevented the effect of synthetic NPS. In conclusion, our results indicate a significant role of the OXT system in mediating the effects of NPS on anxiety, and fill an important gap in our understanding of brain neuropeptide interactions in the context of regulation of emotional behavior within the hypothalamus.

Key words: anxiety; DREADD; GCaMP6s; microdialysis; neuropeptide S; oxytocin

Significance Statement

Given the rising scientific interest in neuropeptide research in the context of emotional and stress-related behaviors, our findings demonstrate a novel intrahypothalamic mechanism involving paraventricular oxytocin neurons that express the neuropeptide S receptor. These neurons respond with transient Ca^{2+} increase and somatodendritic oxytocin release following neuropeptide S stimulation. Thereby, oxytocin neurons seem essential for neuropeptide S-induced anxiolysis, as this effect was blocked by pharmacological and chemogenetic inhibition of the oxytocin system.

Introduction

Anxiety disorders have a lifetime prevalence of ~28% (Gross and Hen, 2004; Kessler et al., 2005); however, specific and efficient

therapeutic strategies are still required. The nonapeptide oxytocin (OXT) and the recently discovered neuropeptide S (NPS), a 20-amino acid neuropeptide, represent powerful therapeutic candidates due to their potent anxiolytic activity (Xu et al., 2004;

Received Aug. 1, 2017; revised Oct. 27, 2017; accepted Oct. 31, 2017.

Author contributions: T.G., A.C., V.G., and I.D.N. designed research; T.G., S.G., Y.L., M.E., H.L., A.C., and I.D.N. performed research; T.G. and I.D.N. contributed unpublished reagents/analytic tools; T.G., S.G., Y.L., M.E., H.L., and I.D.N. analyzed data; T.G., A.C., V.G., and I.D.N. wrote the paper.

This work was supported by German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft), German Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung), EU (FemNatCD), and Bayerische Forschungstiftung to I.D.N.; Chica and Heinz Schaller Research Foundation, Fritz Thyssen Foundation, German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft) within the Collaborative Research Center (Sonderforschungsbereich) 1134 and 1158, and Human Frontiers Science Program RGP0019/2015 to V.G.; PHC PROCOP program

329755A (DAAD and Campus France) and ANR-Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant GR 3619/701 to V.G. and A.C.; and University of Strasbourg Institute for Advanced Study Fellowship 2014–17, Fyssen Foundation Research Grant 2015, and National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression Young Investigator Grant 24821 to A.C. We thank Dr. Harold Gainer (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for kindly providing the OXT antibody; Dr. Maurice Manning (Toledo, Ohio) for generously providing the OXTR-A; Drs. Kay Jingling and Hans-Christian Pape (Institute of Physiology, Münster, Germany) for advice on applications of NPS and SHA-68; Rodrigue Maloumy and Andrea Havasi for excellent technical assistance; and Judith Müller and Elke Lederer for preparation of rAAVs and help with FACS.

Pape et al., 2010; Neumann and Landgraf, 2012; Slattery et al., 2015; Neumann and Slattery, 2016). However, the OXT and NPS systems represent, so far, two separate neuropeptide systems, and studies for possible interactions at neuronal level are lacking.

In addition to the hypothalamic supraoptic (SON) and accessory nuclei, the main site of OXT synthesis is the paraventricular nucleus (PVN) (Swanson and Sawchenko, 1983), where OXT is locally released in response to various stressful stimuli (Neumann, 2007), and where it exerts anxiolytic effects as shown in male and female rats (Blume et al., 2008; Jurek et al., 2012; van den Burg et al., 2015). The PVN is a major integrative center of the brain coordinating behavioral and physiological responses, for example, to stress and fearful stimuli (Knobloch et al., 2012; Neumann and Landgraf, 2012; Anthony et al., 2014). Accordingly, the rodent PVN receives afferents from various limbic regions and from noradrenergic neurons located in the locus coeruleus (LC) (Swanson and Sawchenko, 1980; Jones and Yang, 1985; Loughlin et al., 1986) that also harbors a cluster of predominantly glutamatergic neurons synthesizing NPS (Xu et al., 2007). Prominent NPS-immunopositive projections to the PVN have so far been described in C57BL/6 mice (Clark et al., 2011).

Whereas NPS-synthesizing neurons in rats are exclusively found in distinct brainstem regions, such as the LC, Barrington's nucleus, lateral parabrachial nucleus, and the principal sensory trigeminal nucleus, the NPS receptor (NPSR) is widely distributed in the rat brain (Xu et al., 2007). There is evidence for NPSR expression in areas involved in olfaction, modulation of sleep–wake cycle and food intake, and limbic brain regions relevant for the processing of fear, anxiety, and stress responses, such as the amygdala and the hypothalamus, specifically in the PVN (Xu et al., 2007; Leonard and Ring, 2011).

In addition to robust anxiolytic actions, NPS and OXT share various other behavioral and physiological effects, such as the reversal of social fear (Zoicas et al., 2014; Zoicas et al., 2016), the attenuation of aggressive-like behavior (Beiderbeck et al., 2014; de Jong et al., 2014; Ruzza et al., 2015), as well as anorexic (Olson et al., 1991; Beck et al., 2005; Smith et al., 2006) and antinociceptive effects (Li et al., 2009; Eliava et al., 2016). Moreover, both NPS and OXT neurons are responsive to acute stress (Neumann, 2007; Ebner et al., 2011; Jüngling et al., 2012; Torner et al., 2017) and have the capacity to regulate the physiological activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (Neumann et al., 2006; Smith et al., 2006; Jurek et al., 2015; Torner et al., 2017).

These functional similarities, together with the neuroanatomical overlapping of the NPS and OXT systems (Swanson and Sawchenko, 1983; Xu et al., 2007; Yoshida et al., 2009), led us to hypothesize that NPS effects are mediated via OXT neurons within the PVN of male Wistar rats. Our present results reveal that NPS specifically activates NPSR-expressing OXT neurons within the PVN indicated by increased Ca^{2+} mobilization and local somatodendritic OXT release. Moreover, we show that pharmacological and chemogenetic inhibition of OXT neurons blocks NPS-induced anxiolysis. These findings provide the first evidence for an intrahypothalamic mechanism involving NPSR-expressing OXT neurons in the potent anxiolytic profile of NPS.

Materials and Methods

Animals. Male Wistar rats (230–250 g, Charles River Laboratories) were housed under standard laboratory conditions (12:12 h light/dark cycle, lights on at 0700, 21°C–23°C, 55% humidity, food/water *ad libitum*). Rats were allowed at least 1 week of habituation before they were used for surgical procedures. All experiments were performed between 0800 and 1300 in accordance with the *Guide for the care and use of laboratory animals* by the National Institutes of Health, and were approved by the governments of the Oberpfalz and Baden-Württemberg.

Surgical procedures. For stereotaxic gene delivery, or implantation of guide cannulas and microdialysis probes, rats were injected subcutaneously with the analgesic drug Buprenorphine (Bayer, 0.05 mg/kg) and the antibiotic Baytril (Baxter, 10 mg/kg) 30 min before the start of the surgery. All stereotaxic procedures were performed under isoflurane anesthesia and semisterile conditions as described in detail previously (Slattery et al., 2015; van den Burg et al., 2015; Eliava et al., 2016). All coordinates used are based on the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998).

For viral microinfusion into the left and right PVN (anteroposterior, -1.8 mm; mediolateral, ± 0.3 mm; dorsoventral, -8.0 mm) and SON (anteroposterior, -1.4 mm; mediolateral, ± 1.7 mm; dorsoventral, -9.0 mm), respectively, we used a 5 μ l calibrated micropipette (VWR, inner diameter, 0.3 mm), which was pulled to create a long narrow shank. The micropipette shaft was marked with a 1 mm scale that corresponds to a volume of ~ 70 nl. In total, 280 nl of cell-type specific recombinant adeno-associated viral vectors (rAAVs) were infused slowly into each PVN by pressure infusion. After the infusion, the micropipette was kept in place for 3 min to ensure adequate rAAV diffusion. The drill hole in the skull was closed using bone wax (Ethicon), and the wound was sutured using sterile nylon material.

For intracerebroventricular (i.c.v.) infusions, a 12-mm-long 21-G guide cannula was stereotaxically placed 2 mm above the lateral ventricle (anteroposterior, -1.0 mm; mediolateral, -1.6 mm; dorsoventral, -2.0 mm). For bilateral intra-PVN infusions, 12-mm-long 23-G guide cannulas were implanted 2 mm above the left and right PVN (anteroposterior, -1.4 mm; mediolateral, 1.8 mm; -2.1 mm; dorsoventral, -6.3 mm; angle: 10°). To monitor OXT locally released within the PVN, a U-shaped microdialysis probe was implanted into the right PVN (anteroposterior, -1.4 mm; mediolateral, 1.8 mm; dorsoventral, -8.3 mm; angle: 10°). Both guide cannulas and microdialysis probes targeting the PVN were implanted using an angle of 10° to avoid sagittal sinus damage. All implants were fixed to two stainless-steel screws using dental cement. Rats were housed singly after surgery, allowed to recover for 2 d (microdialysis) or 5 d (central infusions), and handled daily to minimize non-specific stress responses at the day of experiment. Guide cannulas were closed using dummy cannulas, which were cleaned daily during the handling procedure with 70% ethanol and sterile water.

Retrograde tracing of NPS-immunoreactive neurons. Cholera toxin subunit B coupled to AlexaFluor-488 (CTB-488, ThermoScientific, 0.5 μ l, 5 μ g/ μ l in PBS, pH 7.4) was infused bilaterally into the PVN (anteroposterior, -1.8 mm; mediolateral, ± 0.3 mm; dorsoventral, -8.0 mm) using a calibrated micropipette under isoflurane anesthesia. The infusion system was kept in place for 3 min to ensure adequate tracer diffusion. Animals were housed singly for 5 d until transcardial perfusion. NPS (1:500, Abcam, ab18252); OXT (1:500, p38 mouse monoclonal) (Ben-Barak et al., 1985) and CTB-488 were visualized in 40 μ m coronal brain slices containing the PVN and LC, respectively, using Leica DM5000B.

Preparation of samples and FACS analysis. Rats were injected with cell-type specific AAV_{1/2} OXTpr-Venus into the SON and PVN to express Venus in OXT neurons (Knobloch et al., 2012). Three weeks later, rats were killed, and their brains were removed and sectioned into large pieces using rat brain matrix (1-mm thick sections). SON and PVN were bilaterally extracted by micro-punch technique. FACS method of neuronal cells was modified from established protocols (Lobo et al., 2006; Guez-Barber et al., 2012). The tissue was placed in 1 ml of dissection buffer containing the following (in mM): 150 sucrose, 125 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 2.4 $CaCl_2$, 1.3 $MgCl_2$, 6.65 glucose, and 2 HEPES, pH 6.9 (osmolality 326 mM, all from Sigma) (Li et al., 2015) and minced with

The authors declare no competing financial interests.

*V.G. and I.D.N. contributed equally to this work as senior authors.

Correspondence should be addressed to Dr. Inga D. Neumann, University of Regensburg, Department of Behavioural and Molecular Neurobiology, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg, Germany. E-mail: inga.neumann@ur.de.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2161-17.2017

Copyright © 2017 the authors 0270-6474/17/3712215-12\$15.00/0

Table 1. List of primers used for mRNA expression studies in rats

Primer/probe	5'-3'
NPSR (forward)	TCCAATGGTGAGGTACAGTGC
NPSR (reverse)	ACACAGAAAGGCCAACGATG
Beta actin (forward)	TCCTGTGGCATCCATGA AAC
Beta actin (reverse)	ACAGCACTGTGTGGCATAG

razor blades on an ice-cold glass plate. Later, dissection buffer was replaced with 1 ml of Accutase (A6964, Sigma-Aldrich), and tubes were rotated for 30 min at 4°C. Then, tissue pieces were rinsed twice in ice-cold Neurobasal-A complete medium: 50% Neurobasal-A, 50% Leibovitz L-15 medium (31415, Invitrogen), 2% B27 supplement (17504044, Invitrogen), DNase I 0.001%, and 0.5% penicillin-streptomycin (15140122, Invitrogen). To dissociate the cells, tissue pieces were triturated in 1 ml Neurobasal-A complete medium with a Pasteur pipette. Supernatant containing cloudy dissociated cells were transferred to a new 15 ml Falcon tube on ice. Cells were filtered with 70 μ m cell strainer and centrifuged for 3 min at 430 \times g through a three-step density gradient of Percoll (P1644, Sigma). Cells at the bottom layer were collected for later use. For FACS of OXT-Venus⁺ cells, propidium iodide (20 μ g/ml) was used to label dead cells just before sorting. Subsequently, FACS-based purifications of Venus⁺ and Venus⁻ viable cells were sorted into RNase-free tubes with RNA extraction lysis buffer by BD FACSAria II at Flow Cytometry Core Facility at DKFZ. Negative controls were done at the same time.

qRT-PCR. Total RNAs were extracted and purified from FACS-sorted cells with the RNeasy Mini kit or RNeasy FFPE Kit (QIAGEN). RNA was transcribed into cDNA using random primers (dN6, Roche) and M-MLV reverse transcriptase (Promega). cDNA were quantified by using SYBR gene expression assays (QIAGEN) or TaqMan Probe with Absolute Blue qPCR Rox mix (ThermoFisher), on the CFX96 Real-time System (Bio-Rad). Standard curves were generated, and each experiment was performed in duplicate. Relative transcript concentrations were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) in relation to β -actin as reference gene. Primers and probes used for qRT-PCR are listed in Table 1.

Ca²⁺ imaging in PVN-OXT neurons. AAV_{1/2} OXTpr-GCaMP6s was infused bilaterally into the PVN. Three weeks later, animals were anesthetized using a ketamine/xylazine mixture (Imalgene 90 mg/kg, Rompun, 10 mg/kg) administered intraperitoneally.

Transcardial perfusion was then performed using NMDG-based ACSF (composition in mM as follows): 93 NMDG, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 30 NaHCO₃, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 20 HEPES, 25 D-glucose, 5 L ascorbic acid, 2 thiourea, 3 sodium pyruvate, 10 N-acetyl-L-cysteine, and 2 kynurenic acid, pH 7.4 (300–310 mOsm/l, continuously bubbled in 95% O₂-5% CO₂ gas). Next, 300- μ m thick coronal slices containing the PVN were collected using a Leica VT1000s vibratome. Next, brain slices were placed in a room-temperature holding chamber with normal ACSF, for a minimum of 1 h before the conduction of any experiments. In Ca²⁺ imaging experiments, slices were transferred to an immersion recording chamber and superfused at a rate of 2 ml/min with normal ACSF (composition in mM as follows): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, and 15 D-glucose (300–310 mOsm/l, adjusted for pH values of 7.4 with HCl and continuously bubbled in 95% O₂-5% CO₂ gas) unless indicated otherwise.

Ex vivo Ca²⁺ imaging recordings. Spinning disk confocal microscope used to perform OXT neuron Ca²⁺ imaging was composed of a Zeiss Axio examiner microscope with a 20 \times water-immersion objective (numerical aperture of 1.0), mounted with a X-Light Confocal unit, CRESTOPT spinning disk. Images were acquired at 5 Hz with an optimOS sCMOS camera (Qimaging). Cells within a confocal plane were illuminated for 100–150 ms for each wavelength (GCaMP6s: 475 nm) using a Spectra 7 LUMENCOR. The different hardware elements were synchronized through the MetaFluor software (Molecular Devices), which was also used for online and offline quantitative fluorescence analysis. OXT neuron Ca²⁺ levels were measured in hand-drawn regions of interest (ROIs) comprising the cell body. [Ca²⁺]_i variations were esti-

mated as changes in fluorescence signals over the baseline ($\Delta F/F$) after drug applications. In all recordings, background fluorescence measured in an ROI drawn in the darkest area of the field of view was extracted to every ROIs for each wavelength and for each image. Absolute [Ca²⁺]_i variations were estimated as changes in fluorescence signals over the baseline ($\Delta F/F$). Baseline was established for each ROI as the average fluorescence over all pictures. Bleaching was corrected using a linear regression on the overall $\Delta F/F$ trace for each OXT neurons, which values were then subtracted to the $\Delta F/F$. Upon extraction of data, calculations, and corrections of $\Delta F/F$ for each neuron, the area under the curve (AUC) was calculated over a time period of 5 min before and after drug application. NPS (2 μ M, Bachem) and SHA-68 (NPSR antagonist, 100 μ M, Tocris Bioscience) were bath-applied during 20 s and >15 min, respectively. An OXT neuron was considered as being responsive to the drug, when the peak $\Delta F/F$ and the relative ratio of AUCs after drug application over baseline were both 4SD and 20% greater than in baseline conditions, respectively. The relative AUCs ratios values were used for quantitative analysis and called “relative AUC increase.” Maximal peak reached after drug application was also measured and used in quantitative analysis. Data were averaged across OXT neurons per slices, which were used as the statistical unit over a minimum of 3 animals per condition. ImageJ software was also used on GCaMP6s pictures to produce illustrative pictures, such as the one in Figure 3. All Ca²⁺ imaging experiments were conducted at controlled room temperature of 22°C.

Monitoring of intra-PVN release of OXT. A U-shaped microdialysis probe (Neumann et al., 1993; Torner et al., 2017) was implanted into the right PVN, and a guide cannula (21G, 12 mm) was stereotaxically placed 2 mm above the lateral ventricle. Two days later, the microdialysis probe was connected to a syringe mounted onto a microinfusion pump via polyethylene tubing and perfused with sterile Ringer's solution (3.3 μ l/min) starting at 0800 for 2 h before the start of the experiment to establish an equilibrium between inside and outside of the microdialysis membrane. Then, five consecutive 30-min dialysates were collected: Samples 1 and 2 were taken under basal conditions, and Samples 3, 4, and 5 after i.c.v. infusion of either NPS (1 or 5 nmol/5 μ l) or sterile Ringer's solution (vehicle, Veh, 5 μ l). The outflow of the microdialysis probe was equipped with a tube holder that allowed direct sample collection into a 1.5-ml Eppendorf tube containing 10 μ l of 0.1 M HCl. Following this, samples were immediately frozen on dry ice and subsequently stored at -20°C until quantification of OXT. OXT content was measured in evaporated dialysates by a highly sensitive and selective radioimmunoassay (de Jong et al., 2015).

Pharmacological inhibition of OXT receptor (OXTR). Guide cannulas were implanted above the lateral ventricle for i.c.v. infusion or above the left and right PVN for intra-PVN infusions. For evaluation of the local effect of the OXT receptor antagonist (OXTR-A; des-Gly-NH₂,d(CH₂)₃[Tyr(Me)²,Thr⁴]OVT) (Manning et al., 2012) on NPS-induced anxiolysis, four groups of conscious rats were studied, which received Veh/Veh, Veh/NPS, OXTR-A/Veh, or OXTR-A/NPS with a 5-min interval. The infused dose of the OXTR-A (0.75 μ g/5 μ l i.c.v., 0.15 μ g/0.5 μ l intra-PVN) was selected on the basis of earlier experiments (Lukas et al., 2013). NPS was infused either i.c.v. (1 nmol/5 μ l) or intra-PVN (0.2 nmol/0.5 μ l); controls were infused with an equal volume of sterile Ringer's solution. Anxiety was tested using the light/dark box (LDB) 15 min after last intracerebral infusion. Two days later, the same rats were tested in the open field (OF) 15 min after they received a randomized treatment.

Chemogenetic silencing of PVN-OXT neurons. AAV_{1/2} OXTpr-hM4Di:mCherry was bilaterally microinfused into the left and right PVN, an i.c.v. guide cannula was implanted, and then the rats were single-housed to recover for 48 h. On day 16 after AAV infusion, animals were housed singly in observation cages. On day 21 after AAV infusion and induction of expression of DREADD in OXT neurons, hM4Di, the G_i-coupled designer receptor, was activated by intraperitoneal injection of clozapine N-oxide (CNO, 2 mg/kg); controls received 1 ml/kg of sterile PBS. NPS (1 nmol) or Veh (5 μ l) was infused i.c.v. 40 min later, i.e., 15 min before testing on the elevated plus maze (EPM). Expression of OXTpr-hM4Di:mCherry was verified in perfused, 40- μ m thick coronal brain slices by immunofluorescent staining of mCherry (1:1,000, Abcam, ab167453)

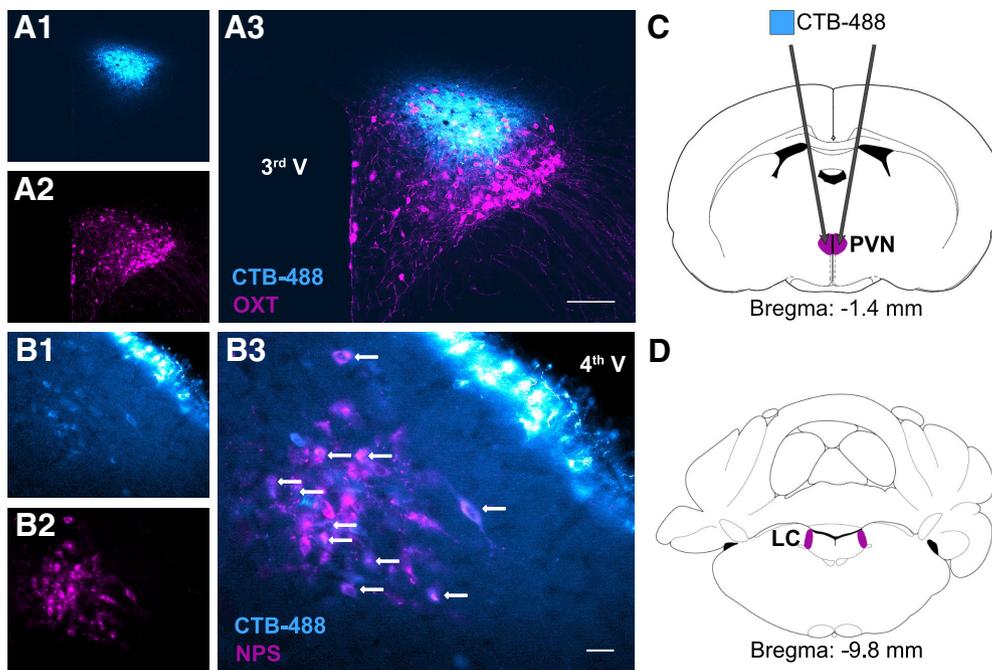


Figure 1. NPS neurons within the LC innervate the hypothalamic PVN, a brain region that harbors OXT neurons. **A**, PVN with OXT-immunoreactive neurons (magenta, **A2**) and infusion site of cholera toxin subunit B conjugated to AlexaFluor-488 (CTB-488, blue; **A1**). **B**, Five days following intra-PVN infusion of the tracer, retrogradely transported CTB-488 labeled neurons immunoreactive for NPS (magenta) in the LC (white arrows). 3rd V, Third ventricle; 4th V, fourth ventricle. Scale bars: **A3**, 100 μ m; **B3**, 30 μ m. **C**, Schematic drawing of intra-PVN infusion site of CTB-488. **D**, LC harboring NPS-immunoreactive neurons.

and OXT (1:500) (Ben-Barak et al., 1985) and visualized using a DM5000B microscope (Leica). As an additional control, and to exclude potential effects of CNO and its metabolite clozapine on general anxiety-related behavior (Gomez et al., 2017), sham-operated DREADD-free rats were treated with PBS or CNO (2 mg/kg, i.p.) before testing on the EPM.

Drug infusion procedure in conscious rats. For acute i.c.v. or intra-PVN infusions, the dummy cannula was replaced by the infusion cannula (25G, 14.7 mm i.c.v.; 27G, 14 mm intra-PVN). Sterile Ringer's solution was infused as vehicle control. After each infusion, the cannula was kept in place for 10 s to allow local substance diffusion. None of the drug-infused rats showed any signs of tremor, convulsions, or wet-dog shakes in their homecage.

Behavioral testing. Anxiety-related behavior as well as locomotor activity were assessed using LDB, OF, or EPM during a 5-min test session 15 min after the last intracerebral infusion.

Briefly, the LDB consisted of a lit (40 \times 50 cm, 100 lux) and a dark (40 \times 30 cm, 0 lux) compartment connected via a small opening (7.5 \times 7.5 cm) enabling transition between the two floors. Rats were placed into the lit compartment, and the time spent in the light box was taken as measurement for anxiety-related behavior. LDB behaviors were assessed on video recordings using an automated video tracking system (EthoVision X7, Noldus).

For the OF, rats were placed in the center of the OF (80 \times 80 \times 40 cm, 140 lux) and allowed to freely explore the arena while the time the animals spent in the center zone (40 \times 40 cm), the number of center zone entries and locomotor activity were monitored. OF behaviors were assessed on video recordings using an automated video tracking system (EthoVision X7, Noldus).

For testing on the EPM, rats were placed onto the neutral zone (10 \times 10 cm) facing a closed arm of the plus-shaped maze, which was elevated (70 cm) from the floor and consisted of two closed arms (50 \times 10 cm, 10 lux) and two open arms (50 \times 10 cm, 40–50 lux). An observer blind to treatment determined the percentage of time the rats spent on the open arms as an indicator of anxiety-related behavior as well as the number of closed arm entries as an indicator of locomotor activity on a video recording.

Statistics. Statistical analyses were performed using SigmaPlot 11 (Systat). Two-tailed *t* test was used to evaluate FACS analysis and anxiety-related behavior in CNO-only DREADD-free rats. For calcium imaging, data are expressed as mean \pm SEM. The Student's *t* test was used to compare the size of the NPS-induced response after verification of the normality. Differences were considered significant for $p < 0.05$. OXT content in microdialysates was analyzed using two-way ANOVA for repeated measures (time \times treatment). In experiments designed out of four groups, anxiety-related behavior was analyzed using two-way ANOVA (first infusion \times second infusion). In case of significant main or interaction effects ($p < 0.05$), Tukey-corrected *post hoc* comparisons were performed.

Results

NPS afferents project toward the PVN that harbors NPSR-expressing OXT neurons

To test for NPS neurons innervating the PVN, we infused the retrograde tracer CTB-488 bilaterally into the PVN. Five days later, dense labeling of NPS-immunoreactive neurons was detected throughout the LC, indicating prominent LC-NPS afferents to the PVN (Fig. 1). As NPSR expression has been described in the rat PVN (Xu et al., 2007), we specifically investigated NPSR expression in PVN-OXT neurons of male Wistar rats. In the absence of a specific NPSR antibody (Slattery et al., 2015), we performed FACS analysis in extracted PVN samples 3 weeks after bilateral intra-PVN infusion of a cell type-specific rAAV expressing Venus selectively under the control of an OXT promoter fragment (AAV_{1/2} OXTpr-Venus). Hence, Venus expression was confined to PVN-OXT neurons (Knobloch et al., 2012). FACS analysis of viable cells in combination with qRT-PCR revealed that NPSR mRNA was predominantly expressed in Venus⁺ neurons, whereas NPSR expression in Venus⁻ cells was almost negligible (Fig. 2).

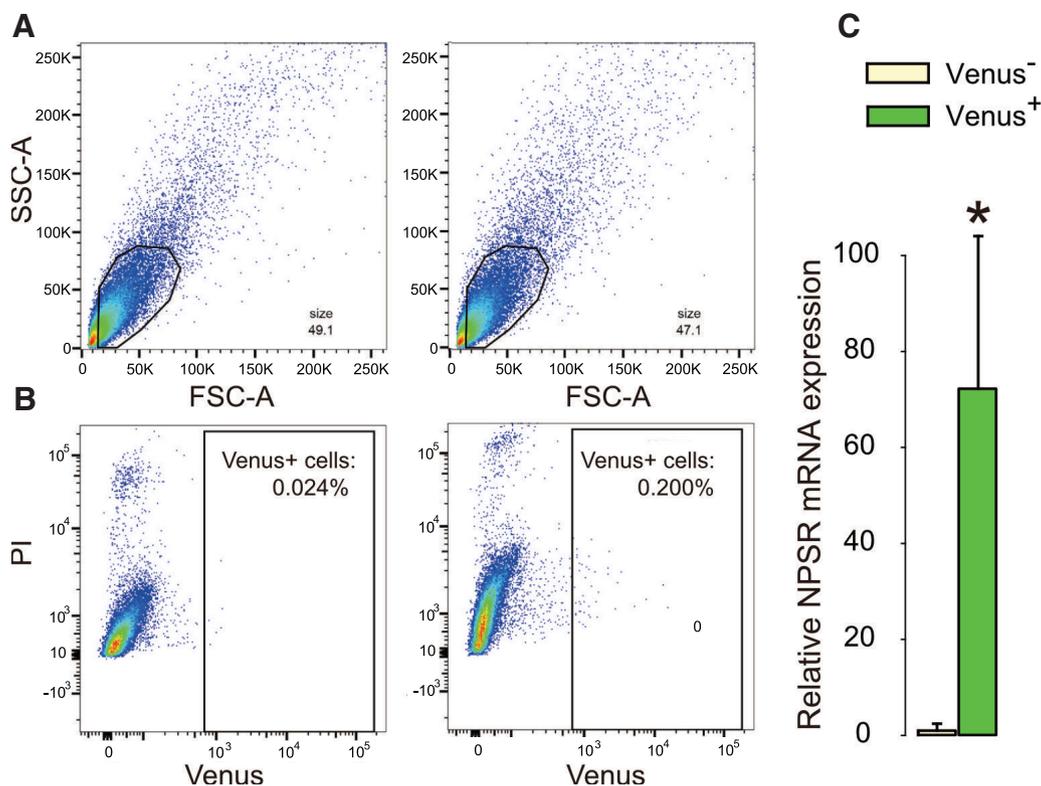


Figure 2. OXT neurons within the hypothalamic PVN and SON express NPSR mRNA. FACS plots indicate that cells were sorted by (**A**) size via side- (SSC) and forward-scattered light (FSC) and (**B**) fluorescence intensity in living cells negative for propidium iodide (PI). **C**, qRT-PCR of reversely transcribed RNA isolated from sorted viable cells demonstrated prominent NPSR mRNA expression in Venus⁺ neurons, whereas NPSR mRNA expression in Venus[−] cells was almost negligible. Data are mean ± SEM. * $p < 0.05$.

NPS activates OXT neurons within the PVN

To study whether NPS activates OXT neurons, we used ultrasensitive fluorescent proteins (GCaMP6s) for imaging intracellular Ca²⁺ levels, which is based on rapid deprotonation of GFP following conformational change of calmodulin upon Ca²⁺ binding (Chen et al., 2013). Three weeks following bilateral infusion of AAV_{1/2}OXTpr-GCaMP6s into the PVN, GCaMP6s was selectively expressed under the control of the OXT promoter fragment (Fig. 3A). Following hypothalamic slice preparation, part of OXT neurons were identified as constitutively active (113 of 372 neurons, 30.4%), whereas the majority of neurons (259 of 372 neurons, 69.6%) displayed low variability with respect to intracellular Ca²⁺ fluctuations and, thereby, were characterized as constitutively silent (Fig. 3B). While a subpopulation of silent OXT neurons (24 of 235, 10.1%) responded to NPS (2 μM for 20 s) by increased fluorescence indicative for transient rise in intracellular Ca²⁺ levels (AUC increase of 58.22 ± 16.20%, max ΔF/F₀ of 75.02 ± 22.03%, duration of the response 16.63 ± 6.40 s; Fig. 3C,D), no response to NPS was observed in the active OXT neurons (2 of 135, 1.4%). In the presence of a selective NPSR antagonist (SHA-68, 100 μM, 30 min), NPS failed to induce any cellular response compared with baseline (AUC increase of −3.53 ± 3.25%, $p < 0.01$; max ΔF/F₀ of 16.63 ± 3.55%, $p < 0.05$; Fig. 3C,D), indicating that the NPS-induced increase in intracellular Ca²⁺ in OXT neurons is specifically mediated via the NPSR.

Another indicator for a stimulated activity of OXT neurons is increased somatodendritic OXT release (Landgraf and Neumann, 2004). Thus, we monitored OXT release within the PVN of conscious rats in response to NPS (1 or 5 nmol, i.c.v.) using intracerebral microdialysis. Two-way ANOVA revealed an alter-

ation in local OXT release in response to NPS ($F_{(8,79)} = 5.93$, $p < 0.001$). In detail, NPS dose-dependently evoked a significant rise in local OXT release during the first (5 nmol, $p < 0.001$ vs Veh) and during the second and third (1 nmol, $p < 0.05$ vs Veh) 30-min dialysis period, respectively, following NPS (Fig. 4).

Selective inhibition of OXTR and chemogenetic silencing of OXT neurons within the PVN prevent NPS-induced anxiolysis

To examine the behavioral relevance of NPS-evoked activation of OXT neurons, two strategies were used: First, OXTR were pharmacologically blocked by i.c.v. or intra-PVN infusion of a specific OXTR-A (des-Gly-NH₂,d(CH₂)₅[Tyr(Me)²,Thr⁴]OVT) before i.c.v. or local infusion of NPS and behavioral testing on the LDB and in the OF, respectively, to assess anxiety-related behavior. Next, PVN-OXT neurons were chemogenetically silenced before i.c.v. infusion of NPS and behavioral testing on the EPM.

Pharmacological blockade of OXTR by OXTR-A

Pharmacological blockade of OXTR signaling by preinfusion of a selective OXTR-A 5 min before NPS infusion prevented NPS-induced anxiolysis in both behavioral tests (Fig. 5). Specifically, comparison of the four existing groups (Veh/Veh, Veh/NPS, OXTR-A/Veh, OXTR-A/NPS) revealed that, in Veh-preinfused rats, i.c.v. NPS increased the percentage of time the rats spent in the lit compartment of the LDB ($F_{(1,31)} = 4.25$, $p = 0.049$; Veh/NPS vs Veh/Veh: $p = 0.006$), whereas i.c.v. OXTR antagonism blocked this effect of NPS (OXTR-A/NPS vs Veh/NPS: $p = 0.036$). The OXTR-A alone did not affect anxiety-related behav-

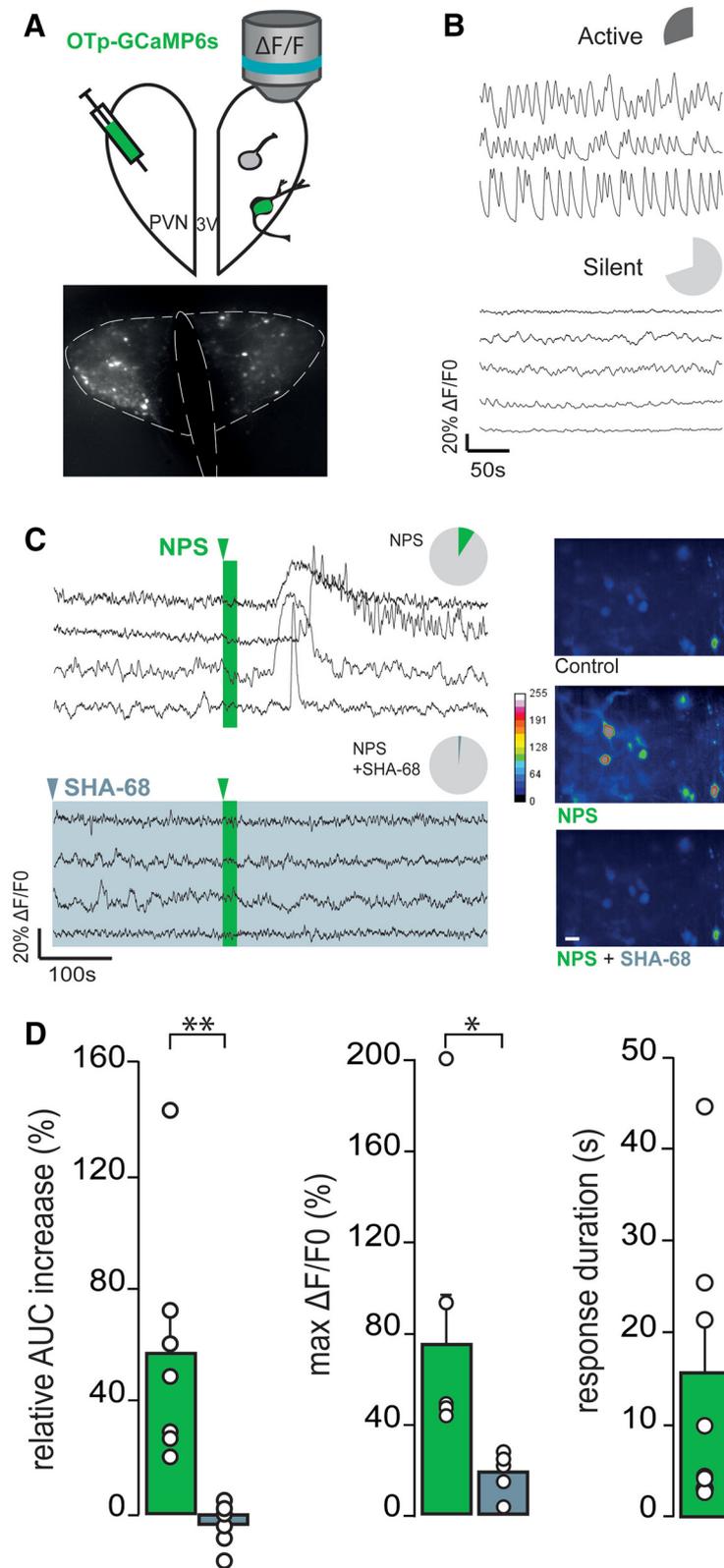


Figure 3. NPS effects on PVN-OXT neurons in hypothalamic slice preparation (**A–D**). **A**, Schematic drawing of the PVN OXTpr-GCaMP6s virus infusion and subsequent $[Ca^{2+}]_i$ imaging of OXT neurons. **B**, Basal activity of two distinct subpopulations of OXT neurons (dark gray represents active; light gray represents silent) illustrated by typical $\Delta F/F_0$ traces. Pie charts represent the proportion of responsive OXT neurons to NPS application alone ($2 \mu M$, 20 s; $n_s = 11$, $n_n = 24$ of 237; green) or in the presence of NPSR antagonist (SHA-68 $100 \mu M$, >15 min; $n_s = 6$, $n_n = 3$ of 135; light blue) and typical $\Delta F/F_0$ traces. Pseudo-color video extract of identified OXT neurons through GCaMP6s imaging $[Ca^{2+}]_i$ in control conditions (gray), in the presence of NPS (green) or NPS + SHA-68 (light blue) (stacks of 50 images/10 s of recording). Scale bar, $20 \mu m$. **D**, Relative AUC increase and maximal $\Delta F/F_0$

ior ($p = 0.48$, OXTR-A/Veh vs Veh/Veh). Neither NPS nor OXTR-A, alone or in combination, influenced the locomotor activity indicated by traveled distance ($F_{(1,31)} = 0.50$, $p = 0.49$; Fig. 5). Similarly, in the OF, i.c.v. NPS produced a robust anxiolytic effect as animals spent more time in the center zone ($F_{(1,33)} = 4.46$, $p = 0.043$; Veh/NPS vs Veh/Veh; $p = 0.002$). In contrast, in rats preinfused with OXTR-A, NPS failed to induce anxiolysis (OXTR-A/NPS vs Veh/NPS; $p = 0.003$). None of the treatments changed locomotor activity in the OF, as reflected by the traveled distance ($F_{(1,33)} = 0.57$, $p = 0.46$; Fig. 5).

To localize the effects of OXTR-A pretreatment and NPS within the PVN, local infusions were performed. In Veh-pretreated rats, local NPS exerted a robust anxiolytic effect, which was comparable with that seen after i.c.v. infusion. Preinfusion of the OXTR-A bilaterally into the PVN prevented the anxiolytic effect of NPS infused 5 min later (Fig. 5). Specifically, in the LDB, NPS increased the time the rats spent in the lit compartment (main effect of second infusion: $F_{(1,41)} = 6.65$, $p = 0.014$; Veh/NPS vs Veh/Veh; $p = 0.003$), whereas preinfusion of OXTR-A prevented this effect ($p = 0.49$, OXTR-A/Veh vs OXTR-A/NPS). Neither local OXTR-A nor NPS, alone or in combination, changed the locomotor activity indicated by the distance traveled in the LDB ($F_{(1,30)} = 0.28$, $p = 0.60$; Fig. 5). The result of local blockade of OXTR preventing the anxiolytic NPS effects within the PVN was recapitulated in the OF: in Veh-pretreated rats, NPS increased the time spent in the center of the OF (main effect of the second infusion: $F_{(1,35)} = 4.17$, $p = 0.049$; Veh/NPS vs Veh/Veh; $p = 0.033$), whereas preinfusion of OXTR-A prevented this anxiolytic effect (OXTR-A/Veh vs OXTR-A/NPS; $p = 0.49$). In the OF, NPS increased the traveled distance indicative of increased locomotor activity (main effect of the second infusion: $F_{(1,35)} = 6.82$, $p = 0.014$; Veh/NPS vs Veh/Veh; $p = 0.049$; Fig. 5).

of OXT neurons in the presence of NPS ($n_s = 11$; green) or NPS + SHA-68 ($n_s = 6$, light blue). Only response duration of OXT neurons in the presence of NPS ($n_s = 11$; green) are represented here. White circles represent the average value per slice. * $p < 0.05$ (Student's t test). ** $p < 0.01$ (Student's t test).

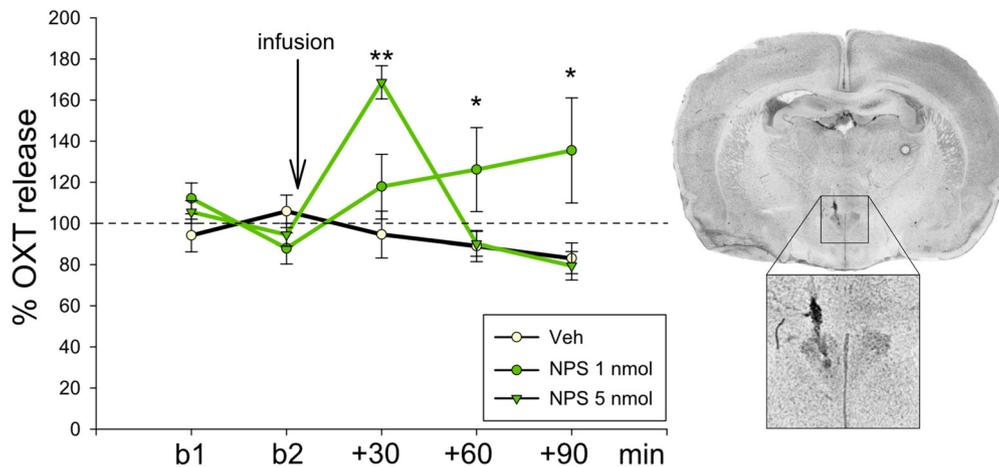


Figure 4. NPS effects on intracerebral OXT release in the PVN of conscious male rats. OXT content in 30-min microdialysates sampled within the PVN under basal conditions (b1 and b2), and after i.c.v. infusion of either Veh or NPS (1 or 5 nmol), as well as a representative microphotograph of a Nissl-stained coronal section demonstrating the placement of the microdialysis probe within the PVN. Data are expressed as percentage of baseline (mean of basal 1 and 2; = 100%; dotted line) \pm SEM; $n = 5$ or 6. $**p < 0.01$ versus all. $*p < 0.05$ versus respective Veh.

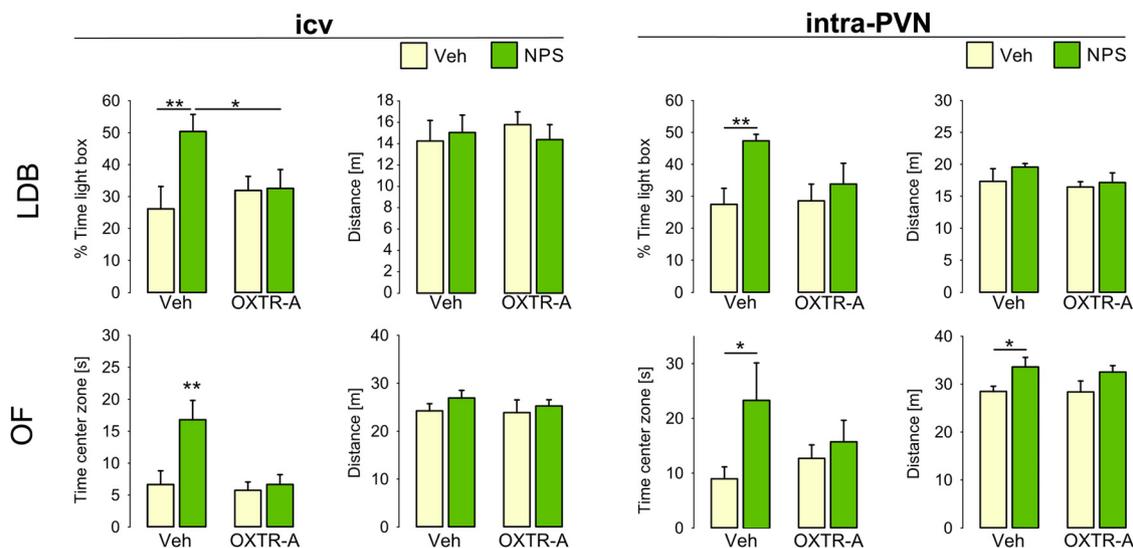


Figure 5. Intracerebroventricular and intra-PVN preinfusion with an OXTR antagonist blocked NPS-induced anxiolysis. Male rats were infused with a selective OXTR antagonist (OXTR-A, 0.75 μ g i.c.v.; 0.15 μ g intra-PVN) before infusion with either NPS (.) (1 nmol i.c.v.; 0.2 nmol intra-PVN) or Veh. The percentage of time spent in the lit compartment of the LDB (upper row) and the time spent in the center zone of the OF (lower row) indicate anxiety-related behavior. Traveled distance indicates locomotor activity in the lit and dark compartment, and center and outer OF zones of the LDB and OF, respectively. Data are mean \pm SEM; group sizes: $n = 8$ –13. $*p < 0.05$ versus all or as indicated. $**p < 0.01$ versus all or as indicated.

Chemogenetic silencing of PVN-OXT neurons

Following intra-PVN infusion of AAV_{1/2} OXTpr-hM4Di:mCherry, an inhibitory DREADD was expressed under the control of the OXT promoter fragment. Quantitative analysis of the PVN showed that $93.0 \pm 1.4\%$ of mCherry-immunopositive cells ($n = 278$) expressed OXT, and $94.2 \pm 1.2\%$ of OXT-immunoreactive neurons ($n = 274$) expressed hM4Di:mCherry, revealing an efficient and specific virus expression. After intraperitoneal CNO (Fig. 6), i.c.v. NPS failed to induce anxiolysis suggesting DREADD-mediated inhibition of PVN-OXT neurons and their importance for NPS-induced anxiolysis. On the EPM, two-way ANOVA revealed a main effect of the first ($F_{(1,31)} = 6.63$, $p = 0.016$, CNO vs PBS) and second infusion ($F_{(1,31)} = 7.65$, $p = 0.010$, NPS vs Veh). In detail, NPS increased the percentage of time spent on the open arms of the EPM in PBS-pretreated rats (PBS/NPS vs PBS/Veh; $p = 0.008$)

indicative of an anxiolytic effect, whereas CNO pretreatment prevented the effect of NPS (CNO/NPS vs PBS/NPS; $p = 0.014$; CNO/Veh vs CNO/NPS; $p = 0.25$). Moreover, NPS increased the percentage of open arm entries (main effect of the first infusion: $F_{(1,35)} = 11.60$, $p = 0.002$; second infusion: $F_{(1,31)} = 10.42$, $p = 0.003$; PBS/NPS vs PBS/Veh; $p = 0.048$), an effect that was also blocked by chemogenetic silencing (CNO/NPS vs PBS/NPS; $p = 0.042$; CNO/Veh vs CNO/NPS; $p = 0.019$). CNO alone resulted in a partial increase in anxiety-related behavior as seen by a reduction in the percentage of open arm entries only ($p < 0.05$ vs all). None of the drugs altered locomotor activity expressed by the number of closed arm entries ($F_{(1,31)} = 1.69$, $p = 0.21$). Control intraperitoneal application of CNO alone to sham-operated animals revealed no behavioral effects during 5-min testing on the EPM, as the percentage of time spent on the open arms ($t_{(12)} = 0.33$, $p = 0.75$), the percentage of open arm entries ($t_{(12)} = -0.71$,

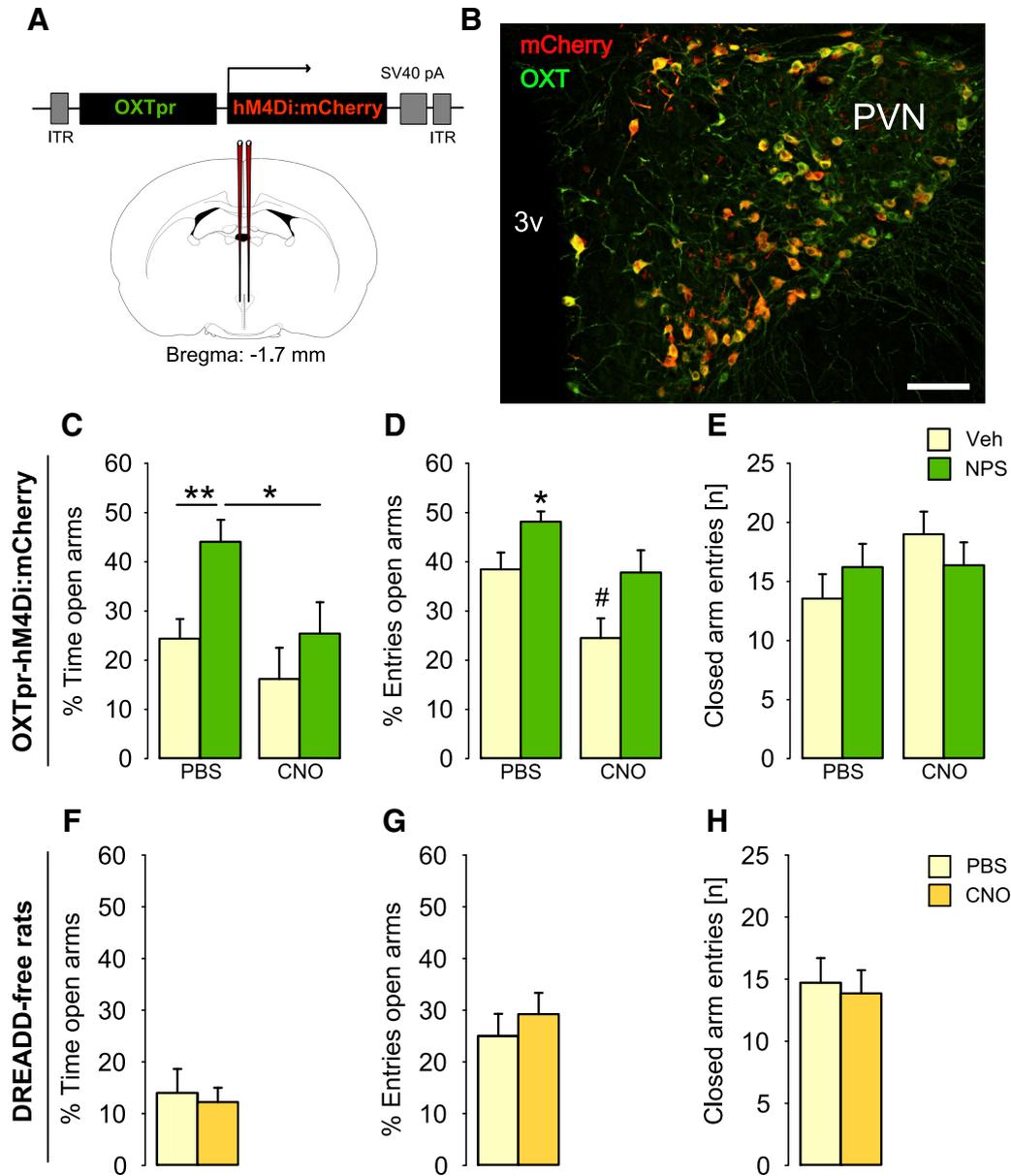


Figure 6. Chemogenetic silencing of PVN-OXT neurons prevented the anxiolytic effect of a subsequent NPS infusion. **A**, Schematic drawing of rAAV construct used to transfect PVN neurons. **B**, Virally introduced expression of an inhibitory DREADD (hM4Di:mCherry) in OXT neurons within the PVN. Scale bar, 100 μ m. 3v, Third ventricle. To evaluate the effect of chemogenetic silencing of PVN-OXT neurons on NPS-induced anxiolysis (**C–E**), rats were pretreated with either PBS or CNO (2 mg/kg; i.p.), followed by i.c.v. infusion of either Ringer’s solution (Veh, 5 μ l) or NPS (1 nmol); group sizes: $n = 8$ or 9, except CNO/Veh: $n = 6$. To analyze potential effects of CNO or its metabolites on anxiety-related behavior, sham-operated DREADD-free rats were injected with either PBS or CNO (2 mg/kg; i.p.); group sizes: $n = 7$. **C, F**, Percentage of time spent on the open arms of the EPM. **D, G**, Percentage of open arm entries. **E, H**, Number of closed arm entries reflects locomotor activity during the 5-min test period. Data are mean + SEM. * $p < 0.05$ versus all or as indicated. ** $p < 0.01$ versus all or as indicated. # $p < 0.05$ versus all.

$p = 0.49$), and the number of closed arm entries ($t_{(12)} = 0.31, p = 0.76$) did not differ in comparison with PBS-treated rats.

Discussion

The present study describes a novel intrahypothalamic mechanism with NPS activating a subpopulation of OXT neurons within the PVN that mediate the anxiolytic effect of NPS. This finding comes at a time of growing interest in brain neuropeptides as potential therapeutic targets to treat psychopathologies, such as anxiety disorders (Pape et al., 2010; Neumann and Landgraf, 2012; Neumann and Slattery, 2016); and both OXT and NPS have been established as potent anxiolytic neuropeptides of the brain (Xu et al., 2004; Neumann, 2008; Pape et al., 2010; Neumann and Landgraf, 2012; Slattery et al., 2015; van den Burg et al., 2015; Neumann and

Slattery, 2016). Herein, our findings demonstrate pericoerulear NPS fibers innervating the PVN and NPSR expression in hypothalamic OXT neurons. Moreover, NPS activated a subpopulation of PVN-OXT neurons as reflected by transient Ca^{2+} influx and increased the somatodendritic release of OXT in the PVN under otherwise basal conditions. Both pharmacological blockade of local OXTR as well as chemogenetic silencing of OXT neurons within the PVN blocked the NPS-induced anxiolysis demonstrating the essential involvement of OXT neurons within the PVN.

Whereas NPS projections in the rat brain have not been studied so far, NPS-immunopositive fibers originating within the LC have been detected in various mouse brain regions, including the PVN as shown in C57BL/6 mice (Clark et al., 2011). Here, we can

confirm the existence of NPS neurons in the LC projecting toward the PVN also in the rat using a retrograde tracer. Thus, in both rats and mice, the PVN has been identified as a target site of NPS neurons in the brainstem.

Previous studies using *in situ* hybridization revealed abundant NPSR mRNA expression in the PVN of rats (Xu et al., 2007). In our study, we applied a sensitive and highly specific technique (FACS analysis of Venus-labeled PVN and SON OXT neurons) and demonstrated prominent NPSR expression in OXT neurons, whereas NPSR mRNA in Venus⁻ cells, likely to be specifically vasopressin or corticotrophin-releasing hormone (CRH) neurons, was almost negligible. Earlier experiments confirmed selective expression of Venus in OXT neurons with >97% colocalization of OXT supporting the significance of our results in terms of cell-type-specific Venus labeling (Knobloch et al., 2012). In this context, it is worth mentioning that our intention to localize NPSR protein in OXT neurons of the PVN with NPSR antibodies used before (Leonard and Ring, 2011) failed, as subsequent analysis using NPSR knock-out mouse brains revealed a severe lack of specificity of these antibodies (Slattery et al., 2015).

Based on the finding of NPSR mRNA expression in OXT neurons of the PVN, we analyzed the neurophysiological effects of NPS on the activity of OXT neurons using ultrasensitive fluorescent proteins. In hypothalamic slice preparations, a subpopulation of constitutively silent OXT neurons expressing ultrasensitive fluorescent Ca²⁺ imaging marker GCaMP6s responded to synthetic NPS with transient Ca²⁺ influx, which reflects neuronal activation. The recorded Ca²⁺ response was heterogeneous, but massive, with a slow rise time and relative long-lasting responses of several seconds. This observation is compatible with a previous study in hippocampal mouse neurons (Erdmann et al., 2015). The NPS effects on intracellular Ca²⁺ also studied in NPSR1-transfected HEK293T and CHO cells are most likely mediated by NPSR-induced G_q signaling (Reinscheid et al., 2005; Liao et al., 2016; Clark et al., 2017). *In vivo*, it has recently been demonstrated that NPS promotes anxiolysis in a phospholipase C-dependent manner and increases intracellular Ca²⁺ levels characterized by increased phosphorylation and synthesis of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II within the rat medial amygdala (Grund and Neumann, 2017).

It is important to note that repeated NPS application failed to induce a repeated Ca²⁺ response in the same OXT neurons, as already reported by previous studies (Jüngling et al., 2008; Meis et al., 2008). While the mechanism involved is yet to be determined, one can hypothesize desensitization of NPSR. However, the specific involvement of NPSR on NPS-induced activation of OXT neurons was successfully demonstrated, because NPS failed to increase intracellular Ca²⁺ levels in the presence of the selective NPSR antagonist SHA-68 (Okamura et al., 2008; Ruzza et al., 2010).

The presence of extracellular Ca²⁺ and the rise in intracellular Ca²⁺ were found to be essential for both OXT secretion from neurohypophysial terminals (Fisher and Bourque, 1996) as well as for somatodendritic release in the SON and PVN (Neumann et al., 1993; Lambert et al., 1994; Ludwig et al., 2002). To test whether NPS also affects the secretory activity of OXT neurons within the PVN, we used microdialysis in combination with a highly sensitive radioimmunoassay. Indeed, we could demonstrate that NPS dose-dependently stimulated OXT release within the PVN of conscious rats under otherwise basal conditions. Central NPS infusion at 1 nmol induced a measurable and long-lasting increase in OXT release from neuronal structures within the PVN over 60 min as reflected by an increased OXT content

in the two consecutive post-treatment 30-min microdialysates. In contrast, 5 nmol of NPS induced a rather rapid increase in OXT release, which declined to baseline during the second sampling period after treatment. However, the underlying mechanisms of the dose-dependent effects of NPS on the dynamics of OXT release and the differential contribution of various Ca²⁺ sources are currently unknown.

The stimulatory effects of NPS on the activity of OXT neurons within the PVN, which are NPSR-mediated, highlight an intrahypothalamic mechanism at the cellular level. Moreover, we can show that NPS exerts a behavioral effect directly within the PVN, and this anxiolytic effect requires the activation of local OXT neurons. Based on pharmacological and chemogenetic inhibition of the OXT system, our results indicate an important role for OXT to mediate the anxiolytic effect of NPS in the hypothalamic PVN. Specifically, preinfusion of a selective OXTR-A (Manning et al., 2012) into the cerebral ventricular system was able to prevent the NPS-induced reduction in anxiety levels as seen in two separate and well-established tests for anxiety-related behavior (i.e., the LDB and the OF). Infusion of the OXTR-A alone did not alter anxiety levels, which confirms earlier results in male rats under basal conditions (Waldherr and Neumann, 2007). Importantly, also local preinfusion of OXTR-A bilaterally into the PVN reduced the robust NPS-induced anxiolysis seen in rats preinfused with vehicle, although to a lower degree. Thus, we hypothesize that NPS infused into the PVN activates local OXT neurons resulting in local somatodendritic OXT release. Both endogenous as well synthetic OXT have been repeatedly shown to exert an anxiolytic effect within the PVN (Neumann et al., 2000; Blume et al., 2008; Jurek et al., 2012; van den Burg et al., 2015). Possible underlying mechanisms of local OXT-induced anxiolysis are likely to include inhibitory effects on local CRF neurons (Jurek et al., 2015). As OXT neurons are glutamatergic in nature, their activation might also increase synaptic glutamate release. This will comprise an autoexcitatory network structure synchronizing OXT release throughout the hypothalamus (Dabrowska et al., 2011; for review, see Johnson and Young, 2017). Moreover, local NPS may activate those OXT neurons in the PVN, which project to other brain regions, such as the amygdala (Knobloch et al., 2012), where OXT was also found to reduce anxiety- and fear-related behavior (Bale et al., 2001; Viviani et al., 2011).

To specifically prove for the involvement of PVN-OXT neurons in the behavioral effects of NPS, we chemogenetically inhibited OXT neurons of the PVN using a G_i-coupled DREADD selectively expressed under the control of the OXT promoter fragment. At the cellular level, chemogenetic silencing using AAV_{1/2} OXTpr-hM4Di:mCherry has been shown to result in reduced mean frequency of spikes induced by application of currents, increased inward currents, and decreased input resistance of OXT neurons (Eliava et al., 2016). Thus, chemogenetically silenced OXT neurons can no longer be activated by NPS. In our experiment, DREADD-evoked silencing of OXT neurons reliably prevented the anxiolytic effect of a subsequent central NPS infusion, as seen on the EPM, which provides final evidence for the essential role of stimulated PVN-OXT neurons in mediating this behavioral effect of NPS. Importantly, injection of CNO to rats expressing DREADD in OXT neurons slightly increased anxiety-related behavior, as seen from a reduced percentage of open arm entries on the EPM. Thus, chemogenetic silencing of OXT neurons might result in a general neuronal inhibition, including abolished intracerebral OXT release under basal conditions within the PVN or in other relevant limbic brain regions, important for the individual level of anxiety. Also, dysregulation of the

CRH system after silencing of OXT neurons, especially during exposure to an emotional stressor, such as the EPM, cannot be ruled out, the more as OXT was found to attenuate the stress-induced expression of CRH in a CREB-dependent manner (Jurek et al., 2015).

Recently, it has been shown that the CNO metabolite clozapine, an atypical antipsychotic, potently activates DREADD (Gomez et al., 2017). To exclude unspecific behavioral effects of CNO or its metabolite clozapine demonstrated at doses >5 mg/kg (i.p.) (MacLaren et al., 2016), we have applied CNO at a dose of 2 mg/kg (i.e., at subthreshold level) to specifically activate DREADD expressed by OXT neurons. Moreover, control application of CNO alone in DREADD-free Wistar rats did not alter anxiety-related behavior and locomotor activity on the EPM. Therefore, we are confident that stimulation of an inhibitory DREADD resulted in selective inhibition of OXT neurons, particularly because i.c.v. and local OXTR antagonism before NPS infusion leads to comparable effects on anxiety-related behavior.

Based on our results, we suggest the following scenario under physiological conditions: In response to a challenging and stressful situation, pericoerulear NPS neurons, which are CRH-sensitive (Jüngling et al., 2012), become activated resulting in local NPS release as shown in the basolateral amygdala during forced swimming (Ebner et al., 2011). However, NPS neurons also project to the PVN as described in mice (Clark et al., 2011), and in rats using a retrograde tracer infused into the PVN (Fig. 1). Thus, NPS released within the PVN from NPS terminals activates OXT neurons, as indicated by increased intracellular Ca^{2+} levels, which results in local OXT release or stimulation of centrally projecting OXT neurons as described above. Finally, the rise in OXT availability in the regional extracellular fluid results in the modulation of an appropriate anxiety response of an individual to cope with the environmental challenge.

In conclusion, our findings demonstrate a novel intrahypothalamic mechanism involving NPSR-expressing OXT neurons of the PVN, which are activated by NPS and respond with transient increase in intracellular Ca^{2+} and local somatodendritic OXT release. The stimulation of local OXT neurons is essential for NPS-induced anxiolysis, as this effect was blocked by specific pharmacological and chemogenetic inhibition of the OXT system. These findings provide important evidence for interactions of NPS with another neuropeptidergic system but obviously warrant further research into how these circuits orchestrate specific physiological effects resulting in distinct behavioral outputs (e.g., the regulation of stress or anxiety-related behavior).

References

- Anthony TE, Dee N, Bernard A, Lerchner W, Heintz N, Anderson DJ (2014) Control of stress-induced persistent anxiety by an extra-amygdala septo-hypothalamic circuit. *Cell* 156:522–536. [CrossRef Medline](#)
- Bale TL, Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, McCarthy MM (2001) CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neurosci* 21:2546–2552. [Medline](#)
- Beck B, Fernet B, Stricker-Krongrad A (2005) Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 332:859–865. [CrossRef Medline](#)
- Beiderbeck DI, Lukas M, Neumann ID (2014) Anti-aggressive effects of neuropeptide S independent of anxiolysis in male rats. *Front Behav Neurosci* 8:185. [CrossRef Medline](#)
- Ben-Barak Y, Russell JT, Whitnall MH, Ozato K, Gainer H (1985) Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system: I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Neurosci* 5:81–97. [Medline](#)
- Blume A, Bosch OJ, Miklos S, Torner L, Wales L, Waldherr M, Neumann ID (2008) Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 27:1947–1956. [CrossRef Medline](#)
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreier ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295–300. [CrossRef Medline](#)
- Clark SD, Duangdao DM, Schulz S, Zhang L, Liu X, Xu YL, Reinscheid RK (2011) Anatomical characterization of the neuropeptide S system in the mouse brain by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 519:1867–1893. [CrossRef Medline](#)
- Clark SD, Kenakin TP, Gertz S, Hassler C, Gay EA, Langston TL, Reinscheid RK, Runyon SP (2017) Identification of the first biased NPS receptor agonist that retains anxiolytic and memory promoting effects with reduced levels of locomotor stimulation. *Neuropharmacology* 118:69–78. [CrossRef Medline](#)
- Dabrowska J, Hazra R, Ahern TH, Guo JD, McDonald AJ, Mascagni F, Muller JF, Young LJ, Rainnie DG (2011) Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotrophin-releasing factor and oxytocin systems in the hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: implications for balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology* 36:1312–1326. [CrossRef Medline](#)
- de Jong TR, Beiderbeck DI, Neumann ID (2014) Measuring virgin female aggression in the female intruder test (FIT): effects of oxytocin, estrous cycle, and anxiety. *PLoS One* 9:e91701. [CrossRef Medline](#)
- de Jong TR, Menon R, Bludau A, Grund T, Biermeier V, Klampfl SM, Jurek B, Bosch OJ, Hellhammer J, Neumann ID (2015) Salivary oxytocin concentrations in response to running, sexual self-stimulation, breastfeeding and the TSST: the Regensburg Oxytocin Challenge (ROC) study. *Psychoneuroendocrinology* 62:381–388. [CrossRef Medline](#)
- Ebner K, Rjabokov A, Pape HC, Singewald N (2011) Increased in vivo release of neuropeptide S in the amygdala of freely moving rats after local depolarisation and emotional stress. *Amino Acids* 41:991–996. [CrossRef Medline](#)
- Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, Ciobanu AC, Triana Del Rio R, Roth LC, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demoulière N, Busnelli M, Chini B, Tan LL, Mitre M, Froemke RC, Chao MV, et al. (2016) A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron* 89:1291–1304. [CrossRef Medline](#)
- Erdmann F, Kügler S, Blaesse P, Lange MD, Skryabin BV, Pape HC, Jüngling K (2015) Neuronal expression of the human neuropeptide S receptor NPSR1 identifies NPS-induced calcium signaling pathways. *PLoS One* 10:e0117319. [CrossRef Medline](#)
- Fisher TE, Bourque CW (1996) Calcium-channel subtypes in the somata and axon terminals of magnocellular neurosecretory cells. *Trends Neurosci* 19:440–444. [CrossRef Medline](#)
- Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357:503–507. [CrossRef Medline](#)
- Gross C, Hen R (2004) The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* 5:545–552. [CrossRef Medline](#)
- Grund T, Neumann ID (2017) Neuropeptide S induces acute anxiolysis by phospholipase C-dependent signaling within the medial amygdala. *Neuropsychopharmacology*. Advance online publication. Retrieved Aug. 14, 2017. doi: 10.1038/npp.2017.169. [CrossRef Medline](#)
- Guez-Barber D, Fanous S, Harvey BK, Zhang Y, Lehrmann E, Becker KG, Picciotto MR, Hope BT (2012) FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J Neurosci Methods* 203:10–18. [CrossRef Medline](#)
- Johnson ZV, Young LJ (2017) Oxytocin and vasopressin neural networks: implications for social behavioral diversity and translational neuroscience. *Neurosci Biobehav Rev* 76:87–98. [CrossRef Medline](#)
- Jones BE, Yang TZ (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242:56–92. [CrossRef Medline](#)
- Jüngling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, Okamura N, Duangdao DM, Xu YL, Reinscheid RK, Pape HC (2008) Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of

- intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59:298–310. [CrossRef Medline](#)
- Jüngling K, Liu X, Lesting J, Coulon P, Sosulina L, Reinscheid RK, Pape HC (2012) Activation of neuropeptide S-expressing neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. *J Physiol* 590:3701–3717. [CrossRef Medline](#)
- Jurek B, Slattery DA, Maloumy R, Hillerer K, Koszinowski S, Neumann ID, van den Burg EH (2012) Differential contribution of hypothalamic MAPK activity to anxiety-like behaviour in virgin and lactating rats. *PLoS One* 7:e37060. [CrossRef Medline](#)
- Jurek B, Slattery DA, Hiraoka Y, Liu Y, Nishimori K, Aguilera G, Neumann ID, van den Burg EH (2015) Oxytocin regulates stress-induced Crf gene transcription through CREB-regulated transcription coactivator 3. *J Neurosci* 35:12248–12260. [CrossRef Medline](#)
- Kessler RC, Brandenburg N, Lane M, Roy-Byrne P, Stang PD, Stein DJ, Wittchen HU (2005) Rethinking the duration requirement for generalized anxiety disorder: evidence from the National Comorbidity Survey Replication. *Psychol Med* 35:1073–1082. [CrossRef Medline](#)
- Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann LC, Eliava M, Khrulev S, Cetin AH, Osten P, Schwarz MK, Seeburg PH, Stoop R, Grinevich V (2012) Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* 73:553–566. [CrossRef Medline](#)
- Lambert RC, Dayanithi G, Moos FC, Richard P (1994) A rise in the intracellular Ca^{2+} concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin. *J Physiol* 478:275–287. [CrossRef Medline](#)
- Landgraf R, Neumann ID (2004) Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 25:150–176. [CrossRef Medline](#)
- Leonard SK, Ring RH (2011) Immunohistochemical localization of the neuropeptide S receptor in the rat central nervous system. *Neuroscience* 172:153–163. [CrossRef Medline](#)
- Liao Y, Lu B, Ma Q, Wu G, Lai X, Zhang J, Shi Y, Liu D, Han F, Zhou N (2016) Human neuropeptide S receptor is activated via a Galphaq protein-biased signaling cascade by a human neuropeptide S analog lacking the C-terminal 10 residues. *J Biol Chem* 291:7505–7516. [CrossRef Medline](#)
- Li W, Chang M, Peng YL, Gao YH, Zhang JN, Han RW, Wang R (2009) Neuropeptide S produces antinociceptive effects at the supraspinal level in mice. *Regul Pept* 156:90–95. [CrossRef Medline](#)
- Li Y, Schmidt-Edelkraut U, Poetz F, Oliva I, Mandl C, Hözl-Wenig G, Schönig K, Bartsch D, Ciccolini F (2015) γ -Aminobutyric A receptor (GABA(A)R) regulates aquaporin 4 expression in the subependymal zone: relevance to neural precursors and water exchange. *J Biol Chem* 290:4343–4355. [CrossRef Medline](#)
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25:402–408. [CrossRef Medline](#)
- Lobo MK, Karsten SL, Gray M, Geschwind DH, Yang XW (2006) FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nat Neurosci* 9:443–452. [CrossRef Medline](#)
- Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307–319. [CrossRef Medline](#)
- Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418:85–89. [CrossRef Medline](#)
- Lukas M, Toth I, Veenema AH, Neumann ID (2013) 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* 38:916–926. [CrossRef Medline](#)
- MacLaren DA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, España RA, Clark SD (2016) Clozapine N-oxide administration produces behavioral effects in Long–Evans rats: implications for designing DREADD experiments. *eNeuro* 3:ENEURO.0219–16.2016. [CrossRef Medline](#)
- Manning M, Misicka A, Olma A, Bankowski K, Stoev S, Chini B, Durroux T, Mouillac B, Corbani M, Guillon G (2012) Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol* 24:609–628. [CrossRef Medline](#)
- Meis S, Bergado-Acosta JR, Yanagawa Y, Obata K, Stork O, Munsch T (2008) Identification of a neuropeptide S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS One* 3:e2695. [CrossRef Medline](#)
- Neumann ID (2007) Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. *Biochem Soc Trans* 35:1252–1257. [CrossRef Medline](#)
- Neumann ID (2008) Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol* 20:858–865. [CrossRef Medline](#)
- Neumann ID, Landgraf R (2012) Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends Neurosci* 35:649–659. [CrossRef Medline](#)
- Neumann ID, Slattery DA (2016) Oxytocin in general anxiety and social fear: a translational approach. *Biol Psychiatry* 79:213–221. [CrossRef Medline](#)
- Neumann ID, Torner L, Wigger A (2000) Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95:567–575. [CrossRef Medline](#)
- Neumann ID, Torner L, Toschi N, Veenema AH (2006) Oxytocin actions within the supraoptic and paraventricular nuclei: differential effects on peripheral and intranuclear vasopressin release. *Am J Physiol Regul Int Comp Physiol* 291:R29–R36. [CrossRef Medline](#)
- Neumann I, Russell JA, Landgraf R (1993) Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience* 53:65–75. [CrossRef Medline](#)
- Okamura N, Habay SA, Zeng J, Chamberlin AR, Reinscheid RK (2008) Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1, 1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluorobenzamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 325:893–901. [CrossRef Medline](#)
- Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS, Hrubby VJ, Stricker EM, Verbalis JG (1991) Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12:113–118. [CrossRef Medline](#)
- Pape HC, Jüngling K, Seidenbecher T, Lesting J, Reinscheid RK (2010) Neuropeptide S: a transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. *Neuropharmacology* 58:29–34. [CrossRef Medline](#)
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, Ed 7. San Diego: Academic.
- Reinscheid RK, Xu YL, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, Wang Z, Civelli O (2005) Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide S receptor variants. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1338–1345. [CrossRef Medline](#)
- Ruzza C, Rizzi A, Trapella C, Pela' M, Camarda V, Ruggieri V, Filaferro M, Cifani C, Reinscheid RK, Vitale G, Ciccocioppo R, Salvadori S, Guerrini R, Calo' G (2010) Further studies on the pharmacological profile of the neuropeptide S receptor antagonist SHA 68. *Peptides* 31:915–925. [CrossRef Medline](#)
- Ruzza C, Asth L, Guerrini R, Trapella C, Gavioli EC (2015) Neuropeptide S reduces mouse aggressiveness in the resident/intruder test through selective activation of the neuropeptide S receptor. *Neuropharmacology* 97:1–6. [CrossRef Medline](#)
- Slattery DA, Naik RR, Grund T, Yen YC, Sartori SB, Füchsl A, Finger BC, Elfving B, Nordemann U, Guerrini R, Calo G, Wegener G, Mathé AA, Singewald N, Czibere L, Landgraf R, Neumann ID (2015) Selective breeding for high anxiety introduces a synonymous SNP that increases neuropeptide S receptor activity. *J Neurosci* 35:4599–4613. [CrossRef Medline](#)
- Smith KL, Patterson M, Dhillo WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner JV, Ghatei MA, Bloom SR (2006) Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology* 147:3510–3518. [CrossRef Medline](#)
- Swanson LW, Sawchenko PE (1980) Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31:410–417. [CrossRef Medline](#)
- Swanson LW, Sawchenko PE (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6:269–324. [CrossRef Medline](#)
- Torner L, Plotsky PM, Neumann ID, de Jong TR (2017) Forced swimming-induced oxytocin release into blood and brain: effects of adrenalectomy and corticosterone treatment. *Psychoneuroendocrinology* 77:165–174. [CrossRef Medline](#)

- van den Burg EH, Stindl J, Grund T, Neumann ID, Strauss O (2015) Oxytocin stimulates extracellular Ca(2+) influx through TRPV2 channels in hypothalamic neurons to exert its anxiolytic effects. *Neuropsychopharmacology* 40:2938–2947. [CrossRef Medline](#)
- Viviani D, Charlet A, van den Burg E, Robinet C, Hurni N, Abatis M, Magara F, Stoop R (2011) Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science* 333:104–107. [CrossRef Medline](#)
- Waldherr M, Neumann ID (2007) Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16681–16684. [CrossRef Medline](#)
- Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L, Civelli O (2004) Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 43:487–497. [CrossRef Medline](#)
- Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK (2007) Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 500:84–102. [CrossRef Medline](#)
- Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, Kimura T, Young LJ, Onaka T, Nishimori K (2009) Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 29:2259–2271. [CrossRef Medline](#)
- Zoicas I, Slattery DA, Neumann ID (2014) Brain oxytocin in social fear conditioning and its extinction: involvement of the lateral septum. *Neuropsychopharmacology* 39:3027–3035. [CrossRef Medline](#)
- Zoicas I, Menon R, Neumann ID (2016) Neuropeptide S reduces fear and avoidance of con-specifics induced by social fear conditioning and social defeat, respectively. *Neuropharmacology* 108:284–291. [CrossRef Medline](#)

3. ARTICLE 3 : Données préliminaires

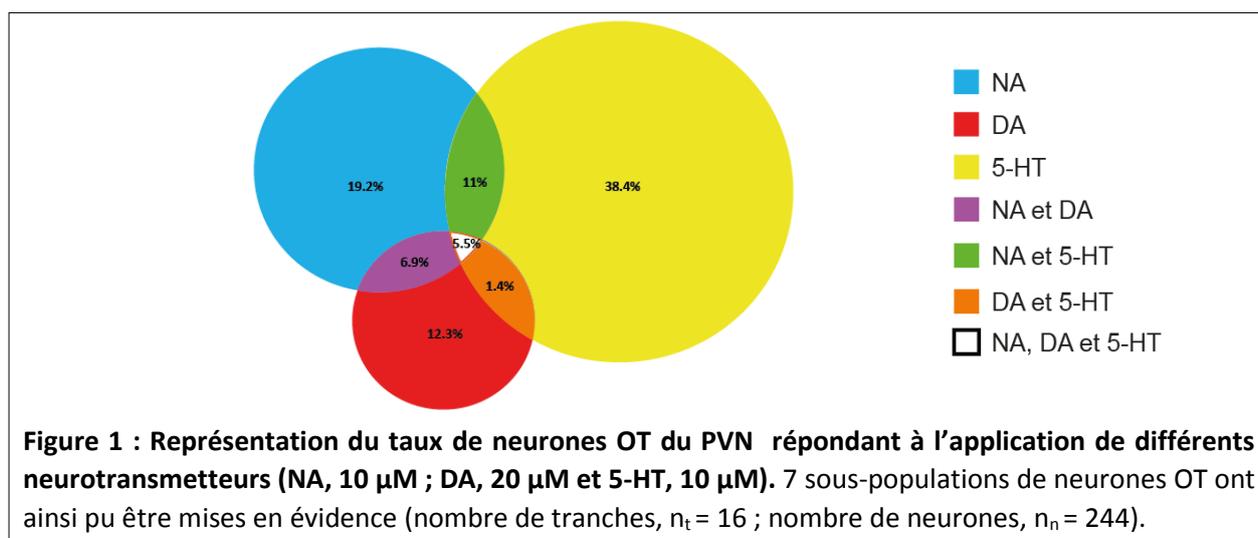
Caractérisation fonctionnelle des projections de la *Zona Incerta* sur les neurones ocytocinergiques.

Mots clés : *zona incerta*, dopamine, ocytocine, noyau paraventriculaire

I. Introduction

Différentes études ont mis en évidence des projections du PVN vers de nombreuses structures du SNC ainsi que leur fonction de régulation des fonctions physiologiques telles que l'anxiété, la douleur ou encore la prise alimentaire (Knobloch et al., 2012 ; Eliava et al., 2016 ; Geerling et al., 2010). Cependant, même si les rôles de l'OT sont de nos jours bien connus, des incertitudes persistent. Comment le système OT est-il recruté afin d'exercer ses différentes fonctions ? Existe-t-il des sous-groupes fonctionnels de neurones OT au sein du PVN ?

Il a été montré que l'activité des neurones OT peut être modulée par différents neurotransmetteurs tels que la noradrénaline (Daftary et al., 1998), la dopamine et la sérotonine (Azdad et al., 2003). La littérature montre que ces neurotransmetteurs proviennent de structures cérébrales différentes : la NA provient du *locus caeruleus* (LC) (Loughlin et al., 1986), la DA principalement de la *zona incerta* (ZI) (Tonelli et Chiaraviglio, 1995) et la 5-HT des noyaux du raphé (Condés-Lara et al., 2012). Des données préliminaires *in vitro*, obtenues au laboratoire ont mis en évidence des sous-populations de neurones OT du PVN activées par ces différents neurotransmetteurs (Figure 1).



Pour la suite de ce travail, nous nous sommes focalisés sur la DA provenant de la *zona incerta* (ZI). Cette structure, connue depuis les années 1880, fut décrite comme « une région dont rien de certain ne peut être affirmé » (Mitrofanis, 2005). Cependant, les neurones DA et GABA de la ZI ainsi que leurs projections vers l'hypothalamus semblent jouer un rôle majeur dans le comportement alimentaire (Tonelli et Chiaraviglio, 1995). Une étude a récemment montré que la stimulation des neurones GABA de la ZI projetant vers les PVN induit une prise alimentaire excessive chez des souris (Zhang et van den Pol, 2017). Une inhibition des neurones GABA de la ZI semble jouer un rôle dans certains cas de douleurs neuropathiques (Moon et al., 2016). Cependant, cette structure reste peu connue et donc complexe. C'est pourquoi l'objectif de ce projet est de mieux comprendre l'implication potentielle des projections de la ZI sur les neurones OT du PVN. Pour cela, le recours à différents vecteurs viraux a été nécessaire afin de repérer spécifiquement les neurones DA de la ZI projetant sur le PVN ainsi que pour le marquage spécifique des neurones OT du PVN. Une fois les neurones d'intérêt marqués, nous avons combinés des approches électrophysiologiques, optogénétiques et d'imagerie calcique afin d'étudier le recrutement des neurones OT par les neurones DA de la ZI.

II. Matériels et méthodes

2.1. Animaux et conditions de stabulation

Les animaux utilisés lors des expériences sont des rats (*Rattus norvegicus*) femelles Wistar. Les animaux sont installés par fratrie de 3-4 individus dans des cages collectives, soumis à un cycle jour/nuit de 12 h (7-19 h). La pièce de stabulation est maintenue à une température de 22 °C et à un taux d'humidité de 45 % (± 5 %) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. À 8 semaines, les rats sont considérés comme adultes avec peu de variation de la morphologie crânienne et encéphalique. Les coordonnées d'injections stéréotaxiques sont alors considérées fiables. L'ensemble des procédures réalisées dans cette étude a été approuvé par le CREMEAS et le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (n°2016011815445431).

2.2. Injections stéréotaxiques de différents vecteurs viraux

Les virus injectés par stéréotaxies sont des virus adéno-associés (AAV) provenant du centre de recherche en science (DFKZ) de Heidelberg en Allemagne ainsi qu'un virus CAV (Canine AdenoVirus) provenant de l'institut de génétique moléculaire de Montpellier. Les rats sont

anesthésiés grâce à une injection en intrapéritonéal d'un mélange de kétamine/xylazine (Imalgène, 87 mg/kg ; Rompun, 13 mg/kg). L'injection de vecteurs viraux dans le cerveau de rat a été réalisée par analogie avec Knobloch et al., 2012. Chaque noyau a été injecté bilatéralement aux coordonnées suivantes : le PVN (M-L \pm 0.3 mm, A-P -1.8 mm, D-V -8.0 mm) et la ZI rostrale (M-L \pm 1.8 mm, A-P -2.4 mm, D-V -7.8 mm) (Paxinos et Watson, 1998). Le point d'origine pour les coordonnées est le bregma et la différence de niveau Z ne doit pas être supérieure à 0.1mm (Knobloch et al., 2012). Le volume d'injection par site d'injection est de 300 nL tandis que la titration virale utilisée est de l'ordre de 10^{11} - 10^{12} copies génomique par mL.

L'utilisation de trois vecteurs viraux différents ont été nécessaires :

- ***AAV-pOT::GCaMP6s***

La GCaMP6s est une sonde calcique créée à partir de la fusion de la GFP (protéine fluorescente verte) avec une calmoduline. La fixation du calcium sur la calmoduline entraîne une modification de la conformation spatiale de ce complexe, elle-même responsable de l'augmentation de l'intensité de fluorescence reflétant ainsi la variation d'activité calcique de la cellule. L'expression de la GCaMP6s est placée sous la direction du promoteur OT afin de marquer spécifiquement les neurones OT du PVN (zone d'injection de ce virus).

- ***Virus AAV-pEF1a::C1V1(t/t)-mCherry***

Ce vecteur viral a été injecté dans le PVN afin de permettre des stimulations optiques. En effet, C1V1 est une opsine et un canal non sélectif aux cations. Lorsqu'elle est stimulée, l'opsine C1V1 induit généralement une dépolarisation de la cellule qui l'exprime et donc une augmentation de l'excitabilité du neurone. La mCherry quant à elle est un fluorophore rouge. Sa fusion avec C1V1 permet d'utiliser la fluorescence de mCherry comme marqueur de la transfection. Grâce à ce vecteur viral injecté directement dans la ZI, toutes les fibres DA de cette zone sont marquées.

- ***CAV-Cre et AAV-pEF1a::DIO-C1V1(t/t)-mCherry***

Afin d'augmenter la spécificité du marquage des neurones de la ZI projetant au PVN, deux vecteurs viraux supplémentaires ont été nécessaires. Le vecteur viral CAV-Cre a été injecté dans le PVN tandis que AAV-pEF1a::DIO-C1V1(t/t)-mCherry a été injecté dans la ZI. L'intérêt de combiner ces deux vecteurs viraux est que seuls les neurones transfectés par ce dernier virus et qui possèdent la Cre ne vont exprimer le marqueur fluorescent mCherry et donc par conséquent la C1V1. Ceci permet un marquage très spécifique des neurones DA de la ZI projetant sur les neurones OT du PVN.

2.3. Tranches aigües de cerveau

Deux semaines après les injections virales par stéréotaxies, les rats sont sacrifiés. Pour cela, les rats sont anesthésiés avec une injection ip de pentobarbital de sodium (82 mg/kg). Lorsque l'animal ne présente plus aucun réflexe, une perfusion intracardiaque avec une solution appelée fluide cérébro-spinal artificiel (ACSF). Pour les rats âgés de 10 ou 11 semaines, l'aCSF utilisé est à base de NMDG et il est conservé en permanence au froid. Cette aCSF NMDG contient (en mM) : NMDG (93), KCl (2.5), NaH₂PO₄ (1.25), NaHCO₃ (30), MgSO₄ (10), CaCl₂ (0.5), HEPES (20), D-Glucose (25), L-ascorbic acid (5), thiourea (2), sodium pyruvate (3), N-acetyl-L-cysteine (10), kynurenic acid (2). Le pH est ajusté à 7.4 en utilisant du HCl 37 % et l'aCSF NMDG est oxygéné en permanence (95 % O₂ et 5 % CO₂). Après décapitation de l'animal, la tête est rapidement transférée dans le même aCSF que celui utilisé pour la perfusion intracardiaque. Le cerveau est alors extrait de la boîte crânienne et collé de sorte à obtenir des coupes coronales de cerveau, d'épaisseur 350 µm. Ces coupes sont réalisées à l'aide d'un vibratome Leica VT1000s. Après la coupe, les tranches contenant la ZI et le PVN (en moyenne 2-3 tranches par animal) sont immédiatement placées dans de l'aCSF NMDG oxygéné (95 % O₂ et 5 % CO₂) et à 37°C pendant 10 minutes avant d'être transférées dans une chambre contenant de l'aCSF normal oxygéné (95 % O₂ et 5 % CO₂) et elles sont maintenues à température ambiante dans l'obscurité. L'aCSF normal, utilisé tout au long des expériences contient (en mM) : NaCl (124), KCl (2.5), NaH₂PO₄ (1.25), NaHCO₃ (26), MgSO₄ (2), CaCl₂ (2), D-Glucose (15). Tout comme l'aCSF NMDG, l'aCSF normal est oxygéné en permanence (95 % O₂ et 5 % CO₂) et ajusté à un pH de 7.4 avec du HCl 37 %. L'osmolarité de chaque ACSF a été vérifiée et maintenue entre 307 et 312 mOsm/L. Pour les expériences d'électrophysiologie ou d'imagerie calcique, les tranches sont transférées dans la chambre d'enregistrement qui est en permanence perfusée à une vitesse de 2 mL/min avec l'aCSF normal oxygéné (95 % O₂ et 5 % CO₂) et à température ambiante.

2.4. Stimulations optiques

Les stimulations optiques ont été réalisées avec des diodes électroluminescentes (LED). Les protocoles de stimulation utilisés sont les suivants : 10 Hz (10 stimulations de 10 ms sur 1 s), 20 Hz (20 stimulations de 10 ms sur 1 s) ou encore 30 Hz (30 stimulations de 10 ms sur 1 s) et l'ensemble des stimulations a été réalisé en microscopie confocale.

2.5. Electrophysiologie

Une fois la tranche de cerveau placée dans la chambre d'enregistrement du microscope, la zone d'intérêt est repérée en infra-rouge, au grossissement x40 et les neurones de cette zone sont repérés au grossissement x400. Grâce aux injections stéréotaxiques de vecteurs viraux permettant l'expression de protéines fluorescentes dans des neurones spécifiques, il est alors possible de discriminer au sein d'une même région les neurones d'intérêt. Une pipette de borosilicate (OD 1.5 mm, ID 0.86 mm ; Sutter Instrument, CA USA) de résistance comprise entre 4 et 6 M Ω , remplie d'une solution intrapipette contenant (en mM) : KMeSO₄ (135), NaCl (0.5), MgCl₂ (0.2), HEPES(10), ATPNa₂ (2), GTPNa (0.3), est descendue au plus près du neurone repéré afin de l'enregistrer. Les enregistrements électrophysiologiques en patch-clamps sont réalisés en configuration cellule entière. L'ensemble des données est collecté grâce à un amplificateur/opérateur qui renvoie le signal à l'interface analogique/digitale (AxonInstruments® Digidata1322A) qui lui-même transmet le signal vers ClampEx afin de suivre en direct l'enregistrement. Au début de chaque enregistrement, le neurone est maintenu à un potentiel de membrane physiologique (-65 mV) et les stimulations optiques peuvent ainsi être réalisées.

2.6. Imagerie calcique

La procédure de préparation et la mise en place des tranches est identiques à celle décrite précédemment lors des enregistrements électrophysiologiques. L'indicateur calcique GCaMP6s a été placé sous la direction du promoteur de l'OT et injecté par stéréotaxie directement de le PVN, ce qui permet de marquer spécifiquement les neurones OT du PVN et ainsi suivre leur activité calcique au cours de différents protocoles de stimulations des fibres DA de la ZI projetant sur ces neurones. Ces fibres DA de la ZI sont quant à elles marquées grâce à une opsine C1V1 afin de les stimuler par optostimulation. La stimulation optique est répétée en boucle à une fréquence de 5 Hz. Un maximum de deux séries d'enregistrements par tranche est réalisé.

2.7. Analyses et statistiques

L'ensemble des données électrophysiologiques a été extrait et ensuite traité avec Clampfit 10.7. Après vérification de la non-normalité de nos échantillons, le test statistique utilisé afin

de comparer les effets des différentes stimulations sur le nombre de potentiels d'action (PA) engendré, est le test de Friedman.

L'ensemble des données d'imagerie calcique a été réalisé avec Fiji puis Excel. Les régions d'intérêt (ROI) ont été définies sur les traces obtenues en condition basale. Le bruit de fond propre à chaque tranche a été soustrait à chaque ROI d'intérêt. Afin de tenir compte de la perte de la fluorescence « naturelle » (le bleaching), la régression linéaire a été utilisée et appliquée à toutes les ROI. Le ratio de l'activité calcique pendant la stimulation optique sur l'activité calcique observée en condition basale ($\Delta F/F_0$, en %) permet de rendre compte des variations de l'activité calcique. L'aire sous la courbe (AUC, en %) a été calculée sur une période de temps de 20 s avant et après la stimulation optique de C1V1. Les réponses sont considérées comme statistiquement significatives lorsque l'AUC et le $\Delta F/F_0$ maximum sont augmentés respectivement de 20 % de la moyenne et de 4 fois la SEM (erreur standard à la moyenne). La durée de la réponse engendrée par la stimulation optique ainsi que le délai de réponse ont également été quantifiés.

III. Résultats

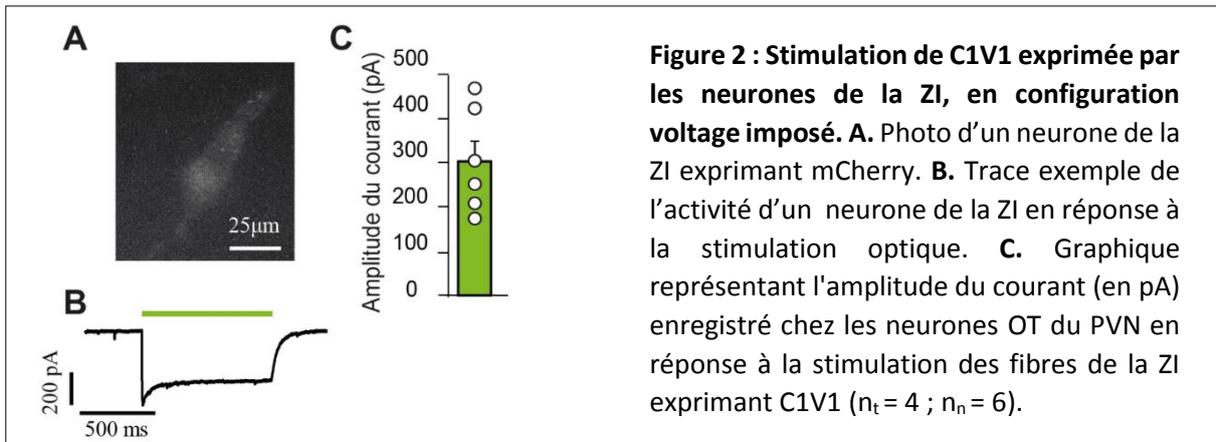
3.1. Validation de l'approche virale par analyse de l'activité électrophysiologique

Après injection de l'outil viral AAV-EF1a::C1V1(t/t)-mCherry permettant d'exprimer la C1V1 dans les neurones de la ZI projetant dans le PVN, son expression et son efficacité ont été vérifiées. Le niveau d'expression de l'opsine a été validé après visualisation qualitative de l'expression de la mCherry tandis que l'efficacité de l'opsine a été validée par une analyse quantitative de l'activité électrophysiologique des neurones exprimant la C1V1 lors de l'optostimulation.

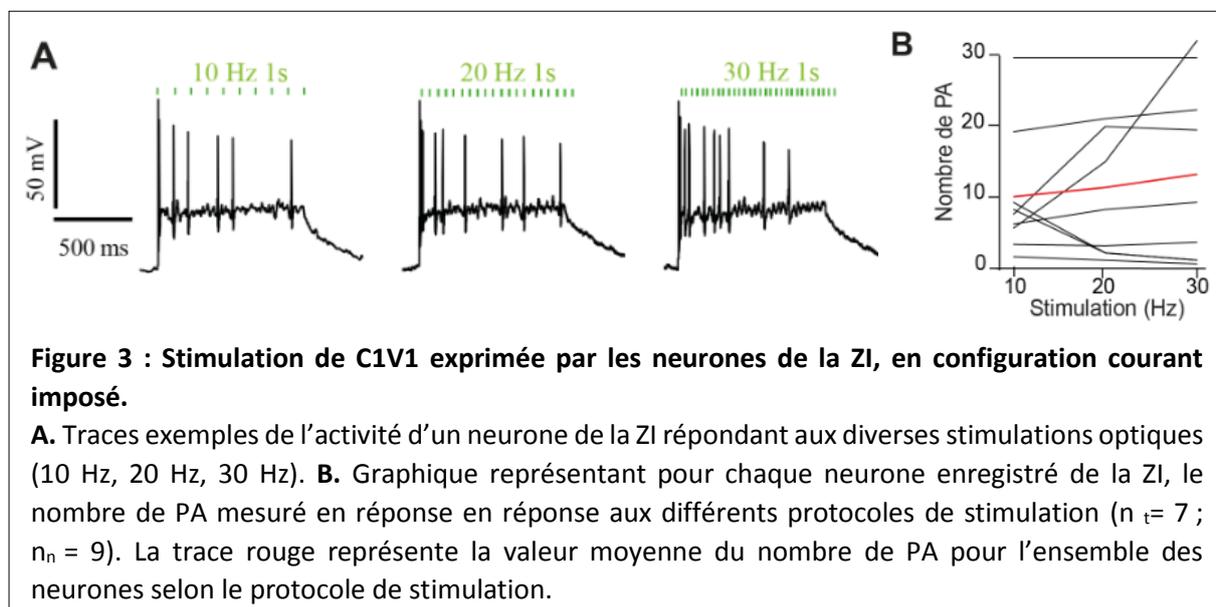
3.2. Expression de C1V1 dans les neurones de projection ZI vers le PVN

Après avoir validé notre opsine dans le PVN, son expression et fonctionnalité ont été évaluées dans les neurones de la ZI projetant vers le PVN. Les protocoles utilisés sont les mêmes que ceux utilisés précédemment dans le PVN à savoir les protocoles de stimulation à 10 Hz, 20 Hz et 30 Hz. Comme on pouvait s'y attendre, les résultats ont été identiques à ceux obtenus au niveau du PVN. En effet, la stimulation optique d'une durée d'une seconde des neurones

exprimant mCherry entraîne l'apparition d'un courant entrant ($n_t = 4$; $n_n = 6$) (Figure 2A et 2B). L'amplitude moyenne des courants évoqués est de $305,46 \pm 47,84$ pA (Figure 2C).



En courant imposé, le nombre de potentiels d'action (PA) pendant la stimulation optique (10 Hz, 20 Hz, 30 Hz ; $n_t = 7$; $n_n = 9$) a été quantifié (Figure 3A et 3B). Le nombre de PA moyens est de $9,8 \pm 2,9$, $11,1 \pm 3,4$ et $12,9 \pm 4,1$ suivant des stimulations à 10, 20 et 30 Hz, respectivement. Aucune différence significative du nombre de PA entre les stimulations n'a été mesurée ($p = 0,967$; test de Friedman).



Cependant, contrairement aux neurones du PVN qui ont des réponses très homogènes, les réponses observées dans la ZI sont très hétérogènes. Au-delà de la stimulation à 10 Hz, les neurones de la ZI ne suivent plus les fréquences de stimulation, il est donc inutile de les stimuler au-delà du protocole à 10 Hz. Pour conclure, le virus utilisé AAV-EF1a:C1V1(t/t)-mCherry

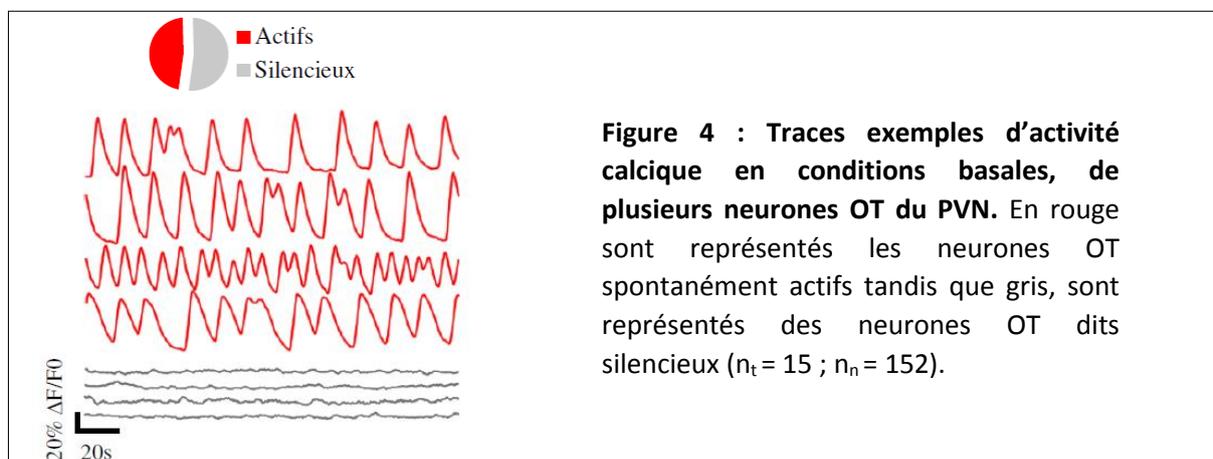
est fonctionnel quelle que soit la zone d'injection et que la stimulation à 10 Hz est la plus adaptée.

3.3. Effet de la stimulation des projections de la ZI vers le PVN sur la réponse calcique des neurones OT

Après validation des outils viraux, nous avons étudié les effets de l'optostimulation des projections ZI vers le PVN sur la réponse calcique des neurones OT du PVN. Pour cela, le virus AAV-EF1a::DIO-C1V1(t/t)-mCherry a été injecté dans la ZI tandis que les virus CAV-Cre et AAV-OT::GCaMP6s l'ont été dans le PVN. Ces injections multiples de vecteurs viraux ont permis d'une part l'expression de C1V1 uniquement dans les neurones de la ZI projetant vers le PVN et, d'autre part, l'expression de la sonde calcique GCaMP6s uniquement dans les neurones OT du PVN.

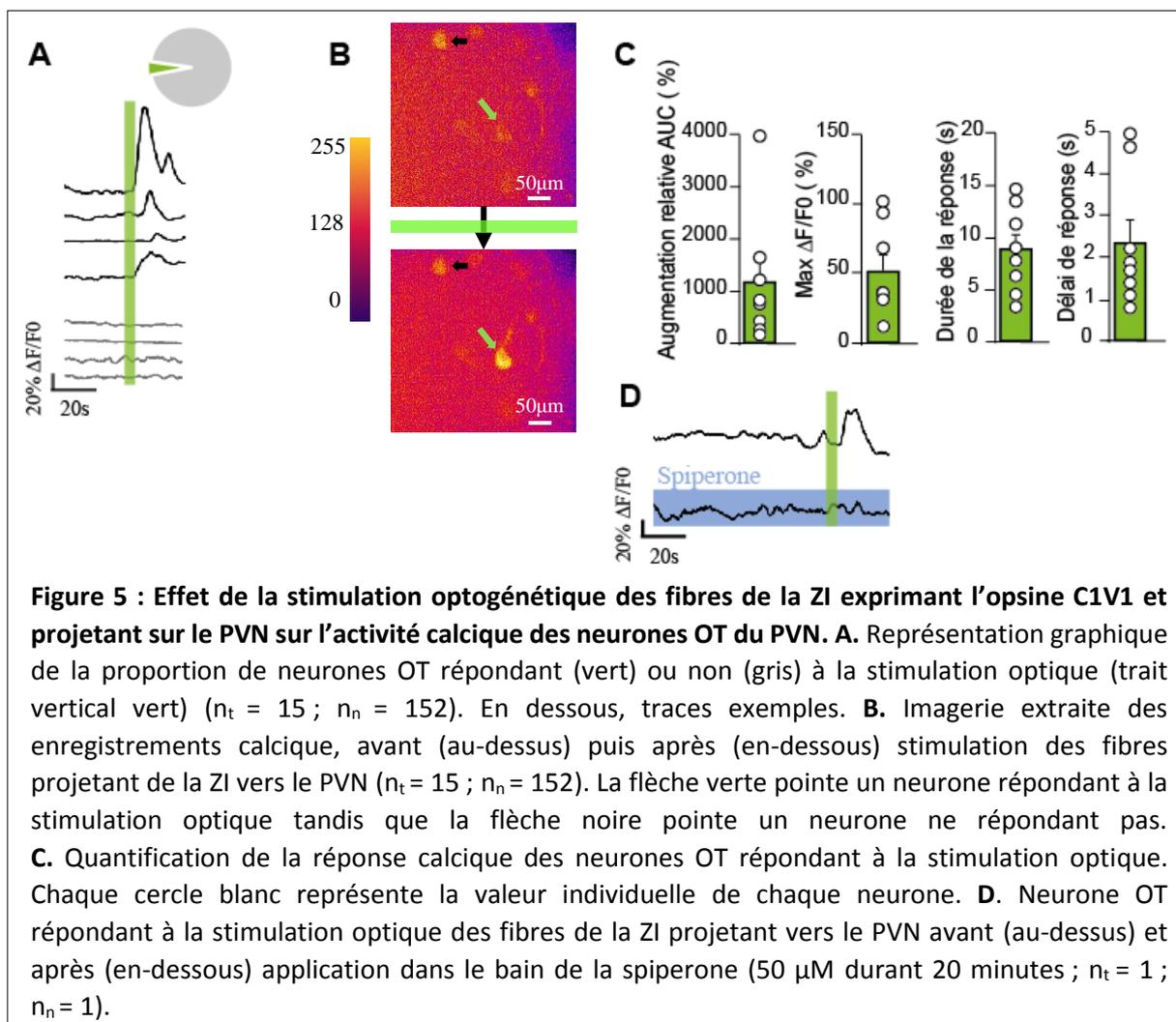
3.3.1. Populations de neurones OT du PVN

Les neurones OT du PVN exprimant GCaMP6s peuvent être distingués en deux sous-populations de neurones, en fonction de leur taille ou de leur activité calcique basale. La majorité des neurones OT exprimant GCaMP6s sont des neurones de grande taille ($> 30 \mu\text{m}$ de \emptyset ; $\sim 80 \%$, $n = 120/152$), les autres étant des neurones de plus petite taille ($< 30 \mu\text{m}$ de \emptyset ; $\sim 20 \%$, $n = 32/152$). Sans distinction de taille, les neurones OT peuvent également être classés selon qu'ils soient silencieux (52% , $n = 80/152$) ou spontanément actifs ($47,37 \%$, $n = 72/152$) (Figure 4 ; $n_t = 15$, $n_n = 152$). Notons qu'à la fin de chaque enregistrement calcique, la viabilité des neurones est vérifiée grâce à l'application dans le bain de KCl (10 mM) entraînant une dépolarisation des neurones encore en vie.



3.3.2. Effet de l'optostimulation des projections de la ZI vers le PVN sur l'activité calcique des neurones

Après optostimulation des projections ZI-PVN (10 Hz, pendant 1 s), l'activité calcique d'environ 5 % des neurones OT du PVN ($n_t = 15$, $n_n = 8/152$) a été significativement modifiée (Figure 5A et 5B ; $n_t = 15$, $n_n = 152$). Chaque réponse a été quantifiée selon quatre critères : l'aire sous la courbe (en %), $\Delta F/F_0$ (en %), la durée de la réponse (en s) et le délai d'apparition de la réponse (en s) (Figure 5C). Ainsi, l'augmentation relative de la réponse calcique des neurones OT du PVN est en moyenne de $1140,40 \pm 437,79$ %, l'augmentation maximale de l'activité calcique moyenne est de $51,09 \pm 11,54$ %, la réponse moyenne dure $8,68 \pm 1,44$ s et le délai de réponse est de $2,31 \pm 0,56$ s. Ces résultats mettent en évidence que seule une petite population de neurones OT semble être recrutée par l'activation des projections provenant de la ZI vers le PVN.



3.3.3. Pharmacologie de la réponse calcique au niveau des neurones OT du PVN

Afin de tester l'implication de la DA dans la réponse calcique des neurones OT suite à l'optostimulation des fibres provenant de la ZI, une approche pharmacologique a été développée. Les récepteurs D2 étant fortement exprimés par les neurones OT du PVN (Baskerville et al., 2009), nous avons appliqué un antagoniste de ces récepteurs, la spiperone (50 μ M) durant 20 minutes. Premier constat, la spiperone ne semble pas bloquer l'activité spontanée des neurones OT du PVN actifs en conditions basales ($n_t = 1$, $n_n = 10$). Ainsi, l'activité spontanée des neurones OT ne serait pas médiée par les récepteurs D2. Second constat et ce, même si nos résultats que sont que très préliminaires, la spiperone bloque la réponse calcique des neurones OT recrutés par les projections de la ZI vers le PVN ($n_t = 1$, $n_n = 1$; Figure 5D). Par la suite, l'implication des autres récepteurs DA, également exprimés dans les neurones OT du PVN (D1, D3 et D4) sera également testée dans cette réponse calcique.

IV. Discussion

Après validation des différentes approches virales, nous avons pu mettre en évidence une petite population de neurones OT du PVN activée par les neurones de la ZI, probablement par une sécrétion de DA.

4.1. Hétérogénéité anatomique

Dans cette étude, nous avons enregistré les neurones OT du PVN sans distinction entre les magnOT (grande taille) et de parvOT (petite taille). Toutefois, il pourrait être intéressant de les distinguer et de les identifier. Pour cela, les magnOT pourraient être identifiés grâce à l'injection de fluorogold dans la circulation sanguine de l'animal et qui serait capté par ces derniers. Ou à l'inverse, ne marquer que les parvOT grâce à l'expression de la GCaMP6s dans certains neurones parvOT projetant spécifiquement vers le SON (Eliava et al., 2016).

4.2. Hétérogénéité fonctionnelle-Electrophysiologie

Les données électrophysiologiques obtenues à partir de neurones de la ZI ont mis en évidence une population de neurones très hétérogène en termes d'activité électrophysiologique. En effet, le nombre de PA évoqués est très variable selon les neurones de la ZI. Augmenter le nombre de neurones enregistrés reste primordial pour confirmer cette information. Etant donné

que la ZI serait principalement composée de neurones GABA et de neurones DA, il n'est pas à exclure que cette hétérogénéité résulte de l'existence de différentes populations.

Dans la ZI comme dans le PVN, nous avons observé que les neurones répondant à la stimulation optique de l'opsine C1V1 suivent le train de stimulation de 10 Hz (ZI : $9,8 \pm 2,9$ Hz ; PVN : $8,2 \pm 1,7$ Hz) mais la fréquence de décharge évoquée par la stimulation de C1V1 ne dépasse pas ~ 10 Hz. L'une des hypothèses pouvant expliquer ce maximum de fréquence de décharge, implique la période réfractaire de ces neurones qui est d'environ 80 ms. Durant cette période, les canaux sodiques sont dans un état « inactif ». Ainsi, les neurones du PVN et de la ZI ont probablement des canaux sodiques à cinétique de réactivation très lente, imposant une fréquence de décharge maximale de 10 Hz. A noter que la fréquence de décharge va souvent de pair avec la taille des neurones : ainsi, les interneurones, qui peuvent décharger à plus de 50 Hz (Jahnsen and Llinas, 1984), sont souvent très petits (10 μm), tandis que les neurones OT, comme d'autres neurones à longue projection, déchargent classiquement à plus faible fréquence (10 Hz) et sont généralement de plus grande taille (50 μm) (Knobloch et al., 2012).

4.3. Hétérogénéité fonctionnelle-Imagerie calcique

En conditions basales, les enregistrements calciques des neurones OT du PVN ont mis en évidence deux populations : les neurones spontanément actifs (~ 47 %) et les neurones silencieux, qui eux sont sans activité basale spontanée (~ 53 %). Ces deux populations ont déjà été observées dans des travaux antérieurs de l'équipe (Grund et al., 2017) mais n'ont pas encore été caractérisées plus en détail. Etant donné que les neurones OT expriment des OTR et que les neurones OT peuvent être activés par l'OT, il n'est pas à exclure que certains neurones aient une activité « auto-entretenu » par la sécrétion autocrine d'OT leur conférant ainsi une activité spontanée en conditions basales. Cependant, l'ensemble des données expérimentales ont été effectuées *ex vivo* sur tranches donc il n'est pas à exclure que l'intégrité des circuits neuronaux n'ait été endommagée lors de l'extraction et de la coupe entraînant une diminution ou perte de la fonctionnalité des neurones étudiés.

4.4. Seule une petite population de neurones recrutée lors de la stimulation optique ?

Le nombre de neurones répondant à la stimulation ($n_n = 8/152$) est probablement sous-estimé par rapport à l'ensemble de la population de neurones OT du PVN. En effet, les neurones répondant à la stimulation n'ont pu être observés que dans le sous-groupe des neurones silencieux. On ne peut donc pas conclure quant à l'existence de neurones répondant à la stimulation parmi les neurones actifs, ni même estimer leur nombre. De plus, la réponse observée repose uniquement sur la stimulation des axones des neurones de la ZI projetant vers le PVN. Or, certaines tranches (8 tranches sur 15) n'ont présenté aucune réponse. Il est alors possible que, au moins dans ces cas, que l'opsine C1V1 n'ait pas été suffisamment exprimée au niveau des terminaisons des neurones de la ZI. Cependant, ces résultats tendent à rejoindre les proportions de neurones OT du PVN répondant suite à l'application de DA dans la chambre d'enregistrement (DA : 12,3 % vs C1V1 : 5,76 % ; Figure 1). Cette similitude tend à confirmer l'hypothèse que les afférences DA du PVN seraient bien ou au moins en partie issues de la ZI et activeraient bien un sous-groupe de neurones OT. Le fait que seuls 5,76 % de neurones présentent une réponse peut sembler contre-intuitif et insuffisant pour impliquer cette population dans la régulation d'une fonction physiologique, mais pour autant ce faible nombre est à mettre en perspective des travaux récents concernant l'OT. Ces travaux montrent que, par exemple, 30 neurones suffisent à contrôler en partie une douleur inflammatoire (Eliava et al, 2016). Par ailleurs, le laboratoire a récemment montré (Article 1, en révision) qu'une peur évoquée induit l'activation de seulement ~10 % de neurones OT du PVN. Il n'est donc pas surprenant, et même cohérent, que la stimulation des projections DA de la ZI vers le PVN n'active que peu de neurones OT, qui seraient tout à fait capable d'exercer une fonction physiologique significative.

4.5. Différents sous-types des récepteurs DA

Bien que notre approche pharmacologique soit à un stade peu avancé, l'application d'un antagoniste des récepteurs D2, la spiperone, bloque la réponse calcique des neurones OT du PVN en réponse à une stimulation optique des fibres des neurones DA projetant vers le PVN. Il faudra bien entendu reproduire ce résultat avant de pouvoir formellement conclure. Outre D2, il faudrait également rechercher l'implication potentielle des autres récepteurs DA présents dans les neurones OT du PVN. En effet, il a été montré par double immunomarquage que les récepteurs D2, D3 et D4 peuvent être colocalisés sur les neurones OT du PVN (Baskerville et

al., 2009). D2 et D3 seraient présents sur les neurones OT magnOT et parvOT, tandis que D4 ne serait exprimé que par les neurones magnOT. De plus, malgré l'expression plus faible des récepteurs de type D1 dans le PVN, il est également souhaitable de tester leurs rôles dans le recrutement des neurones OT par les projections DA. En effet une injection d'agoniste spécifique des récepteurs D1 et D5 induit une augmentation de l'expression de c-Fos dans le PVN (Chocyk et al., 2008). Cependant peu de travaux ont mis en évidence leurs implications dans des comportements et la nature des neurones exprimant c-Fos n'est pas connue.

4.6. Implication fonctionnelle de la DA et de ses projections de la ZI vers le PVN

D'après la littérature, la ZI et ses projections joueraient un rôle majeur dans la balance énergétique. Elle est impliquée dans la diminution de la consommation d'eau et de nourriture lors de la stimulation des neurones DA de la ZI (Tonelli et Chiaraviglio, 1995) et dans la prise alimentaire excessive lors de l'activation des neurones GABA de la ZI (Zhang et van den Pol, 2017) via une diminution de l'activité des neurones DA de la ZI. La stimulation des projections de la ZI vers le PVN pourrait donc favoriser la diminution de la prise alimentaire. Cela correspond au rôle facilitateur de l'OT dans la satiété et son implication dans l'inhibition de la prise alimentaire et la consommation d'eau (Arletti et al., 1990 ; Gimpl et Fahrenholz, 2001). Le circuit de la satiété pourrait donc être sous-tendu par les projections DA de la ZI sur les neurones OT du PVN exprimant les récepteurs DA.

De plus de nombreux travaux ont mis en évidence le lien entre les récepteurs DA du PVN et l'érection chez le rat (Baskerville et al., 2009 ; Sanna et al., 2011). Les projections DA de la ZI pourraient être responsables de la stimulation des neurones OT du PVN présentant notamment les récepteurs DA de type D2 et D4. Ainsi, la ZI pourrait favoriser les comportements sexuels tels que l'érection, par le biais notamment des neurones OT du PVN. Le double rôle des neurones DA de la ZI agissant comme promoteurs des comportements sexuels ou des interactions sociales et inhibiteurs de la prise alimentaire semble envisageable et cohérent. L'OT pourrait favoriser le comportement reproducteur au détriment du comportement alimentaire afin d'assurer la survie des espèces.

V. Conclusions/Perspectives

En conclusion, bien que préliminaires, nos résultats montrent que les projections des neurones DA de la ZI vers le PVN recrutent une sous-population de neurones OT, probablement par une sécrétion de DA. Il reste nécessaire de confirmer ces résultats et d'étudier l'implication comportementale de cette projection.

Il est important d'étudier la pertinence du recrutement des neurones OT du PVN par les fibres DA de la ZI au niveau comportemental. Afin de tester *in vivo* le rôle de ce circuit, des injections virales combinées (dans le PVN, CAV-Cre et dans la ZI ; AAV-EF1a::DIO-C1V1(t/t)-mCherry) sur des rats afin de pouvoir stimuler optogénétiquement les projections de la ZI vers le PVN à l'aide d'une fibre optique installée à demeure au niveau de la ZI. Puis lors de tests comportementaux (prise alimentaire, d'interaction sociale...) nous activerons ces projections grâce à la fibre optique et nous analyserons les modifications comportementales induites.

Même si actuellement, la DA a été au cours de notre étude, il ne faut pas oublier notre hypothèse de départ : il existerait différentes sous-populations de neurones OT recrutées par différents neurotransmetteurs, et *in fine* impliquées dans la régulation de différents comportements. Ainsi, l'étude d'autres populations de neurones OT observés dans les travaux préliminaires de ce projet sont également à explorer (Figure 1). En réalisant une démarche et des expériences similaires, il serait envisageable d'étudier la modulation de l'activité des neurones OT du PVN par les projections NA provenant du LC ou de la 5-HT provenant du noyau du raphé médian. Le LC est un des centres principaux de neurones NA au niveau du SNC et il est anatomiquement relié au PVN par des projections directes (Loughlin et al., 1986). Il en est de même avec la sérotonine provenant du noyau raphé médian projetant vers le PVN (Lee et Lee, 2014). La littérature montre que la NA ainsi que la 5-HT sont capables de stimuler l'expression de l'OT par les neurones OT du PVN et du SON (Vacher et al., 2002) même si précédemment, il avait été montré que seul les neurones OT du PVN pouvaient être stimulés par la 5-HT (Van De Kar et al., 1995). Le LC et le noyau du raphé médian sont connus pour être également impliqués dans de nombreux comportements (douleur, anxiété, prise alimentaire...) a également déjà montré sans pour autant en étudier l'implication ou le recrutement de l'OT. Etant donné l'existence de projections entre le LC et le PVN ainsi qu'entre le noyau du raphé médian et le PVN, et leurs implications à tous dans des comportements

communs, il n'est pas à exclure que l'OT serait recrutée par la NA et la 5-HT afin de moduler divers comportements.

VI. Références

- Arletti R., Benelli A., Bertolini A. (1990). Oxytocin Inhibits Food and Fluid Intake in Rats. *Physiol Rev* 48:825-830.
- Azdad K., Piet R., Poulain D., Oliet S. (2003). Dopamine D4 Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of GABAergic Transmission in the Rat Supraoptic Nucleus. *J Neurophysiol.* 90:559-65.
- Baskerville TA., Allard J., Wayman C., Douglas AJ. (2009). Dopamine – oxytocin interactions in penile erection. *Eur J Neurosci* 30:2151-2164.
- Chocyk A., Czyrak A., Wedzony K. (2008). Dopamine D1-like receptors agoniste SKF 38393 increases cFos in the Para Ventricular Nucleus of the Hypothalamus - Impact of acute and chronic cocaine. *J Physiol Pharmacolgy* 59:425-440.
- Condés-Lara M., Rojas-piloni G., Martinez-Lorenzana G., Condés Diez-Martinez D., Rodriguez-Jiménez J. (2012). Functional interactions between the paraventricular hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *Neuroscience* 209:196-207.
- Daftary SS., Boudaba C., Szabó K., Tasker JG. (1998). Noradrenergic excitation of magnocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus via intranuclear glutamatergic circuits. *J. Neurosci.* 18:10619-10628.
- Eliava M., Melchior M., Knobloch-Bollmann HS., Wahis J., da Silva Gouveia M., Tang Y., Ciobanu AC., Triana del Rio R., Roth LC., Althammer F., Chavant V., Goumon Y., Gruber T., Petit-Demoulière N., Busnelli M., Chini B., Tan LL., Mitre M., Froemke RC., Chao MV., Giese G., Sprengel R., Kuner R., Poisbeau P., Seeburg PH., Stoop R., Charlet A., Grinevich V. (2016). A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron*, 89:1291-1304.
- Geerling JC., Shin JW., Chimenti PC., Loewy AD. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: Axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol* 518:1460-1499.
- Gimpl G., Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81:629-683.

- Grund T., Goyon S., Li Y., Eliava M., Liu H., Charlet A., Grinevich V., Neumann ID. (2017). Neuropeptide S Activates Paraventricular Oxytocin Neurons to Induce Anxiolysis. *J Neurosci.* 37:12214-12225.
- Jahnsen H., Llinás R. (1984). Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: *J Physiol* 349:205-226.
- Knobloch HS., Charlet A., Hoffmann LC., Eliava M., Khrulev S., Cetin AH., Osten P., Schwarz MK., Seeburg PH., Stoop R., Grinevich V. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* 73:553-566.
- Lee J., Lee H. (2014). Reciprocal connections between CART-immunoreactive, hypothalamic paraventricular neurons and serotonergic dorsal raphe cells in the rat: Light microscopic study. *Brain Res.* 1560:46-59.
- Loughlin SE., Foote SL., Grzanna R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307-319.
- Mitrofanis J. (2005). Some certainty for the “zone of uncertainty”? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience* 130:1-15.
- Moon HC., Lee YJ., Cho CB., Park YS. (2016). Suppressed GABAergic signaling in the zona incerta causes neuropathic pain in a thoracic hemisection spinal cord injury rat model. *Neurosci Lett* 632:55-61.
- Paxinos G., Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press
- Sanna F., Succu S., Hübner H., Gmeiner P., Argiolas A, Rosaria M. (2011). Dopamine D2-like receptor agonists induce penile erection in male rats μ differential role of D2 , D3 and D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Behav Brain Res* 225:169-176.
- Tonelli L., Chiaraviglio E. (1995). Dopaminergic neurons in the zona incerta modulates ingestive behavior in rats. *Physiol Behav* 58:725-729.
- Vacher CM., Frérier P., Créminon C., Calas A., Hardin-Pouzet H. (2002). Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci.* 22:1513-1522.
- Van De Kar L., Rittenhouse PA., Li Q., Levy AD., Brownfield MS. (1995). Hypothalamic paraventricular, but not supraoptic neurons, mediate the serotonergic stimulation of oxytocin secretion. *Brain Res Bull.* 36:45-50.
- Veinante P., Freund-Mercier MJ. (1997). Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: A histoautoradiographic study. *J Comp Neurol* 383:305-325.

Zhang X., van den Pol AN. (2017). Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356:853-859.

DISCUSSION GENERALE

J. DISCUSSION GENERALE

Au cours de ce travail de doctorat, je me suis intéressée aux circuits neuronaux, principalement ocytocinergiques, sous-tendant la régulation de différentes émotions. Dans un premier temps, mon travail de thèse a porté sur le recrutement du système OT lors d'un conditionnement de peur lié à un contexte. En combinant l'utilisation de vecteurs viraux avec l'optogénétique et l'électrophysiologie, j'ai pu manipuler spécifiquement les neurones OT, notamment impliqués dans la réponse à la peur, et analyser leur implication dans la modulation des circuits de l'amygdale. Par la suite, grâce au système vGATE, seules les fibres OT recrutées lors de cette émotion ont été marquées et ainsi pu être stimulées par optogénétique. Les enregistrements électrophysiologiques au niveau du CeM ont montré une augmentation de la réponse évoquée par la stimulation optique dans chacun de nos groupes. L'application d'un antagoniste des OTR a permis de bloquer entièrement la réponse observée en absence de conditionnement de peur tandis que suite au conditionnement, la réponse induite est d'avantage bloquée par l'application d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques que par un antagoniste des OTR. Ces données indiquent ainsi un switch fonctionnel entre OT et glutamate suite au conditionnement de peur. Cette observation a été confirmée par les données anatomiques (Article 1). Cette conclusion a directement mené la seconde partie de mon projet et l'interrogation du recrutement du système OT. Je me suis d'abord intéressée au recrutement des neurones OT via un peptide (NPS ; Article 2). Les résultats obtenus ont permis de montrer que les neurones NPS du *locus caeruleus* projettent vers les neurones OT du PVN, et que certains de ces neurones OT, expriment le récepteur au NPS. De plus, le NPS permet l'activation des neurones OT et cette activation est nécessaire à l'effet anxiolytique du NPS. Enfin, je me suis interrogée quant à l'implication des neurotransmetteurs (NA, DA et 5-HT) dans ce recrutement. Les données obtenues, encore préliminaires, montrent que les neurones projetant de la *zona incerta* vers le PVN recrutent une sous-population de neurones OT, probablement en libérant de la DA (données préliminaires, présenté sous forme d'un « Article 3 »).

En parallèle de ce projet de thèse, j'ai contribué à la réalisation de plusieurs travaux effectués en collaboration (Annexe 2, Annexe 3).

La grande majorité des résultats a été discutée dans chacun des articles présentés. J'ai cependant souhaité aborder ici une discussion plus générale concernant l'expérimentation

animale et le choix du modèle animal puis en suivant les principales études que j'ai exposées dans ce manuscrit.

1. Considérations éthiques et réglementaires

Au cours de l'existence de l'Homme, sa vision anthropomorphique de l'animal n'a cessé d'évoluer, conduisant à de nombreuses interrogations. Au cours de la préhistoire, les relations entre Homme et animal étaient une relation d'ordre prédateur à proie. Par la suite, cette relation a évolué vers une relation de dominant à dominé avec la domestication de certaines espèces telles que le chien, le chat, la poule... Au 17^{ème} siècle, apparaissent les premières réflexions philosophiques sur le bien-être animal et en 1850, la première loi concernant la protection des animaux a été proposée. Elle fut marquante car ce fut la première fois où les personnes encourraient une sanction si elles faisaient du mal aux animaux. Près d'un siècle plus tard, une loi souligne le fait que « les animaux sont des êtres sensibles qui subissent des contraintes et souffrances imposées par l'Homme ». Ces lois sont à l'origine de la plupart des textes réglementant et encadrant les pratiques de l'Homme par rapport aux animaux et en particulier ceux concernant l'expérimentation animale qui nous utilisons aujourd'hui. Il est conseillé dans la mesure du possible, d'éviter l'usage des animaux à chaque fois que cela est envisageable. En cas de nécessité d'utiliser des animaux en recherche, son utilisation est autorisée mais encadrée. Dans le cas où les expériences entraînent une souffrance, une détresse pour l'animal, il convient de définir le point limite de la situation en se basant sur des principes définis par des textes de lois. Le principe le plus connu est celui de la règle des 3R pour « Replace, Reduce, Refine » pour « Remplacer, Réduire et Raffiner » (Russell et Buch, 1959) :

- Remplacer : lorsqu'il est possible, il est recommandé d'utiliser d'autres méthodes, appelées méthodes alternatives telles que des modèles informatiques, des cultures de cellules...

- Réduire : diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisé au cours de l'étude.

- Raffiner : lors des expériences, il est nécessaire de diminuer les contraintes ainsi que les douleurs ressenties par l'animal (analgésique, hébergement amélioré et enrichi...).

Même si des méthodes alternatives sont développées, le recours à l'expérimentation animale semble toujours indispensable mais elle est parfaitement encadrée.

Dans le cadre de mon travail de thèse, étant donné que nous avons étudié des réponses intégrées au sein de l'organisme impliquant de nombreuses interactions entre différentes zones

du cerveau ainsi que les conséquences au niveau comportemental, le recours à l'utilisation d'un modèle animal a été nécessaire.

2. Modèle animal : le rat

Afin d'étudier les circuits neuronaux sous-tendant la régulation émotionnelle par le système OT, j'ai utilisé le rat comme modèle animal, qui est avec la souris le plus couramment utilisé en recherche fondamentale tout en respectant la règle des 3R. Aussi lors de l'établissement d'un protocole expérimental, le choix du modèle d'étude est primordial. Il est important de prendre en compte de nombreux paramètres pouvant influencer le résultat des expériences : variabilité inter- et inter-espèces, le sexe des animaux.

2.1. Variabilité inter-espèce

En neurosciences, les recherches reposent généralement sur des rongeurs (rats, souris) mais il est possible d'utiliser bien d'autres modèles (poisson-zèbre, drosophile, hamster d'Alsace...). Cependant, il est important de garder à l'esprit que chaque espèce animale présente des caractéristiques physiologiques qui lui est propre. La répartition des neurones OT au sein des différentes espèces animales semble relativement similaire c'est-à-dire au niveau du PVN, du SON et des AN. Cependant, le chameau par exemple fait exception. Une étude récente a rapporté la présence de neurones OT au niveau du noyau supra-chiasmatique (El Allali et al., 2017). Dans le cas de l'OTR, il a été montré une variabilité importante de la répartition de ces derniers selon l'espèce. Par exemple chez le rat tout comme chez l'Homme, les OTR sont fortement exprimés au niveau de l'hypothalamus tandis qu'aucun OTR n'est présent dans cette région chez d'autres espèces comme le cochon d'inde, le hamster ou le lapin (Gimpl et Fahrenholz, 2001).

Lors de travail de thèse, nous avons ainsi choisi le rat comme modèle animal.

2.2. Variabilité intra-espèce

En plus des variabilités inter-espèces, il existe des variabilités intra-espèces non négligeables. L'étude des fonds génétiques de rats révèle une forte variabilité de comportement face à une situation. Par exemple, les réponses au stress varient dans de grandes proportions à

l'image des rats Fisher qui sont très sensibles au stress ou des rats de Lewis qui eux le sont peu (Rivest et Rivier, 1994). Certaines différences sont simplement d'ordre anatomique comme illustré entre autres par les neurones NA du LC qui projettent selon la provenance des souches des rats Sprague-Dawley, vers la corne postérieure ou antérieure (West et al., 1993). Mais l'exemple le plus frappant est celui des campagnols des prairies et des montagnes. Des travaux menés chez ces deux espèces ont permis de montrer l'importance des OTR dans la relation de fidélité au sein du couple. En effet, la monogamie observée chez les campagnols des prairies semble s'expliquer par une distribution des OTR au niveau du SNC différente de celle observée chez les campagnols des montagnes, qui eux sont polygames (Lim et al., 2004). De plus, grâce à des techniques de transfection des OTR dans une zone particulière du SNC, la fidélité du campagnol des montagnes est restaurée (Donalson et Young, 2008).

De nombreuses souches de rats présentent des caractéristiques qui leur sont propres et qui ont été développées afin d'étudier des cas particuliers et précis. Les rats Zucker obèses sont dits KO pour le récepteur de la leptine, hormone satiétogène. On comprend aisément que cette souche de rats soit utilisée pour les travaux portant sur l'obésité. Les rats Sprague-Dawley développent plus de tumeurs endocriniennes que les autres souches de rats d'où leur utilisation privilégiée lors de travaux portant sur la cancérogénèse. Chaque souche de rats semble être utilisée dans des travaux précis et la majorité de ces souches a été développée à partir des rats Wistar. Le rat Wistar a été développé afin de produire un organisme modèle, facile à manipuler et très docile. C'est donc pour cette raison que le rat Wistar a été notre modèle d'étude.

On comprend aisément que le choix du modèle animal est une étape clé avant de commencer des travaux de recherche. Ainsi tous les résultats obtenus en réponse à un test ou à une molécule spécifique, ainsi que l'action ou l'assimilation d'une substance pharmacologique, peuvent fortement varier selon l'espèce considérée. L'analyse et l'interprétation des données obtenues en laboratoire sont donc toujours à prendre avec prudence.

2.3. Sexe de l'espèce

Autre point intéressant à développer est le choix du sexe des animaux lors des expériences scientifiques. Étant donné que l'OT a été mis en évidence lors de contractions utérines puis dans la lactation, il semblerait « normal » d'utiliser des animaux femelles plutôt que des mâles. Il a été considéré qu'en condition basale, le niveau d'OT était plus important chez la femelle

que chez le mâle. Cependant, aucune étude n'a montré de réelles différences sexe-spécifiques que ce soit au niveau de la concentration de l'OT ou des OTR (Gimpl et Fahrenholz, 2001)... Chez le rat Wistar qui est notre modèle d'étude ainsi que chez l'Homme, le système OT semble identique quel que soit le sexe. En effet, aucune différence sexe-spécifique n'a été montrée au niveau de l'ARNm de l'OT chez le rat Wistar ou au niveau des sites de liaison entre l'OT et son récepteur. Cependant, selon la zone de liaison de l'OT, des différences apparaissent. Concernant le PVN et le CeA, aucune différence sexe-spécifique liée à la liaison OT/OTR n'a été montrée chez le rat Wistar tandis que chez le rat Sprague-Dawley, seul le CeA ne présente pas de différence lié au sexe (Dumais et al., 2013). Pour davantage d'informations sur les différences sexe-spécifiques entre les différentes espèces, se référer à la revue de Dumais et Veenema, 2016. Il a également été montré que l'injection d'OT en icv chez des rats Sprague-Dawley mâles et femelles induit des différences sexe-spécifiques notamment au niveau de l'amygdale qui serait davantage activée chez la femelle que chez le mâle (Dumais et al., 2017).

Pour les raisons développées ici, nous avons choisi d'utiliser des rats Wistar femelle. Cependant, il est dans la mesure du possible et en fonction de l'hypothèse de départ, nécessaire de réaliser les expériences avec des mâles et des femelles.

3. Une si petite population de neurones OT recrutée lors de la peur ? (Article 1)

Lors de la première partie de mon travail, nous avons montré que seule une portion des neurones OT était activée par un contexte de peur. De plus, le switch OT vers glutamate observé au niveau des neurones de l'amygdale représente une potentielle adaptation nécessaire face un contexte de peur. Il est également important de noter que tous les neurones OT ne sont pas réactivés de la même façon : ceci dépend à la fois de leur localisation (PVN ou SON) et du contexte (nouveau ou répété).

3.1. Système vGATE

Pour ce faire, nous avons utilisé une combinaison virale surnommée le système vGATE (virus-delivered Genetic Activity-induced Tagging of cell Ensembles). Basé sur le système Tet-on, la nouveauté du système vGATE est sa capacité à être activée rapidement grâce à une injection unique de doxycycline en ip avant le début du marquage des neurones. La mise au

point de ce système a été relativement difficile. De nombreux contrôles ont dû être réalisés afin de s'assurer de la spécificité de marquage suite à l'activation de ce système vGATE. Il a également été nécessaire de déterminer la concentration ainsi que le nombre d'injection de doxycycline pour permettre l'expression du construit viral (Dogbevia et al., 2015 ; Dogbevia et al., 2016). Le moment de l'injection de doxycycline a également été défini et il a été montré que le maximum d'expression du virus est atteint 24 h après l'injection de doxycycline (Dogbevia et al., 2015).

L'utilisation du système vGATE nous a permis de montrer que seule une portion des neurones OT était marquée signifiant ainsi que seuls ces neurones ont été recrutés lors du conditionnement de peur.

3.2. Réexposition au contexte de peur et implication des neurones OT

Un premier résultat surprenant montre que la stimulation des fibres OT provenant du PVN diminue le temps de freezing et qu'une réexposition au contexte de peur a pour conséquence d'amplifier cet effet. De plus, si seuls les neurones OT Fear⁺ sont activés, le temps de latence avant diminution du freezing est en plus significativement réduit. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'une deuxième exposition à un même contexte permet de recruter plus de neurones OT tandis que le système vGATE permet de recruter un ensemble de neurones OT (environ 10 %) capables d'induire une réponse plus efficace. L'efficacité d'une si petite population de neurones OT pour réguler le comportement de peur peut paraître surprenante et peut sembler contre-intuitive. Cependant, une autre étude rejoint notre résultat. Il a été montré qu'une optostimulation des interneurons GABA du CeL ou de toute l'amygdale centrale entraîne une réponse de freezing moins efficace comparativement à celle observée après optostimulation d'une zone plus ciblée, le CeM (Ciocchi et al., 2010).

Etant donné le nombre considérable de neurones OT dans l'hypothalamus, est-il possible que seul 10 % de ces neurones permettent de moduler la peur ? Ce nombre n'est-il pas sous-estimé ? Ce résultat semble cohérent avec ce qui a déjà été publié dans la littérature. En effet, il a été récemment montré que 30 neurones OT suffisent pour contrôler la douleur. Ces 30 neurones parvOT sont capables d'induire une analgésie chez les rats via un double mécanisme : i) une action directe sur les voies de la douleur de la moelle épinière, ii) par la stimulation de la libération d'OT par les neurones magnOT (Eliava et al., 2016). Les données préliminaires

présentées dans l'article 3, montrent également que seules de petites populations de neurones OT semblent être recrutées par différents neurotransmetteurs.

3.3. Switch fonctionnel entre OT et glutamate

Un second résultat surprenant montre un changement fonctionnel des projections des neurones OT sur le CeL. En effet, il semble qu'après une exposition à un contexte de peur, les projections OT subissent une modification afin de libérer principalement du glutamate et non plus de l'ocytocine. Dans un premier temps, nous avons montré que la stimulation optique *ex vivo* des fibres OT, entraîne une augmentation des IPSCs chez l'ensemble des animaux ayant subi ou non un conditionnement de peur. L'application d'un antagoniste des OTR permet de bloquer la réponse induite par la stimulation optique chez le groupe contrôle mais il a un effet moindre chez les animaux vGATE tandis que l'application d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques bloque la réponse dans le groupe vGATE et a un effet minime chez les contrôles. Dans un second temps, des marquages neuroanatomiques sont venus confirmer ce résultat. En effet, l'observation des neurones OT ainsi que leur fibre a permis de mettre en évidence que le conditionnement de peur n'entraîne pas de modification de la longueur totale des axones OT au niveau du CeL, mais il semble entraîner une surexpression de vGluT2 dans les axones OT après conditionnement de peur.

Au vu de la littérature, l'idée d'une co-libération OT et glutamate par les neurones OT semble plus qu'envisageable. Il a été montré grâce à des marquages immunohistochimiques que les neurones OT du PVN contiennent de l'OT mais également du glutamate (Meeker et al., 1991 ; Knobloch et al., 2012). Cependant, il serait intéressant de comprendre le bénéfice de ce switch dans un tel comportement. Pourquoi le glutamate est-il co-libéré avec l'OT suite à un conditionnement de peur ? L'hypothèse faite est liée à leurs récepteurs. En effet, le glutamate se fixe notamment sur des récepteurs de type ionotropique (récepteur NMDA, AMPA et kaïnate) induisant une ouverture directe du canal ionique. L'entrée massive de cations va ainsi permettre la transduction du signal dans un temps très faible, de l'ordre de la milliseconde. A l'inverse, l'OT se fixe sur un RCPG qui est donc un récepteur de type métabotropique. Ce type de récepteur ne comprend pas de canal ionique « intégré » donc la fixation de l'OT sur son récepteur va entraîner un changement de conformation du récepteur qui induit alors une cascade de réaction impliquant des seconds messagers (voir partie 1.3.3.3 de l'introduction). On comprend aisément que ce genre de récepteurs est relativement lent, de l'ordre de la seconde

au minimum (Waxham, 2014). C'est pourquoi après un conditionnement de peur, la co-libération de l'OT et du glutamate semble nécessaire : le glutamate induira une réponse rapide afin de fuir face à la situation de peur tandis que l'OT induira une réponse capable de perdurer un peu plus dans le temps évitant de se trouver de nouveau dans une situation effrayante. Cependant, il a également été montré l'existence de récepteurs glutamatergiques de type métabotropique (Kunishima et al., 2000) ce qui laisserait penser qu'en plus de sa réponse rapide, le glutamate pourrait agir conjointement avec l'OT afin d'assurer un effet à plus long terme.

4. Développement du système OT et conséquences d'une exposition à un contexte de peur à différents stades de la vie. (Article 1)

Jamais mentionné au cours de ce travail de thèse, il me semble nécessaire de s'intéresser au développement du système OT. Des études immunohistochimiques ont été réalisées afin d'évaluer et d'étudier le développement du système OT. Toutes s'accordent à dire que le PVN et le SON apparaissent tôt durant la vie embryonnaire, vraisemblablement autour du 13^{ème} jour de la vie intra-utérine permettant de générer les neurones hypothalamiques durant la seconde période de gestation chez le rongeur et au milieu de la grossesse chez l'humain (Swaab, 1995). A la naissance, de l'OT mature est détectée tandis que les neurones OT, eux ne le sont pas encore. Leurs propriétés morphologiques et électrophysiologiques continuent d'évoluer et ce durant les deux premières semaines post-natales (Swaab et al., 1995). Les hybridations *in situ* ont révélé une détection des OTR à partir du 13^{ème} jour de la vie intra-utérine dans le noyau dorsal du nerf vague afin d'être progressivement détecté dans d'autres régions du cerveau en commençant par l'aire tegmentale ventrale, le noyau du raphé, le noyau amygdaloïdien et se terminant par le septum latéral, l'hypothalamus ventro-médian (Yoshimura et al., 1996 ; Tribollet et al., 1989). L'apparition des OTR se faisant avant le début de la synthèse de l'OT dans le cerveau du fœtus, cela suggère que le cerveau même au stade fœtal pourrait être réceptif à l'OT maternelle. Il a également été montré que la mère peut transmettre de l'OT à son petit à travers la barrière placentaire (Malek et al., 1996). Enfin, le développement des projections des neurones OT a été jusqu'à aujourd'hui peu étudié. Une étude a montré que les neurones du SON envoient des projections vers le lobe postérieur de l'hypophyse dès le 15^{ème} jour du stade embryonnaire, et vers le PVN à partir du 17^{ème} jour (Makarenko et al., 2000). En raison de son état immature au moment de la période post-natale, le système OT semble donc très vulnérable.

De nombreuses études montrent que durant l'embryogénèse, la naissance et les jours post-natals, le système OT est influencé par l'environnement, le comportement de la mère... Il a été montré par exemple que les comportements de léchage ou toilettage apportés par la mère à sa progéniture entraîne une régulation à la hausse de la fixation de l'OT sur son OTR (Champagne et Meaney, 2007 ; Francis et al., 2000 ; Francis et al., 2002) ainsi qu'une diminution de la peur face à une nouvelle situation (Caldji et al., 1998). A l'inverse, un stress durant la gestation influence le développement des fonctions cognitives de la progéniture (Lordi et al., 1997).

Sachant que les évènements de la vie rythment le développement du SNC et au vu des résultats présentés dans l'article 1, il serait intéressant de regarder l'impact d'un conditionnement de peur durant la période de gestation aussi bien chez la mère que chez sa progéniture. Jusqu'à présent, nous avons pu mettre en évidence l'effet d'un conditionnement de peur sur le système OT chez des femelles adultes. Nous pouvons alors supposer qu'un tel conditionnement sur une femelle gestante pourrait avoir un effet similaire ou légèrement contrebalancé par l'augmentation d'OT observée au cours de la gestation (Zingg et al., 1989 ; Zingg et Leferbvre 1988 ; Douglas et al., 1993). Dans ces deux cas, la quantité d'OT maternelle transmise de la mère à sa progéniture serait alors diminuée. Une expérience de dosage d'OT permettrait d'évaluer sa concentration suite au conditionnement de peur chez la femelle gestante mais également chez ses petits. La diminution d'OT chez le petit pourrait le prédisposer à la mise en place d'un comportement dépressif perdurant au stade adulte ou le développement de maladies mentales, comme cela est illustré chez l'Homme (Huttunen et Niskanen, 1978 ; Mednick, 1970). Cela reviendrait à s'intéresser à l'impact d'un conditionnement de peur chez la mère et les conséquences sur sa descendance. On pourra alors envisager d'étudier, les conséquences d'un tel conditionnement directement sur le petit c'est-à-dire le conditionnement de peur appliqué au petit durant la période post-natale, période durant laquelle le système OT est assez vulnérable. Il serait également intéressant de voir s'il est possible de rétablir le comportement « sauvage » chez le petit en utilisant des agonistes de l'OT. En complément, une étude a mis en évidence l'existence d'une mémoire transgénérationnelle. Des souris ont été exposées à une odeur agréable tout en recevant des stimuli douloureux. Ces animaux ont alors développé une augmentation des récepteurs pour cette odeur afin de détecter l'odeur à des niveaux plus bas permettant de fuir le danger. La descendance de ces animaux est plus anxieuse en présence de cette odeur même s'ils ne l'ont jamais rencontrée auparavant ainsi qu'un niveau élevé des récepteurs pour l'odeur (Dias et Ressler, 2014). Cette étude met ainsi en évidence la transmission de génération en génération d'évènements stressants rencontrés par les parents.

5. Peur et anxiété : émotions étroitement liées avec des systèmes assez bien distincts. (Article 1 et Article 2)

Les symptômes de ces deux émotions sont très similaires même si de nos jours, peur et anxiété sont bien distinguées. La définition retenue pour ces deux termes a été celle définie précédemment dans cette thèse : « un état émotionnel négatif, induit par la perception d'un danger réel (peur) ou potentiel (anxiété) qui menace le bien-être de l'individu » (Jones, 1996 ; Boissy et al., 1998). Les circuits de la peur ainsi que celui de l'anxiété ont été récemment définis chez le rat montrant l'implication de zones cérébrales partiellement différentes (Tovote et al., 2015). En effet, l'amygdale semble être au centre du circuit de la peur tandis que dans le circuit de l'anxiété, le cortex préfrontal jouerait un rôle modulateur sur l'activité de l'amygdale.

Mais qu'en est-il de ces deux circuits chez l'Homme ? Existe-t-il des similitudes ou des contradictions de ces circuits comparativement à ceux du rat ? Pour tester ces deux circuits chez l'Homme, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) a été utilisée afin d'enregistrer l'activité cérébrale des participants. Lors de cette étude, les participants voyaient apparaître sur leur écran un « prédateur visible » donc associé à une situation de peur ou un « prédateur invisible » associé à une situation d'anxiété. Les données obtenues par IRMf montrent une activation du cortex préfrontal ventro-médian, de l'hippocampe et de l'amygdale lorsque le « prédateur » est invisible témoignant de leur implication dans le circuit sous-jacent l'anxiété tandis que la PAG est activée lorsque le « prédateur » est visible témoignant de son implication dans le circuit sous-jacent la peur (Rigoli et al., 2016). D'autres études ont cependant montré l'implication d'autres régions cérébrales dans le circuit de la peur chez l'Homme : amygdale (Lojowska et al., 2018), le cortex préfrontal ventro-médian, l'hippocampe (Milad et al., 2007)...

En conclusion, même si les circuits de la peur ou de l'anxiété ne se résument pas seulement à quelques zones cérébrales mais bien à un réseau plus complexe, les études menées chez le rat et chez l'Homme ne semblent pas indiquer de différence au niveau des zones clés impliquées dans ces deux circuits.

6. Effets de l'OT au niveau périphérique lors d'une peur. (Article 1 et Article 2)

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes uniquement intéressés aux effets de l'OT au niveau central lors de la peur ou du stress mais nous savons que ces deux émotions ont également des effets au niveau périphérique. En effet, lors de ces émotions, diverses réactions se mettent en place : la fréquence cardiaque qui s'accélère, la respiration qui est modifiée, une sensation de moiteur au niveau de la peau qui apparaît, la température corporelle qui augmente... (Gouizi et al., 2011 ; Kreibig et al., 2007) Mais existent-ils des effets de l'OT au niveau périphérique lors d'une situation de peur, de stress ? Si oui, quels sont-ils ?

Il a été montré qu'une population de neurones OT du PVN projetant au niveau de la partie postérieure du cerveau et de la partie thoracique supérieure de la moelle épinière peut augmenter le rythme cardiaque (Coote, 2005). Les projections OT vers le noyau du tractus solitaire permettent de moduler le contrôle réflexe du cœur en facilitant la sortie vagale et le ralentissement du cœur (Higa et al., 2002). L'OT via une action neuroendocrine, favorise la libération d'ANP dans le cœur entraînant une diminution du rythme cardiaque (Gutkowska et al., 1997). De façon générale, l'OT permet de réguler les activités dites autonomes modulant ainsi la respiration (Yang et al., 2013). Pour ces différentes raisons, il pourrait être intéressant de mesurer les effets périphériques engendrés par l'OT lors de la peur. Grâce à un capteur infra-rouge de pincement placé au niveau de la patte de l'animal, l'enregistrement du rythme cardiaque, la saturation en oxygène, la fréquence cardiaque est envisageable et il pourrait nous apporter de nombreuses informations lors d'une situation de peur. Cependant, à cause du capteur au niveau de la patte, il faudrait probablement adapter le conditionnement de peur, peut-être induire une peur par un son plutôt que par un contexte... Depuis quelques années, il a été montré que l'OT et ses récepteurs sont exprimés au niveau de la peau (Denda et al., 2012 ; Gonzalez-Hernandez et al., 2017). La réaction électrodermale est un point intéressant à développer car cette technique permet de rendre compte de l'activité du système nerveux sympathique (Grapperon et al., 2012). Cependant, il paraît un peu compliqué à mettre en place chez des animaux du fait de la nécessité de placer les électrodes en contact direct sur la peau.

7. De nouvelles voies thérapeutiques grâce à l'OT et le NPS ? (Article 1 et Article 2)

Dans le premier article, nous avons montré que la stimulation des fibres OT entraîne une libération d'OT endogène qui a pour effet *in vivo* de diminuer le temps de freezing chez les animaux ayant été conditionnés à la peur. Ces données rejoignent celles de la littérature. En effet, l'injection icv d'OT ou d'agoniste aux OTR ainsi que la stimulation du relargage d'OT endogène diminuent le comportement de peur chez ces animaux (Modi et al., 2016 ; Toth et al., 2012a ; Knobloch et al., 2012). En parallèle, l'OT est connue pour son effet anxiolytique. Des souris KO pour le gène de l'OT présentent un niveau d'anxiété plus élevé que des souris possédant le gène de l'OT (Amico et al., 2004). L'injection icv d'OT chez ces souris KO permet de restaurer le phénotype « sauvage » de ces animaux (Mantella et al., 2004). L'OT par ses effets bénéfiques démontrés chez le rongeur en fait un médicament potentiel important. Des études menées alors chez l'Homme semblent aller dans le même sens (de Oliveira et al., 2012 ; Milad et al., 2012) mais ces résultats sont encore très controversés notamment à cause de la méthode d'administration de l'OT chez l'Homme. Selon plusieurs études, la présence de la barrière hémato-encéphalique est un réel problème car l'OT ne peut la traverser (Ermisch et al., 1985 ; Meisenberg et Simmons, 1983), empêchant ainsi son effet au niveau central. Une étude s'est alors intéressée à évaluer simultanément l'effet de l'injection intranasale d'OT au niveau central et périphérique. Une corrélation a été observée entre l'augmentation de la concentration d'OT au niveau central et au niveau plasmatique mettant en évidence le passage de la barrière hémato-encéphalique par l'OT (Neumann et al., 2013). Le passage de la barrière hémato-encéphalique par l'OT est une question qui reste donc en suspens. D'autres hypothèses sont alors envisageables afin de contourner le passage de la barrière hémato-encéphalique. L'OT administrée par voie intranasale rejoindrait le SNC via les nerfs olfactifs et trijumeaux reliant la fosse nasale aux bulbes olfactifs (Dhuria et al., 2010). Il a été démontré que l'administration par voie intranasale de l'AVP est directement absorbée par le liquide céphalo-rachidien (Born et al., 2002). Etant donné la forte similitude structurale entre l'OT et l'AVP, il pourrait être supposé que les deux molécules pénétreraient dans le liquide céphalo-rachidien par le même processus. Il n'est cependant pas à exclure la possibilité de processus divers mais complémentaires permettant d'augmenter la concentration d'OT au niveau centrale suite à l'administration intranasale de cette dernière.

Plus récemment, un nouveau candidat thérapeutique peptidergique est apparu grâce à ses nombreuses ressemblances avec l'OT, le NPS. Notre second article a permis de montrer que les neurones OT du PVN expriment le récepteur du NPS et que les neurones du *locus caeruleus* synthétisant le NPS projettent sur le PVN laissant supposer un lien entre OT et NPS. L'injection icv de NPS a un effet anxiolytique, qui est bloqué par l'injection préalable d'un antagoniste des OTR. L'injection seule d'un antagoniste des OTR ne modifie pas le comportement anxieux de l'animal. Ces résultats montrent que l'effet anxiolytique du NPS nécessite le recrutement du système OT. Il semblerait donc que le NPS, tout comme l'OT, soit un médicament potentiel important afin de lutter contre les pathologies du comportement. Actuellement, quel que soit le mode d'administration du NPS, aucune étude n'a été menée chez l'Homme. Cependant, la question du passage de la barrière hémato-encéphalique pour ce neuropeptide se pose également. Au vu de sa taille, le passage du NPS à travers cette barrière semble encore plus compliqué que celui de l'OT. Cependant, différents agonistes biaisés des NPSR semblent être développés depuis quelques années (Cifani et al., 2011 ; Clark et al., 2017) ce qui pourrait permettre une meilleure assimilation du NPS au niveau central. On peut également envisager que le NPS présente une meilleure demi-vie que l'OT ce qui pourrait être intéressant pour aller activer le système OT et ainsi exercer son effet anxiolytique. Enfin, il se pourrait que le NPS entraînerait moins d'effet secondaire ce qui ferait de lui un candidat thérapeutique puissant.

8. Zona incerta, neurones dopaminergiques, plusieurs comportements ? (Article 3)

Même si actuellement nos données concernant la dopamine et la *zona incerta* ne sont que préliminaires, ceux-ci semblent très prometteurs. Les données de la littérature illustrent largement les projections de la DA de la ZI vers de nombreuses régions du cerveau dont notamment le PVN (Bujis et al., 1984 ; Lindvall et al., 1984 ; Decavel et al., 1987). La combinaison de vecteurs viraux nous a permis de marquer spécifiquement ces projections de la ZI vers le PVN et d'exprimer une sonde calcique dans les neurones OT du PVN. En condition basale, deux populations de neurones ont été ainsi mise en évidence : une population dite silencieuse et une autre, spontanément active. Une première analyse montre que la stimulation des fibres de la ZI projetant sur le PVN entraîne une réponse calcique dans environ 5 % des neurones OT. Cependant, il est important de noter que les neurones spontanément actifs n'ont pu être analysés soit environ 45 %. Il sera nécessaire de développer une analyse plus fine afin

de prendre en compte ces neurones. Des données électrophysiologiques montrent également un recrutement des neurones OT par la DA (Azdad et al., 2003 ; Price et Pittman, 2001). Ces données indiquent donc un probable contrôle d'une sous-population de neurones OT par la DA de la *zona incerta*.

En parallèle, il a également été montré que cette zone, la ZI, pouvait moduler différentes émotions positives telle que la prise alimentaire (Zhang et al., 2017 ; Tonelli et al., 1995), le comportement sexuel (Edwards et Isaacs, 1991) et négatives telle que la douleur (Masri et al., 2009). Connaissant l'implication de la ZI dans de nombreux comportements, pour la plupart similaires à ceux impliquant l'OT, et sachant que les neurones OT du PVN peuvent être recrutés par les projections de la ZI, il serait intéressant d'étudier comment le recrutement des neurones OT par les fibres DA de la ZI impacte les différents comportements. Il pourrait également être envisagé de réutiliser le système vGATE mais adapter à cette situation. En effet, il pourrait être envisageable de marquer uniquement les neurones projetant de la ZI activés par un comportement de douleur ou lors de prise alimentaire et comparer ainsi si ce sont des sous-populations différentes ou bien identiques.

Pour finir, même si actuellement nous nous sommes focalisés sur la dopamine et la *zona incerta*, il ne faut pas oublier notre hypothèse de départ : existe-t-il des sous-groupes fonctionnels de neurones OT au sein du PVN activées par différentes projections ? Il a été montré que l'activité des neurones OT peut être modulée par différents neurotransmetteurs tels que la noradrénaline (Daftary et al., 1998), la dopamine et la sérotonine (Azdad et al., 2003). La littérature montre que ces neurotransmetteurs proviennent de structures cérébrales différentes : la NA provient du *locus caeruleus* (Loughlin et al., 1986), la DA de la *zona incerta* (Tonelli et Chiaraviglio, 1995) et la 5-HT du noyau du raphé médian (Condés-Lara et al., 2012). Des données préliminaires *in vitro*, obtenues au laboratoire ont mis en évidence des sous-populations de neurones OT du PVN activées par ces différents neurotransmetteurs. Ces premières données font ainsi écho aux résultats présentés précédemment mettant en évidence l'activation de sous-populations de neurones OT grâce à des projections d'origine différentes.

9. Neurones OT spontanément actifs

Plusieurs de nos résultats obtenus en imagerie calcique montrent qu'il est possible de classer les neurones selon leur activité en condition basale : les neurones OT qui ne présentent pas de fluctuation de Ca^{2+} sont dits silencieux, tandis que les neurones OT présentant une variation de la concentration de Ca^{2+} ont été qualifiés de neurones OT spontanément actifs. En effet, l'article 2 a mis en évidence que seuls 30 % des neurones OT sont spontanément actifs tandis que les autres, soit 70 % des neurones OT sont silencieux. « L'article 3 » montre également la présence de neurones OT silencieux ou spontanément actifs mais dans des proportions différentes (respectivement 53 % et 47 %). Sans le savoir, ces résultats rejoignent une autre étude publiée récemment sur des cellules isolées provenant du SON. Il a été montré que 60 % des neurones OT du SON sont spontanément actifs. En condition de lactation, le nombre de neurones spontanément actifs augmente pour atteindre les 80 % (Kortus et al., 2016). Les différences de pourcentages au niveau des neurones OT spontanément actifs ou silencieux peuvent avoir plusieurs explications. Premièrement, nous avons travaillé sur tranche, *in vitro*, permettant de garder à maximum les différents réseaux neuronaux tandis que Kortus et al. ont utilisé des cellules en culture. Secondairement, le fait que nos travaux ont été menés sur des zones cérébrales différentes, cela a pu influencer le taux de neurones spontanément actifs ou silencieux. En effet, nous avons enregistré l'activité calcique des neurones OT localisés dans le PVN tandis que l'étude a été elle, réalisée au niveau du SON. Or, nous savons que la répartition des neurones parvOT et magnOT diffèrent selon la région. Il n'y a pas de neurones parvOT dans le SON soit uniquement des neurones magnOT alors qu'au niveau du PVN, des neurones parvOT et magnOT sont présents. On peut ainsi supposer que les neurones parvOT sont majoritairement silencieux ce qui pourrait expliquer la différence de proportions de neurones OT spontanément actifs et silencieux.

Il a également été montré l'existence d'une réponse oscillatoire hétérogène selon les neurones OT : une oscillation de Ca^{2+} dite régulière, des oscillations de Ca^{2+} dites irrégulières ou encore des oscillations dites de haute fréquence signifiant que le niveau de Ca^{2+} intracellulaire reste en permanence au-dessus de la concentration mesurée en condition basale. Ces différents types de réponse ont également été observés lors du travail portant sur le NPS (mais ces données ne figurent pas dans l'article publié).

Ainsi les observations annexes faites lors de mes travaux de thèse sur les populations de neurones OT spontanément actifs et silencieux confirment les résultats illustrés lors de publications scientifiques annexes.

K. CONCLUSIONS

L'ensemble de données obtenues au cours de ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence qu'une fraction de la population des neurones OT est nécessaire et suffisante pour moduler le comportement de peur. Dans une démarche visant à comprendre comment des populations restreintes de neurones OT pouvaient être recrutés spécifiquement, nous avons montré que des populations distinctes de neurones OT peuvent être par exemple recrutées par un neuropeptide, le NPS, ou par un neurotransmetteur, la DA.

Pour conclure, le passage de la recherche fondamentale à l'application clinique est un parcours tortueux et semé d'embûches. Les applications de l'OT chez l'Homme semblent encore très controversées. Néanmoins, la conception d'un nouveau ligand OTR avec une sélectivité de profil de couplage ainsi qu'une perméabilité améliorée de la barrière hémato-encéphalique est sur le bon chemin (Manning et al., 2012b). Le système OT est une cible thérapeutique pour de nombreux troubles et maladies allant aussi bien du cancer (Imanieh et al., 2014) aux troubles psychiatriques (Shamay-Tsoory et Young, 2016 ; Zik et Roberts, 2015), notamment les troubles du spectre autistique (Guastella et Hickie, 2016). L'OT est donc un neuropeptide très important dont l'étude approfondie aidera à mieux comprendre le système nerveux et comment il régule ses propres circuits et cibles périphériques.

REFERENCES

L. REFERENCES

A

- Acher R., Chauvet J. (1954). The structure of bovine vasopressin. *Biochim Biophys Acta* 14:421-429.
- Acher R., Chauvet J., Crocker C., Laurila UR., Thureauux J., Fromageot C. (1954). Isolation and characterization of the oligopeptides obtained on acid hydrolysis; study of the structure of lysozyme and vasopressin. *Bull Soc Chim Biol* 36:167-179.
- Acheson D., Feifel D., de Wilde S., McKinney R., Lohr J., Risbrough V. (2013). The effect of intranasal oxytocin treatment on conditioned fear extinction and recall in a healthy human sample. *Psychopharmacology* 229:199-208.
- Adan RA., Cox JJ., van Kats JP., Burbach JP. (1992). Thyroid hormone regulates the oxytocin gene. *J Biol Chem* 267:3771-3777.
- Adolphs R., Tranel D., Damasio H., Damasio AR. (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* 372:669-672.
- Aggelton JP., Mishkin M. (1986). The amygdala: sensory gateway to the emotions. In *emotion: theory, research, and experience*. (Eds Plutchik, R. and Kellerman, H.) pp.281-299. Orlando: Academic press.
- Akerlund M., Bossmar T., Brouard R., Kostrzewska A., Laudanski T., Lemancewicz A., Serradeil-Le Gal C., Steinwall M. (1999). Receptor binding of oxytocin and vasopressin antagonists and inhibitory effects on isolated myometrium from preterm and term pregnant women. *Br J Obstet Gynaecol* 106:1047-1053.
- Albers HE. (2015). Species, sex and individual differences in the vasotocin/vasopressin system: Relationship to neurochemical signaling in the social behavior neural network. *Front. Neuroendocrinol* 36:49-71.
- Albizu L., Cottet M., Kralikova M., Stoev S., Seyer R., Brabet I., Roux T., Bazin H., Bourrier E., Lamarque L., Breton C., Rives ML., Newman A., Javitch J., Trinquet E., Manning M., Pin JP., Mouillac B., Durroux T. (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol* 6:587-594.
- Althammer F., Grinevich V. (2017). Diversity of oxytocin neurons: beyond magno- and parvocellular cell types? *J Neuroendocrinol*
- Alves SE., Lopez V., McEwen BS., Weiland NG. (1998). Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3281-3286.
- Amico JA., Challinor SM., Cameron JL. (1990). Pattern of oxytocin concentrations in the plasma and cerebrospinal fluid of lactating rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evidence for functionally independent oxytocinergic pathways in primates. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1531-1535.
- Amico JA., Mantella RC., Vollmer RR., Li X. (2004). Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *Journal of neuroendocrinology* 6:319-324.

- Amsalem H., Aldrich CJ., Oskamp M., Windrim R., Farine D. (2014). Postpartum uterine response to oxytocin and carbetocin. *J Reprod Med* 59:167-173.
- Anagnostaras SG., Wood SC., Shuman T., Cai DJ., Leduc AD., Zurn KR., Zurn JB., Sage JR., Herrera GM. (2010). Automated assessment of pavlovian conditioned freezing and shock reactivity in mice using the video freeze system. *Front Behav Neurosci* 158.
- Andari E., Duhamel JR., Zalla T., Herbrecht E., Leboyer M., Sirigu A. (2010). Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *PNAS* 107:4389-4394.
- Andreano JM., Cahill L. (2010). Menstrual cycle modulation of medial temporal activity evoked by negative emotion. *Neuroimage* 53:1286-1293.
- Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairret S., Chelsky D., Dennis M., Bouvier M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3684-3689.
- Antoni FA., Chadio SE. (1989). Essential role of magnesium in oxytocin-receptor affinity and ligandspecificity. *Biochem J* 257:611-614.
- Argiolas A., Melis MR., Gessa GL. (1985). Intraventricular oxytocin induces yawning and penile erection in rats. *Eur J Pharmacol* 117:395-396.
- Argiolas A., Melis MR., Mauri A., Gessa GL. (1987). Paraventricular nucleus lesion prevents yawning and penile erection induced by apomorphine and oxytocin but not by ACTH in rats. *Brain Res* 421:349-352.
- Argiolas A., Melis MR., Vargiu L., Gessa GL. (1987). D(CH₂)₅Tyr(Me) - [Orn₈]vasotocin, a potent oxytocin antagonist, antagonizes penile erection and yawning induced by oxytocin and apomorphine, but not by ACTH-(1-24). *European journal of Pharmacology* 134:221-224.
- Argiolas A., Melis MR., Stancampiano R. (1993). Role of central oxytocinergic pathways in the expression of penile erection. *Regulatory peptides* 45:139-142.
- Arima H., Aguilera G. (2000). Vasopressin and oxytocin neurones of hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei co-express mRNA for Type-1 and Type-2 corticotropin-releasing hormone receptors. *J Neuroendocrinol.* 12:833-842.
- Arletti R., Bertolini A. (1985). Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides* 6:247-253.
- Arletti R., Bazzani C., Castelli M., Bertolini A. (1985). Oxytocin improves male copulatory performance in rats. *Horm Behav* 19:14-20.
- Arletti R., Benelli A., Bertolini A. (1989). Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides* 10:89-93.
- Arletti R., Benelli A., Bertolini A. (1993). Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides* 24:125-129.
- Armstrong WE. (1995). Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol* 47:291-339.
- Arrowsmith S., Wray S. (2014). Oxytocin: Its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. *J Neuroendocrinol* 26:356-369.
- Atasoy D., Betley JN., Su HH., Sternson SM. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger', *Nature* 488:172-177.

- Axelson JF., Leeuwen FW. (1990). Differential localization of estrogen receptors in various vasopressin synthesizing nuclei of the rat brain. *J Neuroendocrinol* 2:209-216.
- Ayers LW., Missig G., Schulkin J., Rosen JB. (2011). Oxytocin reduces background anxiety in a fear-potentiated startle paradigm: peripheral vs central administration. *Neuropsychopharmacology* 36:2488-2497.
- Azad K., Piet R., Poulain D., Olié S. (2003). Dopamine D4 Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of GABAergic Transmission in the Rat Supraoptic Nucleus. *J Neurophysiol.* 90:559-65.

B

- Bale TL., Dorsa DM. (1997). Cloning, novel promoter sequence, and estrogen regulation of a rat oxytocin receptor gene. *Endocrinology* 138:1151-1158.
- Bale TL., Dorsa DM. (1998). NGF, cyclic AMP, and phorbol esters regulate oxytocin receptor gene transcription in SKN-SH and MCF7 cells. *Mol Brain Res* 53:130-137.
- Bale TL., Davis AM., Auger AP., Dorsa DM., McCarthy MM. (2001). CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neurosci* 21:2546-2552.
- Bales KL., van Westerhuyzen JA., Lewis-Reese AD., Grotte ND., Lanter JA., Carter CS. (2007a). Oxytocin has dose dependent developmental effects on pair-bonding and alloparental care in female prairie voles. *Horm Behav* 52:274-279.
- Bales KL., Plotsky PM., Young LJ., Lim MM., Grotte N., Ferrer E., Carter CS. (2007b). Neonatal oxytocin manipulations have long-lasting, sexually dimorphic effects on vasopressin receptors. *Neuroscience* 144:38-45.
- Banerjee P., Joy KP., Chaube R. (2017). Structural and functional diversity of nonapeptide hormones from an evolutionary perspective: A review. *Gen Comp Endocrinol* 241:4-23.
- Bandler R., Keay KA., Floyd N., Price J. (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53:95-104.
- Barberis C., Mouillac B., Durroux T. (1998). Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 156:223-229.
- Barth T., Krejčí I., Vaněčková J., Jošt K., Rychlík I. (1974). Prolonged action of deamino-carba analogues of oxytocin on the rat uterus in vivo. *Eur J Pharmacol* 25:67-70.
- Baskerville TA., Douglas AJ. (2008). Interactions between dopamine and oxytocin in the control of sexual behaviour. *Prog Brain Res* 170:277-90.
- Baskerville TA., Allard J., Wayman C., Douglas AJ. (2009). Dopamine-oxytocin interactions in penile erection. *European journal of neuroscience.* 30:2151-2164.
- Baskerville TA., Douglas AJ. (2010). Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 16:92-123.
- Bealer SL., Crowley WR. (1998). Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol* 274:453-458.
- Bealer SL., Armstrong WE., Crowley WR. (2010). Oxytocin release in magnocellular nuclei: neurochemical mediators and functional significance during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:452-458.

- Beets I., Temmerman L., Janssen T., Schoofs L. (2013). Ancient neuromodulation by vasopressin/oxytocin-related peptides. *Worm* 2 e24246.
- Belin V., Moos F., Richard P. (1984). Synchronization of oxytocin cells in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei in suckled rats: direct proof with paired extracellular recordings. *Exp. Brain Res* 57:201-203.
- Belin V., Moos F. (1986). Paired recordings from supraoptic and paraventricular oxytocin cells in suckled rats: recruitment and synchronization. *J Physiol* 377:369-390.
- Beyer CE., Dwyer JM., Platt BJ., Neal S., Luo B., Ling HP., Lin Q., Mark RJ., Rosenzweig-Lipson S., Schechter LE. (2010). Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation. *Psychopharmacology (Berl)* 209:303-311.
- Blanchard C., Blanchard RJ. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* 81:281-290.
- Blanchard DC., Griebel G., Blanchard RJ. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25:205-218.
- Blevins JE., Schwartz MW., Baskin DG. (2004). Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:87-96.
- Blume A., Bosch OJ., Miklos S., Torner L., Wales L., Waldherr M., Neumann ID. (2008). Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: Local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 27:1947-1956.
- Blumenstein M., Hruby V.J., Viswanatha V. (1979). Investigation of the interactions of oxytocin with neurophysins at low pH using carbon-13 nuclear magnetic resonance and carbon-13-labeled hormones. *Biochemistry* 18:3552-3557.
- Bodnar RJ., Nilaver G., Wallace MM., Badillo-Martinez D., Zimmerman EA. (1984). Pain threshold changes in rats following central injection of beta-endorphin, met-enkephalin, vasopressin or oxytocin antisera. *Int J Neurosci* 24:149-160.
- Boissy A., Terlouw C., Le Neindre P. (1998). Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm substances in urine. *Physiol Behav* 63:489-495.
- Bondy CA., Jensen RT., Brady LS., Gainer H. (1989). Cholecystokinin evokes secretion of oxytocin and vasopressin from rat neural lobe independent of external calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5198-5201.
- Born J., Lange T., Kern W., McGregor GP., Bickel U., Fehm HL. (2002). Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5:514-516.
- Bourque CW., Oliet SH. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 59:601-619.
- Bourque CW. (2008). Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9:519-531.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2:274-286.

- Braga DC., Mori E., Higa KT., Morris M., Michelini LC. (2000). Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278:1474-1482.
- Breslow E., Burman S. (1990). Molecular, thermodynamic, and biological aspects of recognition and function in neurophysin-hormone systems: a model system for the analysis of protein-peptide interactions. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol* 63:1-67.
- Brown CH., Murphy NP., Munro G., Ludwig M., Bull PM., Leng G., Russell JA. (1998). Interruption of central noradrenergic pathways and morphine withdrawal excitation of oxytocin neurones in the rat. *J Physiol* 507:831-842.
- Brown CH., Bains JS., Ludwig M., Stern JE. (2013). Physiological regulation of magnocellular neurosecretory cell activity: Integration of intrinsic, local and afferent mechanisms. *J Neuroendocrinol* 25:678-710.
- Bruhn TO., Sutton SW., Plotsky PM., Vale WW. (1986). Central administration of corticotropin-releasing factor modulates oxytocin secretion in the rat. *Endocrinology* 119:1558-1563.
- Brunton PJ., Sabatier N., Leng G., Russell JA. (2006). Suppressed oxytocin neuron responses to immune challenge in late pregnant rats: a role for endogenous opioids. *Eur J Neurosci* 23:1241-1247.
- Brunton PJ., Russell JA. (2008). Keeping oxytocin neurons under control during stress in pregnancy. *Prog Brain Res* 170:365-377.
- Buijs RM. (1978). Intra- and extra-hypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res* 192:423-435.
- Buijs RM. (1983). Vasopressin and oxytocin--their role in neurotransmission. *Pharmacol Ther* 22:127-141.
- Buijs RM., Geffard M., Pool CW., Hoorneman EMD. (1984). The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus - A light and electron microscopical study. *Brain Research* 323:65-72.
- Buller KM., Day TA. (1996). Involvement of medullary catecholamine cells in neuroendocrine responses to systemic cholecystokinin. *J Neuroendocrinol* 8:819-824.
- Burbach JP., Luckman SM., Murphy D., Gainer H. (2001). Gene regulation in the magnocellular hypothalamoneurohypophysial system. *Physiol Rev* 81:1197-1267.
- Burbach Burbach JPH. (2002). Regulation of gene promoters of hypothalamic peptides. *Front Neuroendocrinol* 23:342-369.
- Busnelli M., Saulière A., Manning M., Bouvier M., Galés C., Chini B. (2012). Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. *J Biol Chem* 287:3617-3629.
- Busnelli M., Bulgheroni E., Manning M., Kleinau G., Chini, B. (2013). Selective and potent agonists and antagonists for investigating the role of mouse oxytocin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 346:318-327.
- Busnelli, M., Kleinau, G., Muttenthaler, M., Stoev, S., Manning, M., Bibic, L., Howell, LA., McCormick, P.J., Di Lascio, S., Braidà, D., Sala M., Rovati GE., Bellini T., Chini B. (2016). Design and characterization of superpotent bivalent ligands targeting oxytocin receptor dimers via a channel-like structure. *J Med Chem* 59:7152-7166.

Busnelli M., Chini B. (2017). Molecular basis of oxytocin receptor signalling in the brain: what we know and what we need to know. *Curr Top Behav Neurosci* 10:10-27.

C

Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plotsky PM., Meaney MJ. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 95:5335-5340.

Caldwell JD., Prange AJ. Jr., Pedersen CA. (1986). Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides* 7:175-189.

Caligioni CS., Oliver C., Jamur MC., Franci CR. (2007). Presence of oxytocin receptors in the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones in female rats: a possible direct action of oxytocin on GnRH neurones. *J Neuroendocrinol* 19:439-448.

Camerino C. (2009). Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice. *Obesity (Silver Spring)* 17:980-984.

Campeau S., Davis M. (1995). Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* 15:2301-2311.

Cardoso C., Ellenbogen MA., Linnen AM. (2012). Acute intranasal oxytocin improves positive self-perceptions of personality. *Psychopharmacology*

Carmichael MS., Humbert R., Dixen J., Palmisano G., Greenleaf W., Davindson JM. (1987). Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab* 64:27-31.

Carter CS., Porges SW. (2012). The biochemistry of love: an oxytocin hypothesis. *EMBO Rep* 14:12-16.

Carter DA., Murphy D. (1991). Rapid changes in poly (A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophyseal peptide gene activation following physiological stimulation. *Neuroendocrinology* 53:1-6.

Cassell MD., Freedman LJ., Shi C. (1999). The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann NY Acad Sci* 877:217-241.

Castel M., Gainer H., Dellmann HD. (1984). Neuronal secretory systems. *Int Rev Cytol* 88:303-459.

Chakfe Y., Bourque CW. (2000). Excitatory peptides and osmotic pressure modulate mechanosensitive cation channels in concert. *Nat Neurosci* 3:572-579.

Champagne FA., Meaney MJ. (2006). Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry* 59:1227-1235.

Chang SWC., Brent L.J.N., Adams GK., Klein JT., Pearson JM., Watson KK., Platt ML. (2013). Neuroethology of primate social behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:10387-10394.

Chatterjee O., Patil K., Sahu A., Gopalakrishnan L., Mol P., Advani J., Mukherjee S., Christopher R., Prasad TSK. (2016). An overview of the oxytocin-oxytocin receptor signaling network. *J. Cell Commun Signal* 1-6.

Cheung S., Ballew JR., Moore KE., Lookingland KJ. (1998). Contribution of dopamine neurons in the medial zona incerta to the innervation of the central nucleus of the amygdala, horizontal diagonal band of Broca and hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 808:174-81.

- Chiodera P., Volpi R., Capretti L., Marchesi C., D'Amato L., De Ferri A., Bianconi L., Coiro V. (1991). Effect of estrogen or insulin-induced hypoglycemia on plasma oxytocin levels in bulimia and anorexia nervosa. *Metabolism* 40:1226-1230.
- Chini B., Mouillac B., Balestre M.-NN., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Hibert M., Andriolo M., Pupier S., Jard S., Barberis C. (1996). Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett* 397:201-206.
- Cho MM., DeVries C., Williams JR., Carter CS. (1999). The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci* 113:1071-1079.
- Choleris E., Little SR., Mong JA., Puram SV, Langer R., Pfaff DW. (2007). Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4670-4675.
- Chung SK., McCabe JT., Pfaff DW. (1991). Estrogen influences on oxytocin mRNA expression in preoptic and anterior hypothalamic regions studied by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 307:281-295.
- Cifani C., Micioni Di Bonaventura MV., Cannella N., Fedeli A., Guerrini R., Calo G., Ciccocioppo R., Ubaldi M. (2011). Effect of neuropeptide S receptor antagonists and partial agonists on palatable food consumption in the rat. *Peptides* 32:44-50.
- Ciocchi S., Herry C., Grenier F., Wolff SB., Letzkus JJ., Vlachos I., Ehrlich I., Sprengel R., Deisseroth K., Stadler MB., Müller C., Lüthi A. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*. 468:277-82.
- Clark SD., Duangdao DM., Schulz S., Zhang L., Liu X., Xu YL., Reinscheid RK. (2011). Anatomical characterization of the neuropeptide S system in the mouse brain by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 519:1867-1893.
- Clark SD., Kenakin TP., Gertz S., Hassler C., Gay EA., Langston TL., Reinscheid RK., Runyon SP. (2017). Identification of the first biased NPS receptor agonist that retains anxiolytic and memory promoting effects with reduced levels of locomotor stimulation. *Neuropharmacology* 118:69-78.
- Clarke G., Wood Merrick L., Lincoln DW. (1979). Opiate inhibition of peptide release from the neurohumoral terminals of hypothalamic neurones. *Nature* 282:746-748.
- Claybaugh JR., Uyehara CF. (1993). Metabolism of neurohypophysial hormones. *Ann N Y Acad Sci* 689:250-268.
- Clément P., Peeters M., Bernabé J., Denys P., Alexandre L., Giuliano F. (2008). Brain oxytocin receptors mediate ejaculation elicited by 7-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetralin (7-OH-DPAT) in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 154:1150-1159.
- Clément P., Bernabé J., Compagnie S., Alexandre L., McCallum S., Giuliano F. (2013). Inhibition of ejaculation by the non-peptide oxytocin receptor antagonist GSK557296: a multi-level site of action. *Br J Pharmacol* 169:1477-1485.
- Colaianni G., Sun L., Zaidi M., Zallone A. (2014). Oxytocin and bone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307:970-977.
- Conti F., Sertic S., Reversi A., Chini B. (2009). Intracellular trafficking of the human oxytocin receptor: evidence of receptor recycling via a Rab4/Rab5 "short cycle". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:532-542.

- Coote JH. (2005). A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Exp Physiol* 90:169-173.
- Cottet M., Albizu L., Perkovska S., Jean-Alphonse F., Rahmeh R., Orcel H., Méjean C., Granier S., Mendre C., Mouillac B., Durroux T. (2010). Past, present and future of vasopressin and oxytocin receptor oligomers, prototypical GPCR models to study dimerization processes. *Curr Opin Pharmacol* 10:59-66.
- Crankshaw D., Gaspar V., Pliska V. (1990). Multiple [3H]-oxytocin binding sites in rat myometrial plasma membranes. *J Recept Res* 10:269-285.
- Cunningham ET Jr., Sawchenko PE. (1988). Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274:60-76.
- D**
- Daftary SS., Boudaba C., Szabó K., Tasker JG. (1998). Noradrenergic excitation of magnocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus via intranuclear glutamatergic circuits. *J Neurosci* 18:10619-10628.
- Dale HH. (1906). On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34:163-206.
- Davis M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:353-375.
- Davis M., Rainnie D., Cassell M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17:208-214.
- Dayanithi G., Cazalis M., Nordmann JJ. (1987). Relaxin affects the release of oxytocin and vasopressin from the neurohypophysis. *Nature* 325:813-816.
- Decavel C., Geffard M., Calas A. (1987). Comparative study of dopamine- and noradrenaline-immunoreactive terminals in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 77:149-154.
- Denda S., Takei K., Kumamoto J., Goto M., Tsutsumi M., Denda M. (2012). Oxytocin is expressed in epidermal keratinocytes and released upon stimulation with adenosine 5'-[g-thio]triphosphate in vitro. *Exp Dermatol* 7:535-537.
- Dhuria SV., Hanson LR., Frey WH. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99:1654-1673.
- Dias BG., Ressler KJ. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci* 17:89-96.
- Dogbevia GK., Roßmanith M., Sprengel R., Hasan MT. (2016). Flexible, AAV-equipped Genetic Modules for Inducible Control of Gene Expression in Mammalian Brain. *Mol Ther Nucleic Acids* 5:e309.
- Dogbevia GK., Marticorena-Alvarez R., Bausen M., Sprengel R., Hasan MT. (2015). Inducible and combinatorial gene manipulation in mouse brain. *Front Cell Neurosci* 9.
- Domes G., Schulze L., Bottger M., Grossmann A., Hauenstein K., Wirtz, PH., Heinrichs M., Herpertz SC. (2010b). The neural correlates of sex differences in emotional reactivity and emotion regulation. *Hum Brain Mapp* 31:758-769.
- Donaldson ZR., Young LJ. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322:900-904.

- Douglas AJ., Dye S., Leng G., Russell JA., Bicknell RJ. (1993). Endogenous opioid regulation of oxytocin secretion through pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* 5:307-314.
- Douglas AJ., Scullion S., Antonievic IA., Brown D., Russell JA., Leng G. (2001). Uterine contractile activity stimulates supraoptic neurons in term pregnant rats via a noradrenergic pathway. *Endocrinolo* 142:633-644.
- Douglas AJ., Johnstone L., Leng G. (2007). Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: A potential role for brain oxytocin. *Physiology and Behavior* 91:352-365.
- Drake MT., Shenoy SK., Lefkowitz RJ. (2006). Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99:570-582.
- Duque-Wickens N., Steinmain M., Grinevich V., Trainor B. (2017). The role of oxytocin neurons in the bed nucleus of stria terminalis in mediating social withdrawal. *Biol Psychiatry* 81:44-45.
- Dumais KM., Bredewold R., Mayer TE., Veenema AH. (2013). Sex differences in oxytocin receptor binding in forebrain regions: correlations with social interest in brain region- and sex- specific ways. *Horm Behav* 64:693-701.
- Dumais KM., Veenema AH. (2016). Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Front Neuroendocrinol* 40:1-23.
- Dumais KM., Kulkarni PP., Ferris CF., Veenema AH. (2017). Sex differences in neural activation following different routes of oxytocin administration in awake adult rats. *Psychoneuroendocrinology* 81:52-62.

E

- Ebner K., Bosch OJ., Krömer S., Singewald N., Neumann ID. (2005). Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids. *Neuropsychopharmacology* 30:223-230.
- Eckstein M., Scheele D., Patin A., Preckel K., Becker B., Walter A., Domschke K., Grinevich V., Maier W., Hurlmann R. (2015). Oxytocin Facilitates Pavlovian Fear Learning in Males. *Neuropsychopharmacology* 41:932-939.
- Edwards DA., Isaacs S. (1991). The zona incerta lesions: effects on copulation, partner preference and other socio-sexual behaviours. *Behav Brain Res* 44:145-150.
- Egorova AE., Kuzik VV., Ozirskaya EV. (2003). Electron microscopy study of anterior neuropituitary of the starlet acipenser ruthenus. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 39: 241-248.
- Eisenach JC., Tong C., Curry R. (2015). Phase 1 safety assessment of intrathecal oxytocin. *Anesthesiology* 122:407-413.
- El Allali K., Achaâban MR., Piro M., Ouassat M., Challet E., Errami M., Lakhdar-Ghazal N., Calas A., Pévet P. (2017). The Suprachiasmatic Nucleus of the Dromedary Camel (*Camelus dromedarius*): Cytoarchitecture and Neurochemical Anatomy. *Front Neuroanat* 11:103.
- Elands J., Barberis C., Jard S. (1988a). [3H]-[Thr4,Gly7]OT: a highly selective ligand for central and peripheral OT receptors. *Am J Physiol* 254:31-38.

- Elands J., Barberis C., Jard S., Tribollet E., Dreifuss JJ., Bankowski K., Manning M., Sawyer WH. (1988b). 125Ilabelled d(CH₂)₅[Tyr(Me)₂,Thr₄,Tyr-NH₂(9)]OVT: a selective oxytocin receptor ligand. *Eur J Pharmacol* 147:197-207.
- Eliava M., Melchior M., Knobloch-Bollmann HS., Wahis J., da Silva Gouveia M., Tang Y., Ciobanu AC., Triana del Rio R., Roth LC., Althammer F., Chavant V., Goumon Y., Gruber T., Petit-Demoulière N., Busnelli M., Chini B., Tan LL., Mitre M., Froemke RC., Chao MV., Giese G., Sprengel R., Kuner R., Poisbeau P., Seeburg PH., Stoop R., Charlet A., Grinevich V. (2016). A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron* 89:1291-1304.
- Ermisch A., Barth T., Rühle HJ., Skopková J., Hrbas P., Landgraf R. (1985). On the blood-brain barrier to peptides: accumulation of labelled vasopressin, DesGlyNH₂-vasopressin and oxytocin by brain regions. *Endocrinol exp* 19:29-37.
- F**
- Fanelli F., Barbier P., Zanchetta D., de Benedetti PG., Chini, B. (1999). Activation mechanism of human oxytocin receptor: a combined study of experimental and computer-simulated mutagenesis. *Mol Pharmacol* 56:214-225.
- Fanselow MS., Bolles RC. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:736-744.
- Fanselow MS. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* 1:429-438.
- Fanselow MS., Wassum KM. (2015). The origins and organization of vertebrate pavlovian conditioning. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8:a021717.
- Feinstein J., Adolphs R., Damasio A., Tranel D. (2011). The human amygdala and the induction and experience of fear. *Current biology* 21:34-38.
- Feldman R., Weller A., Zagoory-Sharon O., Levine A. (2007). Evidence for a neuroendocrinological foundation of human affiliation: Plasma oxytocin levels across pregnancy and the postpartum period predict mother-infant bonding. *Psychological Science* 18:965-970.
- Feldman R., Gordon I., Schneiderman I., Weisman O., Zagoory-Sharon O. (2010). Natural variations in maternal and paternal care are associated with systematic changes in oxytocin following parent-infant contact. *Psychoneuroendocrinology* 35:1133-1141.
- Feldman R., Monakhov M., Pratt M., Ebstein RP. (2016). Oxytocin pathway genes: evolutionary ancient system impacting on human affiliation, sociality, and psychopathology. *Biol Psychiatry* 79:174-184.
- Fendt M., Fanselow MS. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Ferguson JN., Young LJ., Hearn EF., Matzuk MM., Insel TR., Winslow JT. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 25:284-288.
- Ferre S., Casado V., Devi LA., Filizola M., Jockers R., Lohse MJ., Milligan G., Pin JP., Guitart X. (2014). G Protein-Coupled Receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev* 66:413-434.
- Fields PA., Eldridge RK., Fuchs AR., Roberts RF., Fields MJ. (1983). Human placental and bovine corpora luteal oxytocin. *Endocrinology* 112:1544-1546.

- Fields RL., House SB., Gainer H. (2003). Regulatory domains in the intergenic region of the oxytocin and vasopressin genes that control their hypothalamus-specific expression in vitro. *J Neurosci* 23:7801-7809.
- Figueira RJ., Peabody MF., Lonstein JS. (2008). Oxytocin receptor activity in the ventrocaudal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior in postpartum rats. *Behav Neurosci* 122:618-628.
- Flak JN., Myers B., Solomon MB., McKlveen JM., Krause EG., Herman JP. (2014). Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress. *European journal of neuroscience* 39:1903-1911.
- Fleming JGW., Spencer TE., Safe SH., Bazer FW. (2006). Estrogen regulates transcription of the ovine oxytocin receptor gene through GC-rich SP1 promoter elements. *Endocrinology* 147:899-911.
- Fliers E., Guldenaar SE., van de Wal N., Swaab DF. (1986). Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 375:363-367.
- Fox RJ., Sorenson CA. (1994). Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. *Brain Res* 648:215-221.
- Francis DD., Champagne FC., Meaney MJ. (2000). Variations in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol* 12:1145-1148.
- Francis DD., Young LJ., Meaney MJ., Insel TR. (2002). Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. *J Neuroendocrinol* 14:349-353.
- Freeman SM., Inoue K., Smith AL., Goodman MM., Young LJ. (2014a). The neuroanatomical distribution of oxytocin receptor binding and mRNA in the male rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinology* 45:128-141.
- Freeman SM., Walum H., Inoue K., Smith AL., Goodman MM., Bales KL., Young LJ. (2014b). Neuroanatomical distribution of oxytocin and vasopressin 1a receptors in the socially monogamous coppery titi monkey (*Callicebus cupreus*). *Neuroscience* 273:12-23.
- Freeman SM., Young LJ. (2016). Comparative perspectives on oxytocin and vasopressin receptor research in rodents and primates: translational implications. *J Neuroendocrinol* 28.
- Freund-Mercier MJ., Stoeckel ME., Palacios JM., Pazos A., Reichhart JM., Porte A., Richard P. (1987). Pharmacological characteristics and anatomical distribution of [3H]oxytocin-binding sites in the Wistar rat brain studied by autoradiography. *Neuroscience* 20:599-614.
- Fuxe K., Borroto-Escuela DO., Romero-Fernandez W., Ciruela F., Manger P., Leo G., Díaz-Cabiale Z. Agnati LF. (2012). On the role of volume transmission and receptor-receptor interactions in social behaviour: Focus on central catecholamine and oxytocin neurons. *Brain research* 1476:119-131.

G

- Gainer H. (2012). Cell-Type Specific Expression of Oxytocin and Vasopressin Genes: An Experimental Odyssey. *J Neuroendocrinol* 24:528-538.

- Gallagher M., Holland PC. (1994). The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11771-11776.
- Garrison JL., Macosko EZ., Bernstein S., Pokala N., Albrecht DR., Bargmann CI. (2012). Oxytocin/vasopressin-related peptides have an ancient role in reproductive behavior. *Science* 338:540-543.
- Ge Y., Lundeberg T., Yu LC. (2002). Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Res* 927:204-207.
- Geenen V., Legros JJ., Franchimont P., Baudrihay M., Defresne MP., Boniver J. (1986). The neuroendocrine thymus: coexistence of oxytocin and neurophysin in the human thymus. *Science* 232:508-511.
- Gilligan P., Brenner S., Venkatesh B. (2003). Neurone-specific expression and regulation of the pufferfish isotocin and vasotocin genes in transgenic mice. *J Neuroendocrinol* 15:1027-1036.
- Gimpl G., Klein U., Reiländer H., Fahrenholz F. (1995). Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry* 34:13794-13801.
- Gimpl G., Burger K., Fahrenholz F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36:10959-10974.
- Gimpl G., Fahrenholz F. (2000). Human oxytocin receptors in cholesterol-rich vs. cholesterol-poor microdomains of the plasma membrane. *Eur J Biochem* 267:2483-2497.
- Gimpl G., Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629-683.
- Gimpl G., Fahrenholz F. (2002). Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 1564:384-392.
- Gimpl G., Reitz J., Brauer S., Trossen, C. (2008). Oxytocin receptors: ligand binding, signalling and cholesterol dependence. *Prog Brain Res* 170:193-204.
- Glasgow E., Kusano K., Chin H., Mezey É., Young WS., Gainer H. (1999). Single Cell Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis of Rat Supraoptic Magnocellular Neurons: Neuropeptide Phenotypes and High Voltage- Gated Calcium Channel Subtypes. *Endocrinology* 140:5391-5401.
- Goldsmith LT., Skurnick JH., Wojtczuk AS., Linden M., Kuhar MJ., Weiss G. (1989). The antagonistic effect of oxytocin and relaxin on rat uterine segment contractility. *Am J Obstet Gynecol* 161:1644-1649.
- Goldstein JM., Jerram M., Poldrack R., Ahern T., Kennedy DN., Seidman LJ., Makris N. (2005). Hormonal cycle modulates arousal circuitry in women using functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 25:9309-9316.
- Goldstein JM., Jerram M., Abbs B., Whitfield-Gabrieli S., Makris N. (2010). Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle. *J Neurosci* 30:431-438.
- Gonzalez-Hernandez A., Manzano-Garcia A., Martinez-Lorenzana G., Tello-Garcia IA., Carranza M., Aramburo C., Condes-Lara M. (2017). Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide dynamic range neurons. *Pain* 140:265-73.

- Goosens KA., Maren S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem* 8:148-155.
- Gouizi K., Bereksi Reguig F., Maaoui C. (2011). Emotion recognition from physiological signals. *J Med Eng Technol* 35:300-307.
- Grapperon J., Pignol AC., Vion-Dury J. (2012). The measurement of electrodermal activity. *Encephale* 38(2):149-155.
- Gravati M., Busnelli M., Bulgheroni E., Reversi A., Spaiardi P., Parenti M., Toselli M., Chini B. (2010). Dual modulation of inward rectifier potassium currents in olfactory neuronal cells by promiscuous G protein coupling of the oxytocin receptor. *J Neurochem* 114:1424-1435.
- Grazzini E., Guillon G., Mouillac B., Zingg HH. (1998). Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392:509-512.
- Green L., Fein D., Modahl C., Feinstein C., Waterhouse L., Morris M. (2001). Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. *Biol Psychiatry* 50:609-613.
- Grinevich V., Polenov AL. (1998). Morphofunctional specialization of the main and accessory magnocellular neuroendocrine nuclei of the hypothalamus. *Neurosci Behav Physiol* 28:710-714.
- Grinevich V., Desarménien M., Chini B., Tauber M., Muscatelli F. (2015). Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Front Neuroanat* 8:164.
- Grinevich V., Knobloch-Bollmann HS., Eliava M., Busnelli M., Chini B. (2016). Assembling the puzzle: pathways of oxytocin signaling in the brain. *Biol Psychiatry* 79:155-164.
- Grinevich V., Charlet A. (2017). Commentary. Oxytocin: pain relief in skin. *Pain* 158:2061-2063.
- Grund T., Goyon S., Li Y., Eliava M., Liu H., Charlet A., Grinevich V., Neumann ID. (2017). Neuropeptide S Activates Paraventricular Oxytocin Neurons to Induce Anxiolysis. *J Neurosci* 37:12214-12225.
- Guldenaar SE., Pickering BT. (1985). Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testis. *Cell Tissue Res* 240:485-487.
- Guastella AJ., Hickie IB. (2016). Oxytocin treatment, circuitry, and autism: A critical review of the literature placing oxytocin into the autism context. *Biological psychiatry*
- Gutkowska J., Jankowski M., Lambert C., Mukaddam-Daher S., Zingg HH., Mccann SM. (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Physiology* 94:11704-11709.
- Gutkowska J., Jankowski M., Antunes-Rodrigues J. (2014). The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Brazilian J Med Biol Res* 47:206-214.
- Guzzi F., Zanchetta D., Cassoni P., Guzzi V., Francolini M., Parenti M., Chini B. (2002). Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene* 21:1658-1667.

H

- Hara Y., Battey J., Gainer, H. (1990). Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Brain Res Mol Brain Res* 8:319-324.

- Harony-Nicolas H., Mamrut S., Brodsky L., Shahar-Gold H., Barki-Harrington L., Wagner S. (2014). Brain regionspecific methylation in the promoter of the murine oxytocin receptor gene is involved in its expression regulation. *Psychoneuroendocrinology* 39:121-131.
- Hasbi A., Devost D., Laporte SA., Zingg HH. (2004). Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. *Mol Endocrinol* 18:1277-1286.
- Hatton GI. (1990). Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Neurobiol* 34:437-504.
- Haubensak W., Kunwar PS., Cai H., Ciochi S., Wall NR., Ponnusamy R., Biag J., Dong HW., Deisseroth K., Callaway EM., Fanselow MS., Lüthi A., Anderson DJ. (2010). Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature*. 468:270-276.
- Heinrichs M., von Dawans B., Domes G. (2009). Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. *Front Neuroendocrinol* 30:548-557.
- Herbison AE., Voisin DL., Douglas AJ., Chapman C. (1997). Profile of monoamine and excitatory amino acid release in rat supraoptic nucleus over parturition. *Endocrinology* 138:33-40.
- Herget U., Wolf A., Wullimann MF., Ryu S. (2014). Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol* 522:1542-1564.
- Hernández, J., Segarra AB., Ramírez M., Banegas I., de Gasparo M., Alba F., Vives F., Durán R., Prieto I. (2009). Stress influences brain enkephalinase, oxytocinase and angiotensinase activities: a new hypothesis. *Neuropsychobiology* 59:184-189.
- Higa KT., Mori E., Viana FF., Morris M., Michelini LC. (2002). Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R537-R545.
- Hoare S., Copland JA., Strakova Z., Ives K., Jeng YJ., Hellmich MR., Soloff MS. (1999). The proximal portion of the COOH terminus of the oxytocin receptor is required for coupling to G(q), but not G(i). Independent mechanisms for elevating intracellular calcium concentrations from intracellular stores. *J Biol Chem* 274:28682-28689.
- Hökfelt T. (1991). Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* 7:867-879.
- Holmes GM., Browning KN., Babic T., Fortna SR., Coleman FH., Travagli RA. (2013). Vagal afferent fibres determine the oxytocin-induced modulation of gastric tone. *J Physiol* 591:3081-3100.
- Hou-Yu A., Lamme AT., Zimmerman EA., Silverman AJ. (1986). Comparative distribution of vasopressin and oxytocin neurons in the rat brain using a double-label procedure. *Neuroendocrinology* 44:235-246.
- Hrabovszky E., Kalló I., Steinhauser A., Merchenthaler I., Coen CW., Petersen SL., Liposits Z. (2004). Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol* 473:315-333.
- Hrabovszky E., Liposits Z. (2008). Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system. *J Neuroendocrinol* 20:743-751.
- Huber D., Veinante P., Stoop R. (2005). Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science* 308:245-248.

Huttunen MO., Niskanen P. (1978). Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiat* 35:429-431.

I

Iijima K., Ogawa T. (1981). An HRP study on the distribution of all nuclei innervating the supraoptic nucleus in the rat brain. *Acta Histochem* 69:274-295.

van Ijzendoorn MH., Bakermans-Kranenburg MJ. (2011). A sniff of trust: Meta-analysis of the effects of intranasal oxytocin administration on face recognition, trust to in-group, and trust to out-group. *Psychoneuroendocrinology*

Imanieh MH., Bagheri F., Alizadeh AM., Ashkani-Esfahani S. (2014). Oxytocin has therapeutic effects on cancer, a hypothesis. *Eur J Pharmacol* 741:112-123.

Ingram CD., Moos F. (1992). Oxytocin-containing pathway to the bed nuclei of the stria terminalis of the lactating rat brain: immunocytochemical and in vitro electrophysiological evidence. *Neuroscience* 47:439-452.

Insel TR., Harbauch CR. (1989). Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. *Physiology and Behavior* 45:1033-1041.

Insel TR., Winslow JT., Wang Z., Young LJ. (1998). Oxytocin, vasopressin, and the neuroendocrine basis of pair bond formation. *Adv Exp Med Biol* 449:215-224.

Ishii M., Naruse K., Hattori A., Tsujimoto M., Ishiura S., Numaguchi Y., Murohara T., Kobayashi H., Mizutani S. (2009). Oxytocin hypersensitivity in pregnant P-LAP deficient mice. *Life Sci* 84:668-672.

Ivell, R., and Richter, D. (1984). Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2006-2010.

Ivell R., Bathgate RA., Walther N., Kimura T. (1998). The molecular basis of oxytocin and oxytocin receptor gene expression in reproductive tissues. *Adv Exp Med Biol* 449:297-306.

Ivell R., Walther N. (1999). The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Mol Cell Endocrinol* 151:95-101.

Ivell R., Kimura T., Müller D., Augustin K., Abend N., Bathgate R., Telgmann R., Balvers M., Tillmann G., Fuchs R. (2001). The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Exp Physiol* 86:289-296.

J

Janak PH., Tye KM. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517:284-292.

Jeng YJ., Lolait SJ., Soloff MS. (1998). Induction of oxytocin receptor gene expression in rabbit amnion cells. *Endocrinology* 139:3449-3455.

Juif PE., Poisbeau P. (2013). Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain* 154:1449-1456.

Juif PE., Breton JD., Rajalu M., Charlet A., Goumon Y., Poisbeau P. (2013). Long-lasting spinal oxytocin analgesia is ensured by the stimulation of allopregnanolone synthesis which potentiates GABA(A) receptor-mediated synaptic inhibition. *J Neurosci* 33:16617-16626.

- Johnston CA., Lopez F., Samson WK., Negro-Vilar A. (1990). Physiologically important role for central oxytocin in the preovulatory release of luteinizing hormone. *Neurosci Lett* 120:256-258.
- Jones RB. (1996). Fear and adaptability in poultry: insights, implications and imperatives. *World's Poultry Science Journal* 52:131-174.
- Jones C., Barrera I., Brothers S., Ring R., Wahlestedt C. (2017). Oxytocin and social functioning. *Dialogues Clin Neurosci* 119:193-201.
- Jüngling K., Seidenbecher T., Sosulina L., Lesting J., Sangha S., Clark SD., Okamura N., Duangdao DM., Xu YL., Reinscheid RK., Pape HC. (2008). Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59:298-310.

K

- Kamm O., Aldrich TB., Grote IW., Rowe LW., Bugbee EP. (1928). The active principles of the posterior lobe of the pituitary gland. I. The demonstration of the presence of two active principles. II. The separation of the two principles and their concentration in the form of potent solid preparations. *J Am Chem Soc* 50:573-601.
- Kania A., Gugula A., Grabowiecka A., de Ávila C., Blasiak T., Rajfur Z., Lewandowski MH., Hess G., Timofeeva E., Gundlach AL., Blasiak A. (2017). Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3-RXFP3 signalling. *J Physiol* 595:3425-3447.
- Karpenko I., Margathe JF., Rodriguez T., Pflimlin E., Dupuis E., Hibert M., Durroux T., Bonnet D. (2015). Selective nonpeptidic fluorescent ligands for oxytocin receptor: design, synthesis, and application to time-resolved FRET binding assay. *J Med Chem* 58:2547-2552.
- Kawasaki A., Shuto F., Nogami H., Hisano S. (2006). VGLUT2 expression is up-regulated in neurohypophysial vasopressin neurons of the rat after osmotic stimulation. *Neuroscience research* 56:124-127.
- Kendrick KM. (2000). Oxytocin, motherhood and bonding. *Experimental Physiology* 85:111-124.
- Kimura T., Tanizawa O., Mori K., Brownstein MJ., Okayama H. (1992). Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356:526-529.
- Kimura T., Saji F., Nishimori K., Ogita K., Nakamura H., Koyama M., Murata, Y. (2003). Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. *J Mol Endocrinol* 30:109-115.
- Kita I., Yoshida Y., Nishino S. (2006). An activation of parvocellular oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus in oxytocin-induced yawning and penile erection. *Neurosci Res* 54:269-275.
- Kiss A., Mikkelsen JD. (2005). Oxytocin - Anatomy and functional assignments: A minireview *Endocr Regul* 39:97-105.
- Kiyama H., Emson PC. (1990). Evidence for coexpression of oxytocin and vasopressin messenger ribonucleic acids in magnocellular neurosecretory cell: simultaneous demonstration of two neurophysin messenger ribonucleic acids by hybridization histochemistry. *J Neuroendocrinol* 2:257-259.

- Klein U., Gimpl G., Fahrenholz F. (1995). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34:13784-13793.
- Klenerova V., Krejci I., Sida P., Hlinak Z., Hynie S. (2009a). Modulatory effects of oxytocin and carbetocin on stress-induced changes in rat behavior in the open-field. *J Physiol Pharmacol* 60:57-62.
- Klenerova V., Krejci I., Sida P., Hlinak Z., Hynie S. (2009b). Oxytocin and carbetocin effects on spontaneous behavior of male rats: modulation by oxytocin receptor antagonists. *Neuro Endocrinol Lett* 30:335-342.
- Klockars A., Levine AS., Olszewski PK. (2015). Central oxytocin and food intake: Focus on macronutrient-driven reward. *Front Endocrinol* 6:e65.
- Knobloch HS., Charlet A., Hoffmann LC., Eliava M., Khrulev S., Cetin AH., Osten P., Schwarz MK., Seeburg PH., Stoop R., Grinevich V. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* 73:553-566.
- Knobloch HS., Grinevich V. (2014). Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates. *Front. Behav. Neurosci.* 8:31.
- Koohi, M.K., Ivell, R., and Walther, N. (2005). Transcriptional activation of the oxytocin promoter by oestrogens uses a novel non-classical mechanism of oestrogen receptor action. *J Neuroendocrinol* 17:197-207.
- Kortus S., Srinivasan C., Forostyak O., Ueta Y., Sykova E., Chvatal A., Zapotocky M., Verkhatsky A., Dayanithi G. (2016). Physiology of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in the isolated vasopressin and oxytocin neurones of the rat supraoptic nucleus. *Cell Calcium* 59:280-288.
- Kosfeld M., Heinrichs M., Zak PJ., Fischbacher U., Fehr E. (2005). Oxytocin increases trust in humans. *Nature* 435:673-676.
- Kreibig SD., Wilhelm FH., Roth WT., Gross JJ. (2007). Cardiovascular, electrodermal, and respiratory response patterns to fear- and sadness-inducing films. *Psychophysiology* 44:787-806.
- Kubota Y., Kimura T., Hashimoto K., Tokugawa Y., Nobunaga K., Azuma C., Saji F., Murata Y. (1996). Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 124:25-32.
- Kumsta R., Hummel E., Chen FS., Heinrichs M. (2013). Epigenetic regulation of the oxytocin receptor gene: Implications for behavioral neuroscience. *Front Neurosci* 7:1-6.
- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H., Morikawa K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971-977.
- Kusui C., Kimura T., Ogita K., Nakamura H., Matsumura Y., Koyama M., Azuma C., Murata Y. (2001). DNA methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 289:681-686.

L

- Lambert RC., Moos FC., Richard P. (1993). 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* 57:1027-1038.
- Landgraf R., Neumann ID. (2004). Vasopressin and oxytocin release within the brain: A dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 25:150-176.
- Landry M., Trembleau A., Arai R., Calas A. (1991). Evidence for a colocalization of oxytocin mRNA and galanin in magnocellular hypothalamic neurons: a study combining in situ hybridization and immunohistochemistry. *Mol Brain Res* 10:91-95.
- Landry M., Hökfelt T. (1998). Subcellular localization of preprogalanin messenger RNA in perikarya and axons of hypothalamo-posthypophyseal magnocellular neurons: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 84:897-912.
- Larsen PJ., Mikkelsen JD., Jessop DS., Lightman SL., Chowdrey HS. (1993). Neuropeptide Y mRNA and immunoreactivity in hypothalamic neuroendocrine neurons: effects of adrenalectomy and chronic osmotic stimulation. *J Neurosci* 13:1138-1147.
- Larcher A., Neculcea J., Chu K., Zingg HH. (1995). Effects of retinoic acid and estrogens on oxytocin gene-expression in the rat uterus - in-vitro and in-vivo studies. *Mol Cell Endocrinol* 114:69-76.
- Larsen PJ., Hay-Schmidt A., Vrang N., Mikkelsen JD. (1996). Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience* 70:963-88.
- LeDoux JE. (1996). *The emotional brain*. New York: Simon & Schuster.
- LeDoux JE., Cicchetti P., Xagoraris A., Romanski LM. (1999). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062-1069.
- LeDoux JE. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- Lee HJ., Macbeth AH., Pagani JH., Young WS. (2009). Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88:127-151.
- van Leengoed E., Kerker E., Swanson HH. (1986). Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *Journal of endocrinology* 112:275-282.
- van Leeuwen FW., Swaab DF. (1977). Specific immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin and oxytocin in the neurohypophysis of the rat. *Cell Tissue Res* 177:493-501.
- Leng G., Caqueneau C., Sabatier N. (2005). Regulation of oxytocin secretion. *Vitam Horm* 71:27-58.
- Leng G., Ludwig M. (2008). Neurotransmitters and peptides: whispered secrets and public announcements. *J Physiol* 586:5625-5632.
- Leng G., Onaka T., Caqueneau C., Sabatier N., Tobin VA., Takayanagi Y. (2008). Oxytocin and appetite. *Prog Brain Res* 170:137-151.
- Levine A., Zagoory-Sharon O., Feldman R., Weller A. (2007). Oxytocin during pregnancy and early postpartum: Individual patterns and maternal-fetal attachment. *Peptides* 28:1162-1169.
- Li J., Hand GA., Potts JT., Mitchell JH. (1997). Identification of hypo-thalamic vasopressin and oxytocin neurons activated during the exercise pressor reflex in cats. *Brain Res* 752:45-51.

- Lightman SL., Young WS. (1987). Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat. *J Physiol* 394:23-39.
- Lim MM., Murphy AZ., Young LJ. (2004). Ventral striatopallidal oxytocin and vasopressin V1a receptors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *J Comp Neurol* 468:555-570.
- Lindvall O., Bjorklund A., Skagerberg G. (1984). Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306:19-30.
- Lipkin SM., Nelson CA., Glass CK., Rosenfeld MG. (1992). A negative retinoic acid response element in the rat oxytocin promoter restricts transcriptional stimulation by heterologous transactivation domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1209-1213.
- Lipschitz DL., Crowley WR., Bealer SL. (2004). Differential sensitivity of intranuclear and systemic oxytocin release to central noradrenergic receptor stimulation during mid- and late gestation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:523-528.
- Liu D., Seuthe AB., Ehrler OT., Zhang X., Wytenbach T., Hsu JF., Bowers MT. (2005). Oxytocin-receptor binding: why divalent metals are essential. *J Am Chem Soc* 127:2024-2025.
- Lojowska M., Ling S., Roelofs K., Hermans EJ. (2018). Visuocortical changes during a freezing-like state in humans. *Neuroimage* 179:313-325.
- Lordi B., Protais P., Mellier D., Caston J. (1997). Acute stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring. *Physiol Behav* 62:1087-1092.
- Loughlin SE., Foote SL., Grzanna R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: Morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307-319.
- Louvel D., Delvaux M., Felez A., Fioramonti J., Bueno L., Lazorthes Y., Frexinos J. (1996). Oxytocin increases thresholds of colonic visceral perception in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 39:741-747.
- Luckman S., Hamamura M., Antonijevic I., Dye S., Leng G. (1993). Involvement of cholecystokinin receptor types in pathways controlling oxytocin secretion. *J Pharmacol* 110:378-384.
- Luckman SM., Antonijevic I., Leng G., Dye S., Douglas AJ., Russell JA., Bicknell RJ. (1993). The maintenance of normal parturition in the rat requires neurohypophysial oxytocin. *J Neuroendocrinol* 5:7-12.
- Luckman SM. (1995). Fos expression within regions of the preoptic area, hypothalamus and brainstem during pregnancy and parturition. *Brain Res* 669:115-124.
- Ludwig M. (1998). Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol* 10:881-895.
- Ludwig M., Leng G. (2006). Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat. Rev Neurosci* 7:126-136.
- Luttrell LM., Maudsley S., Bohn LM. (2015). Fulfilling the promise of “biased” G protein-coupled receptor agonism. *Mol Pharmacol* 88:579-588.

M

- Mackiewicz KL., Sarinopoulos I., Cleven KL., Nitschke JB. (2006). The effect of anticipation and the specificity of sex differences for amygdala and hippocampus function in emotional memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14200-14205.
- Makarenko IG., Ugrumov MV., Derer P., Calas A. (2000). Projections from the hypothalamus to the posterior lobe in rats during ontogenesis: 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate tracing study. *J Comp Neurol* 422:327-337.
- Malek A., Blann E., Mattison DR. (1996). Human placental transport of oxytocin. *J Matern Fetal Med* 5:245-255.
- Manaye KF., Lei D-L., Tizabi Y., Dávila-García MI., Mouton PR., Kelly PH. (2005). Selective neuron loss in the paraventricular nucleus of hypothalamus in patients suffering from major depression and bipolar disorder. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:224-229.
- Manning M., Misicka A., Olma A., Bankowski K., Stoev S., Chini B., Durroux T., Mouillac B., Corbani M., Guillon G. (2012). Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol* 24:609-628.
- Mantella RC., Vollmer RR., Li X., Amico JA. (2003). Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. *Endocrinology* 144:2291-2296.
- Maren S., Fanselow MS. (1996). The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16:237-240.
- Maren S. (1999). Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. *J Neurosci* 19:8696-8703.
- Margatho LO., Elias CF., Elias LL., Antunes-Rodrigues J. (2013). Oxytocin in the central amygdaloid nucleus modulates the neuroendocrine responses induced by hypertonic volume expansion in the rat. *J Neuroendocrinol* 25:466-477.
- Marinissen MJ., Gutkind JS. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22:368-376.
- Marlin BJ., Mitre M., D'amour JA., Chao MV., Froemke RC. (2015). Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature* 520:499-504.
- Marlin BJ., Froemke RC. (2017). Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior. *Dev Neurobiol* 77:169-189.
- Martin R., Geis R., Holl R., Schäfer M., Voigt KH. (1983). Co-existence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophyses: Immunoreactive methionine5-enkephalin-, leucine5-enkephalin- and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience* 8:213-227.
- Martínez-Lorenzana G., Guadalupe, Espinosa-López L., Carranza M., Aramburo C., Paz-Tres C., Rojas-Piloni G., and Condés-Lara M. (2008). PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. *Pain* 140:265-273.
- Masri R., Quiton RL., Lucas JM., Murray PD., Thompson SM., Keller A. (2009). Zona incerta: a role in central pain. *J Neurophysiol* 102:181-191.
- Maurel D., Kniazeff J., Mathis G., Trinquet E., Pin JP., Ansanay H. (2004). Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. *Anal Biochem* 329:253-262.

- McCarthy MM. (1995). Estrogen modulation of oxytocin and its relation to behavior. *Adv Exp Med Biol* 395:235-245.
- McCarthy MM., McDonald CH., Brooks PJ., Goldman D. (1996). An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav* 60:1209-1215.
- McCracken JA., Custer EE., Eldering JA., Robinson AG. (1996). The central oxytocin pulse generator: A pacemaker for the ovarian cycle. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56:819-832.
- McEwen BB. (2004). General introduction to vasopressin and oxytocin: structure/metabolism, evolutionary aspects, neural pathway/receptor distribution, and functional aspects relevant to memory processing. *Adv Pharmacol* 50:1-50, 655-708.
- McFarland D. (1985). Animal awareness and emotion. In *Animal behavior. Psychobiology, ethology and evolution*, pp. 520-531. Great Britain: Pitman.
- Scherer KR. (1999). Emotion. Introduction to social psychology. (Eds. Hewstone, M. and Stroebe, W.) Oxford: Blackwell.
- Meddle SL., Bishop VR., Gkoumassi E., van Leeuwen FW., Douglas AJ. (2007). Dynamic changes in oxytocin receptor expression and activation at parturition in the rat brain. *Endocrinology* 148:5095-5104.
- Mednick SA. (1970). Breakdown in individuals at high risk for schizophrenia: Possible predispositional perinatal factors. *Ment Hyg* 54:50-63.
- Meeker RB., Swanson DJ., Greenwood RS., Hayward JN. (1991). Ultrastructural distribution of glutamate immunoreactivity within neurosecretory endings and pituicytes of the rat neurohypophysis. *Brain Res* 564:181-193.
- Meisenberg G., Simmons WH. (1983). Peptides and the blood-brain barrier. *Life science* 32:2611-2623.
- Meister B., Cortes R., Villar MJ., Schalling M., Hokfelt T. (1990). Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260:279-297.
- Mens WB., Witter A., van Wimersma Greidanus TB. (1983). Penetration of neurohypophyseal hormones from plasma into cerebrospinal fluid (CSF): half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF. *Brain Res* 262:143-149.
- Meriam-webster. (2017). <https://www.merriam-webster.com/dictionary/emotion>
- Michaloudi HC., el Majdoubi M., Poulain DA., Papadopoulos GC., Theodosis DT. (1997). The noradrenergic innervation of identified hypothalamic magnocellular somata and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *J Neuroendocrinol* 9:17-23.
- Michellini S., Urbanek M., Dean M., Goldman D. (1995). Polymorphism and genetic mapping of the human oxytocin receptor gene on chromosome 3. *Am J Med Genet* 60:183-187.
- Milad MR., Wright CL., Orr SP., Pitman RK., Quirk GJ., Rauch SL. (2007). Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert. *Biological Psychiatry* 62:446-454.
- Milad MR., Quirk GJ. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol* 63:129-151.
- Millan M., Schmauss C., Millan M., Herz A. (1984). Vasopressin and oxytocin in the rat spinal cord: analysis of their role in the control of nociception. *Brain research* 309:384-388.

- Mitre M., Marlin BJ., Schiavo JK., Morina E., Norden SE., Hackett TA., Aoki CJ., Chao MV, Froemke RC. (2016). A distributed network for social cognition enriched for oxytocin receptors. *J Neurosci* 36:2517-2535.
- Modahl C., Green L., Fein D., Morris M., Waterhouse L., Feinstein C., Levin H. (1998). Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry* 43:270-277.
- Modi ME., Majchrzak MJ., Fonseca KR., Doran A., Osgood S., Vanase-Frawley M., Feyfant E., McInnes H., Darvari R., Buhl DL., Kablaoui NM. (2016). Peripheral administration of a long-acting peptide oxytocin receptor agonist inhibits fear-induced freezing. *J Pharmacol exp ther* 358:164-172.
- Mohr E., Bahnsen U., Kiessling C., Richter, D. (1988). Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Lett* 242:144-148.
- Moore CAC., Milano SK., Benovic, JL. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69:451-482.
- Morin V., Del Castillo JRE., Authier S., Ybarra N., Otis C., Gauvin D., Gutkowska J., Troncy, E. (2008). Evidence for non-linear pharmacokinetics of oxytocin in anesthetized rat. *J Pharm Pharm Sci* 11:12-24.
- Morris JF., Pow DV. (1991). Widespread release of peptides in the central nervous system: quantitation of tannic acid-captured exocytoses. *Anat Rec* 231:437-445.
- Murphy D., Wells S. (2003). In vivo gene transfer studies on the regulation and function of the vasopressin and oxytocin genes. *J Neuroendocrinol* 15:109-125.

N

- Nasanbuyan N., Yoshida M., Takayanagi Y., Inutsuka A., Nishimori K., Yamanaka A., Onaka T. (2018). Oxytocin-oxytocin receptor systems facilitate social defeat posture in male mice. *Endocrinology* 159:763-775.
- Navone F., Di Gioia G. (1988). Microvesicles of secretory nerve endings of the neurohypophysis are biochemically similar to small synaptic vesicles of nerve terminals. *Ann Ist Super Sanita* 24:507-510.
- Neumann ID., Krömer SA., Toschi N., Ebner K. (2000). Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul Pept* 96:31-38.
- Neumann ID. (2002). Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res* 139:147-162.
- Neumann ID., Malouby R., Beiderbeck D., Lukas M., Landgraf R. (2013). Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice. *Psychoneuroendocrinology* 38:1985-1993.
- Nishimori K., Young LJ., Guo Q., Wang Z., Insel TR., Matzuk MM. (1996). Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11699-11704.
- Nomura M., McKenna E., Korach KS., Pfaff DW., Ogawa S. (2002). Estrogen receptor-beta regulates transcript levels for oxytocin and arginine vasopressin in the hypothalamic paraventricular nucleus of male mice. *Brain Res Mol Brain Res* 109:84-94.

- Nomura S., Ito T., Yamamoto E., Sumigama S., Iwase A., Okada M., Shibata K., Ando H., Ino K., Kikkawa F., Mizutani S. (2005). Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1751:19-25.
- Normandin JJ., Murphy AZ. (2011). Somatic genital reflexes in rats with a nod to humans: Anatomy, physiology, and the role of the social neuropeptides. *Horm Behav* 59:656-665.
- O**
- Oakley RH., Laporte SA., Holt JA., Barak LS., Caron MG. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem* 276:19452-19460.
- O'Byrne K.T., Summerlee AJS. (1985). Relaxin suppression of oxytocin release occurs at the neurohypophysis in rat. *J Physiol* 365:49P.
- O'Byrne K.T., Eltringham L., Clarke G., Summerlee AJS. (1986). Effects of porcine relaxin on oxytocin release from the neurohypophysis in the anaesthetized lactating rat. *Journal of Endocrinology* 109:297-393.
- Oettl LL., Ravi N., Schneider M., Scheller MF., Schneider P., Mitre M., da Silva Gouveia M., Froemke RC., Chao MV., Young WS., Meyer-Lindenberg A., Grinevich V., Shusterman R., Kelsch W. (2016). Oxytocin enhances social recognition by modulating cortical control of early olfactory. *Processing. Neuron* 90:609-621.
- Olds J. (1963). Mechanisms of instrumental conditioning. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 24:219+.
- de Oliveira DC., Zuardi AW., Graeff FG., Queiroz RH., Crippa JA. (2012). Anxiolytic-like effect of oxytocin in the simulated public speaking test. *J Psychopharmacol* 26:497-504.
- Olson BR., Drutarosky MD., Chow MS., Hruby VJ., Stricker EM., Verbalis JG. (1991). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12:113-118.
- Onaka T., Luckman SM., Antonijevic I., Palmer JR., Leng, G. (1995a). Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarius to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience* 66:403-412.
- Onaka T., Luckman SM., Guevara-Guzman R., Ueta Y., Kendrick K., Leng G. (1995b). Presynaptic actions of morphine: blockade of cholecystokinin-induced noradrenaline release in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 69-79.
- Onaka T. (2004). Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. *Journal of neuroendocrinology* 16:308-312.
- Onaka T., Takayanagi Y., Yoshida M. (2012). Roles of oxytocin neurones in the control of stress, energy metabolism, and social behaviour. *J Neuroendocrinol* 24:587-598.
- Ortega-Villalobos M., García-Bazán M., Solano-Flores LP., Ninomiya-Alarcón JG., Guevara-Guzmán R., Wayner MJ. (1990). Vagus nerve afferent and efferent innervation of the rat uterus: an electrophysiological and HRP study. *Brain Res Bull* 25:365-371.
- Ossipov MH., Dussor GO., Porreca F. (2010). Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779-3787.

Ozaki Y., Nomura M., Saito J., Luedke CE., Muglia LJ., Matsumoto T., Ogawa S., Ueta Y., Pfaff DW. (2004). Expression of the arginine vasopressin gene in response to salt loading in oxytocin gene knockout mice. *J Neuroendocrinol* 16:39-44.

P

- Pagani JH., Lee HJ., Young WS. (2011). Postweaning, forebrain-specific perturbation of the oxytocin system impairs fear conditioning. *Genes Brain Behav* 10:710-719.
- Palkovits M. (1999). Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front. Neuroendocrinol.* 20:270-295.
- Paloyelis Y., Krahé C., Maltezos S., Williams SC., Howard MA., Fotopoulou A. (2016). The analgesic effect of oxytocin in humans: A double-blind, placebo-controlled cross-over study using laser-evoked potentials. *Journal of neuroendocrinology*
- Pape HC., Jungling K., Seidenbecher T., Lesting J., Reinscheid RK. (2010). Neuropeptide S: a transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. *Neuropharmacology* 58:29-34.
- Paré P., Paixão-Côrtes VR., Tovo-Rodrigues L., Vargas-Pinilla P., Viscardi LH., Salzano FM., Henkes LE., Bortolini MC. (2016). Oxytocin and arginine vasopressin receptor evolution: implications for adaptive novelties in placental mammals. *Genet Mol Biol* 39:646-657.
- Parent AS., Rasier G., Matagne V., Lomniczi A., Lebrethon MC., Gérard A., Ojeda S. Bourguignon JP. (2008). Oxytocin facilitates female sexual maturation through a glia-to-neuron signaling pathway. *Endocrinology* 149:1358-1365.
- Passoni I., Leonzino M., Gigliucci V., Chini B., Busnelli M. (2016a). Carbetocin is a functional selective gq agonist that does not promote oxytocin receptor recycling after inducing β -arrestin-independent internalisation. *J Neuroendocrinol* 28.
- Passoni I., Leonzino M., Gigliucci V., Chini B., Busnelli M. (2016b). Carbetocin is a functional selective gq agonist that does not promote oxytocin receptor recycling after inducing β -arrestin-independent internalisation. *J Neuroendocrinol* 28.
- Patisaul HB., Scordalakes EM., Young LJ., Rissman EF. (2003). Oxytocin, but not oxytocin receptor, is regulated by oestrogen receptor beta in the female mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 15:787-793.
- Pavlov IP. (1927). *Conditioned reflexes: An investigation of the psychological activity of the cerebral cortex.* Oxford University Press, New-York.
- Pearlmutter AF., Soloff MS. (1979). Characterization of the metal ion requirement for oxytocinreceptor interaction in rat mammary gland membranes. *J Biol Chem* 254:3899-3906.
- Pedersen CA., Prange AJ, Jr. (1979). Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6661-6665.
- Pedersen C., Ascher J., Monroe YL., Prange J. (1982). Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science* 216:648-650.
- Pedersen CA., Vadlamudi SV., Boccia ML., Amico JA. (2006). Maternal behavior deficits in nulliparous oxytocin knockout mice. *Genes Brain Behav* 5:274-281.

- Petersson M., Ahlenius S., Wiberg U., Alster P., Uvnas-Moberg, K. (1998). Steroid dependent effects of oxytocin on spontaneous motor activity in female rats. *Brain Res.Bull.* 45:301-305.
- Phaneuf S., Asboth G., Carrasco MP., Europe-Finner GN., Saji F., Kimura T., Harris A., López Bernal A. (1997). The desensitization of oxytocin receptors in human myometrial cells is accompanied by down-regulation of oxytocin receptor messenger RNA. *J Endocrinol* 154:7-18.
- Phillips RG., LeDoux JE. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Pirnik Z., Mravec B., Kiss A. (2004). Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Neurochem Int* 45:597-607.
- Plested CP., Bernal AL. (2001). Desensitisation of the oxytocin receptor and other G-protein coupled receptors in the human myometrium. *Exp Physiol* 86:303-312.
- Plieika V., Heiniger J., Muller-Ihotsky A., Pliska P. (1986). Binding of oxytocin to uterine cells in vitro. 16984-16989.
- van den Pol AN. (2012).neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron* 76:98-115.
- Ponzio TA., Ni Y., Montana V., Parpura V., Hatton GI. (2006). Vesicular glutamate transporter expression in supraoptic neurones suggests a glutamatergic phenotype. *J Neuroendocrinol* 18:253-265.
- Porter DG., Ryan PL., Norman L. (1992). Lack of effect of relaxin on oxytocin output from the porcine neural lobe in vitro or in lactating sows *in vivo*. *J Reprod Fert* 96:251-260.
- Pow DV., Morris JF. (1989). Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience* 32:435-439.
- Prager-Khoutorsky M., Bourque CW. (2015). Mechanical basis of osmosensory transduction in magnocellular neurosecretory neurones of the rat supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol* 27:507-515.
- Preteel S., Piekut DT. (1990). Coexistence of CRF peptide and oxytocin mRNA in the paraventricular nucleus. *Peptides* 11:621-624.
- Price CJ., Pittman QJ. (2001). Dopamine D4 receptor activation inhibits presynaptically glutamatergic neurotransmission in the rat supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 86:1149-1155.
- Puglia M.H., Lillard TS., Morris JP., Connelly JJ. (2015). Epigenetic modification of the oxytocin receptor gene influences the perception of anger and fear in the human brain. *Proc Natl Acad Sci* 112:3308-3313.
- Pumford KM., Russell JA., Leng G. (1993). Effects of the selective kappa-opioid agonist U50,488 upon the electrical activity of supraoptic neurones in morphine-tolerant and morphine-naive rats. *Exp Brain Res* 94:237-246.

R

- Raby WN., Renaud LP. (1989). Dorsomedial medulla stimulation activates rat supraoptic oxytocin and vasopressin neurones through different pathways. *J. Physiol.* 417:279-294.

- Ragnauth AK., Devidze N., Moy V., Finley K., Goodwillie A., Kow LM., Muglia LJ., Pfaff DW. (2005). Female oxytocin gene-knockout mice, in a semi-natural environment, display exaggerated aggressive behavior. *Genes, Brain and Behavior* 4:229-239.
- Randle JC., Day TA., Jhamandas JH., Bourque CW., Renaud LP. (1986). Neuropharmacology of supraoptic nucleus neurons: norepinephrine and gamma-aminobutyric acid receptors. *Fed Proc* 45:2312-2317.
- Ranjbar H., Radahmadi M., Alaei H., Reisi P., Karimi S. (2016). The effect of basolateral amygdala nucleus lesion on memory under acute, mid and chronic stress in male rats. *Turk J Med Sci* 46:1915-1925.
- Ranjbar H., Radahmadi M., Reisi P., Alaei H. (2017). Effects of electrical lesion of basolateral amygdala nucleus on rat anxiety-like behaviour under acute, sub-chronic, and chronic stresses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 44:470-479.
- Rao VV., Löffler C., Battey J., Hansmann, I. (1992). The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 61:271-273.
- Rash JA., Campbell TS. (2014). The effect of intranasal oxytocin administration on acute cold pressor pain: a placebo-controlled, double-blind, within-participants crossover investigation. *Psychosom Med* 76:422-429.
- Reinscheid RK., Xu YL., Okamura N., Zeng J., Chung S., Pai R. Wang Z., Civelli O. (2005). Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide s receptor variants. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1338-1345.
- Renaud LP., Bourque CW. (1991). Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36:131-169.
- Reversi, A., Cassoni, P., and Chini, B. (2005a). Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10:221-229.
- Reversi A., Rimoldi V., Marrocco T., Cassoni P., Bussolati G., Parenti M., Chini, B. (2005b). The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a “biased agonist” mechanism. *J Biol Chem* 280:16311-16318.
- Rhodes CH., Morrell JI., Pfaff DW. (1981). Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. *J Comp Neurol* 198:45-64.
- Richard S., Zingg HH. (1990). The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem* 265:6098-6103.
- Richard P., Moos F., Freund MM. (1991). Central effects of oxytocin. *Physiol Rev* 71:331-370.
- Rigoli F., Ewbank M., Dalgleish T., Calder A. (2016). Threat visibility modulates the defensive brain circuit underlying fear and anxiety. *Neurosci Lett* 612:7-13
- Rimoldi V., Reversi A., Taverna E., Rosa P., Francolini M., Cassoni P., Parenti M., Chini, B. (2003). Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains. *Oncogene* 22:6054-6060.
- Rinaman L., Hoffman GE., Dohanics J., Le WW., Stricker EM., Verbalis JG. (1995). Cholecystokinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol* 360:246-56.

- Rivest S., Rivier C. (1994). Stress and interleukin-1 beta-induced activation of c-fos, NGFI-B and CRF gene expression in the hypothalamic PVN: comparison between Sprague-Dawley, Fisher-344 and Lewis rats. *J Neuroendocrinol* 6:101-117.
- Rosen JB., Schukin J. (1998). From natural fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 105:325-350.
- Ruan M., Russell JA., Brown CH. (2011). Acute morphine administration and withdrawal from chronic morphine increase afterdepolarization amplitude in rat supraoptic nucleus neurons in hypothalamic explants. *Neuropharmacology* 61:789-797.
- Robinson C., Schumann R., Zhang P., Young RC. (2003). Oxytocin-induced desensitization of the oxytocin receptor. *Am J Obstet Gynecol* 188:497-502.
- Rogers RC., Hermann GE. (1985). Dorsal medullary oxytocin, vasopressin, oxytocin antagonist, and TRH effects on gastric acid secretion and heart rate. *Peptides* 6:1143-1148.
- Romanov RA., Zeisel A., Bakker J., Girach F., Hellysaz A., Tomer R., Alpar A., Mulder J., Clotman F., Keimpema E., Hsueh B., Crow AK., Martens H., Schwindling C., Calvigioni D., Bains JS., Mate Z., Szabo G., Yanagawa Y., Zhang MD., Rendeiro A., Farlik M., Uhlen M., Wulff P., Bock C., Broberger C., Deisseroth K., Hokfelt T., Linnarsson S., Horvath TL., Harkany T. (2017). Molecular interrogation of hypothalamic organization reveals distinct dopamine neuronal subtypes. *Nat Neurosci* 20:176-88.
- Romero-Fernandez W., Borroto-Escuela DO., Agnati LF., Fuxe K. (2012). Evidence for the existence of dopamine d2-oxytocin receptor heteromers in the ventral and dorsal striatum with facilitatory receptor-receptor interactions. *Mol Psychiatry* 18:849-850.
- Ross HE., Cole CD., Smith Y., Neumann ID., Landgraf R., Murphy AZ., Young LJ. (2009). Characterization of the oxytocin system regulating affiliative behavior in female prairie voles. *Neuroscience* 162:892-903.
- Rozen F., Russo C., Banville D., Zingg HH. (1995). Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:200-204.
- Ruppert S., Scherer G., Schutz G. (1984). Recent gene conversion involving bovine vasopressin and oxytocin precursor genes suggested by nucleotide sequence. *Nature* 308:554-557.
- Russell JA., Neumann I., Landgraf R. (1992). Oxytocin and vasopressin release in discrete brain areas after naloxone in morphine-tolerant and -dependent anesthetized rats: push-pull perfusion study. *J Neurosci* 12:1024-1032.
- Russell JA., Leng G., Douglas AJ. (2003). The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Front Neuroendocrinol* 24:27-61.
- Russell WMS., Burch RL. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Special edition published by Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.
- Rydén G., Sjöholm J. (1969). Half-life of oxytocin in blood of pregnant and non-pregnant women. *Acta Endocrinol* 61:425-431.

S

- Sah P., Faber ESL., Lopez De Armentia M., Power J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.

- Salehi MS., Khazali H., Mahmoudi F., Janahmadi M. (2017). Oxytocin intranasal administration affects neural networks upstream of GNRH neurons. *J Mol Neurosci* 62:356-362.
- Sato S., Shintani Y., Miyajima N., Yoshimura K. (2002). Japan Patent WO 0231145.
- Saydoff JA., Rittenhouse PA., van de Kar LD., Brownfield MS. (1991). Enhanced serotonergic transmission stimulates oxytocin secretion in conscious male rats. *J Pharmacol Exp Ther* 257:95-99.
- Sausville E., Carney D., Battey, J. (1985). The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J Biol Chem* 260:10236-10241.
- Sawchenko PE., Swanson LW., Steinbusch HW., Verhofstad AA. (1983). The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 277:355-360.
- Schafe GE., Nader K., Blair HT., LeDoux JE. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24:540-546.
- Shamay-Tsoory SG., Fischer M., Dvash J., Harari H., Perach-Bloom N., Levkovitz Y. (2009). Intranasal administration of oxytocin increases envy and schadenfreude (gloating). *Biological Psychiatry* 66:864-870.
- Shamay-Tsoory SG., Young LJ. (2016). Understanding the oxytocin system and its relevance to psychiatry. *Biol Psychiatry* 79:150-152.
- Shor-Posner G., Azar AP., Insinga S., Leibowitz SF. (1985). Deficits in the control of food intake after hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol Behav* 35:883-890.
- Shughrue PJ., Lane MV., Merchenthaler I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.
- Shughrue PJ., Delovade TL., Merchenthaler I. (2002). Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor-?? In *Progress in Brain Research*, pp. 15-29.
- Silverman AJ., Hoffman DL., Zimmerman EA. (1981). The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull* 6:47-61.
- Simmons CF Jr., Clancy TE., Quan R., Knoll JH. (1995). The oxytocin receptor gene (OXTR) localizes to human chromosome 3p25 by fluorescence in situ hybridization and PCR analysis of somatic cell hybrids. *Genomics* 26:623-625.
- Simmons DM., Swanson LW. (2008). High-resolution paraventricular nucleus serial section model constructed within a traditional rat brain atlas. *Neurosci Lett* 438:85-89.
- Sims JS., Lorden JF. (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behav. Brain Res* 22:265-281.
- Skutella T., Weber T., Jirkowski GF. (1993). Coexistence of oxytocin and tyrosine hydroxylase in the rat hypothalamus, an immunocytochemical study. *J Neural Transm Gen Sect* 94:55-61.
- Smith MP., Ayad VJ., Mundell SJ., McArdle C., Kelly E., López Bernal A. (2006). Internalization and desensitization of the oxytocin receptor is inhibited by Dynamin and clathrin mutants in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol* 20:379-388.

- Sofroniew MV., Weind A. (1978). Extrahypothalamic neurophysin-containing perikarya, fiber pathways and fiber clusters in the rat brain. *Endocrinology* 102:334-337.
- Sofroniew MV. (1980). Projections from vasopressin, oxytocin, and neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. *J. Histochem. Cytochem* 28:475-478.
- Sofroniew MV. (1983). Morphology of vasopressin and oxytocin neurones and their central and vascular projections. *Prog. Brain Res* 60:101-114.
- Son SJ., Filosa JA., Potapenko ES., Biancardi VC., Zheng H., Patel KP., Tobin VA., Ludwig M., Stern JE. (2013). Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. *Neuron* 78:1036-1049.
- Sripada CS., Phan KL., Labuschagne I., Welsh R., Nathan PJ., Wood AG. (2012). Oxytocin enhances resting-state connectivity between amygdala and medial frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 30:1-6.
- Stedronsky, K., Telgmann, R., Tillmann, G., Walther, N., and Ivell, R. (2002). The affinity and activity of the multiple hormone response element in the proximal promoter of the human oxytocin gene. *J Neuroendocrinol* 14:472-485.
- Stoop R. (2012). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76:142-159.
- Stoop R. (2014). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin in the central nervous system as a basis for their rapid behavioral effects. *Curr Opin Neurobiol* 29:187-193.
- Stoop R., Hegoburu C., van den Burg E. (2015). New opportunities in vasopressin and oxytocin research: A perspective from the amygdala. *Annu Rev Neurosci* 38:369-388.
- Summerlee AJ., O'Byrne KT., Poterske RS. (1998). Relaxin inhibits the pulsatile release of oxytocin but increases basal concentrations of hormone in lactating rats. *Biol Reprod* 58:977-981.
- Sun N., Cassell MD. (1993). Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol* 330:381-404.
- Svane PC., Thorn NA., Richter D., Mohr E. (1995). Effect of hypoosmolality on the abundance, poly(A) tail length and axonal targeting of arginine vasopressin and oxytocin mRNAs in rat hypothalamic magnocellular neurons. *FEBS Lett* 373:35-38.
- Swaab DF., Nijveldt F., Pool CW. (1975). Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 67:461-462.
- Swaab DF., Hofman MA., Lucassen PJ., Purba JS., Raadsheer FC., Van de Nes JA. (1993). Functional neuroanatomy and neuropathology of the human hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)* 187:317-330.
- Swaab DF., Purba JS., Hofman MA. (1995). 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* 80:573-579.
- Swaab DF. (1995). Development of the human hypothalamus. *Neurochem Res* 20:509-519.
- Swanson LW., Kuypers HG. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194:555-570.
- Swanson LW., Sawchenko PE. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6:269-324.

T

- Takayanagi Y., Kasahara Y., Onaka T., Takahashi N., Kawada T., Nishimori K. (2008). Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity. *Neuroreport* 19:951-955.
- Terrillon S., Durroux T., Mouillac B., Breit A., Ayoub MA., Taulan M., Jockers R., Barberis C., Bouvier M. (2003). Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* 17:677-691.
- Theodosios DT. (2002). Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 23:101-135.
- Theodosios DT., Piet R., Poulain DA., Oliet SH. (2004). Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem Int* 45:491-501.
- Thienel M., Fritsche A., Heinrichs M., Peter A., Ewers M., Lehnert H., Born J., Hallschmid M. (2016). Oxytocin's inhibitory effect on food intake is stronger in obese than normal-weight men. *Int J Obes (Lond)* 40:1707-1714.
- Thorndike E. (1898). Animal intelligence: an experimental study of the associative processes in animals. *Psychological review* 5:551-553.
- Thornton S., Vatish M., Slater D. (2001). Oxytocin antagonists: clinical and scientific considerations. *Exp Physiol* 86:297-302.
- Tippett DC., Godin BR., Oishi K., Oishi K., Davis C., Gomez Y., Trupe LA., Kim EH., Hillis AE. (2018). Impaired recognition of emotional faces after stroke involving right amygdala or insula. *Semin Speech Lang* 39:87-100.
- Tonelli L., Chiaraviglio E. (1995). Dopaminergic neurons in the zona incerta modulates ingestive behavior in rats. *Physiol Behav* 58:725-729.
- Toth I., Neumann ID., Slattery DA. (2012). Central administration of oxytocin receptor ligands affects cued fear extinction in rats and mice in a timepoint-dependent manner. *Psychopharmacology (Berl)* 223:149-158.
- Toth I., Dietz M., Peterlik D., Huber S.E., Fendt M., Neumann ID., Flor PJ., Slattery DA. (2012a). Pharmacological interference with metabotropic glutamate receptor subtype 7 but not subtype 5 differentially affects within- and between-session extinction of Pavlovian conditioned fear. *Neuropharmacology* 62:1619-1626.
- Tovote P., Fadok JP., Lüthi A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16:317-31.
- Tracy LM., Georgiou-Karistianis N., Gibson SJ., Giummarra MJ. (2015). Oxytocin and the modulation of pain experience: Implications for chronic pain management. *Neurosci Biobehav* 55:53-67.
- Tribollet E., Charpak S., Schmidt A., Dubois-Dauphin M., Dreifuss JJ. (1989). Appearance and transient expression of oxytocin receptors in fetal, infant, and peripubertal rat brain studied by autoradiography and electrophysiology. *J Neurosci* 9:1764-1773.
- Tribollet E., Barberis C., Arsenijevic Y. (1997). Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 78:499-509.
- Truitt WA., Coolen LM. (2002). Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 297:1566-1569.

- Tsujimoto M., Hattori A. (2005). The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics* 1751:9-18.
- Tsuruo Y., Ceccatelli S., Villar MJ., Hökfelt T., Visser TJ., Terenius L., Goldstein M., Brown JC., Buchan A., Walsh J. (1988). Coexistence of TRH with other neuroactive substances in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat* 1:235-253.
- The Cambridge declaration on consciousness (2012).
<http://fcmconference.org/img/CambridgeDeclarationOnConsciousness.pdf>

U

- Ueta Y., Kannan H., Higuchi T., Negoro H., Yamashita H. (1993). CCK-8 excites oxytocin-secreting neurons in the paraventricular nucleus in rats--possible involvement of noradrenergic pathway. *Brain Res Bull* 32:453-459.
- Uvnäs-Moberg K., Bruzelius G., Alster P., Bileviciute I., Lundeberg T. (1992). Oxytocin increases and a specific oxytocin antagonist decreases pain threshold in male rats. *Acta Physiol Scand* 144:487-488.
- Uvnäs-Moberg K., Ahlenius S., Hillegaard V., Alster P. (1994). High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 49:101-106.

V

- Vaaga CE., Borisovska M., Westbrook GL. (2014). Dual-transmitter neurons: Functional implications of co-release and co-transmission. *Curr Opin Neurobiol* 29:25-32.
- Vacher CM., Fretier P., Creminon C., Calas A., Hardin-Pouzet H. (2002). Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci* 22:1513-1522.
- Vanderhaeghen JJ., Lotstra F., De Mey, J., Gilles C. (1980). Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1190-1194.
- Vandesande F., Dierickx, K. (1975). Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res* 164:153-162.
- Vargas-Martínez F., Uvnäs-Moberg K., Petersson M., Olausson HA., Jiménez-Estrada I. (2014). Neuropeptides as neuroprotective agents: Oxytocin a forefront developmental player in the mammalian brain. *Prog Neurobiol* 123:37-78.
- Vargas-Pinilla P., Paixão-Côrtes VR., Paré P., Tovo-Rodrigues L., Vieira CM. de A.G., Xavier A., Comas D., Pissinatti A., Sinigaglia M., Rigo MM., Vieira GF., Lucion AB., Salzano FM., Bortolini MC. (2015). Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: coevolution and positive selection footprints. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:88-93.
- Veening JG., de Jong TR., Barendregt HP. (2010). Oxytocin-messages via the cerebrospinal fluid: Behavioral effects; a review. *Physiol Behav* 101:193-210.
- Veening JG., de Jong TR., Waldinger MD., Korte SM., Olivier B. (2015). The role of oxytocin in male and female reproductive behavior. *Eur J Pharmacol* 753:209-228.

- Veinante P., Freund-Mercier MJ. (1997). Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *J Comp Neurol* 383:305-325.
- Veinante P., Yalcin I., Barrot M. (2013). The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *J Mol Psychiatry* 1, 9.
- Venkatesh B., Si-Hoe SL., Murphy D., Brenner S. (1997). Transgenic rats reveal functional conservation of regulatory controls between the Fugu isotocin and rat oxytocin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12462-12466.
- Verbalis JG., McCann MJ., McHale CM., Stricker EM. (1986). Oxytocin secretion in response to cholecystokinin and food: differentiation of nausea from satiety. *Science* 232:1417-1419.
- Verbalis JG., Stricker EM., Robinson AG., Hoffman GE. (1991). Cholecystokinin activates C-fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J Neuroendocrinol* 3:205-213.
- Verbalis JG., Mangione MP., Stricker EM. (1991). Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology* 128:1317-1322.
- Vertes RP., Fortin WJ., Crane AM. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 407:555-582.
- Viero C., Shibuya I., Kitamura N., Verkhatsky A., Fujihara H., Katoh A., Ueta Y., Zingg HH., Chvatal A., Sykova E., Dayanithi G. (2010). Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther* 16:138-156.
- Du Vigneaud V., Ressler C., Trippett S. (1953). The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205:949-957.
- Du Vigneaud V., Ressler C., Swan J.M., Roberts CW., Katsoyannis PG. (1954). The Synthesis of Oxytocin. *J Am Chem Soc* 76:3115-3121.
- Du Vigneaud V. (1956). Trail of sulfur research: from insulin to oxytocin. *Science* (80-). 123:967-974.
- Viviani D., Stoop, R. (2008). Opposite effects of oxytocin and vasopressin on the emotional expression of the fear response. *Prog Brain Res* 170:207-218.
- Viviani D., Charlet A., Van den Burg E., Robinet C., Hurni N., Abatis M., Magara F., Stoop R. (2011). Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science* 333:104-107.
- van Vulpen EH., Yang CR., Nissen R., Renaud LP. (1999). Hypothalamic A14 and A15 catecholamine cells provide the dopaminergic innervation to the supraoptic nucleus in rat: a combined retrograde tracer and immunohistochemical study. *Neuroscience* 93:675-680.

W

- Wagenaar DA., Hamilton MS., Huang T., Kristan WB., French KA. (2010). A hormone-activated central pattern generator for courtship. *Curr Biol* 20:487-495.
- Waldherr M., Neumann ID. (2007). Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16681-16684.

- Wallace KJ., Rosen JB. (2001). Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. *J Neurosci* 21:3619-3627.
- Wallis M. (2012). Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: Comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues. *Gen. Comp. Endocrinol* 179:313-318.
- Wang JW., Lundeberg T., Yu LC. (2003). Antinociceptive role of oxytocin in the nucleus raphe magnus of rats, an involvement of mu-opioid receptor. *Regul Pept* 115:153-159.
- Wang YF., Hatton GI. (2007a). Dominant role of subunits of G-proteins in oxytocin-evoked burst firing. *J Neurosci* 27:1902-1912.
- Wang Z., Moody K., Newman JD., Insel TR. (1997). Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Synapse* 27:14-25.
- Watson JB., Rayner R. (1917). Conditioned emotional reactions. *American journal of psychology* 28:163-174.
- Wathes DC., Swann RW. (1982). Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature* 297:225-227.
- Wathes DC., Swann RW., Pickering BT., Porter DG., Hull MG., Drife JO. (1982). Neurohypophysial hormones in the human ovary. *Lancet (London, England)* 2:410-412.
- Waxham MN. (2014). From molecules to networks (Third edition). An introduction to cellular and molecular neuroscience 285-321.
- Way SA., Leng G. (1992). Relaxin increases the firing rate of supraoptic neurones and increases oxytocin secretion in the rat. *J Endocrinol* 132:149-158.
- Wesley VJ., Hawtin SR., Howard HC., Wheatley M. (2002). Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* 41:5086-5092.
- West WL., Yeomans DC., Proudfit HK. (1993). The function of noradrenergic neurons in mediating antinociception induced by electrical stimulation of the locus coeruleus in two different sources of Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 626:127-135.
- Wilensky AE., Schafe GE., Kristensen MP., Ledoux JE. (2006). Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 26:12387-12396.
- Windle RJ., Shanks N., Lightman SL., Ingram CD. (1997). Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138:2829-2834.
- Wolfe BL., Trejo J. (2007). Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8:462-470.
- Wotjak CT., Landgraf R., Engelmann M. (2008). Listening to neuropeptides by microdialysis: echoes and new sounds? *Pharmacol Biochem Behav* 90:125-134.
- Wrzal PK., Devost D., Pétrin D., Goupil E., Iorio-Morin C., Laporte SA., Zingg HH., Hébert TE. (2012a). Allosteric interactions between the oxytocin receptor and the β 2-adrenergic receptor in the modulation of ERK1/2 activation are mediated by heterodimerization. *Cell Signal* 24:342-350.

Wrzal PK., Goupil E., Laporte SA., Hébert TE., Zingg HH. (2012b). Functional interactions between the oxytocin receptor and the β 2-adrenergic receptor: implications for ERK1/2 activation in human myometrial cells. *Cell Signal* 24:333-341.

X

Xi D., Kusano K., Gainer H. (1999). Quantitative analysis of oxytocin and vasopressin messenger ribonucleic acids in single magnocellular neurons isolated from supraoptic nucleus of rat hypothalamus. *Endocrinology* 140:4677-4682.

Xu YL., Reinscheid RK., Huitron-Resendiz S., Clark SD., Wang Z., Lin SH., Brucher FA., Zeng J., Ly NK., Henriksen SJ., de Lecea L., Civelli O. (2004). Neuropeptide S: A neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 43:487-497.

Xu YL., Gall CM., Jackson VR., Civelli O., Reinscheid RK. (2007). Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 500:84-102.

Y

Yamahara N., Nomura S., Suzuki T., Itakura A., Mitsuaki I., Okamoto T., Tsujimoto M., Nakazato H., Mizutani S. (2000). Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. *Life Sci* 66:1401-1410.

Yamashita H., Inenaga K., Kannan H. (1987). Depolarizing effect of noradrenaline on neurons of the rat supraoptic nucleus in vitro. *Brain Res* 405:348-52.

Yamashita K., Kitano T. (2013). Molecular evolution of the oxytocin-oxytocin receptor system in eutherians. *Mol Phylogenet Evol* 67:520-528.

Yang CR., Bourque CW., Renaud LP. (1991). Dopamine D2 receptor activation depolarizes rat supraoptic neurones in hypothalamic explants. *J Physiol* 443:405-419.

Yang J., Yang Y., Chen JM., Liu WY., Wang CH., Lin BC. (2007a). Central oxytocin enhances antinociception in the rat. *Peptides* 28:1113-1119.

Yang J. (1994). Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine* 19:867-871.

Yang HP., Wang L., Han L., Wang SC. (2013). Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin. *ISRN Neurosci* 179272.

Yoshida M., Takayanagi Y., Inoue K., Kimura T., Young LJ., Onaka T., Nishimori K. (2009). Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 29:2259-2271.

Yoshimura R., Kimura T., Watanabe D., Kiyama H. (1996). Differential expression of oxytocin receptor mRNA in the developing rat brain. *Neurosci Res* 24:291-304.

Young LJ., Wang Z., Donaldson R., Rissman EF. (1998). Estrogen receptor alpha is essential for induction of oxytocin receptor by estrogen. *Neuroreport* 9:933-936.

Young LJ., Wang Z., Insel TR. (1998). Neuroendocrine bases of monogamy. *Trends Neurosci* 21:71-75.

Young LJ., Nilsen R., Waymire KG., MacGregor GR., Insel TR. (1999). Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. *Nature* 400:766-768.

- Young WS., Gainer H. (2003). Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology* 78:185-203.
- Yu SQ., Lundeberg T., Yu LC. (2003). Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Res* 983:13-22.

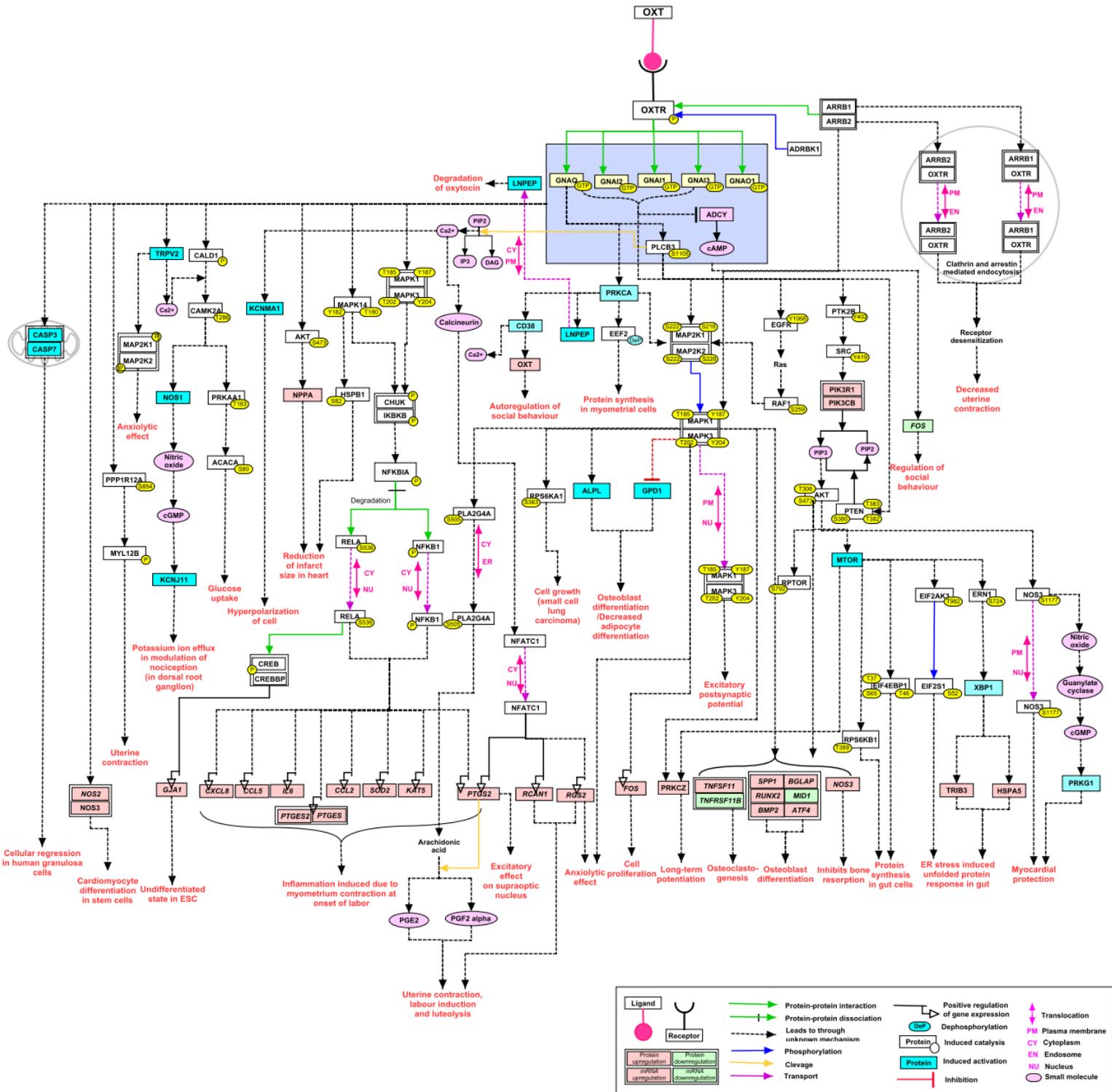
Z

- Zhang X., van den Pol A. (2017). Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356:853-859
- Zhu H., Mingler MK., McBride ML., Murphy AJ., Valenzuela DM., Yancopoulos GD., Williams MT., Vorhees CV., Rothenberg ME. (2010). Abnormal response to stress and impaired NPS-induced hyperlocomotion, anxiolytic effect and corticosterone increase in mice lacking NPSR1. *Psychoneuroendocrinology* 35:1119-1132.
- Zhu L., Onaka T. (2002). Involvement of medullary A2 noradrenergic neurons in the activation of oxytocin neurons after conditioned fear stimuli. *Eur J Neurosci* 16:2186-2198.
- Zik JB., Roberts DL. (2015). The many faces of oxytocin: Implications for psychiatry. *Psychiatry Res* 226:31-37.
- Zingg HH., Lefebvre DL. (1988). Oxytocin and vasopressin gene expression during gestation and lactation. *Brain Res* 464:1-6.
- Zingg HH., Lefebvre DL. (1989). Oxytocin mRNA: increase of polyadenylate tail size during pregnancy and lactation. *Mol Cell Endocrinol* 65:59-62.
- Zingg HH., Grazzini E., Breton C., Larcher A., Rozen F., Russo C., Guillon G., Mouillac B. (1998). Genomic and nongenomic mechanisms of oxytocin receptor regulation. *Adv Exp Med Biol* 449:287-295.
- Zunhammer M., Geis S., Busch V., Greenlee MW., Eichhammer P. (2015). Effects of intranasal oxytocin on thermal pain in healthy men: a randomized functional magnetic resonance imaging study. *Psychosom* 77:156-166.
- Zoicas I., Menon R., Neumann ID. (2016). Neuropeptide S reduces fear and avoidance of conspecifics induced by social fear conditioning and social defeat, respectively. *Neuropharmacology* 108:284-291.

ANNEXES

M. ANNEXES

1. APERÇU DES VOIES DE SIGNALISATION OT/OTR



ANNEXE 1 : Aperçu des voies de signalisation OT-OTR. Cette représentation schématique des différentes réactions induites par l'OT est extraite d'un article publié par Chatterjee et al., 2016. Toutes les références et les informations liées à chaque interaction sont disponibles sur netpat.org, le lien étant le suivant http://www.netpath.org/pathways?path_id=NetPath_169

2. PUBLICATION EN LIEN NON DIRECT AVEC MA THESE

Titre : Favouring inhibitory synaptic drive mediated by GABAA receptors in the basolateral nucleus of the amygdala efficiently reduces pain symptoms in neuropathic mice.

Auteurs : Zeitler A., Kamoun N., **Goyon S.**, Wahis J., Charlet A., Poisbeau P., Darbon P.

Journal : European Journal of Neuroscience (2016).

Favouring inhibitory synaptic drive mediated by GABA_A receptors in the basolateral nucleus of the amygdala efficiently reduces pain symptoms in neuropathic mice

Alexandre Zeitler,¹ Nisrine Kamoun,¹ Stéphanie Goyon,¹ Jérôme Wahis,¹ Alexandre Charlet,^{1,2} Pierrick Poisbeau¹ and Pascal Darbon¹

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR 3212 CNRS, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg Cedex, France

²University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), Strasbourg, France

Keywords: etifoxine, neuronal network, neurosteroid

Edited by Paul Bolam

Received 27 October 2015, revised 16 February 2016, accepted 18 February 2016

Abstract

Pain is an emotion and neuropathic pain symptoms are modulated by supraspinal structures such as the amygdala. The central nucleus of the amygdala is often called the 'nociceptive amygdala', but little is known about the role of the basolateral amygdala. Here, we monitored the mechanical nociceptive thresholds in a mouse model of neuropathic pain and infused modulators of the glutamate/GABAergic transmission in the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) via chronically-implanted cannulas. We found that an *N*-methyl-D-aspartate-type glutamate receptor antagonist (MK-801) exerted a potent antiallodynic effect, whereas a transient allodynia was induced after perfusion of bicuculline, a GABA_A receptor antagonist. Potentiating GABA_A receptor function using diazepam or etifoxine (a non-benzodiazepine anxiolytic) fully but transiently alleviated mechanical allodynia. Interestingly, the antiallodynic effect of etifoxine disappeared in animals that were incapable of producing 3 α -steroids. Diazepam had a similar effect but of shorter duration. As indicated by patch-clamp recordings of BLA neurons, these effects were mediated by a potentiation of GABA_A receptor-mediated synaptic transmission. Together with a presynaptic elevation of miniature inhibitory postsynaptic current frequency, the duration and amplitude of GABA_A miniature inhibitory postsynaptic currents were also increased (postsynaptic effect). The analgesic contribution of endogenous neurosteroid seemed to be exclusively postsynaptic. This study highlights the importance of the BLA and the local inhibitory/excitatory neuronal network activity while setting the mechanical nociceptive threshold. Furthermore, it appears that promoting inhibition in this specific nucleus could fully alleviate pain symptoms. Therefore, the BLA could be a novel interesting target for the development of pharmacological or non-pharmacological therapies.

Introduction

The amygdaloid complex (or amygdala) is composed of a dozen subcortical nuclei within the temporal lobe. It can be subdivided anatomically and functionally into four distinct subregions: superficial, basolateral, central and medial (Veinante *et al.*, 2013). Functionally, it is an important structure of the limbic system providing an emotional value to sensory information and leading to adaptive behavioural responses. In line with our study, the amygdala plays a key role linking pain sensation and emotional responses as demonstrated by anatomical, electrophysiological, pharmacological and behavioural approaches (for review see Neugebauer *et al.*, 2009).

The central nucleus of the amygdala (CeA), often referred to as the 'nociceptive amygdala', serves as the output nucleus for major

amygdala functions and regulates behavioural responses through projections to hypothalamic nuclei and various brainstem areas (Veinante *et al.*, 2013). This nucleus receives nociceptive information from two major pathways. The first pathway is composed of the spino-parabrachio-amygdaloid projections (Gauriau & Bernard, 2002). It provides nociceptive information of different modalities originating from a large number of tissues (e.g. skin, viscera, joints and muscles) and is mostly associated with an increase in the activity of CeA neurons. The second pathway is involved in the processing of polymodal nociceptive information originating from the thalamus and cerebral cortex. This sensory information is initially processed by neuronal circuits in the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) before reaching the CeA, directly or indirectly via a relay in the intercalated cell clusters. Transfer of this information is ensured by a subpopulation of glutamatergic BLA neurons establishing excitatory synapses with the target neurons. In comparison to the direct BLA–CeA projections, which generate excitation, synaptic

Correspondence: Dr Pascal Darbon, as above.

E-mail: pascal.darbon@inci-cnrs.unistra.fr

A.Z. and N.K. contributed equally to this work.

connections to intercalated GABAergic neurons provide an inhibitory interface capable of generating feed-forward inhibition (Royer *et al.*, 1999). Interestingly, lesion of the BLA has been recently proposed to prevent the development of chronic pain states (Li *et al.*, 2013).

The contribution of the BLA to nociceptive processing cannot be restricted to an input provider to the CeA. Its role in the control of analgesic responses has been demonstrated after local infusion of a wide variety of pharmacological substances (Veinante *et al.*, 2013). Injection of morphine into the BLA suppresses formalin-induced conditioned place aversion, at least in part, through inhibition of glutamatergic transmission mediated by *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Deyama *et al.*, 2007). From this study, it is also clear that the place aversion induced by intraplantar formalin is associated with excessive glutamate levels in the BLA. Of particular interest for our present study, stress-induced analgesia has been significantly reduced after bilateral injection into the BLA of the GABA_A receptor agonist, muscimol, or of the positive allosteric modulator, diazepam (DZP) (Helmstetter, 1993; Rea *et al.*, 2011). These experiments and others dealing with the modulation of anxiety strongly indicated that GABAergic inhibitory transmission in the BLA plays a key role in the processing of sensory information including nociception.

In addition to the influence of GABAergic intercalated cell cluster neurons, the coding properties of glutamatergic BLA projection neurons can be placed under the control of local GABAergic interneurons. Although not fully characterized, they account for about 10–15% of the neuronal population and are tentatively classified based on expression of neurochemical markers such as parvalbumin, somatostatin, cholecystokinin, calbindin, calretinin and vasoactive intestinal peptide [see references in Ehrlich *et al.* (2009)]. The majority (50%) are parvalbumin-positive interneurons that establish synaptic contacts on the soma and proximal dendrites of projection neurons. The location of these inhibitory synapses is of course expected to play a critical role for the coding properties of principal BLA neurons (Veres *et al.*, 2014). This may easily explain the anxiolytic efficacy of benzodiazepine (Nagy *et al.*, 1979; Shibata *et al.*, 1982), which may preferentially target BLA sites (Niehoff & Kuhar, 1983; Thomas *et al.*, 1985; Hodges & Green, 1987). Based on these studies, anxiolytic effects have been attributed to the recruitment of $\alpha 2/3$ -containing GABA_A receptors expressed by BLA neurons. It is interesting to note here that intercalated cell cluster neurons express large amounts of extrasynaptic $\alpha 4/\delta$ -containing GABA_A receptors, known to be extremely sensitive to neurosteroids, which contribute greatly to a tonic inhibition of principal BLA neurons (Marowsky & Vogt, 2014).

To date there is still little data demonstrating the influence of inhibitory/excitatory BLA microcircuits on nociceptive processes and pain responses. We therefore used a mouse model of neuropathic pain and intra-BLA injections to manipulate the balance between excitatory and inhibitory controls. Focusing mostly on GABAergic inhibitory controls, we characterized the analgesic action of benzodiazepine and non-benzodiazepine allosteric modulators of GABA_A receptor function after *in vivo* intra-BLA injections. The associated changes in GABAergic synaptic transmission were also studied using patch-clamp recordings of pyramidal neurons of the BLA in brain slices.

Materials and methods

Animals and ethical issues

In the present study, behavioural testing was performed on 8–12-week-old C57Bl6J male mice (20–30 g; Janvier, Le Genest St.

Isle, France), housed under standard conditions (room temperature, 22 °C; 12/12-h light/dark cycle) with *ad libitum* access to food and water. All animals were habituated to the room and to the tests at least 1 week before starting the experiments. For electrophysiological recordings, postnatal day 21–28 C57Bl6J mice of both sexes were used and housed in the same conditions. All procedures were performed in accordance with the recommendations of the directive (2010/63/EU) of the European Parliament and of the Council (September 22, 2010). The project received authorization from the French Department of Agriculture (license number 67-116 to P.P.) and from the regional ethic committee (CREMEAS AL/12/15/03/07).

Surgical procedures

All surgeries were performed under aseptic conditions and with ketamine/xylazine anaesthesia (ketamine, 17 mg/mL, i.p.; xylazine, 2.5 mg/mL, i.p., 4 mL/kg; Centravet, Taden, France).

Cannula implantation and drug infusion

The animals were anaesthetized with intraperitoneal injection of a mixture containing ketamine (75 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg). At the time of surgery, the animals were implanted with two 6-mm 23-gauge stainless-steel guide cannulas (outer diameter, 0.64 mm; inner diameter, 0.32 mm; PlasticsOne, USA). All animals were bilaterally implanted with cannulas targeting the basolateral amygdala (BLA relative to bregma; AP, −1.8 mm; ML, \pm 3.1 mm; DV, −4.2 mm) by stereotaxic instruments according to the mouse brain atlas of Paxinos & Watson (1998). After surgery, animals received Atipamezole (10 mg/kg, i.p.) and Ketofene (5 mg/kg, i.m.), after which they had 7 days recovery before starting the experiments. Prior to drug injection, animals were lightly anaesthetized with isoflurane (2%) and 30-G cannulas (outer diameter, 0.3 mm; inner diameter, 0.15 mm; length, 6 mm; PlasticsOne) were inserted. Drugs (0.5 μ L) were infused over a period of 5 min (0.1 μ L/min) with a syringe pump (CMA 400; CMA Microdialysis, Sweden). The injection needles were left in place for an additional 5 min to allow diffusion. Animals were tested at 15 min after infusion after visual confirmation of full recovery from anaesthesia. After finishing the test sessions, bilateral injections of a 1% Chicago Sky Blue (Sigma) solution were targeted to the BLA (0.5 μ L each side) as described in the Drug Application section below. After 30 min, the animals were anaesthetized with isoflurane (2.5%) and decapitated. Brains were removed, frozen in isopentane (Sigma) and stored at −80 °C. Sectioning (40 μ m) was performed with a cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific, USA). The sites of injections were verified according to the atlas of Paxinos & Watson (1998). Animals with injection sites located outside the BLA regions were not used in the analysis.

Neuropathic pain model

To produce a controlled constriction of the sciatic nerve, we used the cuff model, which has been well characterized previously (Benbouzid *et al.*, 2008). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2-mm-long split section of polyethylene tubing (inner diameter, 0.38 mm; outer diameter, 1.09 mm; PE-20, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (Cuff group). The shaved skin layer was sutured closed. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure as described above but without implantation of the cuff (Sham group).

Measures of mechanical nociception and pain symptoms

The mechanical threshold was measured using von Frey (VF) filaments (Bioseb, Chaville, France) as previously described (Chaplan *et al.*, 1994). Mice were placed in clear Plexiglass boxes (7 × 9 × 7 cm) on an elevated mesh screen, and were allowed to habituate for 15 min before testing. Filaments were applied to the plantar surface of each hindpaw in a series of ascending forces. We approached the filament toward the plantar surface slowly until it slightly bent at contact. At that point the pressure was immediately removed. Each filament was tested five times per paw and the threshold was defined as three or more withdrawals observed among the five consecutive trials. The results were expressed in grams and both hindpaws (ipsilateral allodynic right paw and contralateral control left paw) were tested on cuff and sham animals.

Patch-clamp recordings

Slice preparation and solutions

Coronal slices containing the BLA were prepared from C57Bl6J mice (21–28 days old). Briefly, after ketamine anaesthesia (2.5 mg/100 g, *i.p.*, Centravet), animals were decapitated, and brains were removed quickly and immersed in 4 °C Mg-artificial cerebrospinal fluid containing (in mM): 124 NaCl, 10 MgSO₄, 2.7 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, continuously bubbled with 95% O₂/5% CO₂ leading to pH 7.4. The brain was glued on the slicer platform, and coronal brain slices (325 µm thick) were prepared with a tissue slicer (1200vs, Leica, Germany). Slices were hemisected and incubated for 45 min at 34 °C in artificial cerebrospinal fluid containing (in mM): 124 NaCl, 2.7 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.0 CaCl₂, 26.0 NaHCO₃, bubbled with 95% O₂/5% CO₂. After another hour at room temperature, in artificial cerebrospinal fluid containing 0.5 µM tetrodotoxin (Abcam Biochemicals, UK) and 2 mM kynurenic acid (Sigma-Aldrich) to block sodium voltage-dependent ionic channels and ionotropic glutamatergic receptors, a single slice was transferred to the recording chamber.

Electrophysiological recordings and data acquisition

Whole-cell voltage-clamp recordings were obtained with an amplifier (MultiClamp 700B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Borosilicate glass electrodes ($R = 3\text{--}8\text{ M}\Omega$) with an inner filament (outer diameter, 1.2 mm; inner diameter, 0.69 mm; Harvard Apparatus Ltd, UK) were pulled using a horizontal laser puller (P2000; Sutter Instruments, USA). Pipettes were filled with an intracellular solution containing (in mM): 125 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.2 Na-GTP (pH adjusted to 7.3 with KOH, osmolarity 295 mOsm adjusted with sucrose). Due to the chloride reversal potential of 0 mV and holding potential of –60 mV, inward synaptic currents corresponded to GABA miniature inhibitory postsynaptic currents (IPSCs). Series capacitances and resistances were compensated electronically throughout the experiments using the main amplifier. Recordings were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz and stored with PCLAMP 8.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) before analysis. All recordings were from neurons identified visually as having a large, pyramidal-like soma corresponding to glutamatergic BLA output neurons. Our patch-clamp configuration for miniature IPSCs did not allow us to record action potential firing; therefore, these neurons could not be identified by their accommodating firing pattern (Sah *et al.*, 2003). In a subset of experiments, however, we found that large pyramidal-like cells

indeed displayed accommodated spiking when tetrodotoxin and kynurenic acid were absent from the extracellular medium (data not shown). In addition, biocytine was included in the pipette solution identifying that these pyramidal neurons had axons targeting the CeA (data not shown).

Data analysis

Synaptic currents were detected and analysed using the Strathclyde electrophysiology software packages WINEDR and WINWCP (courtesy of Dr J. Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Detection of each single event was further confirmed by visual inspection. For each synaptic current, the peak amplitude was measured as well as the exponential decay time constant (τ) and the overall inhibitory charge (area under the curve). In some experiments KCl was replaced by K MeSO₄ in patch pipette solution and the excitatory : inhibitory (E : I) ratio was calculated. For each recorded cell, the excitatory charge per time unit measured at E_{Cl} was divided by the inhibitory charge per time unit measured at E_{cation}.

Drug application

We used bicuculline methiodide (10 µM; Sigma-Aldrich) or MK-801 (1 µM; Sigma-Aldrich) as antagonists of GABA_A receptor and NMDA glutamate receptor currents, respectively. They were prepared as 1000 times concentrated solutions in water. DZP (Roche, France) was dissolved in absolute ethanol at a final concentration of 10 µM (final ethanol concentration < 0.1%). Etifoxine (EFX) (2-ethylamino-6-chloro-4-methyl-4-phenyl-4H-3,1-benzoxazine hydrochloride) (Stresam™, Biocodex, Gentilly, France) was prepared in dimethylsulphoxide (Sigma-Aldrich) and injected at a final concentration of 60 µM (final concentration of dimethylsulphoxide < 0.1%). Drugs were either infused (0.5 µL) in the basolateral nuclei *in vivo* or bath-applied at the same concentration on amygdala slices *in vitro*. Finasteride (FIN) [1,(5 α)-androst-4-ene-3-one-17 β -(N-tert-butyl-carboxamide)] (Steraloids, Newport, RI, USA) solubilized in ethanol and diluted in olive oil was used to inhibit 5 α -reductase activity. It was subcutaneously injected (100 µL, 25 mg/kg) three times every 2 days.

Statistics

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed with Prism software (GRAPHPAD) using multifactor ANOVA or *t*-test. The Tukey *posthoc* test and Bonferroni comparisons were used when appropriate for multiple comparisons in the behavioural as well as the electrophysiological experiments. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Results

The influence of inhibitory and excitatory controls in the BLA was characterized in a mouse model of mono-neuropathy resulting from a chronic constriction of the sciatic nerve. As shown in Fig. 1A, the surgery aimed at installing a polyethylene cuff around the main branch of the right sciatic nerve triggered a significant ipsilateral (right paw) reduction in the VF threshold as a measure of mechanical nociceptive thresholds (repeated-measures two-way ANOVA, time \times paw side, $F_{51,561} = 4.406$, $P < 0.0001$). Compared with the value before surgery (4.75 ± 0.55 g, $n = 12$), the threshold was strongly reduced to 0.62 ± 0.04 g ($n = 12$, Tukey, $P < 0.0001$) after 7 days and remained significantly lower for > 70 days (Fig. 1A). During this period, the VF values of the ipsilateral paw

were significantly different for every time-point from the respective mean values of the contralateral paw and of both paws of sham-operated mice. This result is fully in agreement with the presence of a mechanical allodynia resulting from the 'cuff' compression of the right sciatic nerve.

Excitation/inhibition balance control of nociception and pain in the basolateral nucleus of the amygdala in mice

Using mice preimplanted with BLA cannulas and bilateral injections, the effects of drugs modulating the balance between fast excitation and inhibition were analysed at 2 weeks after the cuff surgery. As shown above, VF thresholds measured at 2 weeks after surgery were significantly different (repeated-measures two-way ANOVA, time, $F_{5,90} = 21.9$, $P < 0.0001$; Bonferroni, $P < 0.0001$) between intact left and cuffed right paws. As early as 15 min after

BLA injection of the NMDA receptor antagonist MK-801 (1 μM , Fig. 1B), the VF threshold increased significantly from 1.36 ± 0.04 to 4.62 ± 0.31 g ($n = 10$; Tukey, $P < 0.001$) and also remained not significantly different from the intact contralateral paw after 30 min (Bonferroni, $P = 0.073$). This strong analgesic effect was transient and thresholds returned to basal (neuropathic) levels at 60 min after the BLA infusion (1.16 ± 0.07 g, $n = 10$; compared with before injection: Tukey, $P = 0.9$). We next used bicuculline to inhibit GABA_A receptor-mediated inhibition in the BLA (Fig. 1C). If bicuculline (10 μM) had no significant effect on the allodynic right paw (from 1.47 ± 0.12 to 1.20 ± 0.06 g after 15 min, $n = 12$; Bonferroni, $P = 0.99$), it induced a rapid decrease in the mean VF threshold of the left (intact) hindpaw (from 4.33 ± 0.22 to 1.07 ± 0.04 g after 15 min, $n = 12$; repeated-measures two-way ANOVA, time \times paw side, $F_{5,45} = 25.21$, $P < 0.001$; Tukey, $P < 0.0001$). These low VF thresholds were not different from the cuffed paw at 15 and 30 min after bicuculline injection (Bonferroni, $P = 0.95$). Note that the effects of MK-801 and bicuculline were short-lasting (< 1 h) but particularly efficient at producing analgesia or allodynia, respectively. This effect seemed specific as vehicle injections were ineffective at modulating VF thresholds in all cases ($n = 10$ for MK-801 and $n = 12$ for bicuculline).

Analgesia mediated by the potentiation of inhibition in basolateral nucleus of the amygdala microcircuits

As the function of BLA microcircuits also relies on the activity of GABAergic interneurons, we next evaluated the consequences of injecting GABA_A receptor-positive modulators on mechanical nociception and allodynia. We first used the classical benzodiazepine DZP (Fig. 2A, left graph). The injection of DZP at 1 μM (final volume 0.5 μL) was associated with a rapid and significant increase in the mean VF threshold for the left and right hindpaws (repeated-measures two-way ANOVA, time \times paw side, $F_{5,55} = 17.97$, $P < 0.0001$). This increase was modest but statistically significant in the case of the left hindpaw as the maximal antinociceptive effect was reached at 30 min after injection of DZP when the VF mean threshold reached 6.33 ± 0.22 g (compared with before injection: 4.67 ± 0.28 g, $n = 12$; Tukey, $P < 0.0001$). The DZP analgesic effect was more pronounced for the ipsilateral (allodynic) paw (from 1.33 ± 0.04 to 5.33 ± 0.38 g, 30 min after DZP, $n = 12$; Tukey, $P < 0.001$). VF threshold changes followed a similar time-course in both paws. The DZP-induced analgesic effect was still present at 1 h after the injection and thresholds were back to their respective basal values after 2 h. We also used the recently described non-benzodiazepine compound EFX (Fig. 2B, left graph), which potentiates GABA_A receptor function after binding to a site distinct from the benzodiazepines. Injected at a concentration of 60 μM , we found that it significantly increased the VF threshold of the allodynic paw (repeated-measures two-way ANOVA, time \times paw side, $F_{5,45} = 10.08$, $P < 0.0001$) but was without apparent effect on the left paw (from 4.80 ± 0.33 to 5.20 ± 0.33 g, 2 h after EFX, $n = 10$; Tukey, $P = 0.99$). The mean VF thresholds of the right hindpaw were increased from 1.28 ± 0.06 g to a maximal value of 4.40 ± 0.40 g ($n = 10$; Tukey, $P < 0.0001$) at 2 h after EFX bilateral injection. No statistical differences could be found between the two paws of the cuffed EFX-treated mice at 60 and 120 min. It should be noted here that the antiallodynic effect was much slower to establish, compared with DZP, but was also transient as thresholds were back to their original level at 4 h after the injection.

Apart from a direct allosteric modulation of GABA_A receptor function, DZP and EFX are also known to bind to mitochondrial

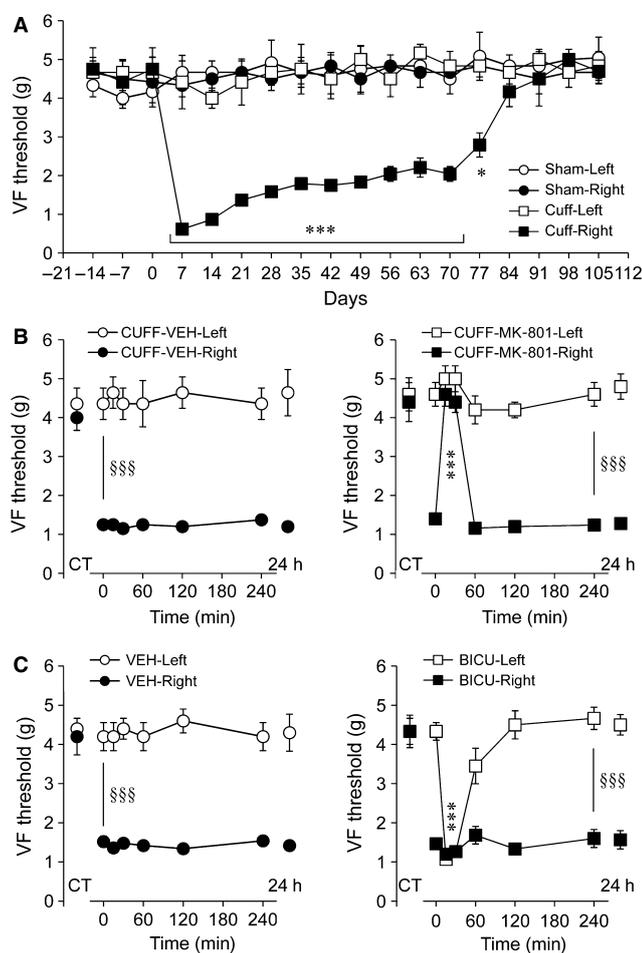


FIG. 1. Changes in mechanical nociceptive thresholds measured with VF filaments in mice that were sham-operated (Sham) (A) or with a chronic compression of the right sciatic nerve (Cuff) (A–C). Values are shown for left and right hindpaws. (A) Time-course of VF threshold before and after surgery (day 0) for both hindpaws in sham and cuffed mice. Note that mechanical allodynia developed rapidly for the right hindpaw of cuffed mice and persisted for about 3 months. (B and C) Changes in VF thresholds in neuropathic mice after a bilateral BLA injection at time 0 of the vehicle (VEH) solutions (left graphs): 1 μM MK-801 (B, right graph) or 10 μM bicuculline (BICU) (C, right graph). VF thresholds are also given in control (CT) (i.e. before cuff surgery). Tukey (*compared with paw value at time 0) and Bonferroni (§ for a time-point between paws) multiple comparisons are indicated: ***,§§§ $P < 0.001$, * $P < 0.05$.

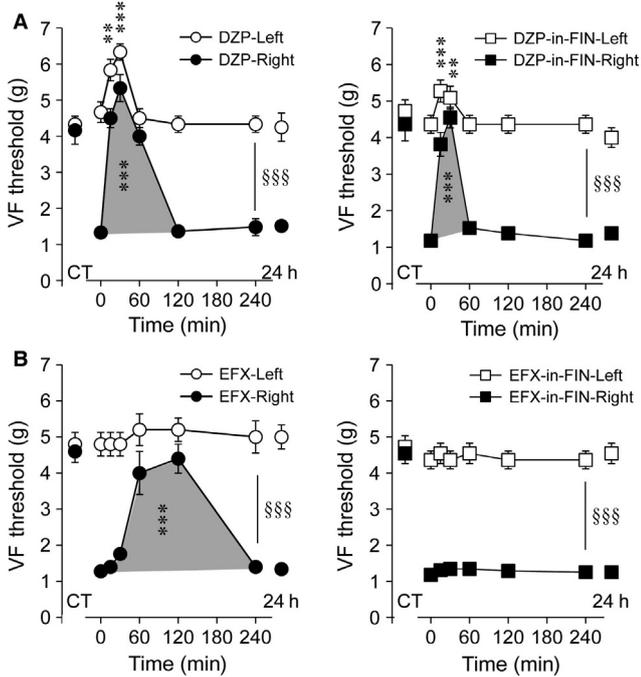


FIG. 2. Effects of BLA bilateral injections of DZP (1 μ M) (A) and EFX (60 μ M) (B) at time 0 on VF thresholds. The graphs on the right were obtained in FIN-treated animals. In all cases, VF thresholds are also given in control (CT) (i.e. before cuff surgery). Tukey (*compared with paw value at time 0) and Bonferroni (§ for a time-point between paws) multiple comparisons are indicated: ***,§§§ $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

translocator protein (TSPO). In several brain structures, this action has been shown to promote the intracellular synthesis of allopregnanolone-like compounds (neurosteroids), which are the most potent endogenous modulators of GABA_A receptor function (Poisbeau *et al.*, 2014). To verify this hypothesis, the synthesis of allopregnanolone-like compounds was inhibited by treating the mice with three subcutaneous injections of FIN every 2 days before BLA infusions (see Materials and methods). As illustrated in Fig. 2 (right graphs), DZP analgesia persisted in FIN-treated mice (repeated-measures two-way ANOVA, time \times paw side, $F_{5,50} = 18.51$, $P < 0.0001$), whereas EFX action was fully prevented (repeated-measures two-way ANOVA, $F_{5,50} = 0.20$, $P = 0.99$). As the DZP analgesic effect was shorter (< 1 h) in FIN-treated mice, this result suggests that part of the transient analgesic effect was also controlled by endogenous neurosteroid. In the case of EFX and at this concentration, the endogenous production of allopregnanolone-like compounds was necessary to observe the antiallodynic effect.

Modulation of inhibitory synaptic controls by etifoxine in basolateral nucleus of the amygdala neurons in mice

To go one step further, the effect of these modulators was more directly characterized by using patch recording of BLA pyramidal neurons and analysis of GABA_A receptor-mediated synaptic currents (GABA_A receptor IPSCs) (Fig. 3). As expected, DZP applied at 1 μ M on BLA neurons potentiated the apparent affinity of GABA_A receptors. This was clearly seen by a prolongation of the decaying time constant (from 16.84 ± 2.17 to 30.62 ± 3.82 ms, $n = 6$; Student's t -test, $t = 6.21$, $df = 5$, $P = 0.0016$). If no significant change could be seen for the mean amplitude (from 15.54 ± 3.27 to 22.39 ± 4.31 pA, $n = 6$; Student's t -test, $t = 1.77$, $df = 5$,

$P = 0.13$), a clear increase was observed for the frequency of occurrence (from 2.78 ± 0.32 to 5.21 ± 0.88 ms, $n = 6$; Student's t -test, $t = 3.65$, $df = 5$, $P = 0.015$). In the case of EFX, potentiation was associated with an increase in the mean frequency of occurrence of spontaneously-occurring GABA_A IPSCs and of their amplitude and duration (see Fig. 3 and Table 1). This corresponded to an overall increase in the inhibitory charge (e.g. increase of both amplitude and duration) carried by individual GABA_A IPSCs from 222.6 ± 20.6 to 334.9 ± 26.7 pA.ms ($n = 17$; one-way ANOVA, $F_{3,32} = 6.344$, Tukey, $P = 0.037$). When applied to BLA slices and within the time-course of a patch-clamp recording (about 1 h), we failed to see a proper washout of EFX. However, similar experiments performed on slices collected from FIN-treated mice revealed that the EFX increase of IPSC inhibitory charge was absent (Table 1). This was not the case for the transient increase in IPSC frequency, which persisted in the FIN condition.

To investigate, *in vitro*, the consequences of EFX on BLA network activity, we calculated the E : I ratio in control condition ($n = 13$) or in the presence of BIC ($n = 4$), EFX ($n = 6$) or MK-801 ($n = 6$) in 23 cells. In control conditions, excitation was more important than inhibition, and the mean E : I ratio was 2.62 (ranging from 0.99 to 6.71). Bicuculline fully suppressed inhibition. EFX, as well as MK-801, reversed the ratio, but in different ways (mean EFX E : I ratio, 0.26 ranging from 0.025 to 0.48; mean MK-801 E : I ratio, 0.31 ranging from 0.054 to 0.64). EFX increased the inhibitory charge by 66.51%, whereas the excitatory charge decreased (-605.72%) due to the large overall network inhibition. For its part, MK-801, as expected, decreased the excitatory charge (-89.71%) but also reduced the inhibitory charge (-15.93%) to lead to a net imbalance in favour of inhibition.

Discussion

The BLA is the initial site of sensory convergence and integration in the amygdala. Indeed, infusion in the BLA of mu opioid receptor agonist decreases thermal nociceptive sensitivity (Helmstetter *et al.*, 1995; McGaraughty & Heinricher, 2002). Moreover, the BLA controls stress-induced and fear-induced analgesia, which are both reduced by intra-BLA infusions of the GABA_A receptor agonist muscimol (Rea *et al.*, 2011) or by the allosteric modulator DZP

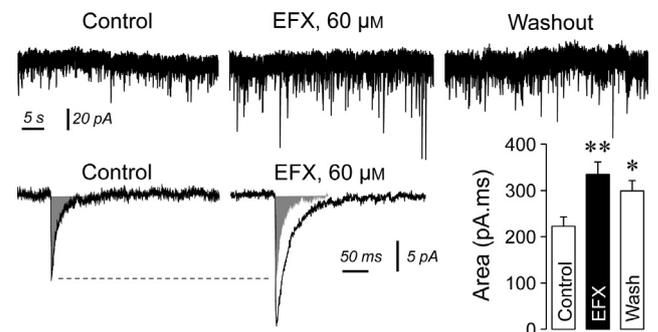


FIG. 3. Properties of GABA_A receptor-mediated IPSCs recorded in BLA neurons in amygdala slices from 21–28-day-old mice using the whole-cell patch-clamp technique. As illustrated with the raw traces, bath application of EFX increased the frequency of occurrence of IPSCs and their amplitudes (see also Table 1). Histogram gives the mean inhibitory charge carried by the GABA_A receptor IPSCs (area) in control, EFX and after washout of the drug. Note that, during the course of the recording (maximum recording time of 40 min), increase in inhibitory charge was hardly reversible after EFX bath application. Statistical significance with Tukey *posthoc* test: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

TABLE 1. Changes in miniature GABA_AR-mediated IPSCs after application of EFX (60 μM) in the absence (top three lines) and presence (bottom three lines) of the 5α-reductase inhibitor finasteride (FIN, 10 μM)

Conditions	Freq. (Hz)	Area (pA.ms)	Amp. (−pA)	Decay (ms)	N
Control	3.2 ± 0.5	222.6 ± 20.6	13.6 ± 1.2	17.3 ± 1.3	17
EFX (60 μM)	5.4 ± 0.8***	334.9 ± 26.7**	18.3 ± 1.3**	21.0 ± 1.2*	17
Washout	3.9 ± 0.5	299.0 ± 22.6*	15.1 ± 1.3	21.3 ± 2.0*	13
Control in FIN	2.8 ± 0.8	192.3 ± 27.8	15.3 ± 2.9	17.8 ± 1.2	8
EFX (60 μM) in FIN	5.6 ± 1.0*	209.9 ± 33.5	14.5 ± 2.7	17.6 ± 1.2	8
Washout in FIN	2.5 ± 0.6	206.8 ± 31.8	16.6 ± 2.3	17.7 ± 1.6	7

Mean frequency of occurrence (Freq.), inhibitory charge carried by IPSCs (Area), absolute current amplitude (Amp.) and half decay time are given for the IPSCs in the two different conditions. Data in bold were found to be statistically different at *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$ with the Tukey *posthoc* test after one-way ANOVA. Statistical analysis was performed on BLA neurons submitted to at least 10 min of EFX washout (i.e. 13 out of 17 in control; 7 out of 8 in finasteride). In finasteride condition (FIN), note that only changes in frequency persisted during the application of EFX.

(Helmstetter, 1993). Based on this experimental evidence, it can be concluded that GABAergic inhibition in the BLA controls nociceptive responses as well as analgesia induced by fear or stress. Among many possibilities, BLA inhibition is likely to affect CeA neuronal activity, which has been shown to modulate pain behaviour through projections to descending pain control centres in the brainstem (Neugebauer *et al.*, 2009) and to control pain modulation systems (Helmstetter *et al.*, 1998). To fully understand the involvement of BLA inhibition in pain modulation, we also have to take into account the excitatory/inhibitory balance regulating BLA network excitability and therefore its impact on the activity of downstream structures. To date, no studies have shown any modulation of excitation in the BLA in pain conditions or in stress-induced or fear-induced analgesia. However, it has been shown that infusion of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the BLA reduced anxiety (for review, see Bergink *et al.*, 2004), demonstrating that modulation of excitation in the BLA can influence behaviour. Accordingly our results show that altering the BLA excitatory/inhibitory balance either alleviates neuropathic pain symptoms or induces pain. Indeed, a direct blockade of NMDA receptor suppressed mechanical allodynia, whereas a blockade of GABAergic inhibition produced allodynia in the healthy paw.

Based on these results and focusing on GABAergic transmission, we have explored the consequences of an increase of this neurotransmission on neuropathic-induced allodynia. Previously, it has been shown that BLA infusion of DZP attenuated stress-induced analgesia (Helmstetter, 1993) or produced antinociceptive effects (Jimenez-Velazquez *et al.*, 2010). Our results confirmed that DZP alleviates mechanical allodynia and produces analgesia in both neuropathic and healthy paws. In addition, we used another allosteric modulator of GABA_A receptor (i.e. EFX, a non-benzodiazepine anxiolytic), which has a different pharmacological profile and binding sites that are distinct from those of benzodiazepines (Hamon *et al.*, 2003). A single infusion of EFX produced a longer-lasting alleviation of neuropathic pain symptoms without effect on the healthy paw. As shown previously in a model of neuropathic pain, this effect is likely to be contributed by the action of EFX on neurosteroidogenesis through its action on the mitochondrial translocator protein TSPO (Poisbeau *et al.*, 2014). Indeed, blockade of a key enzyme in the production of neurosteroid by FIN fully suppresses the antiallodynic action of EFX. A similar mechanism has already been proposed by our group (Zell *et al.*, 2014, 2015) to explain analgesia produced by high plasma corticosterone levels through the modulation of spinal GABAergic inhibition. We may then conclude that EFX, by increasing mitochondrial cholesterol entry, increases the synthesis of neurosteroids that are, in turn, potent positive modu-

lators of GABAergic synaptic transmission (Poisbeau *et al.*, 1997) resulting in an increased inhibition within the BLA neuronal network.

To dissect the action of EFX further, we recorded GABAergic synaptic transmission on BLA output neurons and compared the effect of the well-characterized benzodiazepine DZP with that of EFX. DZP prolonged the decay time constant and increased the amplitude and frequency of IPSCs. The increase in IPSC duration and amplitude are mostly contributed by postsynaptic mechanisms (Vicini *et al.*, 1986), whereas the frequency increase generally results from a presynaptic mechanism as demonstrated for glycine receptors in rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons (Jeong *et al.*, 2003). Presynaptic GABA_A receptors have previously been identified in the BLA where they produced excitation (Woodruff *et al.*, 2006). Indeed, depolarization of the presynaptic terminal is expected to increase synaptic release and neuronal excitability, especially if the neurotransmitter is excitatory (Pugh & Jahr, 2011; Dellal *et al.*, 2012). In comparison with DZP, the effects of EFX are likely to be similar, as seen by the increase in frequency, amplitude and duration of synaptic currents. Our results show that the latter two depend greatly on EFX-induced neurosteroidogenesis, whereas the presynaptic increase of synaptic current frequency is not affected by FIN. Accordingly, at the network level, the cellular effect of EFX on synaptic transmission impacts network excitability. Indeed, EFX increases network inhibition, which in turn drastically reduces network excitation leading to a change of network excitatory/inhibitory balance and a decrease in network excitability.

Altogether, this overall increase of GABAergic inhibition impacts CeA neuronal activity. However, the nature of the impact on CeA neuronal activity is difficult to predict. There are many pathways between the BLA and CeA, either direct from glutamatergic output BLA neurons or through a relay in the intercalated mass (Veinante *et al.*, 2013). In the former case, the working hypothesis will predict that a decrease in BLA excitatory drive will cause a smaller activation of the GABAergic CeA neuronal network. In the latter case, a decrease of the excitatory drive on inhibitory intercalated cells will reduce their feed-forward inhibition on CeA neurons. To add layers of complexity, it has also been shown that feed-forward inhibition is itself controlled by inhibition coming from neighbouring intercalated cells (Royer *et al.*, 1999, 2000) and that some specific intercalated cells may respond to noxious stimuli and project back on BLA interneurons (Bienvenu *et al.*, 2015). Therefore, a large amount of work remains to be done in order to fully dissect the BLA–CeA microcircuits. However, our *in vivo* experiments clearly demonstrate that stimulating endogenous GABAergic inhibition in the BLA with DZP or EFX alleviates allodynia in neuropathic mice. This analgesic

action is mediated by a direct and indirect (i.e. neurosteroid-based) potentiation of GABA_A receptor function at presynaptic and postsynaptic sites.

Conflict of interest

P.P. received financial support from Biocodex to establish its molecular mechanisms of action. The other authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Strasbourg, Région Alsace supported the project (A.Z. and N.K.) FP7 Career Integration grant 334455, Initiative of Excellence (IDEX) Attractiveness grant 2013-15 and University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) fellowship 2014-15 (A.C.). We thank the Biocodex laboratories (Gentilly, France) and, especially, Dr Marc Verleye for kindly providing us with EFX. Dominique Ciocca (Chronobiotron, UMS 3415) for helping us to set up cannula implantation and Tando Maduna for English proofreading and editing.

Abbreviations

BLA, basolateral nucleus of the amygdala; CeA, central nucleus of the amygdala; DZP, diazepam; E : I, excitatory : inhibitory; EFX, etifoxine; FIN, finasteride; ISPC, inhibitory postsynaptic current; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; VF, von Frey.

References

- Benbouzid, M., Pallage, V., Rajalu, M., Waltisperger, E., Doridot, S., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. (2008) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur. J. Pain*, **12**, 591–599.
- Bergink, V., van Megen, H.J.G.M. & Westenberg, H.G.M. (2004) Glutamate and anxiety. *Eur. Neuropsychopharm.*, **14**, 175–183.
- Bienvenu, T.C.M., Busti, D., Micklem, B.R., Mansouri, M., Magill, P.J., Ferraguti, F. & Capogna, M. (2015) Large intercalated neurons of amygdala relay noxious sensory information. *J. Neurosci.*, **35**, 2044–2057.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M. & Yaksh, T.L. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Meth.*, **53**, 55–63.
- Dellal, S.S., Luo, R. & Otis, T.S. (2012) GABA(A) receptors increase excitability and conduction velocity of cerebellar parallel fiber axons. *J. Neurophysiol.*, **107**, 2958–2970.
- Deyama, S., Yamamoto, J., Machida, T., Tanimoto, S., Nakagawa, T., Kaneko, S., Satoh, M. & Minami, M. (2007) Inhibition of glutamatergic transmission by morphine in the basolateral amygdaloid nucleus reduces pain-induced aversion. *Neurosci. Res.*, **59**, 199–204.
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciochi, S., Herry, C. & Luthi, A. (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, **62**, 757–771.
- Gauriau, C. & Bernard, J.F. (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.*, **87**, 251–258.
- Hamon, A., Morel, A., Hue, B., Verleye, M. & Gillardin, J.M. (2003) The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA(A) receptors are mediated by the beta subunit. *Neuropharmacology*, **45**, 293–303.
- Helmstetter, F.J. (1993) Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **44**, 433–438.
- Helmstetter, F.J., Bellgowan, P.S.F. & Poore, L.H. (1995) Microinfusion of mu-opioid but not delta-opioid or kappa-opioid agonists into the basolateral amygdala results in inhibition of the tail-flick reflex in pentobarbital-anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 381–388.
- Helmstetter, F.J., Tershner, S.A., Poore, L.H. & Bellgowan, P.S.F. (1998) Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Res.*, **779**, 104–118.
- Hodges, H. & Green, S. (1987) Are the effects of benzodiazepines on discrimination and punishment dissociable? *Physiol. Behav.*, **41**, 257–264.
- Jeong, H.J., Jang, I.S., Moorhouse, A.J. & Akaike, N. (2003) Activation of presynaptic glycine receptors facilitates glycine release from presynaptic terminals synapsing onto rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons. *J. Physiol.*, **550**, 373–383.
- Jimenez-Velazquez, G., Lopez-Munoz, F.J. & Fernandez-Guasti, A. (2010) Parallel anxiolytic-like and antinociceptive actions of diazepam in the anterior basolateral amygdala and dorsal periaqueductal gray. *Brain Res.*, **1349**, 11–20.
- Li, Z., Wang, J., Chen, L., Zhang, M. & Wan, Y. (2013) Basolateral amygdala lesion inhibits the development of pain chronicity in neuropathic pain rats. *PLoS One*, **8**, e70921.
- Marowsky, A. & Vogt, K.E. (2014) Delta-subunit-containing GABA(A)-receptors mediate tonic inhibition in paracapsular cells of the mouse amygdala. *Front. Neural. Circuits.*, **8**, 27.
- McGaraughty, S. & Heinricher, M.M. (2002) Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. *Pain*, **96**, 153–162.
- Nagy, J., Zambo, K. & Decsi, L. (1979) Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid application in the rat. *Neuropharmacology*, **18**, 573–576.
- Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S. & Mackey, S.C. (2009) Forebrain pain mechanisms. *Brain Res. Rev.*, **60**, 226–242.
- Niehoff, D.L. & Kuhar, M.J. (1983) Benzodiazepine receptors: localization in rat amygdala. *J. Neurosci.*, **3**, 2091–2097.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th Edn. Academic Press, San Diego, CA.
- Poisbeau, P., Feltz, P. & Schlichter, R. (1997) Modulation of GABA(A) receptor-mediated IPSCs by neuroactive steroids in a rat hypothalamo-hypophyseal coculture model. *J. Physiol.*, **500**, 475–485.
- Poisbeau, P., Keller, A.F., Aouad, M., Kamoun, N., Groyer, G. & Schumacher, M. (2014) Analgesic strategies aimed at stimulating the endogenous production of allopregnanolone. *Front Cell Neurosci.*, **8**, 174.
- Pugh, J.R. & Jahr, C.E. (2011) Axonal GABA(A) receptors increase cerebellar granule cell excitability and synaptic activity. *J. Neurosci.*, **31**, 565–574.
- Rea, K., Roche, M. & Finn, D.P. (2011) Modulation of conditioned fear, fear-conditioned analgesia, and brain regional c-Fos expression following administration of muscimol into the rat basolateral amygdala. *J. Pain*, **12**, 712–721.
- Royer, S., Martina, M. & Pare, D. (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J. Neurosci.*, **19**, 10575–10583.
- Royer, S., Martina, M. & Pare, D. (2000) Polarized synaptic interactions between intercalated neurons of the amygdala. *J. Neurophysiol.*, **83**, 3509–3518.
- Sah, P., Faber, E.S.L., De Armentia, M.L. & Power, J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.*, **83**, 803–834.
- Shibata, K., Kataoka, Y., Gomita, Y. & Ueki, S. (1982) Localization of the site of the anticonflict action of benzodiazepines in the amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res.*, **234**, 442–446.
- Thomas, S.R., Lewis, M.E. & Iversen, S.D. (1985) Correlation of [3H]diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdaloid complex of the rat. *Brain Res.*, **342**, 85–90.
- Veinante, P., Yalcin, I. & Barrot, M. (2013) The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *J. Mol. Psychiatry*, **1**, 9.
- Veres, J.M., Nagy, G.A., Vereczki, V.K., Andrasi, T. & Hajos, N. (2014) Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.*, **34**, 16194–16206.
- Vicini, S., Alho, H., Costa, E., Mienville, J.M., Santi, M.R. & Vaccarino, F.M. (1986) Modulation of gamma-aminobutyric acid-mediated inhibitory synaptic currents in dissociated cortical cell-cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9269–9273.
- Woodruff, A.R., Monyer, H. & Sah, P. (2006) GABAergic excitation in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.*, **26**, 11881–11887.
- Zell, V., Hanesch, U., Poisbeau, P., Anton, F. & Darbon, P. (2014) Plasma glucocorticoids differentially modulate phasic and tonic GABA inhibition during early postnatal development in rat spinal lamina II. *Neurosci. Lett.*, **578**, 39–43.
- Zell, V., Juif, P.E., Hanesch, U., Poisbeau, P., Anton, F. & Darbon, P. (2015) Corticosterone analgesia is mediated by the spinal production of neuroactive metabolites that enhance GABAergic inhibitory transmission on dorsal horn rat neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **41**, 390–397.

3. PUBLICATION EN LIEN NON DIRECT AVEC MA THESE

Titre : **Oxytocin acts on astrocytes in the central amygdala to promote comfort.**

Auteurs : Wahis J., Kerspern D., Althammer M, **Goyon S.**, Hagiwara D., Boury-Jamot B., Bellanger B., Abatis M., da Silva Gouveia M., Benusiglio D., Eliava M., Rozov A., Weinsanto I., Knobloch-Bollmann HS., Wang H., Pertin M., Inquimbert P., Siemens J., Goumon Y., Boutrel B., Lamy CM., Décosterd I., Chatton JY., Stoop R., Poisbeau P., Grinevich V., Charlet A.

Journal : Cell, en révision.

Circuits neuronaux sous-tendant la régulation émotionnelle par le système ocytocinergique

Résumé

L'ocytocine (OT) est un neuropeptide synthétisé au sein de l'hypothalamus. On sait aujourd'hui que l'OT est fortement impliquée dans la modulation de nombreux comportements et émotions. Pourtant, il reste encore difficile d'expliquer comment s'organise le système ocytocinergique, par exemple en sous-ensembles spécifiques. De même, les circuits neuronaux impliqués dans leur recrutement restent obscures, tout comme leur potentielle plasticité. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, je me suis attachée à mieux comprendre ces différents points. Les résultats obtenus ont montré que *i*) un sous-ensemble spécifique de neurones OT est recruté par la peur ; *ii*) le système OT fait preuve d'une grande plasticité après une exposition à un contexte effrayant ; *iii*) le neuropeptide S est capable de recruter une sous-population de neurones OT afin d'exercer une action anxiolytique ; *iv*) les neurotransmetteurs monoaminergiques sont eux-mêmes capables de recruter différents sous-ensembles de neurones OT. En conclusion, mon travail a mis en évidence la plasticité de ce système peptidergique et différentes manières de recruter de manière spécifiques certains sous-ensembles existants de neurones OT.

Mots-clés : ocytocine, neuropeptide S, dopamine, hypothalamus, amygdale, zona incerta, électrophysiologie, conditionnement de peur.

Summary

Oxytocin (OT) is a peptide synthesized within the hypothalamus. We now know that OT is strongly involved in the modulation of many behaviors and emotions. However, it is still difficult to explain how the oxytocinergic system is organized, for example in specific sub-populations. Similarly, the neuronal circuits involved in their recruitment remain obscure, like their potential plasticity. That is why, during my thesis, I tried to better understand these different points. The results obtained showed that *i*) a specific sub-population of OT neurons is recruited by fear; *ii*) the OT system exhibits great plasticity after exposure to a scary context; *iii*) the neuropeptide S is able to recruit an OT neuron sub-population in order to exert an anxiolytic effect; *iv*) monoaminergic neurotransmitters are themselves able to recruit different sub-populations of OT neurons. In conclusion, my work has highlighted the plasticity of this peptidergic system and different ways to recruit in a specific manner some existing sub-populations of OT neurons.

Key-words: oxytocin, neuropeptide S, dopamine, hypothalamus, amygdala, zona incerta, electrophysiology, fear conditioning.