



HAL
open science

Bases neuro-développementales de la susceptibilité à l'anxiété: apports de l'étude du système habénulo-interpédonculaire

Malalaniaina Rakotobé

► **To cite this version:**

Malalaniaina Rakotobé. Bases neuro-développementales de la susceptibilité à l'anxiété: apports de l'étude du système habénulo-interpédonculaire. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT: 2021COAZ6002 . tel-03234587

HAL Id: tel-03234587

<https://theses.hal.science/tel-03234587v1>

Submitted on 25 May 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Bases neuro-développementales de la susceptibilité à l'anxiété : apports de l'étude du système habénulo- interpédonculaire

Malalaniaina RAKOTOBE

Equipe Neuro-développement, Institut de Biologie Valrose

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en**

Sciences de la vie et de la santé
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Thomas LAMONERIE

Co-encadrée par : Fabien D'AUTRÉAUX

Soutenue le : 20 Janvier 2021

Devant le jury, composé de :

Michèle STUDER, Directeur de recherche INSERM, IBV, Nice

Thomas LAMONERIE, Professeur, IBV, Nice

Fabien D'AUTRÉAUX, Maître de conférences, IBV, Nice

François TRONCHE, Directeur de recherche CNRS, IBPS, Paris

Françoise MUSCATELLI, Directeur de recherche CNRS,

INMED, Marseille

Isabelle CAILLÉ, Maître de conférences HDR, IBPS, Paris

Bases neuro-développementales de la susceptibilité à l'anxiété : apports de l'étude du système habénulo- interpédonculaire

Président du jury

Michèle STUDER, Directeur de recherche INSERM, IBV, Nice

Rapporteurs

François TRONCHE, Directeur de recherche CNRS, IBPS, Paris

Françoise MUSCATELLI, Directeur de recherche CNRS, INMED, Marseille

Examineur

Isabelle CAILLÉ, Maître de conférences HDR, IBPS, Paris

Directeur de thèse

Thomas LAMONERIE, Professeur, IBV, Nice

Co-Directeur de thèse

Fabien D'AUTRÉAUX, Maître de conférences, IBV, Nice

Résumé

Les circuits de récompense du cerveau sont des réseaux neuronaux qui modulent positivement ou négativement la motivation à agir. Ils sont essentiels à la survie en sélectionnant les comportements adaptés à la situation, comme fuir les dangers ou rechercher de la nourriture. Leurs dysfonctionnements peuvent entraîner des troubles de l'humeur et des addictions. Bien que ces troubles psychiatriques se manifestent chez l'adulte, selon l'hypothèse neuro-développementale ils peuvent avoir une origine plus précoce. En effet, il existe des périodes particulières du développement appelées périodes critiques, durant lesquelles les facteurs génétiques et environnementaux influencent la maturation des circuits neuronaux. Un environnement stressant et/ou un défaut d'expression de gènes développementaux durant ces périodes, peuvent conduire à la malformation de ces circuits neuronaux, dont le système de récompense, et ainsi créer une prédisposition à des maladies psychiatriques. Le système habénulo-interpédonculaire (HIPS), constitué de l'habénula médiane (MHb) et de sa principale cible, le noyau interpédonculaire (IPN), émerge comme un composant clé de ce système de récompense. Il est impliqué dans des pathologies comme l'addiction, l'anxiété et la dépression. Notre équipe a récemment montré que le facteur de transcription *Otx2* est essentiel pour la formation du HIPS. Son expression est maintenue dans le HIPS tout au long de la vie, fortement dans les derniers neurones générés dans la MHb (neurones *Otx2*^{High}) et dans les sous-noyaux latéraux et le sous-noyau central de l'IPN caudal, suggérant qu'il pourrait aussi jouer un rôle dans la maturation et le fonctionnement du HIPS. Dans l'aire tegmentale ventrale (VTA), un autre acteur du système de récompense, un stress chronique subi pendant l'enfance diminue le niveau d'expression d'*Otx2* et prédispose à la dépression et à l'anxiété. *Otx2* pourrait jouer un rôle similaire dans la réponse du HIPS au stress pendant des périodes critiques du développement. Ce travail de thèse vise à mieux comprendre comment des facteurs génétiques et environnementaux affectant le développement du HIPS peuvent conduire à l'apparition de troubles psychiatriques.

La première partie de la thèse montre que les neurones *Otx2*^{High} de la MHb projettent sur les neurones *Otx2*⁺ de l'IPN, révélant l'existence d'un sous-circuit *Otx2* dépendant dans le HIPS. L'activation chémo-génétique de la MHb à l'aide d'un DREADD a confirmé que les neurones *Otx2*^{High} de la MHb sont capables de moduler l'activité des neurones *Otx2*⁺ de l'IPN et démontre qu'ils forment un sous-circuit au sein du HIPS, marqué par l'expression d'*Otx2* et dénommé HIPOPS (Habenu-InterPeduncular-*Otx2*-Positive-System).

Dans la deuxième partie de ce projet, la période critique du développement du HIPS sensible au stress a été recherchée. L'utilisation des marqueurs d'activation neuronale Fos et *Egr1* a permis d'identifier une période préadolescente durant laquelle le HIPS est plus réactif à un stress chronique. De manière intéressante, ce stress chronique engage particulièrement l'activité du HIPOPS, soulignant l'implication de ce sous-circuit dans la réponse au stress.

Dans la troisième partie, un modèle de stress chronique « à deux coups » a été développé, et révèle que ce stress chronique subi durant la préadolescence prédispose à l'anxiété mais pas à la dépression à long-terme.

Dans une dernière partie, les effets d'une délétion conditionnelle d'*Otx2* dans le HIPS sur ces comportements ont été étudiés. Cette étude a permis de montrer que la délétion d'*Otx2* dans la MHb protège des effets délétères du stress chronique préadolescente sur l'anxiété. Ce travail démontre donc que l'interaction entre environnement (le stress) et gènes (*Otx2*) à la préadolescence détermine la susceptibilité à développer une anxiété chronique à long-terme et qu'un des supports cellulaires de cette susceptibilité est le HIPOPS, un circuit logé au cœur du HIPS, identifié par l'expression d'*Otx2*.

Mots clés : stress chronique, *Otx2*, système habénulo-interpédonculaire, neuro-développement, système de récompense, anxiété

Summary

Reward circuits of the brain are neuronal networks that modulate positively or negatively the motivation to act according to the situation. They are essential for the survival of the subject and of species by selecting the appropriate behaviors, such as fleeing the danger or searching for food. Dysfunctions of these circuits can lead to mood disorders and addictions. Although these psychiatric disorders can emerge in adulthood, according to the neurodevelopmental hypothesis they can find their origins at a much earlier stage. Indeed, there are periods of development, called critical periods of development, during which genetic and environmental factors influence the maturation of neuronal circuits. A stressful environment and/or defaults in the expression of developmental genes during these critical periods can lead to the malformation of neuronal circuits, including the reward circuits, creating a predisposition to psychiatric disorders. The habenulo-interpeduncular system (HIPS), composed of the medial habenula (MHb) and its main target, the interpeduncular nucleus (IPN), emerges as a key component of the reward circuits. It is notably involved in disorders such as addiction, anxiety and depression. Our team has recently identified the *Otx2* transcription factor as an essential genetic factor for the formation of the MHb and IPN. *Otx2* expression is maintained in the HIPS throughout life, strongly in the last neurons generated in the MHb (*Otx2*^{High} neurons) and in neurons of the lateral and central subnucleus of the caudal IPN, suggesting that it might also play a role in the maturation and functioning of the HIPS. We already know that in the ventral tegmental area (VTA), another actor of the reward circuits, a chronic stress, endured during a specific period of childhood decreases the expression level of *Otx2* and predisposes to depression and anxiety. It is thus possible that *Otx2* might play a similar function in the HIPS response to stress during periods of development. This thesis work aimed to better understand how genetic and environmental factors affecting the development of the HIPS could lead to the development of psychiatric disorders.

The first part of this thesis shows that *Otx2*^{High} neurons of the MHb project on the *Otx2*⁺ neurons of the IPN, revealing an *Otx2*-dependant sub-circuit in the HIPS. The MHb was then chemogenetically activated with the use of DREADD to verify that *Otx2*^{High} neurons of the MHb are indeed able to modulate the activity of the *Otx2*⁺ neurons of the IPN and confirmed the idea that these neurons constitute a sub-circuit of the HIPS, labelled with the expression of *Otx2*, that we will call the HIPOPS (Habenulo-InterPeduncular-*Otx2*-Positive-System).

In the second part of this project, a critical period of development during which the HIPS is more sensitive to stress has been searched. By using *Fos* and *Egr1*, two neuronal markers of activity, we identified a preadolescent period during which the HIPS is more responsive to chronic stress. Interestingly, that chronic stress involves more particularly the activity of the HIPOPS, emphasizing the implication of that sub-circuit in the stress response.

In the third part, a “2-hit” stress protocol of chronic stress has been developed and revealed that a chronic stress endured during preadolescence predisposes to anxiety but not to depression in the long-term.

In the last part, the effects of *Otx2* conditional deletion in the HIPS has been assessed. This study shows that *Otx2* deletion in the MHb protects from the deleterious effects of preadolescent chronic stress on anxiety symptoms.

This work, therefore, demonstrates that the interaction between environment (stress) and genes (*Otx2*) during preadolescence determines the susceptibility to develop chronic anxiety in the long term and that one of the cellular support of that susceptibility is the HIPOPS, a circuit lodged inside the HIPS, recognizable by *Otx2* expression.

Keywords: Chronic stress, *Otx2*, habenulo-interpeduncular system, neurodevelopment, reward circuit, anxiety

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Thomas Lamonerie et Fabien D'Autréaux qui ont encadré ma thèse. Je les remercie de m'avoir accueilli et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet formidable. Je remercie Fabien pour ses encouragements, son aide précieuse et son enthousiasme qui m'ont poussé à me dépasser et m'ont permis de ne rien lâcher malgré tous les aléas rencontrés pendant cette thèse. Sa passion, son dévouement pour ce projet, nos échanges ainsi que ses enseignements m'ont inspiré et m'ont beaucoup apporté scientifiquement. Je le remercie également de m'avoir offert la chance de réaliser une partie de ce projet à l'Institut de Neurosciences de l'Université de Princeton, une opportunité professionnelle incroyable, même si mon séjour a été écourté par la crise sanitaire. Je garde de très bons souvenirs aussi bien dans le cadre du travail qu'à l'extérieur avec son sens certain de la fête. Je remercie également Thomas pour sa disponibilité, ses conseils et sa bienveillance. Je n'ai pas su en profiter assez mais son enthousiasme scientifique et ses nombreuses connaissances suscitent mon admiration. Je les remercie énormément tous les deux pour leur encadrement et leur soutien, sans lesquels je n'y serais pas arrivée, surtout durant l'écriture de cette thèse où ils ont fait preuve d'une grande patience à mon égard.

Je remercie ensuite le docteur Michèle Studer d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que le docteur François Tronche, le docteur Françoise Muscatelli et le docteur Isabelle Caillé, rapporteurs et examinateurs, d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également tous mes collègues de l'équipe Lamonerie, anciens et actuels qui ont rendu cette expérience d'autant plus agréable. Je remercie Nuria pour son accompagnement et son enseignement quand je suis arrivée dans l'équipe et grâce à qui ce projet a pu démarrer, Joffrey mon acolyte de bouffes gratuites avec qui j'ai bien rigolé durant les soirées jeux de société, Pasquale avec qui j'ai eu bien des discussions devant une bière à la brasserie Borriglione. Je remercie également Annabelle pour l'aide précieuse qu'elle a fourni au labo et qui nous a grandement facilité la tâche, pour sa gentillesse, son écoute et sa bienveillance, Nathalie pour ne pas avoir cessé de me motiver et pour son côté énergique qui donne envie de garder la pêche et un grand merci à Salsabiel qui est devenue une véritable amie et qui a été là durant les coups durs. Merci pour ton grand soutien moral pendant le confinement. Je remercie aussi les nouveaux arrivants Niels et Aurélie à qui je souhaite de réussir brillamment leur thèse.

Je remercie aussi tous les membres du 7^{ième} étage qui ont su mettre une bonne ambiance à l'étage et qui ont su égayer mes journées. Je remercie Bénédicte, Vishnu et Matthieu avec qui j'ai partagé des expériences mémorables dont notre petit séjour à Amstersam, Akshay pour nos longues conversations tard le soir à l'étage mais aussi tous les membres des équipes Braendle, Fürthauer et Lepage.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe Studer avec qui nous avons partagé des idées durant les labs meetings. Je remercie particulièrement Maria-Anna qui a été d'un soutien moral sans faille et Torsten qui a su me faire profiter un peu de l'été en dehors du travail. J'ai adoré nos balades à vélo et me goinfrer de barres chocolatées russes.

Je remercie également Chacha et Valentin de vrais amours, avec qui j'ai partagé bien des fous rires. Je garderai un très bon souvenir de toutes nos soirées délirantes dans le Vieux Nice. Je me sens chanceuse de les avoir rencontrés avant la fin de cette thèse.

J'ai également une pensée pour Brybry, avec qui j'ai partagé toutes mes galères depuis la licence et Mirana qui aura toujours qui a toujours été là pour moi depuis que je suis en France et qui a su me motiver. Merci pour tous ces muffins qui m'ont réconforté.

Enfin, je remercie mes parents qui ont fait tant de sacrifices pour nous envoyer en France et nous permettre de faire de bonnes études. Je n'en serai jamais arrivé là sans eux et je les remercie pour leur soutien inconditionnel.

Table des matières

Table des figures.....	1
Liste des abréviations.....	3
Introduction	6
I. Le système de récompense.....	10
I.1. Evolution et rôles du système de récompense.....	12
I.1.1. Le système de récompense de la lamproie	12
I.1.2. Le système de récompense des amphibiens	16
I.1.3. Le système de récompense des mammifères	18
I.2. Pathologies associées au système de récompense.....	20
I.2.1. L'addiction.....	20
I.2.2. L'anxiété.....	22
I.2.3. La dépression.....	25
I.3. Le système habénulo-interpédonculaire : un composant clé du système de récompense	27
I.3.1. Rôle du HIPS dans l'addiction	27
I.3.2. Rôle du HIPS dans l'anxiété.....	30
I.3.3. Rôle du HIPS dans la dépression.....	31
I.3.4. Caractéristiques du HIPS.....	32
I.3.4.1. L'habénula médiane (MHb).....	32
I.3.4.2. Le noyau interpédonculaire (IPN).....	38
II. Neuro-développement et plasticité	48
II.1. L'hypothèse neuro-développementale.....	48
II.1.1. Les facteurs génétiques.....	48
II.1.1.1. Gènes impliqués dans l'addiction	49
II.1.1.2. Gènes impliqués dans l'anxiété	49
II.1.1.3. Gènes impliqués dans la dépression	50

II.1.2.	Les facteurs environnementaux	50
II.1.2.1.	Les différents types de stress	51
II.1.2.2.	Dimorphisme sexuel	56
II.1.2.3.	Susceptibilité vs résilience.....	57
II.2.	Périodes critiques du développement	58
II.2.1.	Neuro-développement précoce : périodes concernées et mécanismes impliqués	58
II.2.2.	Neuro-développement tardif : périodes concernées et mécanismes impliqués	61
II.2.2.1.	Périodes critiques connues et acteurs moléculaires impliqués	61
II.2.2.2.	Mécanismes des changements architecturaux	66
III.	Le facteur de transcription <i>Otx2</i>	68
III.1.	<i>Otx2</i> un gène évolutivement très conservé.....	68
III.2.	Caractéristiques moléculaires d' <i>Otx2</i>	70
III.3.	Fonctions clés d' <i>Otx2</i> dans le développement du système nerveux	72
III.4.	Fonctions du gène <i>Otx2</i> dans le développement du HIPS.....	73
III.4.1.	Fonction du gène <i>Otx2</i> dans le développement de la MHb.....	73
III.4.2.	Fonction développementale d' <i>Otx2</i> dans l'IPN	74
III.5.	Fonctions post-natales d' <i>Otx2</i>	76
III.5.1.	Régions d'expression post-natale d' <i>Otx2</i>	76
III.5.2.	<i>Otx2</i> et plasticité neuronale	80
III.5.3.	Les gènes régulés par <i>Otx2</i> identifiés aux stades postnataux.....	81
	Objectifs	83
	Matériel et méthodes.....	85
I.	Les animaux	86
II.	Microinjection du DREADD viral	86
III.	Protocole de stress	87
IV.	Ingestion de sucrose	87

V.	Tests comportementaux.....	87
a.	Test du champ ouvert	88
b.	Test du labyrinthe en croix surélevé	89
c.	Test de curiosité	90
d.	Test de la nage forcée.....	91
VI.	Immunohistochimie et analyses histologiques.....	91
VII.	Microscopie	93
VIII.	Analyses statistiques.....	93
IX.	Schémas.....	93
	Résultats.....	94
I.	Le HIPOPS est un circuit interconnecté au sein du HIPS	95
I.1.	Les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb projettent sur les neurones $Otx2^{+}$ du cIPN 95	
I.2.	Les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb modulent l'activité des neurones $Otx2^{+}$ du cIPN 112	
II.	Le HIPS présente une période critique de développement post-natale	114
II.1.	Le HIPS présente une période de forte sensibilité au stress chronique	114
III.	Un stress chronique durant la période critique de développement du HIPS crée une susceptibilité aux maladies psychiatriques à long-terme	118
III.1.	Un seul stress chronique imposé durant la période critique n'induit pas d'effets comportementaux	120
III.2.	Le stress adulte précipite les symptômes psychiatriques chez les souris ayant subi un premier stress à l'adolescence	122
III.3.	Une délétion permanente post-natale d' $Otx2$ dans la dMHb seule n'a pas d'effets sur le comportement	123
III.3.1.	La lignée transgénique $Ngn1Cre$ est un outil spécifique pour induire une délétion d' $Otx2$ dans la MHb.....	123
III.3.2.	La délétion d' $Otx2$ seule ne modifie pas les niveaux basaux d'anxiété et de dépression 128	

III.3.3. Une délétion permanente post-natale d'Otx2 dans la MHb protège de l'apparition de symptômes psychiatriques.....	128
III.3.4. La délétion d'Otx2 dans les neurones Otx2 ^{High} de la dMHb conduit à une réponse bimodale de l'IPN en réponse à un stress chronique préadolescent.....	132
Discussion.....	136
1. Otx2 marque un sous-circuit spécifique du HIPS appelé le HIPOPS.....	139
2. Le HIPOPS pourrait être impliqué dans différentes fonctions du HIPS .	141
3. Egr1 et Fos sont de bons indicateurs de la réponse du HIPOPS au stress	144
4. La préadolescence, est une période de susceptibilité à l'anxiété mettant en jeu le HIPOPS	145
5. La préadolescence représenterait une période de transition de l'activité neuronale associée à l'apparition des PNN dans le HIPOPS.....	148
6. La délétion d'Otx2 dans la MHb protège des effets délétères du stress pré-adolescent	152
7. La délétion d'Otx2 dans la MHb accélère le recrutement de la dMHb....	154
Annexe.....	157
Bibliographie	184

Table des figures

FIGURE 1. ROLE DU SYSTEME DE RECOMPENSE DANS LE CONTROLE DES COMPORTEMENTS.	9
FIGURE 2. DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX CHEZ LES VERTEBRES.....	11
FIGURE 3. STRUCTURES MOTRICES CHEZ LES CYCLOSTOMES ET LES POISSONS.	11
FIGURE 4. VUE D'ENSEMBLE SIMPLIFIEE DES CONNEXIONS AFFERENTES ET EFFERENTES DE L'HABENULA DE LA LAMPROIE (A), D'UN AMPHIBIEN (B) ET D'UN MAMMIFERE (C).	13
FIGURE 5. L'ORGANISATION DES GANGLIONS DE LA BASE EST CONSERVEE CHEZ TOUS LES VERTEBRES – DE LA LAMPROIE AUX PRIMATES.....	15
FIGURE 6. SCHEMA MONTRANT LA CONNECTIVITE DU SYSTEME AMYGDALO-HIPPOCAMPAL SUR LE MESENCEPHALE PAR LE COMPLEXE HABENULAIRE.	17
FIGURE 7. SCHEMA SIMPLIFIE DU SYSTEME DE RECOMPENSE IMPLIQUE DANS L'ADDICTION.....	21
FIGURE 8. SCHEMA SIMPLIFIE DU SYSTEME DE RECOMPENSE IMPLIQUE DANS L'ANXIETE.....	23
FIGURE 9. SCHEMA SIMPLIFIE DES PROJECTIONS TS-vmHb-IPN ET BAC-dMhB-IPN.	29
FIGURE 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE SECTION SAGITALE DE RAT A E14 MONTRANT LE PRIMORDIUM HABENULAIRE (EN ROUGE), LES AXONES EN DEVELOPPEMENT (FASCICULUS RETROFLEXUS REPRESENTE PAR LA FLECHE ROUGE).....	33
FIGURE 11. ORGANISATION SOUS-NUCLEAIRE DE LA MHb ET PROFIL D'EXPRESSION GENIQUE CHEZ LE RAT.	33
FIGURE 12. DIAGRAMME REPRESENTANT LA CASCADE DE SIGNALISATION POSSIBLE SOUS-JACENTE DES RECEPTEURS PRE-SYNAPTIQUES GABA-B DE LA vmHb.	35
FIGURE 13. REPARTITION DES NEUROTRANSMETTEURS DANS LES PARTIES ANTERIEURE ET POSTERIEURE DE L'IPN REPRESENTE EN COUPE CORONALE.	39
FIGURE 14. REPRESENTATION DE L'ORIGINE DES SOUS-POPULATION DE L'IPN AU SEIN DE L'ISTHME ET DU RHOMBOMERE R1 ET DE LEUR DESTINATION FINALE DANS L'IPN.....	39
FIGURE 15. AFFERENCES DE LA MHb SUR L'IPN.	41
FIGURE 16. PRINCIPALES AFFERENCES ET EFFERENCES DU HIPS.	41
FIGURE 17. HYPOTHESE NEURO-DEVELOPPEMENTALE.	47
FIGURE 18. TYPES DE STRESS.....	53
FIGURE 19. MODELE HYPOTHETIQUE ILLUSTRANT L'IMPACT D'UN STRESS IMMUNITAIRE PRENATAL DURANT LA GESTATION.	59
FIGURE 20. MECANISMES MOLECULAIRES CONTROLANT LA PERIODE CRITIQUE.	63
FIGURE 21. MECANISMES DES CHANGEMENTS ARCHITECTURAUX QUI SOUS-TENDENT LES PERIODES CRITIQUES.....	65
FIGURE 22. STRUCTURE ET DOMAINES CONSERVES DES PROTEINES OTX CHEZ LES METAZOAIRES.	69
FIGURE 23. ORGANISATION ET EXPRESSION DU LOCUS Otx2 CHEZ LA SOURIS.....	71
FIGURE 24. DYNAMIQUE D'EXPRESSION DU GENE Otx2 AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA SOURIS.	71
FIGURE 25. EFFETS DE LA DELETION CONDITIONNELLE D'Otx2 DANS LA MHb.....	75
FIGURE 26. EFFETS DE LA DELETION D'Otx2 DANS L'IPN.....	75

FIGURE 27. FONCTIONS POST-NATALES D'OTX2.	77
FIGURE 28. BOUCLE DE RETROACTION OTX2-PNN POUR LA PLASTICITE DE LA PERIODE CRITIQUE.	79
FIGURE 29. SCHEMA ILLUSTRANT L'ASPECT ET LA DELIMITATION DES REGIONS DANS LE CHAMP OUVERT... 88	
FIGURE 30. SCHEMA ILLUSTRANT LE LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE ET SES DEUX BRAS OUVERTS ET DEUX BRAS FERMES.	89
FIGURE 31. SCHEMA ILLUSTRANT LE PRINCIPE DU TEST DE CURIOSITE.	90
FIGURE 32. ILLUSTRATION DE TEST DE LA NAGE FORCEE.	91
FIGURE 33. EFFETS DE L'ACTIVATION CHEMO-GENETIQUE DES NEURONES OTX2^{HIGH} DE LA MHB.	111
FIGURE 34. SPECIFICITE DE L'ACTIVATION CHEMO-GENETIQUE DES NEURONES OTX2^{HIGH} DE LA MHB.	113
FIGURE 35. ACTIVITE NEURONALE DE LA MHB EN REPONSE A UN STRESS CHRONIQUE SUBI A DIFFERENTES PERIODES POST-NATALES.	115
FIGURE 36. ACTIVITE NEURONALE DE L'IPN EN REPONSE A UN STRESS SUBI A DIFFERENTES PERIODES POST-NATALES.	117
FIGURE 37. SIGNATURE MOLECULAIRE DES NEURONES OTX2⁺ DES SOUS-NOYAUX LATERAUX DE L'IPN CAUDAL	119
FIGURE 38. EFFETS DU STRESS ADOLESCENT SUR LES NIVEAUX D'ANXIETE ET DE DEPRESSION A LONG-TERME.	121
FIGURE 39. ACTIVITE DU TRANSGENE NGN1^{CREERT2} ET EFFETS DE LA DELETION D'OTX2 DANS LE HIPS.	125
FIGURE 40. REGIONS EXPRIMANT OTX2 ET LA TDTomato	127
FIGURE 41. EFFETS DE LA DELETION D'OTX2 SEULE ET EFFETS DE SON INTERACTION AVEC LE STRESS CHRONIQUE	130
FIGURE 42. EFFETS DE LA DELETION D'OTX2 DANS LA DMHB SUR LA REPONSE AU STRESS PREADOLESCENT.	131
FIGURE 43 EFFETS DE LA DELETION D'OTX2 DANS LA DMHB SUR L'ACTIVITE NEURONALE DU HIPOPS A LONG-TERME EN REPONSE A UN DERNIER STRESS AIGU.	133
FIGURE 44. MODELE HYPOTHETIQUE DE L'ACTIVITE DU HIPOPS EN REPONSE A UN STRESS AIGU OU CHRONIQUE ENTRE DURANT LA PREADOLESCENCE CHEZ LES SOURIS CONTROLES.	147
FIGURE 45 MODELE HYPOTHETIQUE DE L'ACTIVITE DU HIPOPS EN REPONSE A UN STRESS AIGU OU CHRONIQUE ENTRE DURANT LA PREADOLESCENCE CHEZ LES SOURIS OTX2 CKO.	153
TABEAU 1. AFFERENCES DE LA MHB.	37
TABEAU 2. EFFERENCES DE LA MHB.	37
TABEAU 3. AFFERENCES DE L'IPN.	43
TABEAU 4. EFFERENCES DE L'IPN.	45

Liste des abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine
AAV	Virus adéno-associé
BAC	Noyau du lit de la commissure antérieure
BDA	Amine dextran biotinylé
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BLA	Amygdale basolatéral
BST	Noyau du lit de la strie terminale
BSTh	Partie du noyau du lit de la strie terminale projetant sur l'habénula
CeA	Amygdale central
cKO	Knock Out conditionnel
CNO	Clozapine N-oxide
CPG	Réseaux locomoteurs spinaux
CRH	Corticolibérine
DA	Dopamine
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DLR	Régions locomotrices du diencephale
dMHb	Partie dorsale de l'habénula médiane
DR	Noyau du raphé dorsal
DREADD	Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs
DTg	Noyau du tegmentum dorsal
EP	Noyau entopédonculaire
FR	<i>Fasciculus retroflexus</i>
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GCL	Couche des cellules ganglionnaires
Glut	Glutamate
GP	Globus pallidus
GPe	Partie externe du globus pallidus
GPh	Globus pallidus projetant vers l'habénula
GPi	Partie interne du globus pallidus
HIPS	Système habénulo-interpédonculaire
HPA	Axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien

HPC	Hippocampe
HRP	Peroxydase de raifort
Hyp	Hypothalamus
IC	Colliculus inférieur
IF	Noyau interfasciculaire du noyau de l'aire ventrale tegmentale
INL	Couche interne de la rétine
IPN	Noyau interpédonculaire
LC	Locus coeruleus
LDT	Noyau du tegmentum latéro-dorsal
LH	Hypothalamus latéral
LHb	Habénula latérale
Lp	Pallium latéral
LS	Septum latéral
LTP	Potentiation à long-terme
MAM	Région mammillaire
MHb	Habénula médiane
MLR	Régions locomotrices du mésencéphale
MnR	Noyau du raphe médian
MOB	Bulbe olfactif principal
MR	Noyau du raphe magnus
MS	Septum médian
NAcc	Noyau accumbens
nAChR	Récepteur nicotinique
Ndb	Noyau de la bande diagonale
NTP	Noyau du tubercule postérieur
OB	Bulbe olfactif
ONL	Couche nucléaire externe de la rétine
OT	Tectum optique
PAG	Substance grise périaqueducule
PCH	Cortex parahippocampal
PFC	Cortex préfrontal
Pi	Organe pinéale
PNN	Réseaux périneuronaux

POA	Noyau préoptique de l'hypothalamus
PR	Noyau du raphe pontis
PV	Parvalbumine
rIPN	Partie rostrale du noyau interpédonculaire
RMTg	Noyau tegmental rostromédian
RPE	Retinal Pigmented epithelium ou Epithélium rétinien pigmenté
Sc	Noyau suprachiasmatique
SC	Colliculus supérieur
SERT	Transporteur membranaire de la 5-HT
SFi	Noyau septofimbrial
sm	Strie médullaire
SNe	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNr	<i>Substantia nigra pars reticula</i>
SST	Somatostatine
STN	Noyau sous-thalamique
STR	Strie terminale
Sum	Région supramammillaire
TP	Tubercule postérieur
TRDA	Amine dextran Texas Red
TS	Septum triangulaire
vMHb	Partie ventrale de l'habénula médiane
VTA	Aire tegmentale ventrale
β-AR	Récepteur β-adrénergique

Introduction

Les troubles de l'humeur et les addictions peuvent être causés par des dysfonctionnements des circuits de récompense. Les travaux de ces cinquante dernières années suggèrent qu'ils ont une origine neuro-développementale (Ansorge et al., 2007; Leonardo and Hen, 2008). Selon cette hypothèse, les processus de formation (neuro-développement précoce) et de maturation (neuro-développement tardif) du système nerveux sont influencés par les effets combinés de facteurs environnementaux et génétiques durant des périodes critiques du développement. Un environnement stressant et/ou un défaut d'expression de gènes de développement durant ces périodes critiques, peuvent conduire à la malformation de circuits neuronaux, dont le système de récompense, et ainsi créer une prédisposition à des maladies psychiatriques. Cependant, il existe très peu d'études s'intéressant au développement du système de récompense. Le système habénulo-interpédonculaire (HIPS), constitué de l'habénula médiane (MHb) et de sa principale cible, le noyau interpédonculaire (IPN), émerge comme un composant clé de ce circuit (McLaughlin et al., 2017). Des études soulignent son implication dans des pathologies telles que l'addiction, l'anxiété et la dépression. L'équipe a récemment identifié que le facteur de transcription *Otx2* est essentiel pour la formation de la MHb et de l'IPN (Ruiz-Reig et al., 2019). L'expression d'*Otx2* est maintenue tout au long de la vie dans le HIPS suggérant que ce gène pourrait également jouer un rôle dans la maturation et le fonctionnement du HIPS, comme cela a été montré dans beaucoup d'autres structures comme l'aire tegmentale ventrale (VTA), le cervelet ou bien encore la rétine. Les fonctions d'*Otx2* dans ces structures sont diverses mais un lien semble se dessiner entre la réponse au stress et l'expression d'*Otx2* dans plusieurs de ces structures. Plus spécifiquement dans la VTA, qui est une autre composante importante du système de récompense, un stress chronique subi pendant une période spécifique de l'enfance diminue le niveau d'expression d'*Otx2* et prédispose à la dépression et à l'anxiété (Peña et al., 2017). Il est donc possible qu'*Otx2* joue aussi un rôle similaire dans la réponse du HIPS au stress pendant des périodes particulières du développement.

Ce travail de thèse vise à mieux comprendre comment des facteurs génétiques et environnementaux affectant le développement du HIPS peuvent conduire à l'apparition de troubles psychiatriques, en répondant à 5 objectifs :

- 1- Etudier les relations de connectivité entre les neurones *Otx2*⁺ de la MHb et ceux de l'IPN
- 2- Identifier la période critique du développement du HIPS

- 3- Etudier l'impact d'un stress chronique pendant cette période critique sur le développement d'une anxiété et/ou d'une dépression à long-terme
- 4- Etudier les effets d'une délétion d'Otx2 dans le HIPS sur ces comportements
- 5- Analyser les effets de l'interaction Otx2 – stress

Dans cette introduction, je commencerai par résumer les caractéristiques fonctionnelles principales du système de récompense dont celles du HIPS. En deuxième partie, j'exposerai l'hypothèse neuro-développementale et les mécanismes sous-jacents. En troisième partie, je présenterai l'importance du facteur de transcription Otx2 dans le développement du système nerveux et plus particulièrement dans le développement du HIPS, ainsi que son rôle dans la plasticité neuronale.

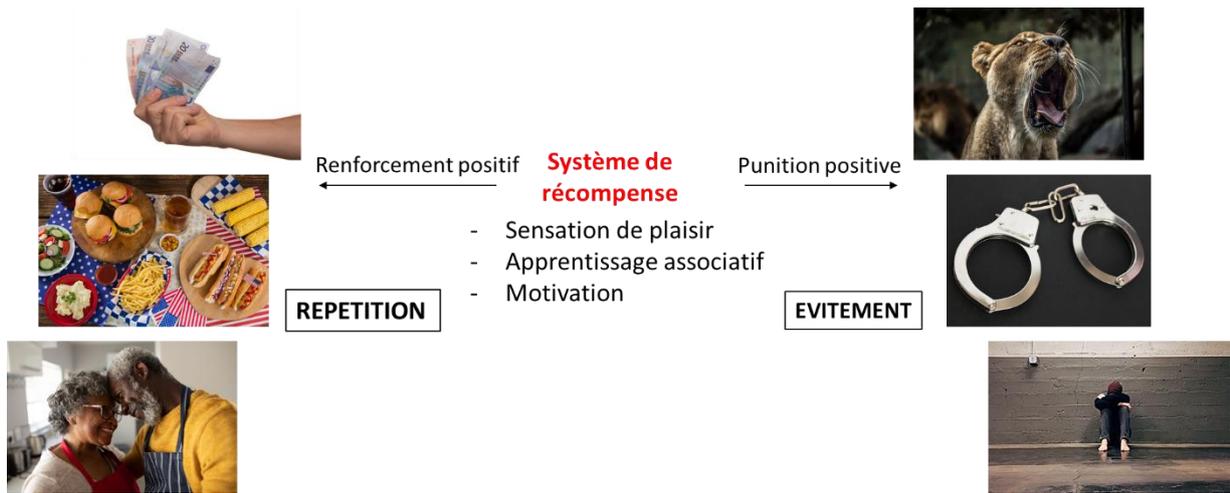


Figure 1. Rôle du système de récompense dans le contrôle des comportements.

Le système de récompense renforce la répétition des comportements qui procurent du plaisir tels que gagner de l'argent, manger et l'interaction sociale (à gauche) et il diminue la répétition des comportements dommageables qui conduisent à l'affrontement d'un prédateur, à une punition ou encore à l'isolement social (à droite).

I. Le système de récompense

Manger, boire, s'abriter et se reproduire sont des besoins primaires essentiels à la survie de l'individu et de l'espèce. Au cours de l'évolution, la sélection naturelle a permis de mettre en place un circuit spécialisé, appelé système de récompense, nécessaire à la réalisation d'actions et de comportements permettant d'assouvir ces besoins. Ultérieurement, ce circuit s'est étendu et s'est complexifié pour permettre d'assouvir des besoins dits secondaires, non nécessaires à la survie, tels que la réussite sociale ou se divertir.

Le système de récompense renforce la répétition de comportements associés à l'obtention de récompenses (renforcement positif). Par exemple, les comportements qui permettent d'obtenir de la nourriture, de se reproduire ou de gagner de l'argent sont renforcés par ce circuit. Ces comportements sont par la suite répétés pour ressentir à nouveau du plaisir, c'est la fonction hédonique des récompenses. Lorsqu'une action aboutit à un résultat négatif, le système de récompense va au contraire diminuer la répétition des comportements qui engendrent ce résultat (punition positive), ce qui permet d'éviter de se retrouver face à un prédateur ou dans toute autre situation défavorable (**Figure 1**).

La récompense se caractérise par trois composantes psychologiques (Berridge et al., 2009). La première composante est le plaisir apporté par la récompense (« liking » en anglais). La deuxième composante est l'apprentissage (« learning ») (associations prédictives et cognitions). Cet apprentissage est nécessaire pour prédire l'arrivée d'une récompense ou d'un stimulus aversif mais aussi pour orienter la prise de décision et anticiper la réponse adéquate. La troisième composante est la motivation (« wanting »). Les récompenses sont rarement obtenues passivement et nécessitent d'agir pour les obtenir. La motivation permet de diriger les comportements vers un but. Lorsque la récompense est obtenue, le but de l'action sert par la suite de renforçateur pour favoriser la répétition des comportements ayant permis son obtention. Il est à noter que la motivation et le sentiment de plaisir sont dissociables aussi bien d'un point de vue psychologique que neurobiologique. Ces trois composantes de la récompense mettent donc en jeu différentes parties du système de récompense qu'il est intéressant d'étudier d'un point de vue évolutif, pour comprendre comment ce circuit a conduit au développement de comportements aussi complexes que chez l'homme.

	Vertébrés lamproie	Amphibiens grenouille	Reptiles tortue	Mammifères opossum	Primates Singe rhésus
					
Bulbes olfactifs	+	+	+	+	+
Hypothalamus	+	+	+	+	+
Cervelet		+	+	+	+
Habénula	+	+	+	+	+
Striatum **	+	+	+	+	+
Amygdale ***		+	+	+	+
Hippocampe ***	+/-	+	+	+	+
Isocortex	+/-	+	+	+	+

Figure 2. Développement du système nerveux chez les vertébrés

** Chez la lamproie, le striatum correspond à l'homologue de l'amygdale

***Seuls les noyaux formant l'amygdale sont représentés

****Le pallium hippocampal est présent chez la lamproie mais n'est pas encore clairement développé

Les codes couleurs représentent les structures. Adapté de (Loonen and Ivanova, 2015)

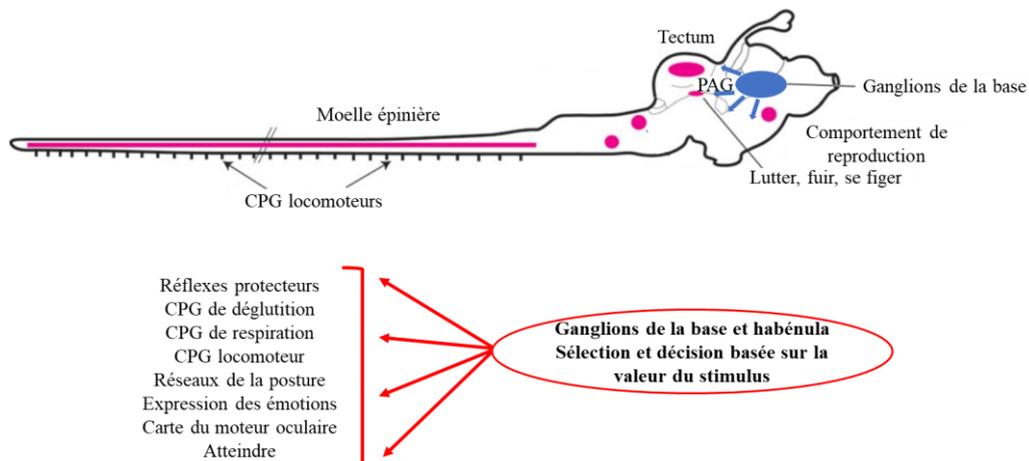


Figure 3. Structures motrices chez les cyclostomes et les poissons.

Différents programmes moteurs/CPG sont localisés dans le tronc cérébral ou dans la moelle épinière. Des programmes plus intégrés tels qu'une activation de la substance grise périaqueducule (PAG) ou de son homologue peuvent être induits pour lutter, fuir ou se figer face à un prédateur ou tels que l'activation du noyau préoptique de l'hypothalamus (POA) pour les comportements de reproduction. La partie inférieure de la figure présente différents programmes moteurs comprenant des programmes simples et plus complexes. L'activation et le recrutement du programme est déterminé par les ganglions de la base. L'habénula contrôle les prises de décisions via le contrôle des neurones dopaminergiques. Adapté de (Grillner.S, 2011).

I.1. Evolution et rôles du système de récompense

Pour survivre en tant qu'espèce et individu, même notre plus vieil ancêtre marin, apparu il y a 560 millions d'années, possédait probablement un système de récompense archaïque qui lui permettait de réguler ses mouvements pour réagir à son environnement. Le tableau suivant résume le développement du système nerveux chez les vertébrés et illustre la complexification des fonctions du système de récompense (**Figure 2**).

I.1.1. Le système de récompense de la lamproie

Chez la lamproie, espèce vertébrée la plus ancienne connue, les structures du pallium se rapprochent de celles du pallium des vertébrés apparus plus récemment, mais le cortex cérébral et l'hippocampe ne sont pas clairement développés (Murakami et al., 2001; Murakami et al., 2005). Comme chez tous les vertébrés, les réseaux coordonnant les mouvements moteurs, également appelés réseaux locomoteurs spinaux ou CPG (Central Pattern Generator), s'étendent le long de la moelle épinière (**Figure 3**). D'autres programmes moteurs et CPG sont également localisés dans le tronc cérébral. Ces programmes comprennent des éléments simples tels que les réflexes protecteurs et des éléments plus complexes tels que l'expression des émotions ou encore les comportements de lutte, de fuite ou de paralysie lors de la rencontre d'un prédateur. Les CPG sont activés par les neurones réticulo-spinaux qui sont eux-mêmes coordonnés par des centres moteurs localisés dans la partie inférieure du cerveau dont le tectum et les régions locomotrices du diencéphale (DLR) et du mésencéphale (MLR). L'habénula est une structure de l'épithalamus, constituée de l'habénula latérale (LHb) et de l'habénula médiane (MHb). Elle est présente chez la lamproie et conservée chez tous les vertébrés. Elle joue un rôle important dans le système de récompense car elle influence l'activité des centres monoaminergiques du tronc cérébral : les systèmes dopaminergique (NTP), sérotoninergique (raphé) et histaminergique (hypothalamus latéral ou LH) (Stephenson-Jones et al., 2012) (**Figure 4**).

Chez la lamproie, les afférences de la structure homologue de la LHb sont assez conservées : les projections de l'hypothalamus latéral (LH) et de la partie du globus pallidus projetant sur la LHb (GPh) sont présentes (Stephenson-Jones et al., 2012) (**Figure 4 a**). L'activité de la LHb est dépendante des récompenses. Elle est activée par des stimuli aversifs

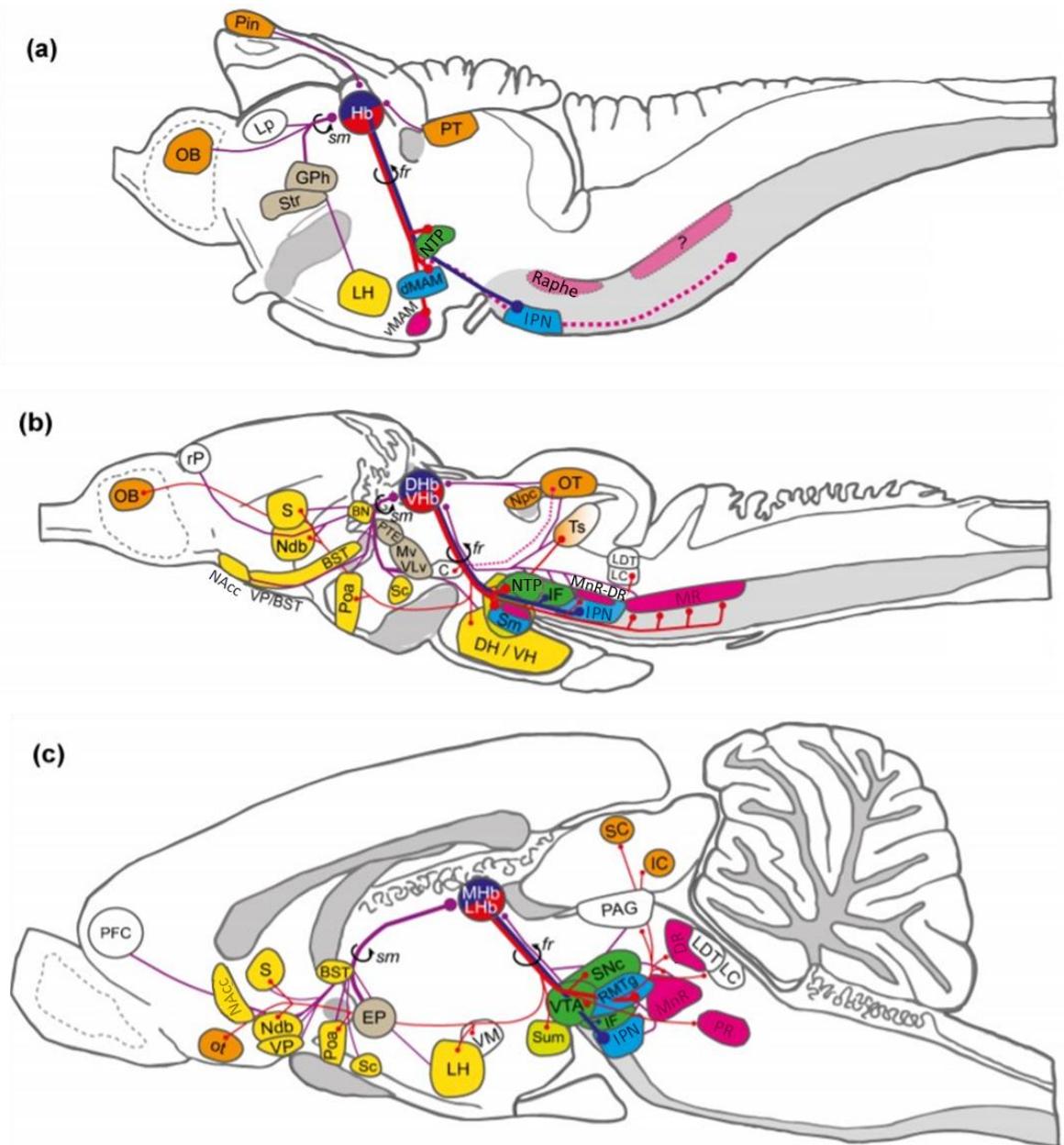


Figure 4. Vue d'ensemble simplifiée des connexions afférentes et efférentes de l'habénula de la lamproie (a), d'un amphibien (b) et d'un mammifère (c).

Les lignes violettes indiquent les afférences vers l'habénula. Les lignes rouges indiquent les efférences de la LHb, les lignes bleues les efférences de la MHb. Les lignes en pointillées indiquent les efférences dont l'origine n'est pas sûre entre la MHb et la LHb. Les afférences directes provenant du bulbe olfactif (OB) chez la lamproie sont absentes chez les mammifères où l'on observe plutôt des afférences provenant du système limbique. Les afférences vers le tronc cérébral se complexifient au cours de l'évolution. Les couleurs communes de régions entre ces différentes espèces marquent les régions d'homologies. Adapté de (Freudenmacher, 2020)

ou lorsque la valeur de la récompense reçue est plus faible que celle attendue (erreur de prédiction de la récompense négative) et inhibée lorsque la récompense reçue est plus bénéfique qu'initialement attendue (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011). La LHb forme donc l'ébauche de la sélection d'actions à la base du mécanisme de renforcement par l'apprentissage. Cela permet aux vertébrés de supprimer les actions aux conséquences indésirables et de prendre des décisions aussi fondamentales qu'évaluer les actions dans un contexte de recherche de nourriture.

La lamproie, possède aussi une structure homologue au noyau interpédonculaire (IPN) des mammifères (Freudenmacher et al., 2020a). Ensemble, la MHb et l'IPN forment un circuit appelé le système habénulo-interpédonculaire (HIPS) qui est évolutivement conservé chez tous les vertébrés, bien que son arrangement topographique soit différent en fonction des espèces (Aizawa et al., 2005) (**Figure 4**). La MHb module indirectement les systèmes monoaminergiques via l'IPN. Chez la lamproie et le poisson zèbre, la locomotion peut être initiée par des stimulations olfactives du bulbe olfactif principal (MOB) (Jesuthasan and Mathuru, 2008; Daghfous et al., 2016). Ces deux espèces présentent d'importantes projections olfactives directement vers la MHb, ce qui suggère que la MHb contrôle les réponses comportementales innées en réponse à des stimuli sensoriels attractifs ou aversifs (Miyasaka et al., 2009) (**Figure 4 a**). L'IPN projette également sur le raphé, qui promeut l'état d'excitation moteur et joue un rôle secondaire dans le contrôle de l'appétit (Gillette, 2006) et sur le noyau central *griseum*, l'homologue de la substance grise périaqueducule (PAG) (Olson et al., 2017), qui peut initier différentes réponses face au stress, à savoir la lutte, la fuite ou la paralysie (Bandler et al., 2000). Leur présence chez la lamproie, suggère que la topographie des efférences du HIPS sur les régions du tronc cérébral est conservée et fournit un mécanisme commun qui adapte la stratégie comportementale aux différents stimuli aversifs.

Chez la lamproie, les ganglions de la base sont déjà présents et contrôlent directement le système locomoteur cerveau inférieur-moelle épinière (Robertson et al., 2014) (**Figure 5**). Ces ganglions de la base comprennent le striatum, une structure homologue au globus pallidus externe (GPe) et interne (GPi) et la *substantia nigra pars reticula* (SNr) qui sont tous GABAergiques. Le striatum projette vers les centres moteurs grâce à des efférences directes du striatum vers la SNr/GPi qui constituent la voie de sortie des ganglions de la base. Une boucle indirecte connecte aussi mutuellement le noyau sous-thalamique (STN) et le GPe, ce dernier reliant le striatum au SNr/GPi. Les ganglions de la base projettent aussi vers le thalamus et le pallium (**Figure 5**), formant ainsi une boucle de rétroaction au sein des ganglions de la base.

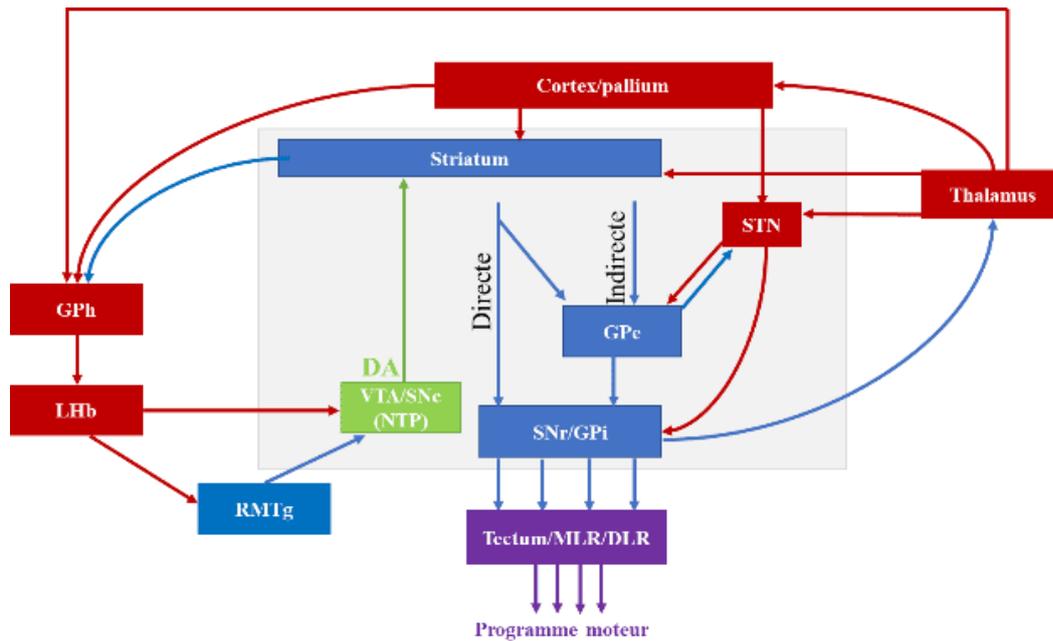


Figure 5. L'organisation des ganglions de la base est conservée chez tous les vertébrés – de la lamproie aux primates.

Les ganglions de la base sont représentés de manière simplifiée dans la zone grise. Le striatum, la partie externe (GPe) et la partie interne (GPi) du globus pallidus et la *substantia nigra pars reticula* (SNr) sont GABAergiques (en bleu). SNr et GPi sont la voie de sortie des ganglions de la base et projettent vers les régions en charge d'initier les programmes moteurs mais aussi vers le thalamus et le pallium. Une boucle indirecte interconnecte également le noyau sous-thalamique (STN) et le GPe qui relie indirectement le striatum au SNr/GPi. Les neurones dopaminergiques (DA, en vert) de la NTP (noyau du tubercule postérieur), précurseurs de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) régulent l'activité du striatum et sont régulés par l'homologue de l'habenula latérale (LHb) directement ou via le noyau tegmental rostro-médian (RMTg). La LHb est activée par le globus pallidus (GPh) qui reçoit des afférences inhibitrices du striatum et des afférences activatrices (en rouge) du pallium et du thalamus.

Le noyau du tubercule postérieur (NTP), centre dopaminergique de la lamproie, fait également partie des ganglions de la base et régule l'activité du striatum. Il est activé par des afférences glutamatergiques directes de la LHb ou inhibé indirectement par celui-ci via l'homologue du noyau tegmental rostro-médian (RMTg). Le GPh, afférence de la LHb, est activé par le pallium et le thalamus. L'activité du NTP est donc sous le contrôle d'un système d'évaluation avec d'un côté des afférences inhibitrices provenant du striatum et de l'autre, des afférences excitatrices provenant du pallium et du thalamus, relayées par le GPh puis par La LHb, pour déterminer si l'initiation d'une activité locomotrice conduirait à l'obtention d'une récompense et pour initier cette action (**Figure 5**).

I.1.2. Le système de récompense des amphibiens

Chez les amphibiens, successeurs évolutifs des lamproies, les parties les plus médianes et rostrales du télencéphale se différencient en striatum tandis que les parties plus latérales et caudales forment l'amygdale (Moreno and González, 2006). Cette structure, responsable de la perception des émotions, est composée d'une partie latérale (LA), antérieure (AA), centrale (CeA) et médiane (MA) chez la grenouille (Moreno and González, 2006). Les parties médianes, antérieures et latérales reçoivent et intègrent principalement des informations sensorielles dont une grande partie est d'origine olfactive. La partie centrale médie les réponses autonomes, somatiques, endocrines et comportementales. La connectivité originale de l'amygdale est bien conservée des amphibiens aux mammifères. L'amygdale est importante pour déclencher les comportements innés tels que l'orientation ou l'approche. Elle régule la recherche du plaisir et est importante dans le renforcement positif. Chez les amphibiens, le pallium médian constitue l'homologue de l'hippocampe. L'amygdale et l'hippocampe sont chargés d'attribuer une valeur motivationnelle aux stimuli et buts. Les projections depuis le pallium médian vers l'amygdale latérale sont les précurseurs des projections de l'hippocampe vers l'amygdale baso-latérale (BLA) des mammifères (Moreno and González, 2006) et indiquent un affinement du contrôle des comportements liés aux prises de décisions en prenant en compte des informations émotionnelles contextuelles.

Chez les amphibiens, on distingue, au sein du striatum ventral, le noyau accumbens (NAcc). Une sous-population de neurones, présente dans le cœur du NAcc, assigne quant à elle une valeur motivationnelle aux différents stimuli attractifs et aversifs rencontrés.

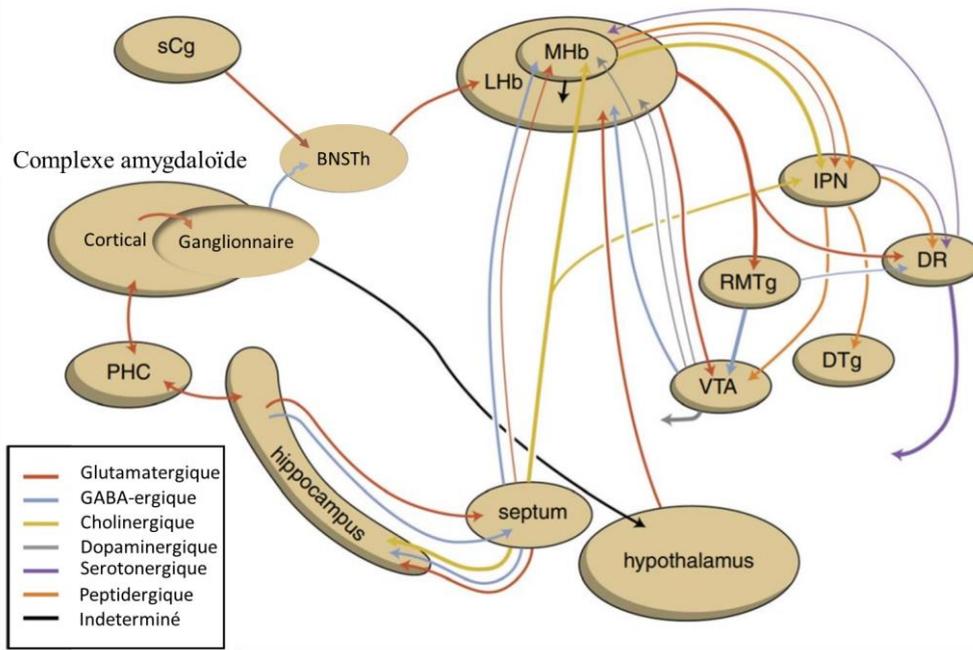


Figure 6. Schéma montrant la connectivité du système amygdalo-hippocampal sur le mésencéphale par le complexe habénulaire.

BSTh : partie du noyau du lit de la strie terminale projetant sur l'habénula ; DR : noyau du raphe dorsal ; DTg : noyau du tegmentum dorsal ; IPN : noyau interpédonculaire ; LHb : habénula latérale ; MHb : habénula médiane ; PCH : cortex parahippocampal ; RMTg : noyau tegmental rostromédian ; sCg : gyrus cingulaire subgénéral ; VTA : aire tegmentale ventrale. Adapté de Loonen and Ivanova, 2018

Le NTP a évolué en domaines comparables à la VTA paranigrale, le noyau interfasciculaire de la VTA et le tiers ventral de *la substantia nigra pars compacta* (SNc) (Freudenmacher et al., 2020b) (**Figure 4 b**).

L'activité de l'habénula est toujours influencée directement par des stimuli sensoriels mais de nouvelles afférences se mettent également en place, dont celles provenant du septum. Au niveau des efférences, les raphé médian et dorsal (MnR et DR) sont différenciables et permettent un affinement des processus émotionnels. L'habénula projette également vers le locus coeruleus (LC), principal centre noradrénergique important pour moduler l'attention dans les processus de prise de décision (Freudenmacher et al., 2020a), et le tegmentum dorso-latéral (LDT), une région importante pour la modulation de la motivation via la VTA.

I.1.3. Le système de récompense des mammifères

Chez les mammifères, on distingue nettement toutes les structures formant la VTA et la SNc. L'isocortex a pris une grande partie du contrôle de la locomotion. On retrouve notamment le cortex préfrontal (PFC), une aire hétérogène qui joue un rôle critique dans les prises de décisions concernant les récompenses, notamment par sa connexion avec la VTA et le noyau accumbens (NAcc) (système dopaminergique mésocortico-limbique). Le cortex préfrontal est responsable de la planification et de l'exécution des actions pour obtenir la récompense.

L'amygdale des mammifères est beaucoup plus complexe que celle des amphibiens. Elle est constituée de 13 noyaux, de régions corticales et de leurs sous-divisions. Toutefois, la connectivité originale est maintenue. Chez les mammifères, l'amygdale corticale intègre, avec l'amygdale baso-latérale (BLA), les informations sensorielles et conduit à la formation de mémoire émotionnelle telle que le conditionnement à la peur. L'amygdale médiane constitue le centre principal du relais secondaire de l'organe voméro-nasal. L'amygdale centrale (CeA) est le composant principal de la sous-division autonome de l'amygdale. La strie terminale connecte l'amygdale avec des régions antérieures du cerveau et avec l'hypothalamus. La connexion indirecte de l'amygdale centro-médiane sur la LHb, via le noyau du lit de la strie terminale (BST) et via l'hypothalamus latéral, est importante pour le processus de prise de décision (Loonen and Ivanova, 2018). L'hippocampe fournit à l'amygdale des informations contextuelles émotionnelles pertinentes pour influencer les prises de décision et de risque (**Figure 6**) qui seront relayées vers les neurones dopaminergiques du NAcc (Chesworth and Corbit, 2017).

L'hippocampe est aussi une voie de sortie de l'amygdale : il régule l'activité de l'habénula par l'intermédiaire de projections sur le septum (**Figure 6**). La connexion BLA-NAcc médie également les comportements de peur et d'anxiété.

Au cours de l'évolution, les informations contextuelles provenant de l'hippocampe ont pris un rôle prépondérant et ont remplacé les afférences olfactives prédominantes chez la lamproie et le poisson vers la MHb (Miyasaka et al., 2009) (**Figure 4 c**). Les projections sensorielles directes vers la MHb sont remplacées par des afférences du système limbique dont le noyau septo-fimbrial (SFi) et le septum triangulaire (TS) (Stephenson-Jones et al., 2012) qui reçoivent la plupart de leurs afférences de l'hippocampe (NAUTA, 1958; Swanson and Cowan, 1979) (**Figure 6**). Cette transition permet aux mammifères d'adapter leurs réponses à des situations contextuelles, au-delà d'une simple réaction innée à des stimuli donnés. Chez les mammifères, l'habénula s'est également complexifiée et aussi bien la MHb que la LHb sont constituées de différents sous-noyaux avec une répartition des projections et des fonctions probables.

Dans sa forme la plus simple, le circuit de récompense permet de tirer avantage de son environnement et d'éviter tout comportement qui pourrait menacer la survie. Les informations sensorielles en provenance de l'environnement sont intégrées au niveau du thalamus. Ces informations sont ensuite catégorisées en stimuli aversifs ou attractifs au niveau de la LHb et de la VTA, respectivement, ou de leurs homologues. Lorsque le stimulus est jugé bénéfique, le système dopaminergique fournit la motivation nécessaire pour enclencher les actions menant à l'obtention de ce bénéfice (activation par le striatum des programmes moteurs adaptés). Cette composante motivationnelle est donc essentielle pour diriger les comportements vers un but précis et une dérégulation du système de récompense peut conduire à une perte de motivation ou à une motivation excessive, et menacer le maintien du bien-être. La réalisation de l'acte débouche sur un sentiment de satisfaction relayé par le système sérotoninergique qui permet de renforcer l'effet motivationnel du système dopaminergique. Un dérèglement de ce circuit peut conduire à la recherche démesurée de plaisir ou à une perte de toute sensation de plaisir. Lorsque le stimulus est délétère, le système de récompense permet d'éviter de se confronter à des situations dangereuses. Cependant, un dysfonctionnement du système de récompense peut aussi conduire à une perception exacerbée du danger ou de toute autre situation inconfortable et provoquer des comportements anxieux. La perception des émotions est associée à

l'émergence de l'amygdale. L'hippocampe est chargé de stocker en mémoire les expériences vécues. Ensemble, ces deux structures permettent de prendre en compte les informations émotionnelles contextuelles dans les prises de décision vis-à-vis des stimuli perçus. Le PFC permet d'anticiper, de planifier et d'exécuter des actions plus complexes qui permettent d'obtenir des récompenses. Le système de récompense des mammifères présente donc des caractéristiques évolutives plus élaborées en termes d'anticipation et de planification, mais son fonctionnement exacerbé peut conduire à des pathologies psychiatriques.

I.2. Pathologies associées au système de récompense

I.2.1. L'addiction

L'addiction est une pathologie psychiatrique à forte prévalence avec un risque au cours de la vie de 16,2% aux Etats-Unis (Kessler et al., 2003). Cette pathologie évolue en plusieurs étapes : utilisation de drogues de manière récréative et sporadique, consommation plus abondante et plus soutenue et enfin perte de contrôle. Malgré les conséquences aversives, la consommation de substance addictive est maintenue. Bien que les différentes drogues ont des mécanismes d'action différents, elles influencent toutes le niveau de dopamine du système de récompense (Di Chiara and Imperato, 1988). En présence d'une récompense, la VTA active des neurones du NAcc grâce aux afférences glutamatergiques provenant du LDT. A l'opposé, en réponse à un stimulus aversif, la LHb active directement ou indirectement, via le RMTg, une autre sous-population dopaminergique de la VTA qui projette sur le PFC et conduit à un comportement d'aversion. Les afférences provenant de l'hippocampe ventral (vHPC), du PFC et de la BLA vers le NAcc contribuent à l'attribution d'une valeur attractive à la récompense, au renforcement positif et à la prise de décision quant à sa consommation et à l'anticipation d'une nouvelle consommation (Cooper et al., 2017). De plus, les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal (DR) projettent dans la BLA et le PFC mais aussi dans la VTA et le NAcc, où ils modulent la libération de dopamine et l'activité du système de récompense (Müller and Homberg, 2015; Fischer and Ullsperger, 2017) (**Figure 7**). Les efférences GABAergiques du

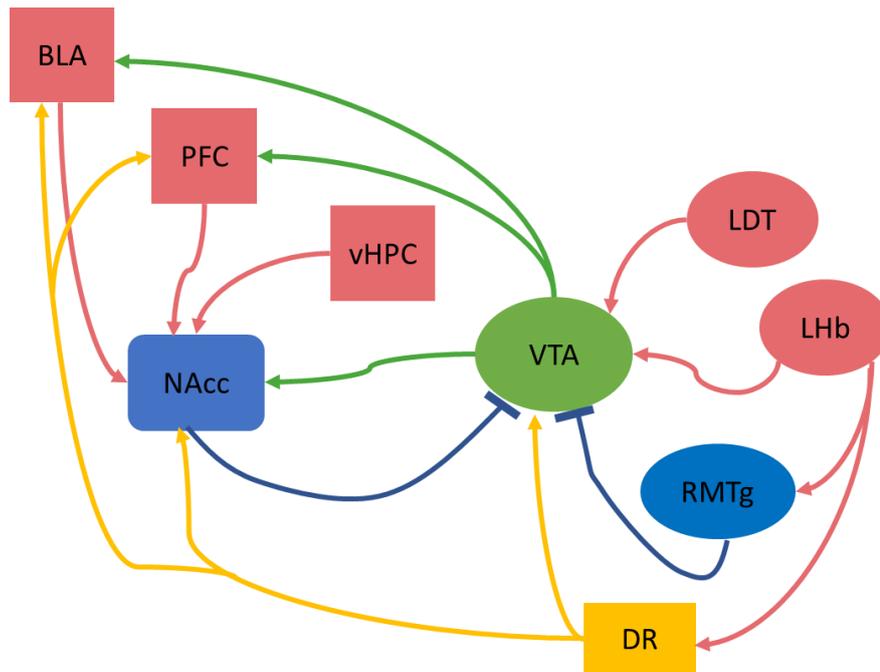


Figure 7. Schéma simplifié du système de récompense impliqué dans l'addiction.

Les afférences dopaminergiques (en vert), glutamatergiques (en rose), GABAergiques (en bleu) et sérotoninergiques (en jaune) convergent vers le NAcc pour coordonner et réguler les comportements liés à la consommation de drogue.

NAcc sont relayées pour modifier les comportements moteurs, le niveau d'éveil et la perception sensorielle (Salgado and Kaplitt, 2015).

Les substances addictives induisent la sécrétion de 5 à 10 fois plus de dopamine que les récompenses naturelles et la durée de libération est plus longue ce qui en renforce les effets. Les drogues comme la cocaïne, les amphétamines, la méthamphétamine et l'ecstasy augmentent le niveau extracellulaire de dopamine en inhibant la recapture de la dopamine et en promouvant sa sécrétion par leur action sur les transporteurs de la dopamine (Madras et al., 1989). Les autres drogues comme la nicotine, l'alcool, les opioïdes et la marijuana agissent indirectement en stimulant des neurones (GABAergiques ou glutamatergiques) qui modulent l'activité des neurones dopaminergiques, à travers leurs effets sur les récepteurs nicotiques, GABAergiques, récepteurs aux opiacés de type mu ou les récepteurs aux endocannabinoïdes CB1, respectivement (Kreek et al., 2002).

La consommation chronique de drogues conduit à des modifications à long terme des circuits neuronaux médiées par des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse des protéines participant à la plasticité synaptique, comme δ FosB et CREB (Nestler, 2001). Les mêmes processus de plasticité sont en jeu durant l'acquisition d'une addiction aux drogues et l'acquisition de la mémoire (Schenk et al., 1993) et impliquent une potentialisation à long terme (LTP) (Kauer and Malenka, 2007). La consommation chronique de drogue conduit aussi à une adaptation des neurotransmetteurs, non seulement la dopamine mais également la sérotonine, le glutamate, les opiacés, le GABA et des neuropeptides variés (Volkow and Fowler, 2000).

I.2.2. L'anxiété

La peur est provoquée par des stimuli qui sont potentiellement dangereux. En présence de ce type de stimuli, trois sortes de réponses sont observées : paralysie, fuite ou combat. L'anxiété est une peur anticipée de se retrouver face à des stimuli dangereux. Elle est importante car elle protège l'organisme d'un danger futur et étend ainsi ses chances de survie. Cependant, elle peut être inadaptée, se manifester sans raison valable et devenir pathologique. La prévalence de l'anxiété au cours de la vie est de 25% aux Etats-Unis (Kessler et al., 1994). Il existe plusieurs types d'anxiétés pathologiques selon la cinquième édition du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux de l'Association Américaine de Psychiatrie (DSM-5) :

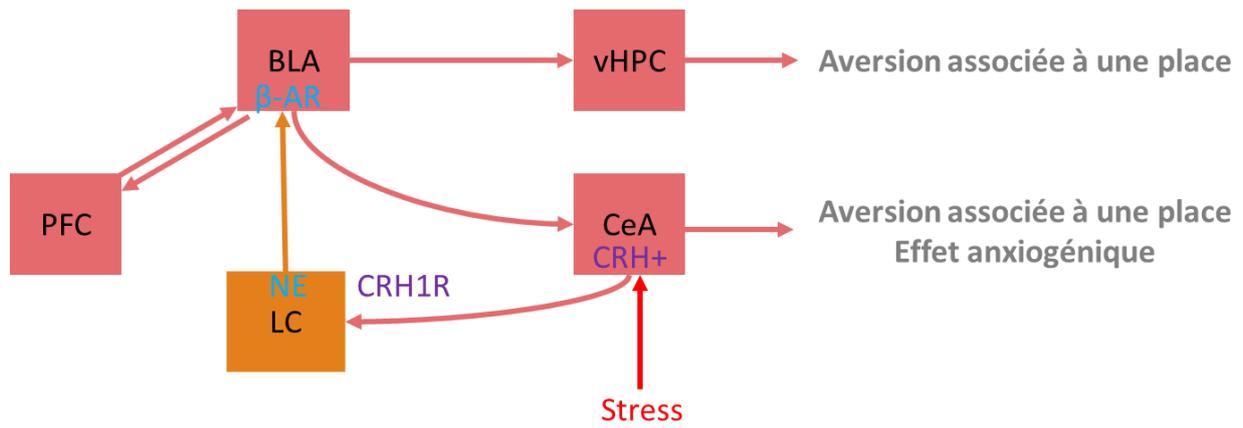


Figure 8. Schéma simplifié du système de récompense impliqué dans l'anxiété.

Les afférences glutamatergiques (en rose) et noradrénergiques (en orange) convergent vers la BLA pour coordonner et réguler les comportements liés à l'anxiété.

- Trouble de panique. Il est caractérisé par des attaques de panique parfois inattendues au cours desquelles l'individu fait face à un sentiment d'anxiété, de symptômes respiratoires et d'activité du système nerveux autonome incontrôlés. Ce trouble est souvent associé à une anxiété anticipée des crises.
- L'anxiété sociale. Elle peut être initiée par une expérience sociale traumatisante ou un manque d'aptitudes sociales qui produit des expériences négatives récurrentes.
- La phobie spécifique. L'existence ou l'anticipation de ces stimuli va provoquer la peur. Les types de phobies spécifiques peuvent être liés à un type d'animal, à l'environnement naturel, ou à un type de situation qui va conduire à une détresse et une anxiété.
- L'anxiété généralisée (GAD). C'est une anxiété disproportionnée à toutes les situations de la vie quotidienne. Dans le GAD, les symptômes concernent l'anticipation de risques ou de menaces futures.
- L'anxiété liée à la consommation de drogues ou d'autres substances.

Ces troubles sont hétérogènes mais impliquent le système de récompense. La BLA est au cœur des manifestations de comportements anxieux. Elle attribue une valeur émotionnelle aux stimuli et guide le comportement de l'individu. Elle reçoit des informations sensorielles différentes et projette sur des structures qui contrôlent les réponses comportementales (Janak and Tye, 2015). L'activation directe du CeA par la BLA induit une aversion associée à un endroit. Une activation du cortex préfrontal ventral a un effet anxiogène immédiat et induit aussi une aversion associée à un lieu (Janak and Tye, 2015; Daviu et al., 2019) (**Figure 8**).

Les expériences stressantes impliquent aussi le système noradrénergique du locus coeruleus qui projette très largement dans le cerveau et est lié à l'aspect physique et émotionnel de la réponse au stress (Berridge and Waterhouse, 2003) et à la consolidation de la mémoire aversive (Rooszendaal et al., 2008). Une activation tonique du LC induite par le stress augmente l'anxiété (Valentino and Van Bockstaele, 2008). Le stress induit la libération de corticolibérine (CRH) par le CeA sur les neurones du LC qui expriment le récepteur au CRH de type 1 (CRH1R) (McCall et al., 2015). L'activation du LC induit la libération de norépinephrine au niveau de la BLA, préférentiellement sur la population projetant sur l'hippocampe ventral, et du CeA qui sont alors activés via leurs récepteurs β -adrénergiques (β -AR).

Différentes aires du cortex préfrontal (PFC) médian et orbital modulent aussi les comportements liés à l'anxiété. Ces structures partagent des projections réciproques avec

l'amygdale et peuvent médier la réponse de l'amygdale aux stimuli émotionnels : l'atténuation de la réponse de peur, l'extinction de la réponse de peur conditionnée par des stimuli qui ne sont plus renforcés, modulation des réponses comportementales et viscérales associées à la peur et à la défense ou vers la récompense (Morgan and LeDoux, 1995).

Le système sérotoninergique joue aussi un rôle important dans l'anxiété mais son rôle n'est pas très bien compris. Akimova *et al.* suggèrent que les récepteurs 5-HT1A pré- et post-synaptiques ont un effet opposé. La suppression de la synthèse et de la sécrétion de sérotonine vers les régions cibles par les autorécepteurs 5-HT1A aurait un effet anxiolytique mais une stimulation des récepteurs post-synaptiques 5-HT1A sur les neurones des régions limbiques aurait un effet anxiogène (Akimova et al., 2009).

I.2.3. La dépression

L'anhédonie ou la perte du sentiment de plaisir face à des stimuli précédemment perçus comme agréables est le symptôme phare de la dépression. La dépression se manifeste par des symptômes tels que le sentiment de tristesse, l'irritabilité, les changements de l'appétit, des effets psychomoteurs ou des troubles de la mémoire qui affectent significativement les capacités de l'individu. Le DSM-5 classifie les dépressions en :

- Trouble disruptif de la régulation émotionnelle, qui se caractérise par la présence de crises de colères répétées, associées à une humeur irritable persistante entre les crises.
- Trouble dépressif majeur (MDD) qui se caractérise par la survenue d'un ou plusieurs épisodes dépressifs majeurs qui tranchent avec le fonctionnement normal de l'individu.
- Persistance du trouble dépressif (dysthymie) qui est caractérisé par des symptômes moins sévères mais chroniques.
- Trouble dysphorique prémenstruel qui est une forme sévère de syndrome prémenstruel.
- Les autres troubles dépressifs dus à une autre condition médicale.

La dépression met en jeu les mêmes composants neuronaux que l'addiction (**Figure 7**).

La dépression diminue l'activité des neurones glutamatergiques du cortex préfrontal médian (Covington et al., 2010). Une stimulation cérébrale profonde dans le cortex préfrontal

ventral, dans un modèle de souris dépressives, inverse le comportement d'évitement social et les effets du stress sur les neurones sérotoninergiques (Veerakumar et al., 2014).

Une augmentation de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe réduit les niveaux d'anxiété et de dépression dans des modèles de souris transgéniques (Hill et al., 2015). Une stimulation directe du vHPC projetant sur le NAcc rend les souris susceptibles à la dépression.

L'imagerie fonctionnelle suggère que l'amygdale est hyperactive chez les individus déprimés (Zhong et al., 2011).

Contrairement à l'effet motivationnel de l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA, une diminution aberrante de son activité peut conduire à une anhédonie.

L'intégration des afférences au sein du réseau inhibiteur du NAcc détermine les comportements à sélectionner à la suite d'une exposition à des stimuli particuliers. Une étude a montré qu'une inhibition des interneurons cholinergiques du NAcc conduit à un trouble dépressif (Warner-Schmidt et al., 2012).

Les neurones du raphé projettent sur le noyau caudé, le putamen, le pallidus, l'amygdale, le cerveau antérieur limbique, et le néocortex où ils contribuent au traitement des émotions. La surexpression des autorécepteurs 5-HT_{1A} diminue l'activité sérotoninergique et peut être un facteur de risque de la dépression (Descarries and Riad, 2012). La délétion génétique ou l'ablation pharmacologique transitoire du transporteur membranaire de la sérotonine (SERT) au stade précoce augmente le tonus sérotoninergique et conduit à un comportement dépressif chez l'adulte (Ansorge et al., 2007).

I.2.4. Comorbidité des maladies psychiatriques

L'effet pathologique d'un trouble psychiatrique rend le sujet plus susceptible de développer d'autres maladies psychiatriques. Par exemple, la dépression et l'anxiété coexistent avec l'addiction, et un dilemme majeur concernant le traitement est de déterminer quelle pathologie est apparue en premier (Quello et al., 2005). La dépression est reconnue comme un facteur de risque pour la consommation de drogue et l'addiction, avec une prévalence de la dépression à 60%. L'état généralisé d'anhédonie (incapacité à ressentir du plaisir) et l'irritabilité sont souvent confondus avec la dépression et les personnes souffrant d'addiction disent souvent qu'elles consomment de la drogue pour traiter leur dépression. L'addiction crée également un état d'anxiété généralisée, notamment dû au sentiment de manque permanent.

Les fonctions du système de récompense sont prises en charge par différentes régions du cerveau. Ce circuit inclut des centres dédiés à la mémoire, la motivation, la génération des émotions, et des effecteurs qui déclenchent les actions appropriées à la situation et médiés par les systèmes mono-aminergiques. Un dysfonctionnement de ces différentes composantes peut conduire à des pathologies psychiatriques différentes, à savoir l'addiction, la dépression ou l'anxiété. La perturbation de certaines de ces composantes peut avoir des conséquences beaucoup plus dramatiques que d'autres, notamment lorsqu'elles constituent une plaque tournante des différentes informations transmises au sein de ce circuit. Tel est le cas du HIPS qui est conservé chez tous les vertébrés et émerge donc comme un acteur clé au sein du système de récompense. Les informations provenant des centres de la mémoire, de la motivation, des émotions convergent au niveau du HIPS et sont relayées vers leurs effecteurs mono-aminergiques dans le mésencéphale et le rhombencéphale. Différentes études ont notamment déjà montré l'implication du HIPS aussi bien dans le développement d'une addiction, que dans l'anxiété et la dépression.

I.3. Le système habénulo-interpédonculaire : un composant clé du système de récompense

I.3.1. Rôle du HIPS dans l'addiction

Le HIPS est impliqué dans les mécanismes qui médient certains symptômes aigus de la consommation et les effets aversifs du sevrage de différentes drogues incluant l'alcool, les opioïdes, la nicotine et d'autres stimulants, en modulant l'activité des efférences de l'IPN qui sont connues pour réguler l'utilisation de drogues, telles que le raphé, le noyau incertus (NI), le septum latéral (LS), le LDT et l'hypothalamus.

La consommation d'alcool active la MHb dans une souche de rats sélectionnée pour sa consommation accrue d'alcool (Smith et al., 2001). L'ARNm du neuropeptide Y, un neuropeptide important pour diminuer la consommation d'alcool, est également absent dans la MHb de cette souche de rat (Hwang et al., 2004). De manière intéressante, les effets du sevrage de l'alcool sont médiés par les récepteurs nicotiques (nAChRs) présents dans la MHb et l'IPN mais pas par ceux exprimés dans la VTA ou l'hippocampe (Perez et al., 2015).

La MHb et l'IPN représentent deux zones denses d'expression des récepteurs aux opioïdes. La morphine est capable d'induire un effet analgésique par infusion directe dans

l'habénula. La libération d'opioïdes dans la MHb au cours d'une autostimulation intracrânienne de la VTA diminue la fixation des autres opioïdes endogènes (Stein, 1993). Une administration chronique de morphine affecte aussi l'activité cholinergique (AChE) dans la MHb, un effet qui disparaît dès la précipitation du sevrage par injection d'un antagoniste comme le naloxone (Neugebauer et al., 2013). Cet effet semble en partie médié par le récepteur nicotinique $\alpha 3\beta 4$ puisque l'infusion intracrânienne de l'antagoniste de ce récepteur dans la MHb ou l'IPN réduit l'auto-administration de morphine (Taraschenko et al., 2007).

Les substances psychostimulantes agissent aussi sur le HIPS. Comme pour la dégénérescence des fibres dopaminergiques observée après une consommation chronique de psychostimulants, les fibres de l'habénula dégèrent à long-terme (Ellison, 2002). L'infusion de 18-méthoxycoronaridine (18-MC), un antagoniste du récepteur nicotinique $\alpha 3\beta 4$, dans la MHb ou l'IPN suffit notamment à réduire l'auto administration de métamphétamine (Glick et al., 2008).

Le rôle le plus connu de l'HIPS reste celui médié par la nicotine, attribuable à la grande densité et à la variété de récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) dans la MHb et l'IPN (Mugnaini et al., 2002). Les sous-unités $\alpha 3\beta 4$ des récepteurs nAChRs médient l'activation tonique des neurones de la MHb après une consommation aiguë de nicotine. Durant le sevrage, la réexposition à la nicotine double la fréquence des potentiels d'action spontanés de la MHb (Görlich et al., 2013; Dao et al., 2014). La sous-unité $\alpha 5$ est aussi nécessaire pour augmenter l'excitabilité de la MHb induite par la nicotine (Dao et al., 2014). Elle est aussi nécessaire pour limiter la dose de nicotine ingérée, qui est consommée à des doses normalement aversives en l'absence de cette sous-unité et conduit à une faible activation de l'IPN (Fowler et al., 2011). Durant le sevrage, l'activité GABAergique de l'IPN augmente et joue un rôle important sur les symptômes somatiques de ce sevrage (Zhao-Shea et al., 2013). Les afférences glutamatergiques provenant de la MHb augmentent également cet effet. Après une exposition chronique, l'infusion de l'antagoniste 18-MC dans la MHb ou l'IPN précipite les symptômes du sevrage et provoque des comportements anxieux.

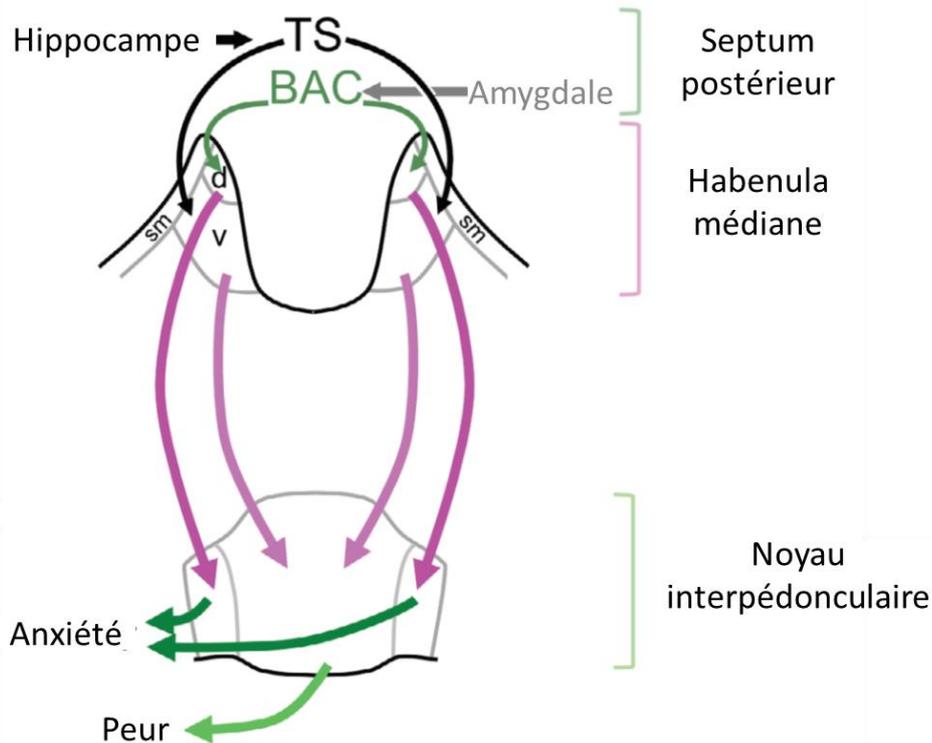


Figure 9. Schéma simplifié des projections TS-vMHb-IPN et BAC-dMHb-IPN.

Le noyau du lit de la commissure antérieure (BAC en vert) et le septum triangulaire TS en noir) dans le septum postérieur reçoivent leurs afférences principales de l'amygdale et de l'hippocampe respectivement. Ces deux sous-régions de la MHb projettent topographiquement sur les régions latérales et central de l'IPN, respectivement. La vMHb régule le niveau d'anxiété (vert sombre) et la dMHb régule la réponse de peur (vert clair). d : MHb dorsale, v : MHb ventrale, sm : strie médullaire. Adapté de Aizawa and Zhu, 2019

I.3.2. Rôle du HIPS dans l'anxiété

Classiquement les états de peur et d'anxiété sont associés à l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus et le PAG. Le HIPS joue aussi un rôle important dans le contrôle de ces états. Toutefois, certains résultats sont contradictoires quant à savoir si son activation génère un effet anxiolytique ou anxiogène. La partie dorsale et ventrale de la MHb (dMHb et la vMHb) projette dans différentes régions de l'IPN. L'ablation génétique du noyau du lit de la commissure antérieure (BAC), afférence de la dMHb, renforce la réaction de peur et l'apprentissage de l'évitement passif. L'élimination génétique du septum triangulaire (TS), afférence de la partie ventrale de la vMHb, réduit quant à elle le niveau d'anxiété chez la souris (Yamaguchi et al., 2013) (**Figure 9**). Cependant une altération de la transmission synaptique entre la vMHb et l'IPN par une délétion du gène *Cbln4*, qui code une protéine impliquée dans le maintien de l'intégrité synaptique, a également un effet anxiogène (Seigneur et al., 2018). Une autre étude suggère que l'inhibition de la vMHb par la suppression de l'expression de TMEM16A, un canal chlorure excitateur activé par le Ca^{2+} , a un effet anxiogène (Cho et al., 2020). La MHb module aussi le type de réponse de peur exprimé face au danger. Cette réponse de peur se traduit par une paralysie chez le poisson zèbre après lésion de la partie latérale de l'homologue de la MHb (dHbl) tandis qu'il se traduit par la fuite chez les contrôles. De plus, cette lésion conduit à la persistance de la paralysie durant le processus d'extinction de la peur dans un paradigme de peur conditionnée (Agetsuma et al., 2010). Chez le poisson zèbre la lésion de la dHb conduit aussi à un état d'anxiété généralisée dans un nouvel environnement (Mathuru and Jesuthasan, 2013). Ces résultats suggèrent que la MHb est impliquée dans la sélection de la stratégie comportementale pour réagir à son environnement. L'IPN, connecté réciproquement au PAG et à la région du tegmentum dorsal, module la réponse comportementale au stimulus stressant. La perte de l'asymétrie de la dHb augmente aussi le taux d'anxiété et de cortisol en réponse à un stress (Facchin et al., 2015).

L'IPN est aussi directement impliqué dans la régulation de la peur et de l'anxiété. Une lésion électrolytique de l'IPN n'altère pas l'expression viscérale de la peur (vocalisation, sursaut, etc...) mais altère l'apprentissage de l'évitement (THOMPSON, 1960). Une étude utilisant l'optogénétique dans la VTA et l'IPN suggère également que l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA, qui projettent sur la partie caudale de l'IPN a un effet anxiolytique tandis que l'inhibition de ces neurones dopaminergiques produit un effet anxiogène (DeGroot et al., 2020).

I.3.3. Rôle du HIPS dans la dépression

Dans un modèle de dépression induit par un stress chronique imprédictible, une augmentation de l'activité de la MHb et de l'IPN est associée à des symptômes dépressifs (Mirrione et al., 2014) qui peuvent être inversés par une lésion dans la MHb (Xu et al., 2018). Une autre étude montre que la délétion génétique de la dMHb chez la souris diminue la motivation pour effectuer un exercice physique et conduit à une anhédonie (baisse de la consommation de sucrose), deux symptômes de la dépression. Au contraire, une activation de la dMHb par optogénétique augmente l'activité physique et médie le renforcement positif primaire. Son inhibition conduit à un comportement d'aversion pour la pièce associée à l'inhibition de la dMHb (Hsu et al., 2014). Une altération de la vMHb peut également conduire à des symptômes dépressifs. Un modèle de dépression chez la souris, montre qu'une altération de la signalisation cholinergique dans la vMHb, notamment une diminution de l'expression de l'acétyltransférase (ChAT), une enzyme nécessaire à la synthèse d'acétylcholine, grâce à un ARNi ciblant cette enzyme, est suffisante pour conduire à un comportement anhédonique mais n'influence pas le comportement de détresse (Han et al., 2017). Ces résultats sont également retrouvés chez les victimes de suicide chez lesquelles l'expression des gènes qui régulent la signalisation cholinergique est diminuée dans la vMHb. Des études caractérisant les différences métaboliques dans différentes régions du cerveau dans une souche de rats susceptibles à la dépression montrent également une augmentation significative de l'activité métabolique dans l'habénula et l'IPN, à l'opposé de la VTA (Shumake et al., 2003). L'administration d'un anti-dépresseur chez le rat diminue l'activité métabolique de l'habénula et de l'IPN (Padilla et al., 2011), ce qui est également le cas chez l'homme (Carlson et al., 2013).

Ces différentes études montrent que le HIPS est impliqué dans le développement des symptômes dépressifs à savoir l'anhédonie et la perte de motivation, dans l'apprentissage associé à la peur, le développement d'une anxiété pathologique et dans les symptômes de l'addiction et du sevrage. Elles soulignent également l'importance d'identifier les différents sous-circuits qui le composent. En effet, les différentes pathologies psychiatriques présentées semblent toucher à des sous-parties du circuit, comme illustré notamment par les travaux de Yamaguchi et al.,. Ceux-ci mettent en exergue l'existence de sous-circuit au sein de la MHb avec d'un côté la dMHb chargée de réguler les réponses de peur et de l'autre la vMHb qui

régule les niveaux d'anxiété. Mais cette simple division en partie dorsale et ventrale n'est pas suffisante pour expliquer la complexité des fonctions du HIPS. D'autres études se focalisant sur la vMHb montrent un effet opposé de son inactivation sur les niveaux d'anxiété. Certaines des sous-régions évoquées, comme la dMHb semblent être à la fois impliquées dans la réponse de peur mais aussi dans l'aspect motivationnel de la locomotion ou encore dans l'hédonie. L'IPN n'est pas en reste puisqu'il est également constitué de différents sous-noyaux ayant leurs propres caractéristiques. Les différentes sous-parties de la MHb projettent également dans des parties différentes de l'IPN qui projettent probablement vers différentes cibles. Malheureusement, les différentes études menées pour comprendre les fonctions du HIPS ont employé différentes méthodes pour le cibler et ne touchent donc pas forcément aux mêmes types de neurones. Il convient donc d'étudier ce circuit en prenant en compte son hétérogénéité. Une des manières pour appréhender cette question est d'étudier l'origine développementale des sous-noyaux composants le HIPS avec l'idée que ces différentes origines pourraient également refléter des fonctions différentes.

I.3.4. Caractéristiques du HIPS

I.3.4.1. L'habénula médiane (MHb)

I.3.4.1.1. Développement de la MHb

Le morphogène *Fgf8* est indispensable au développement de l'habénula. Les neurones de l'habénula naissent à partir des précurseurs neuronaux exprimant le facteur de transcription *Dbx1* au niveau du domaine neuroépithélial dans la partie dorsale du prosomère p2, au niveau de la zone ventriculaire thalamique (Vue et al., 2007). Ces neurones sont générés selon un gradient médio-latéral avec les précurseurs de la LHb apparaissant en premier au jour embryonnaire 13 (E13) suivis des précurseurs de la MHb à E15 chez le rat. Les faisceaux efférents (formant le fasciculus retroflexus ou FR) projettent ventro-caudalement entre les prosomères p1 et p2. Ces axones, qui expriment le récepteur neuropilin-2 (*Nrp2*) sont repoussés par la sémaphorine 3F (*Sema3F*) exprimée par le prosomère 1. Cette interaction *Nrp2-Sema3F* est nécessaire pour la formation des axones fasciculés de l'habénula. Ces axones expriment aussi le récepteur de la nétrine, *DCC* (*Deleted in colorectal cancer*), et sont attirés par le signal de la Netrin1 sécrétée par la plaque du plancher (Aizawa et al., 2011) (**Figure 10**). A la fin de la dernière mitose qui leur donne naissance, les neurones de la MHb et une partie de ceux de la LHb commencent à exprimer le facteur de transcription *Brn3a* (*Pou4f1*). Ce facteur régule

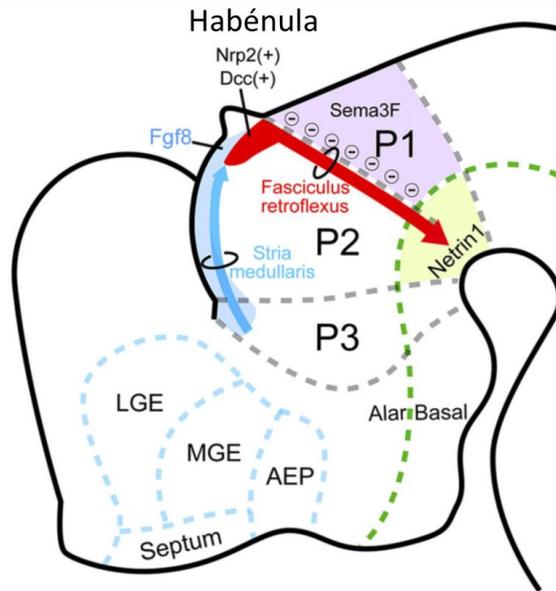


Figure 10. Représentation schématique d'une section sagittale de rat à E14 montrant le primordium habénulaire (en rouge), les axones en développement (fasciculus rétroflexus représenté par la flèche rouge)

La partie dorsale des prosomères p2 et p3 exprime Fgf8 (en bleu clair). Les aires exprimant les molécules de guidage des axones de l'habénula sont en violet pour Sema3F et en vert clair pour la Netrin1. AEP : Aire entopédonculaire antérieure, LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiane.

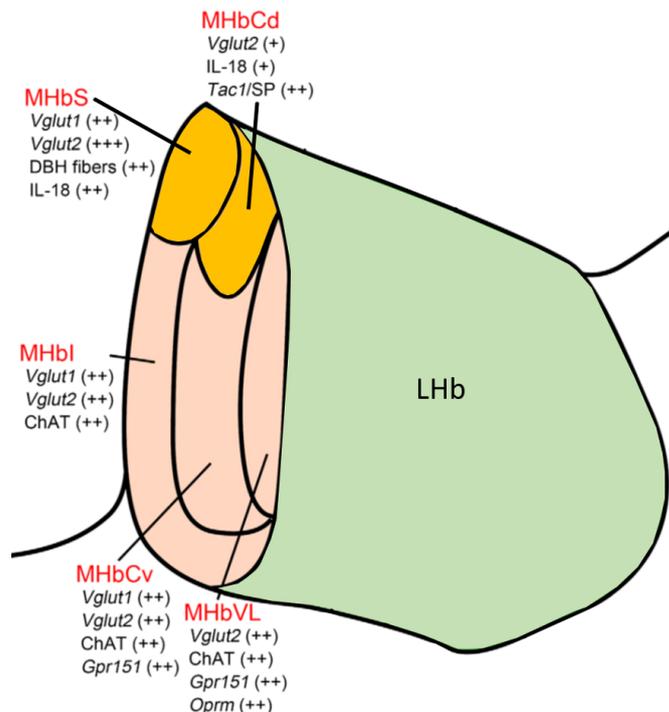


Figure 11. Organisation sous-nucléaire de la MHb et profil d'expression génique chez le Schéma représentant les parties supérieure (MHbS), inférieure (MHbI), centrale dorsale et ventrale (MHbCd et MHbCv respectivement) et latéro-ventrale (MHbVL) de la MHb. Les sous-noyaux en orange forment la dMHb et en rose la vMHb. Les signes (+) correspondent au niveau d'expression de l'ARNm des différents gènes : (+) faible, (++) intermédiaire, (+++) forte. Adapté de Aizawa et al., 2012

l'expression d'un large sous-ensemble de gènes enrichis dans la MHb et est essentiel non seulement pour la différenciation mais aussi pour la survie des neurones de la MHb. Il est aussi nécessaire pour l'innervation de l'IPN par les neurones de la MHb (Quina et al., 2017; Serrano-Saiz et al., 2018).

1.3.4.1.2. Caractéristiques cellulaires de la MHb

La MHb est constituée de sous-noyaux caractérisés par des combinaisons de neurotransmetteurs bien distinctes. Elle comprend une partie supérieure (MHbS), inférieure (MHbI), centrale dorsale et ventrale (MHbCd et MHbCv respectivement) et latéro-ventrale (MHbVL) (**Figure 11**). Les sous-noyaux MHbI, MHbCv et MHbVL co-expriment l'acétylcholine et le glutamate et ensemble forment la partie ventrale de la MHb (vMHb). L'acétylcholine peut être libérée en même temps que le glutamate et permet de contrôler la quantité et la fréquence de sécrétion du glutamate. La partie dorsale de la MHb (dMHb) est constituée de la MHbS, exclusivement glutamatergique, et de la MHbCd à la fois substance-P-ergique et glutamatergique (MHbCd). Le transporteur vésiculaire de glutamate *Vglut2* est exprimé dans toute la MHb avec une expression plus forte dans la MHbS. Le transporteur *Vglut1* est restreint à la MHbS, MHbI et MHbCv. La MHbS a la particularité d'exprimer l'interleukine IL-18, qui peut être induite par la norépinéphrine du LC via les récepteurs β 2-adrénergiques. Etant donné que la production d'IL-18 augmente en réponse à un stress d'immobilisation, Aizawa *et al.* suggèrent que l'IL-18 est un senseur qui permet de percevoir les stimuli stressants. La MHbVL exprime le récepteur aux opioïdes *oprm* tandis que la MHbCv et la MHbVL expriment le récepteur couplé aux protéines G *gpr151* (Aizawa et al., 2012). Ces combinaisons de signatures moléculaires particulières suggèrent que les projections et les fonctions contrôlées par ces différents sous-noyaux sont différentes et doivent être étudiées de manière plus ciblée.

Les neurones de la MHb génèrent intrinsèquement des décharges toniques au repos. Ils expriment les récepteurs au glutamate mais aussi des récepteurs au GABA de type A et B. Les axones génèrent des boutons en passant au sein même de la MHb, indiquant la présence de connexions intrinsèques (Kim and Chang, 2005). Dans la MHb, les récepteurs GABA-A sont excitateurs et conduisent à une décharge tonique des neurones de la vMHb suivie par une inhibition lente médiée par les récepteurs GABA-B chez le rat juvénile (Kim and Chung, 2007).

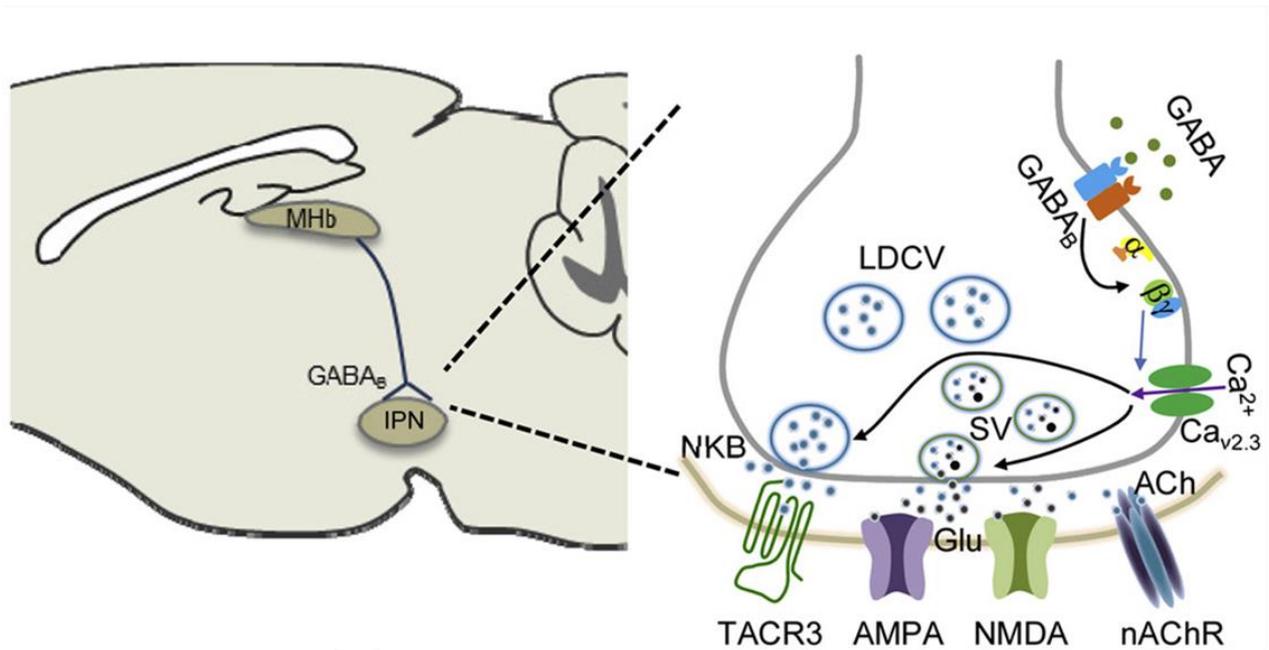


Figure 10. Diagramme représentant la cascade de signalisation possible sous-jacente des récepteurs pré-synaptiques GABA-B de la vMHb.

L'activation des récepteurs GABA-B par le GABA conduit à l'ouverture des canaux calciques Cav2.3. L'influx de calcium qui en résulte stimule la sécrétion d'acétylcholine (ACh), de glutamate (Glu) et de neurokinine B (NKB) vers les synapses de l'IPN. LDCV : vésicules larges à noyau dense, SV : petites vésicules synaptiques. Adaptée de Zhang et al., 2016

Ces neurones se caractérisent également par l'absence d'un rebond de trains de décharges neuronales à la suite d'une hyperpolarisation transitoire. Durant la période juvénile, la transmission glutamatergique sur la dMHb, médiée par les récepteurs AMPA perméables au calcium (CPAR), domine et est ensuite remplacée par une transmission GABAergique excitatrice médiée par les récepteurs GABA-A chez la souris adulte (Koppensteiner et al., 2016). De manière intéressante, les récepteurs pré-synaptiques GABA-B de la vMHb ont aussi un effet exceptionnellement excitateur sur l'IPN. En effet, ces récepteurs amplifient l'entrée de calcium pré-synaptique via les canaux Cav2.3 et stimulent ainsi la sécrétion combinée d'acétylcholine, de glutamate et de neurokinin B. Ces récepteurs GABA-B sont probablement activés par le GABA sécrété par l'IPN amplifiant ainsi l'effet excitateur de la MHb sur l'IPN (**Figure 12**) (Zhang et al., 2016).

1.3.4.1.3. Connexions de la MHb

La MHb reçoit des afférences provenant de différentes structures, à savoir le septum triangulaire (TS), le noyau du lit de la commissure antérieure (BAC), le noyau septofimbrial (SFi), le septum médian (MS), le noyau de la bande diagonale (nDB), l'aire tegmentale ventrale (VTA), le raphe médian (MnR), le noyau accumbens (NAcc), le locus coeruleus (LC) et le ganglion cervical supérieur (superior cervical ganglion or SCG) (**Figure 16**).

La MHb projette sur la glande pinéale (Pi), et envoie quelques efférences vers la LHB et la VTA. Cependant, la MHb projette principalement sur l'IPN (**Figure 16**). Certaines de ces études anatomiques ont été réalisées il y a plusieurs années, avec des techniques qui ne permettaient pas toujours de cibler très spécifiquement les régions et doivent donc être prises avec précaution. Le résumé des afférences de la MHb et des techniques descriptives employées est présenté dans le **tableau 1** et celui des efférences de la MHb dans le **tableau 2**.

Afférences		
Structure	Références	Méthode
nTS	Herkenham et Nauta (1977)	Injection de HRP dans la MHb
	Qin and Luo (2009)	Injection de BDA dans la MHb
MS	Qin and Luo (2009)	Injection de BDA dans la MHb
nDB	Herkenham et Nauta (1977)	Injection de HRP dans la MHb
	Qin et Luo (2009)	Injection de BDA dans la MHb
SFi	Herkenham et Nauta (1977)	Injection de HRP dans la MHb
	Qin et Luo (2009)	Injection de BDA dans la MHb
BAC	Qin et Luo (2009)	Injection de BDA dans la MHb
VTA	Phillipson et Pycock (1982)	Destruction des neurones DA ⁺ de la VTA en utilisant de la 6-Hydroxydopamine et dosage de la dopamine dans la MHb
LC	Gottesfeld (1983)	Lésion des fibres noradrénergiques du LC
SCG	Phillipson et Pycock (1982)	Gangliectomie cervicale et dosage de la dopamine et de la noradrénaline dans la MHb
	Gottesfeld (1983)	
MnR	Herkenham and Nauta (1977)	Injection de HRP dans la MHb
	Conrad et al (1974)	Injection de ³ H-Proline dans le MnR
NAcc	Powell.EW et al. (1976)	Injection de ³ H-Leucine dans le NAcc

Tableau 1. Afférences de la MHb.

nTS : septum triangulaire, MS : septum médian, nDB : noyau de la bande diagonale, SFi : noyau septofimbrial, BAC : noyau du lit de la commissure antérieure, VTA : aire ventrale tegmentale, LC : locus cœruleus, SCG : ganglion cervical supérieur, MnR : raphé médian, NAcc : Noyau accumbens, HRP : peroxydase de raifort, BDA : amine dextran biotinylé. DA : dopamine

Efférences		
Structure	Références	Méthode
IPN	Way (1975)	Lésion chirurgicale ou électrolytique de la MHb
	Qin and Luo (2009)	Injection de TRDA dans la MHb
Pi	Ronnekleiv et Moller (1979)	Lésion chirurgicale ou électrolytique de la MHb et microscopie électronique
LHb	Kim and Chang (2005)	Marquage des neurones de la MHb et de la LHb à la biocytine
	Contestabile et Flumerfelt (1981)	Injection de HRP dans la LHb
VTA	Contestabile et Flumerfelt (1981)	Injection de HRP injection dans la partie interfasciculaire de la VTA

Tableau 2. Efférences de la MHb.

TRDA : amine dextran Texas Red

I.3.4.2. Le noyau interpédonculaire (IPN)

I.3.4.2.1. Développement de l'IPN

Le développement de l'IPN a été étudié chez le poulet. L'IPN est constitué d'au moins cinq sous-populations différentes générées à partir de quatre domaines progéniteurs dorso-ventrales localisés dans l'isthme et le rhombomère 1 (r1). Ces sous-populations sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription PAX7, Otp, Nkx6.1 ou Otx2 (Lorente-Cánovas et al., 2012). Les domaines progéniteurs de l'IPN peuvent être divisés en trois régions rostro-caudales selon les domaines d'expression de ces facteurs de transcription : le domaine de l'isthme, le domaine rostral r1 et le domaine caudal r1 (**Figure 13 A-C**).

Les progéniteurs Nkx6.1+ dans l'isthme génèrent les neurones formant le sous-noyau prodromal de l'IPN (**Figure 13 A, D**). Ceux exprimant Nkx6.1 dans la plaque intermédiaire basale génèrent des neurones qui vont migrer dans le sous-noyau centro-latéral du rIPN (RCL) (**Figure 13 B, D**).

Les neurones post-mitotiques PAX7+ générés à partir de la plaque alaire de r1 migrent massivement de manière tangentielle dans la plaque basale de r1 (**Figure 13 B-D**). Ces neurones migrent ensuite radialement pour contribuer à la formation des parties rostrale et caudale de l'IPN. Cette migration est peut-être délimitée au domaine r1 par un effet de restriction direct ou indirect de Fgf8 sécrété par l'organisateur isthmique et de Hoxa2 exprimé dans le r2. L'existence de progéniteurs coexprimant ces deux facteurs de transcription suggèrent la présence d'un cinquième type de progéniteurs distribué en sel et poivre et mélangé à des progéniteurs purement PAX7 sur la bordure ventrale de la plaque alaire. Les neurones PAX7+/Otp+ de l'IPN proviendraient de progéniteurs localisés dans la partie rostrale de r1 tandis que les neurones PAX7/Otp- proviendraient de progéniteurs localisés dans les parties rostrale et caudale du r1 (**Figure 13 B,D**). Les neurones PAX7+/Otp+ entrent préférentiellement dans les sous-noyaux médiodorsal (RDM) et intermédiaire (RI) du rIPN. Les neurones PAX7+/Otp- migrent dans les autres parties de l'IPN, soutenant l'idée que ces deux populations PAX7 sont distinctes. Les neurones PAX7-/Otp+ sont quant à eux générés dans la partie latérale adjacente de la plaque basale et migrent dans le rIPN. Les neurones Otx2+ sont produits à partir des progéniteurs Nkx6.1 localisés dans la zone intermédiaire de la partie caudale de r1. Les neurones post-mitotiques se mettent à exprimer Otx2 et forment le domaine Otx2+ en-dessous de la zone progénitrice Nkx6.1. Les neurones Otx2+ représentent la population majoritaire de l'IPN caudal (cIPN), notamment les sous-noyaux médio-latéraux avec les neurones Pax7+ (**Figure 13 C-D**).

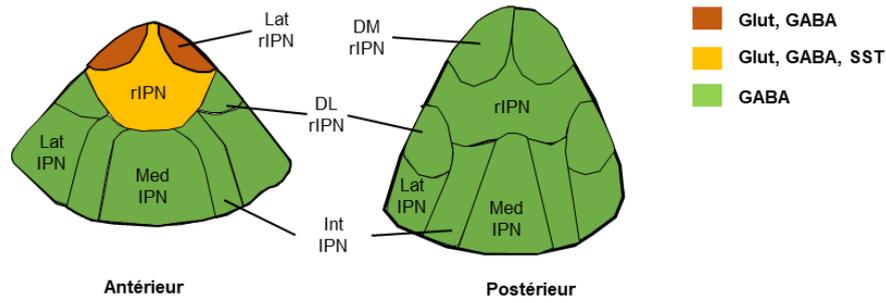


Figure 13. Répartition des neurotransmetteurs dans les parties antérieure et postérieure de l'IPN représenté en coupe coronale.

rIPN : IPN rostral, lat rIPN : Partie latérale du rIPN, DM rIPN : partie dorso-médiane du rIPN, DL rIPN : partie dorso-latérale de l'IPN rostral, Lat IPN : partie latérale de l'IPN caudal, Int IPN : parties intermédiaires de l'IPN caudal, Med IPN : partie médiane/centrale de l'IPN caudal

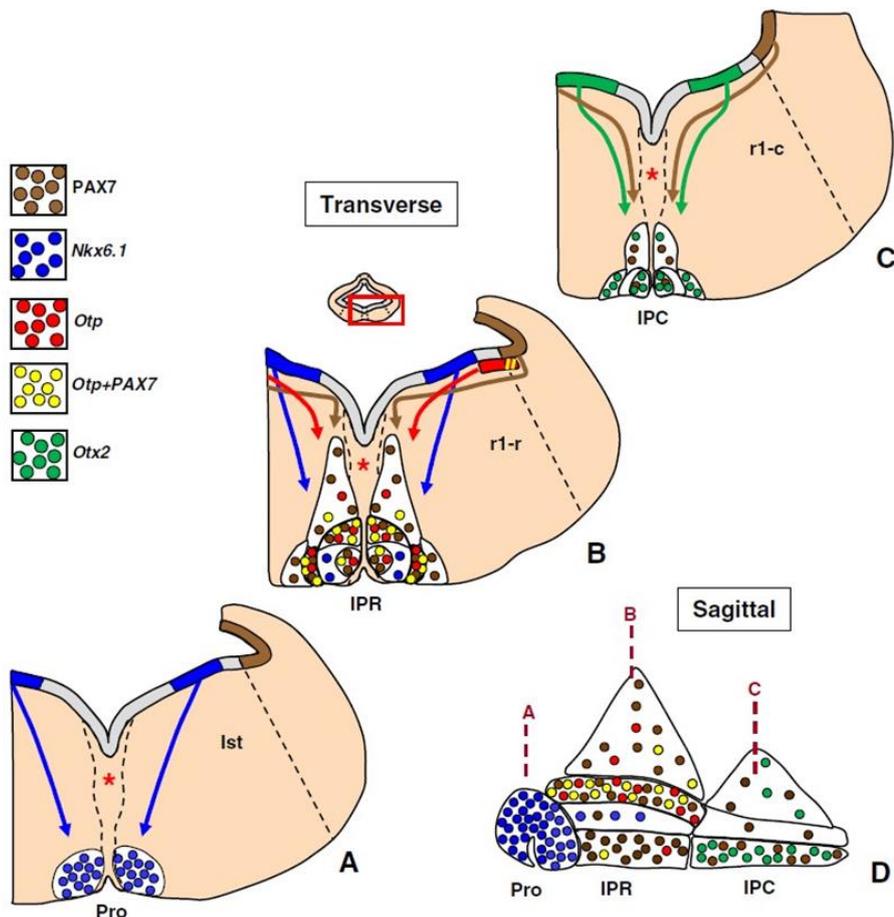


Figure 14. Représentation de l'origine des sous-population de l'IPN au sein de l'isthme et du rhombomère r1 et de leur destination finale dans l'IPN.

A-C, Schéma de sections transverses au niveau de l'isthme (Ist), du rhombomère r1 rostral (r1-r) et caudal (r1-c) respectivement. La distribution des domaines progéniteurs PAX7, Nkx6.1, Otp et Otx2 sont illustrés par des codes couleur. La destination des sous-populations qui en découlent sont représentés par les même codes couleur. A, Illustration de la formation isthmique des neurones du domaine prodromal Nkx6.1+. B,C, Illustration des différentes trajectoires des sous-populations de l'IPN formées dans le r1-r et le r1-c respectivement. D, Répartition sagittale des sous-populations de l'IPN. Le niveau des sections transverses A,B,C est indiqué par les pointillés rouges. RCL : noyau centro-latéral du rIPN, RDM : sous-noyau médiadorsal du rIPN, RI : sous-noyau intermédiaire du rIPN. Adapté de Lorente-Cánovas et al., 2012

Plus précisément, les neurones Pax7⁺ migrent dans les parties intermédiaires du cIPN (Int cIPN) tandis que les neurones Otx2⁺ migrent pour former les parties latérales et médianes du cIPN (Lat cIPN et Med cIPN respectivement) (**Figure 14**).

1.3.4.2.2. Caractéristiques cellulaires de l'IPN

Les sous-noyaux de l'IPN sont principalement GABAergiques. Toutefois, dans la partie antérieure de l'IPN, les neurones de la partie latérale du rIPN (Lat rIPN) sont majoritairement glutamatergiques et contiennent également quelques neurones GABAergiques (Quina et al., 2017). Le rIPN contient des neurones glutamatergiques et GABAergiques. Une partie des neurones GABAergiques du rIPN coexpriment également la somatostatine (SST), un neurotransmetteur proposé comme médiant les symptômes physiques du sevrage à la nicotine (Zhao-Shea et al., 2013). Le reste de l'IPN est exclusivement GABAergique : la partie dorso-latérale du rIPN (DL IPN) dans la partie antérieure de l'IPN, les parties latérales (Lat IPN), intermédiaires (Int IPN), et la partie centrale/médiane du cIPN (Med IPN) mais aussi dans les parties dorso-médianes du rIPN dans l'IPN postérieur (**Figure 14**).

1.3.4.2.3. Connexions de l'IPN

Les principales afférences de l'IPN proviennent de la MHb. Les neurones de la dMHb, comprenant des neurones substance-P-ergiques, innervent les parties latérales du cIPN. Les neurones de la vMHb, qui sont cholinergiques, projettent dans le reste de l'IPN, à savoir le rIPN et les parties dorso-médianes, intermédiaires et médianes du cIPN (Contestabile et al., 1987) (**Figure 15**).

En plus des afférences de la MHb, l'IPN reçoit également des afférences provenant principalement de structures limbiques. Ces afférences incluent la branche horizontale du noyau de la bande diagonale (nhDB), la substantia innominata (SI), le noyau préoptique (POA), le septum, les noyaux hypothalamiques, les noyaux prémamillaire (PreMM) et supramamillaire (SuMM), la substance grise périaqueducale (PAG), les noyaux du raphé et du tegmentum et le locus cœruleus (LC).

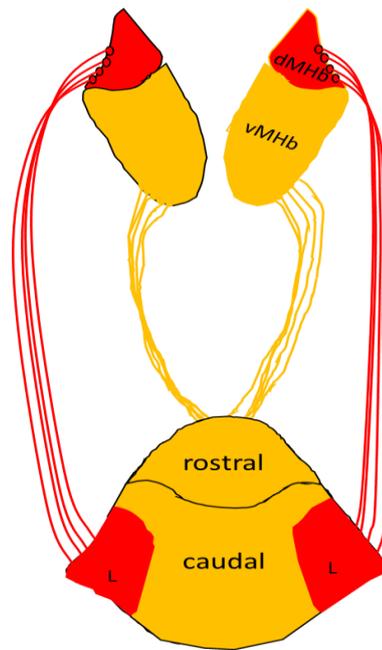


Figure 12. Afférences de la MHB sur l'IPN.

Rouge : afférences des neurones de la dMHb sur les parties latérales du cIPN. Orange : afférences des neurones de la vMHb sur le reste de l'IPN

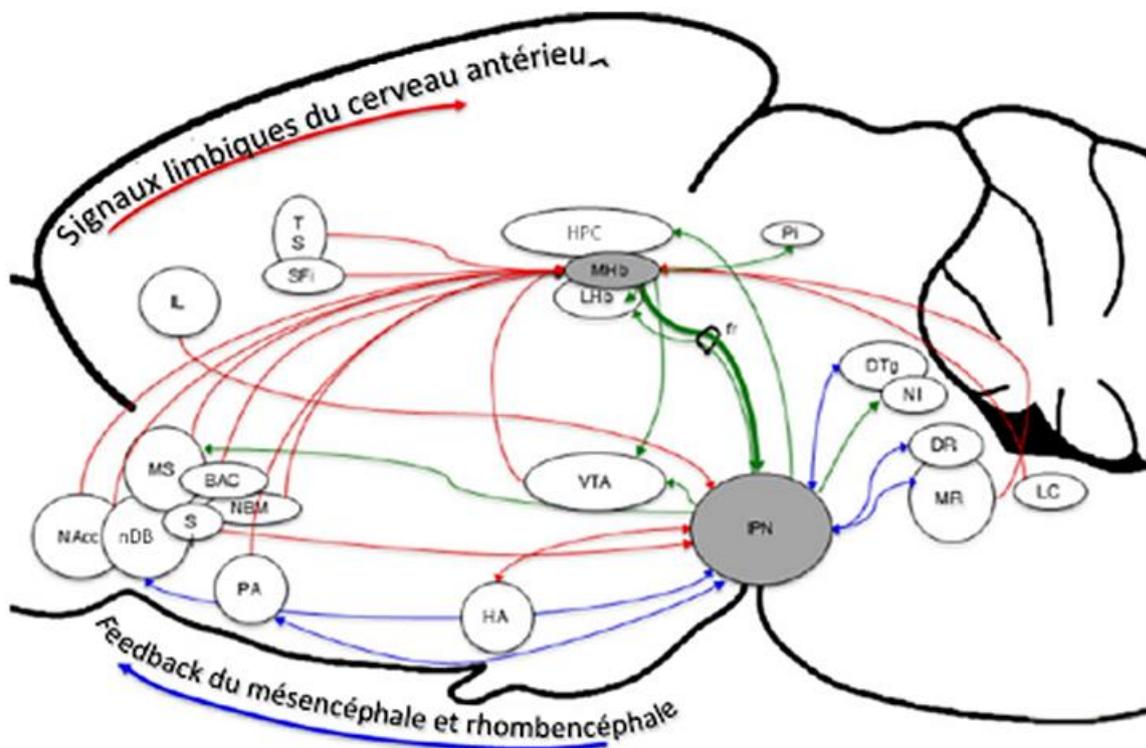


Figure 11. Principales afférences et efférences du HIPS.

La MHB reçoit de nombreuses afférences du système limbique. L'IPN projette principalement vers les effecteurs monoaminergiques et envoie également un feedback vers le système limbique. Adapté de McLaughlin et al., 2017

L'IPN projette sur de nombreuses structures qui régulent l'état émotionnel dans le mésencéphale et rhombencéphale, à savoir les noyaux du raphé, les noyaux du tegmentum, l'aire ventrale tegmentale (VTA), la substance grise périaqueducule (PAG), le noyau incertus (NI). Il renvoie également des afférences vers les structures du système limbique.

Certaines études anatomiques ont été réalisées il y a plusieurs années, avec des techniques qui ne permettaient pas toujours de cibler très spécifiquement les régions et doivent donc être prises avec précaution. Un résumé décrivant les afférences de l'IPN et les techniques d'identification utilisées est présenté dans le tableau 3 et un résumé décrivant les efférences de l'IPN est présenté dans le tableau 4. Les connexions générales du HIPS sont résumées dans la **Figure 16**.

Afférences		
Structure	Références	Méthode
nhDB	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
	Vertes and Fass (1988)	Injection de WGA-HRP dans le nhDB
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
SI	Vertes and Fass (1988)	Injection de WGA-HRP dans la SI
SFi	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
MS + nvDB	Vertes and Fass (1988)	Injection de WGA-HRP dans le MS et nvDB
POA	Hamill and Jacobowitz (1984)	Injection de Fast blue dans l'IPN
	Shibata et al. (1986)	Injection de WGA-HRP dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
LH	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine injection dans le LH
DM	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
MHb	Cuello et al. (1978)	Lesion du fasciculus retroflexus
	Contestabile.A et al. (1987)	Immunohistochimie de substance P et de ChAT dans la MHb et l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection d'AAVeGFP dans la MHb de souris ChAT-Cre ou d'AAVeGFP dans les Tac1Cre
PreMM	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
SuMM	Contestabile et al. (1981)	HRP injection dans l'IPN (+)
	Hamill and Jacobowitz (1984)	Injection de Fast blue dans l'IPN
	Shibata et al. (1986)	Injection de WGA-HRP dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
PAG	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN

Afférences		
Structure	Références	Méthode
MnR	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
DR	Shibata et al. (1986)	Injection de WGA-HRP dans l'IPN
	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
LDTg	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
	Shibata et al. (1986)	Injection de WGA-HRP dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
DTg	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
	Shibata et al. (1986)	Injection de WGA-HRP dans l'IPN
PDTg	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN
LC	Hamill et al. (1984)	Injection de Fast blue dans l'IPN
	Contestabile et al. (1981)	Injection de HRP dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de CTB dans l'IPN

Tableau 3. Afférences de l'IPN.

nhDB : branche horizontale le noyau de la bande diagonale, nvDB : branche verticale du noyau de la bande diagonale, SI : *substantia innominata*, POA : aire préoptique, LH : hypothalamus latéral, DM : hypothalamus dorso-médian, MS : septum médian, SFi : noyau septofimbral, PreMM : noyau prémamillaire, SuMM : noyau supramamillaire, LDTg : noyau du tegmentum latérodorsal, DTg : noyau du tegmentum dorsal, PDTg : noyau du tegmentum postéro-dorsal, LC : locus coeruleus

Références		
Structure	Références	Méthode
nhDB	Vertes and Fass (1988)	Injection de WGA-HRP dans le nhDB
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
LS	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine dans l'IPN ou injection de HRP/WGA-HRP dans le septum
	Vertes and Fass (1988)	Injection de HRP/WGA-HRP dans le LS
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection de CTB dans le LS
SHy	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
MS + nvDB	Vertes and Fass (1988)	Injection de WGA-HRP dans le MS et nvDB
	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection de CTB dans le MS
POA	Hayakawa et al. (1981)	Injection de HRP injection dans le POA
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection de CTB dans POA + LH
LH	Groenewegen et al. (1986)	Injection de HRP/WGA-HRP dans l'hypothalamus
	Kemali et al. (1982)	HRP injection in the IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection de CTB dans POA + LH
DM	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
LHb	Massopust et al. (1962)	Lésion électrique de l'IPN
	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
HPC	Wyss et al. (1979)	Injection de HRP dans le HPC
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection de CTB dans la région CA3 du HPC
SuMM	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
VTA	Hayakawa et al. (1981)	Lésion électrique de l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection de CTB dans la VTA

Efférences		
Structure	Références	Méthode
PAG	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
MnR	Behzadi et al. (1990)	Injection de CTB dans le MnR
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection d'AAVeGFP dans l'IPN Injection de CTB dans le MnR de souris GABACre
DR	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection d'AAVeGFP dans l'IPN
LDTg	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection d'AAVeGFP dans l'IPN Injection de CTB dans la LDTg
DTg	Shibata and Suzuki (1984)	Injection de HRP dans la DTgD ou DTgC
	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine dans l'IPN
PDTg	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
LC	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
NI	Groenewegen et al. (1986)	Injection de ³ H-leucine dans l'IPN
	Lima.LB et al. (2017)	Injection de PHA-L dans l'IPN
	Quina.LA et al. (2017)	Injection d'AAVeGFP dans l'IPN

Tableau 4. Efférences de l'IPN.

SHy : Noyau septohippocampal, HPC : hippocampe, NI : noyau incertus, PHA-L : Phaseolus vulgaris leucoagglutinin

Une fois générés dans le prosomère p1, les neurones formant la MHb commencent à envoyer leurs projections vers l'IPN grâce à différentes molécules de guidage. Les neurones formant l'IPN sont produits au niveau de l'isthme et du rhombomère r1 à partir de différentes sous-populations de progéniteurs exprimant les facteurs de transcription Nkx6.1, PAX7, Otp, PAX7/Otp ou Otx2. Ces neurones migrent ensuite ventralement pour former l'IPN. La MHb et l'IPN sont constitués de sous-noyaux caractérisés par des signatures moléculaires différentes suggérant qu'ils sont impliqués dans des fonctions différentes. La MHb est entièrement glutamatergique mais des sous-groupes de neurones sécrètent également d'autres neurotransmetteurs, à savoir l'acétylcholine, la substance P et l'interleukine 18. L'IPN est principalement GABAergique mais quelques neurones sont glutamatergiques dans la partie antérieure du rIPN. Une sous-population de neurones GABAergiques du rIPN exprime également la somatostatine. Les signaux limbiques du cerveau antérieur sont transmis à la MHb qui active ainsi l'IPN. A son tour, l'IPN active les effecteurs mono-aminergiques et envoie des signaux de rétroaction au mésencéphale et au rhombencéphale. L'IPN est la cible principale de la MHb, toutefois l'IPN reçoit aussi des afférences directes provenant de régions limbiques, dont certaines sont communes à la MHb. L'implication du HIPS dans les pathologies psychiatriques a été étudiée en altérant le HIPS chez l'adulte. Cependant, ces maladies trouvent principalement leur origine durant le développement selon l'hypothèse neuro-développementale, une hypothèse qu'il conviendrait de prendre en compte dans l'étude du HIPS en étudiant son développement, si l'on veut mieux comprendre l'origine des maladies impliquant ce système.

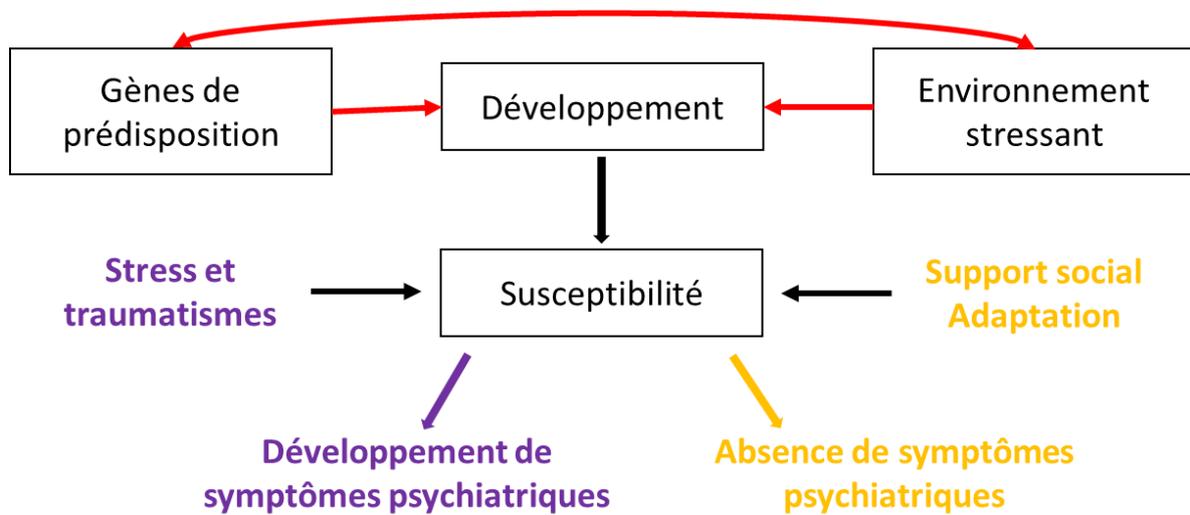


Figure 13. Hypothèse neuro-développementale.

L'interaction entre les gènes de prédisposition et les effets négatifs d'un environnement stressant conduit à la malformation de circuits neuronaux et génère une susceptibilité aux maladies psychiatriques à long-terme. Les symptômes peuvent ne pas se développer par la suite lorsque l'individu se trouve dans un environnement positif (support social, adaptation) ou peuvent être précipités à la suite d'autres stress vécus au cours de la vie.

II. Neuro-développement et plasticité

II.1.L'hypothèse neuro-développementale

Selon l'hypothèse neuro-développementale, bien que les maladies psychiatriques ne se manifestent parfois qu'à l'âge adulte, elles peuvent avoir une origine neuro-développementale. Il existe des périodes du développement, appelées périodes critiques du développement, pendant lesquelles la formation du cerveau, la diversité neuronale, la connectivité et la maturation des circuits neuronaux sont fortement influencées par les facteurs environnementaux et génétiques. Ce phénomène de plasticité peut être bénéfique en permettant aux individus de s'adapter à leur environnement. Dans certains cas, un stimulus environnemental est même nécessaire pour permettre le développement normal de certains circuits. Tel est le cas des jeunes oiseaux qui, d'après Konrad Lorenz, ont besoin d'être exposés à leurs congénères quelques heures suivant l'éclosion des œufs pour développer des attachements filiaux adaptatifs et développer une préférence pour un partenaire approprié plus tard dans leur vie. Toutefois, un dérèglement de l'expression de gènes de développement et/ou des conditions environnementales défavorables peuvent conduire à une malformation ou un dysfonctionnement des circuits neuronaux, créant à long-terme une susceptibilité aux maladies psychiatriques. La combinaison de ces facteurs génétiques et environnementaux durant ces périodes critiques et le type d'expériences rencontrées plus tard au cours de la vie, qui peuvent être négatifs (environnement stressant, traumatismes) ou positifs (support social, habituation), déterminent la probabilité pour un individu de développer une maladie psychiatrique à un moment de sa vie (**Figure 17**). Cette hypothèse neuro-développementale a principalement été fondée sur des travaux concernant la schizophrénie et l'autisme (McGrath et al., 2003; Fatemi and Folsom, 2009), cependant d'autres études ont émergé pour montrer que l'hypothèse neuro-développementale s'applique également à l'anxiété, la dépression et l'addiction (Heim and Nemeroff, 2001; Walters and Kosten, 2019).

II.1.1. Les facteurs génétiques

L'étude génétique des familles et des jumeaux a permis de révéler clairement la contribution des facteurs génétiques dans les maladies neuro-développementales complexes. Cependant, bien que la notion de gènes de susceptibilité ait été bien établie, il reste difficile

d'identifier précisément les gènes impliqués dans ces pathologies. Pour identifier les gènes de susceptibilité et mieux comprendre la pathophysiologie de ce type de maladies neuro-développementales complexes, des outils génétiques, biochimiques, pharmacologiques et neurologiques ont été utilisés.

II.1.1.1. Gènes impliqués dans l'addiction

Les études menées sur les jumeaux dans les pathologies liés aux maladies psychiatriques, indiquent un niveau d'héritabilité entre 50-60% pour l'alcoolisme (Hiroi and Agatsuma, 2005) et jusqu'à 70% pour le tabagisme sévère (Sullivan and Kendler, 1999). À la vue de leur implication dans le système des récompenses, les gènes liés à la voie dopaminergique sont considérés comme des gènes de susceptibilité à l'addiction. En effet, de nombreuses études ont identifié des polymorphismes au niveau de ces gènes : des variations génétiques dans les gènes DRD2, DRD3, COMT and DAT1 ont été associées au tabagisme, à l'alcoolisme, à la consommation de cocaïne et à l'addiction à l'héroïne (Muramatsu and Higuchi, 1995; Horowitz et al., 2000; Guindalini et al., 2006). Cependant, malgré les nombreuses études faites sur ce sujet, les méta-analyses montrent que les effets sont faibles voire non significatifs (Munafò et al., 2007)

II.1.1.2. Gènes impliqués dans l'anxiété

Les facteurs génétiques contribuent modestement (30-40 %) à la prévalence de l'anxiété pathologique (Hettema et al., 2001). Toutefois, des études sur les liens génétiques et des études d'association ont été réalisées pour déterminer la localisation chromosomique des gènes impliqués dans les différents sous-types d'anxiété (van Loo and Martens, 2007). Des études cas-contrôles ont également été réalisées pour identifier des gènes associés à l'anxiété. On retrouve dans cette liste les gènes codant les récepteurs à la sérotonine HTR1A et HTR2A, COMT, le neuropeptide cholécystokinine (CCK), le récepteur à l'adénosine A2a (ADORA2A), MAOA, le facteur de transcription nucléaire modulateur d'éléments sensibles au cAMP (CREM), le récepteur périphérique au benzodiazépine (PBR ou TSPO), l'acide glutamique décarboxylase 1 (GAD1), l'inhibiteur de liaison au diazépam (DBI), la protéine kinase b dépendante de la calmoduline kinase (CaMKKb) et l'enzyme convertissant l'angiotensine (ACE) (van Loo and Martens, 2007). Des études d'association sur 90 SNP localisés sur 21

gènes candidats ont révélé 8 SNP associés au trouble de la panique, localisés dans des gènes impliqués dans les systèmes dopaminergiques, sérotoninergiques et dans le CCK, mais leurs effets individuels restent mineurs (Maron et al., 2005). Le gène *BDNF* a également été identifié comme un gène de susceptibilité associé à des traits de personnalité anxieux (Hünnerkopf et al., 2007).

II.1.1.3. Gènes impliqués dans la dépression

La dépression est une maladie hétérogène, la contribution génétique est seulement de ~37% (Kendler and Karkowski-Shuman, 1997). Pour l'instant, les facteurs de risque génétique n'ont pas été identifiés. La plupart des études se sont focalisées sur des polymorphismes déjà connus comme étant associés à d'autres maladies psychiatriques, à savoir le variant Val66Met du gène *BDNF*, l'allèle court codant le gène *SLC6A4* et le variant Val158Met du gène codant l'enzyme catéchol-O-méthyl-transférase ou COMT (Caspi et al., 2003; Massat et al., 2005; Schumacher et al., 2005), mais les résultats sont contradictoires et ne permettent pas de conclure.

Différents facteurs génétiques contribuent donc au développement de l'anxiété, de la dépression et de l'addiction. Toutefois, le développement de ces pathologies dépend surtout beaucoup des facteurs environnementaux. Or, les conséquences sur le comportement de l'individu ne seront pas les mêmes suivant la temporalité et la phase de maturation sexuelle à laquelle ces facteurs interviennent.

II.1.2. Les facteurs environnementaux

L'exposition à des traumas ou à des événements stressants au cours de la vie est un facteur de risque pour le développement des pathologies psychiatriques liées à un dysfonctionnement des systèmes de récompense (Hettema et al., 2005). Les stress peuvent donc constituer un facteur de prédisposition aux maladies psychiatriques, en interaction durant les périodes critiques du développement avec les facteurs de prédisposition génétiques. Les effets d'un stress dépendent du nombre de stressors, des types de stress subis, de leur fréquence, de leur intensité mais surtout de la période à laquelle ils sont subis. Une des raisons, pour laquelle les facteurs génétiques pourraient être des facteurs de susceptibilité, serait leur influence sur la

réponse d'un individu à un stress donné et la probabilité pour cet individu d'être exposé à certaines situations stressantes.

II.1.2.1. Les différents types de stress

Dans le cas des pathologies qui nous intéressent, la période prénatale, l'enfance précoce et l'adolescence constituent les périodes critiques pendant lesquelles le stress peut avoir un effet particulièrement délétère (Pervanidou and Chrousos, 2018). Par exemple, un stress durant la gestation augmente la prévalence de l'anxiété, de la dépression et des défauts de l'attention chez l'enfant mais aussi celle de l'autisme et de la schizophrénie (Talge et al., 2007; Beydoun and Saftlas, 2008; Darnaudéry and Maccari, 2008).

Les types de stress peuvent être de différente nature à savoir d'ordre gestationnel (grossesse non désirée, grossesse difficile), il peut aussi s'agir de complications obstétriques, d'une infection virale ou bactérienne, de la perte précoce d'un parent ou une séparation, d'un abus physique, moral ou sexuel, de la survenue d'une catastrophe naturelle, ou encore d'un stress social.

Un stress expérimenté une seule fois est appelé stress aigu. Lorsque le stress est répété de manière régulière ou ponctuelle dans le temps on parle alors de stress chronique. Bien que les stress aigus puissent être assez forts pour provoquer des symptômes psychiatriques et provoquer notamment un stress post-traumatique ou une dépression, ils ne récapitulent que très peu d'aspects de ces pathologies et ne sont pas efficaces pour étudier les effets à long-terme, les modèles animaux récapitulant les maladies psychiatriques sont principalement basés sur des modèles de stress chronique (Lezak et al., 2017; Söderlund and Lindskog, 2018).

II.1.2.1.1. Les modèles animaux de stress

a. Modèles prénataux

Comme il est mentionné précédemment, les modèles prénataux consistent à récapituler une infection virale ou bactérienne pendant la grossesse ou à imiter un stress gestationnel.

- Modèle d'infections virales/bactériennes

Parmi ces modèles, des souris gestantes ont été exposées à des rétrovirus, tels que le virus de la grippe, le poliovirus, la rubéole, la rougeole, le virus varicelle-zona ou encore des agents bactériens (Meyer et al., 2009; Marco et al., 2011) (**Figure 18 A**). Par exemple, une stimulation de la réponse virale par une injection d'acide poly-inosinique-poly-cytidylique (Poly-I:C) conduit à long-terme à une suppression de l'activité exploratoire, à des anomalies dans l'apprentissage associatif sélectif et à des défauts dans le comportement social. Une stimulation du système immunologique maternel modifie aussi à long-terme le niveau des neurotransmetteurs dans le cerveau de la progéniture à l'âge adulte, incluant des changements du niveau de dopamine et de sérotonine principalement au sein du système limbique (Marco et al., 2011). Cette réponse maternelle immune, impliquant particulièrement les cytokines pro-inflammatoires interfère avec le développement et la maturation normale du cerveau et conduit à des défauts structurels et fonctionnels qui altèrent les comportements.

- Modèle de stress psychologique : la restrainte

Un stress psychologique durant la période de gestation chez la souris peut être récapitulé par un stress de type restrainte qui consiste à limiter les mouvements ou à immobiliser complètement l'animal, en le plaçant dans un cylindre adapté à sa taille ou en fixant l'animal sur un support qui empêche ses mouvements, sans provoquer aucune douleur physique (**Figure 18 B**). Ce type de stress peut provoquer chez la progéniture une altération du développement cognitif et émotionnel. Une étude a notamment montré qu'un stress de type restrainte appliqué pendant 45 min trois fois par jour pendant la dernière semaine de gestation (jour de gestation 11 jusqu'à la naissance) rend la progéniture moins sociable, augmente le niveau d'anxiété et rend les souris plus vulnérables à la consommation de drogues à l'adolescence (Maccari et al., 2003).

- Modèle de stress physique : le footshock

Ce type de stress consiste à délivrer des chocs électriques aux pattes de l'animal à intervalles de temps réguliers (**Figure 18 C**). Tout comme dans le modèle de restrainte prénatale, ce type de stress a été principalement appliqué durant la dernière semaine de gestation trois fois par jour (Weinstock, 2008).

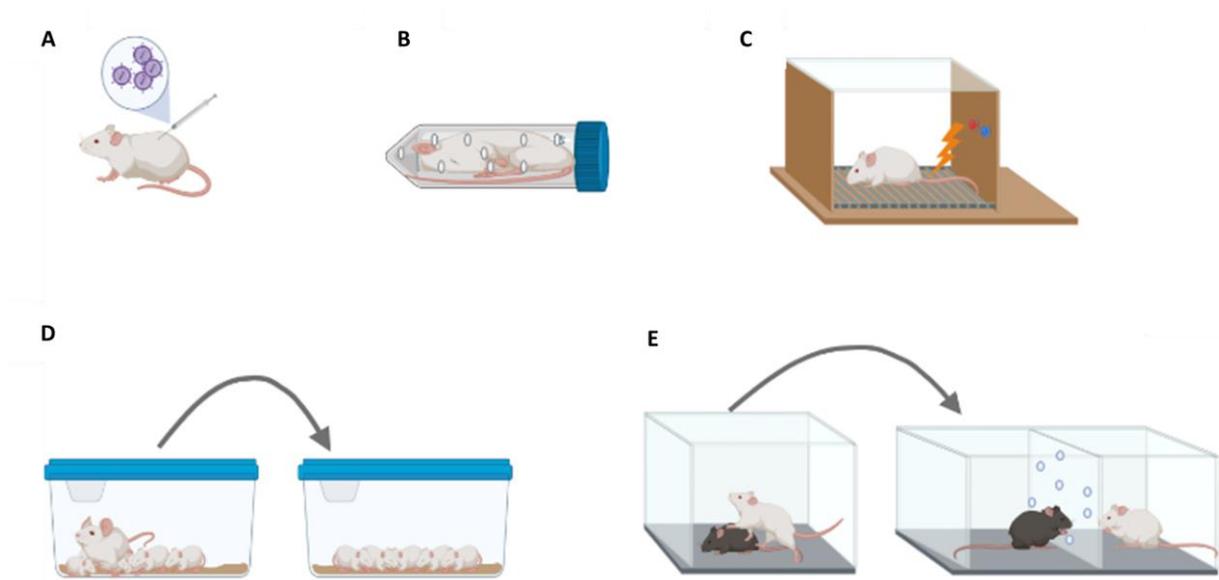


Figure 14. Types de stress

A, Infection virale/bactérienne durant la gestation. **B**, Stress de type restreinte, l'animal est immobilisé pendant un temps donné. **C**, Footshock : l'animal reçoit des chocs électriques au niveau des pattes à intervalle de temps régulier. **D**, Séparation maternelle, les petits sont séparés de la mère pendant un temps donné. **E**, Stress de défaite sociale : l'animal est mis en contact d'un agresseur pendant 5-10 min puis les deux souris sont placées dans une cage dont les deux compartiments sont séparés par un plexiglas perforé qui leur permet de se voir et de communiquer mais pas de se toucher. L'opération est répétée chaque jour avec un nouvel agresseur pendant 10 jours.

b. Modèles post-nataux

- **Modèle de séparation maternelle**

Les deux premières semaines post-natales constituent une période au cours de laquelle les rongeurs sont protégés des effets du stress grâce aux soins maternels. Cette période est appelée la période hypo-sensible au stress ou stress hypo-responsive period (SHRP) (Levine, 2002). Au moins trois aspects du comportement maternel jouent un rôle dans la régulation de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien (HPA) durant le développement. Le premier aspect est la stimulation tactile qui apparaît comme étant capable d'inhiber la plupart des changements au niveau du cerveau qui pourraient être causés par un stress. Le deuxième aspect est l'allaitement par la mère qui est essentiel pour maintenir la désensibilisation des glandes cortico-surrénales aux effets du stress et réduire leur sensibilité à l'adrénocorticotrophine (ACTH). Le troisième aspect est le contact passif qui supprime la réponse au stress. Toutefois, un stress dont la fréquence et/ou l'intensité est suffisamment forte reste capable de créer une susceptibilité ou de provoquer directement des symptômes psychiatriques. Le modèle de séparation maternelle est le modèle de stress chronique néonatal le plus communément utilisé pour récapituler la négligence maternelle. Ce type de stress consiste à séparer les petits de la mère et du nid de quelques minutes à quelques heures par jour sur plusieurs jours (**Figure 18 D**). En l'absence de contact avec la mère et d'allaitement, les petits ne sont plus protégés des effets du stress. Cette séparation maternelle chronique réduit également les comportements maternels de la mère envers ces petits (Aguggia et al., 2013). Pour diluer l'effet protecteur de la présence de la mère durant l'intervalle entre chaque stress, la mère et ses petits sont placés dans un environnement pauvre en matériaux de nidification, ce qui entraîne chez la mère un comportement maternel fragmenté et erratique. Ce type de stress conduit à une réponse exagérée de l'axe HPA et est capable de provoquer des symptômes anxieux et dépressifs.

- **Modèle de stress psychologique : la restreinte**

Le principe est le même que pour la restreinte appliquée durant la période prénatale. Ce modèle de stress peut être utilisé à tout âge (**Figure 18 B**). Tout comme pour la restreinte prénatale, ses effets dépendent de la durée de la restreinte, de sa fréquence, de son intensité et de la période à laquelle elle est appliquée, celle-ci pouvant avoir un effet positif ou négatif en

fonction de la période en question, mais cet effet n'est pas linéaire (Buynitsky and Mostofsky, 2009). Les contraintes chroniques sont principalement appliquées à des animaux après le sevrage. Ce type de stress peut également provoquer des symptômes anxieux, dépressifs et des symptômes d'addiction (Torres-Berrio et al., 2018).

- **Modèle de stress social : la défaite sociale**

Ce modèle de stress consiste à mettre en contact les souris d'intérêt (appelé l'intrus) avec des mâles âgés de la souche CD1 (appelé le résident) qui sont connus pour leur agressivité. Les mâles CD1 agressifs ayant une latence d'attaque très courte sont sélectionnés et logés dans un des compartiments d'une cage contenant un séparateur en plexiglass perforé, ce qui permet de maintenir le contact sensoriel avec l'intrus tout en évitant tout contact physique. Les souris intruses sont mises en contact avec l'agresseur entre 5-10 min puis elles sont logées à côté de l'agresseur, de l'autre côté du séparateur en plexiglas pour le reste de la journée. L'expérience est répétée tous les jours pendant 10 jours en remplaçant l'agresseur par un nouvel individu chaque jour pour éviter une habituation (**Figure 18 E**). Ce modèle est celui qui se rapproche le plus de l'étiologie de la dépression chez l'homme et représenterait l'équivalent de l'intimidation ou d'un conflit parent-enfant. La défaite sociale conduit à un phénotype de dépression illustré par une augmentation du temps d'inactivité dans le test de la nage forcée, reflétant un comportement d'abandon, une relative indifférence aux boissons sucrées dans le test de la préférence au sucrose, reflétant une anhédonie, et une diminution de l'autostimulation intracrânienne, reflétant un défaut du système des récompenses (Krishnan and Nestler, 2008). Ce modèle de stress est principalement utilisé sur des souris adultes mais certaines études montrent également son efficacité chez la souris adolescente (Iñiguez et al., 2014).

- **Modèle de stress imprédictible**

Le modèle de stress imprédictible est un modèle de stress complexe qui peut consister soit en la répétition du même type de stress tous les jours mais à des heures et/ou à une intensité différente, soit en une combinaison de différents stress. Chaque jour, la combinaison des stress imposés, leur longueur ou leur ordre sont différents, ce qui empêche les animaux de s'habituer aux stress et les empêche de développer une certaine forme de résistance. De par son caractère imprédictible, ce modèle de stress est assez intense et peut induire des symptômes anxieux

même à très long terme (Chaby et al., 2015). Il représente un bon modèle de dépression (diminution de la réponse aux récompense et anhédonie (Willner, 2017). Tous les types de stress peuvent être utilisés dans ce modèle, il peut s'agir d'une combinaison de restriction, de chocs électriques au niveau des pattes, de nage forcée, d'une isolation sociale, de secousses de la cage, d'une inversion du cycle jour-nuit et de stressors sonores. Comme pour tous les autres modèles de stress, les effets de ce stress dépendent de son intensité, de sa fréquence et de la période à laquelle il est appliqué.

Tous les modèles de stress décrits précédemment permettent de mieux comprendre la contribution des facteurs environnementaux au développement du cerveau et aux anomalies comportementales associées au développement de maladies psychiatriques. Classiquement, les modèles de stress modifient le niveau des neurotransmetteurs, en particulier celui des systèmes dopaminergique et sérotoninergique (Stein, 2008; Hale et al., 2012). Ces modèles de stress cités ci-dessus à savoir la séparation maternelle, la restriction, la défaite sociale et le modèle de stress imprédictible impliquent également des anomalies concernant le niveau des neurotransmetteurs. Dans la plupart des procédures présentées précédemment, une dérégulation de l'axe HPA est assez communément observée. Le maintien adéquat des fonctions du système de stress est nécessaire pour maintenir l'homéostasie de l'individu. Au contraire, une altération de son fonctionnement physiologique peut conduire à des conséquences très délétères quant à la réponse au stress, c'est-à-dire une incapacité à s'adapter à des situations stressantes. Les études montrent que l'anxiété et la dépression majeure sont associées à des altérations chroniques des niveaux circulants des glucocorticoïdes dans le contrôle de la réactivité émotionnelle (Akil, 2005; de Kloet et al., 2007).

II.1.2.2. Dimorphisme sexuel

Un autre facteur important à considérer dans la prévalence de la dépression et de l'anxiété est le dimorphisme sexuel. Chez les femmes cette prévalence peut être jusqu'à deux fois supérieure à celle des hommes et elle est plus souvent associée à une autre comorbidité (McLean et al., 2011 ; Green et al., 2019). A l'opposé, la prévalence pour la consommation de drogue est plus élevée chez les hommes que chez les femmes, bien que l'écart entre les deux sexes ait diminué ces dernières décennies, mais les effets sont beaucoup plus néfastes chez les

femmes (McHugh et al., 2018). Les raisons de cette différence sont encore obscures. Il se pourrait que cela soit dû à des gènes de prédisposition portés par les chromosomes sexuels. Mais, il se pourrait aussi que cela soit dû à des périodes critiques de développement liées à la maturité sexuelle qui ne coïncident pas temporellement ainsi qu'à des contraintes et expériences environnementales différentes.

II.1.2.3. Susceptibilité vs résilience

Les périodes critiques de développement ne constituent pas seulement des périodes de plus forte sensibilité aux stimuli délétères. Les expériences positives peuvent également influencer le développement et la maturation des circuits neuronaux, prodiguant ainsi des capacités d'adaptation et une résistance accrue aux stimuli dont les conséquences sont délétères (Boyce and Ellis, 2005). Ces expériences positives peuvent aussi contrer les effets délétères des autres stress vécus (Laviola et al., 2008). La littérature met en avant deux types de stimuli capables de réduire les comportements associés à une exacerbation des émotions et les réponses de l'axe HPA aux stressseurs : la manipulation néonatale et l'enrichissement de l'environnement chez les adolescents (Fernández-Teruel et al., 2002; Laviola et al., 2004; Nithianantharajah and Hannan, 2006).

a. La manipulation néonatale

Une manipulation courte des nouveau-nés pendant 10 min une fois par jour durant toute la période de la lactation, ou même une séparation maternelle courte de 3 min par jour durant les trois premières semaines de leur vie réduisent les dommages physiologiques et comportementales provoqués par le stress (WEININGER et al., 1954; LEVINE et al., 1957). Cet effet est en partie due à un renforcement du comportement maternel en réponse à la manipulation des petits selon « l'hypothèse de la médiation maternelle » (Smotherman et al., 1980). Lorsque sa portée lui est retirée pendant une courte durée, la mère va s'occuper beaucoup plus de ses petits (Stern and Johnson, 1990). Les évidences qui soutiennent cette hypothèse ont été trouvées par l'équipe de Michael Meaney, qui montre que les niveaux absolus de comportements maternels augmentent après la courte manipulation (Meaney, 2001). De même, la réduction de la réponse au stress et de la réponse de peur chez les adultes est corrélée à une augmentation du comportement maternel après leur manipulation, pendant la première semaine

néonatale (Liu et al., 1997). Il a été montré que la réduction de la réactivité au stress est dépendante de l'augmentation de la densité des récepteurs aux glucocorticoïdes induite par la manipulation. La manipulation précoce a aussi été adoptée pour compenser les effets négatifs des conséquences d'un stress prénatal sur la neurogénèse dans l'hippocampe (Lemaire et al., 2006).

b. L'enrichissement chez l'adolescent

L'enrichissement environnemental consiste à améliorer l'espace environnemental de l'individu. Il s'agit principalement d'augmenter la taille de la cage, de l'équiper d'une roue, d'ajouter des objets qui attirent la curiosité et qui sont périodiquement remplacés pour entretenir la curiosité et le comportement exploratoire (Rosenzweig and Bennett, 1996; Laviola et al., 2008). L'enrichissement a des effets puissants sur les fonctions et la structure du cerveau. L'enrichissement interagit directement avec les systèmes qui sont généralement affectés par les procédures de stress précoces. Ainsi, chez le rat, l'enrichissement environnemental réduit les niveaux d'anxiété, la production d'ACTH et la réponse du système de stress à des chocs électriques aux pattes et à une restriction de 20 minutes. Il augmente aussi l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes, et les niveaux de 5-HT dans l'hippocampe (Fernández-Teruel et al., 2002; Boyce and Ellis, 2005)). Les effets de cet enrichissement sont suffisamment forts pour contrer les effets d'un stress précoce (Francis et al., 2002). Les animaux qui vivent dans un environnement enrichi durant l'adolescence, présentent un niveau de corticostérone en réponse à une restriction et une réactivité à un agent immunosuppresseur identique à celui d'un contrôle, même s'ils ont vécu préalablement un stress précoce (Laviola et al., 2004).

II.2.Périodes critiques du développement

II.2.1. Neuro-développement précoce : périodes concernées et mécanismes impliqués

Les effets délétères d'une infection virale ou bactérienne chez la femelle gestante sont médiés par les cytokines pro-inflammatoires. Si les études initiales suggéraient qu'une infection virale augmente la prévalence aux maladies psychiatriques lorsqu'elle est induite durant le deuxième trimestre de la gestation humaine (Stöber et al., 2002; Limosin et al., 2003), les études qui ont suivi suggèrent plutôt que l'infection virale augmente la prévalence lorsque l'infection

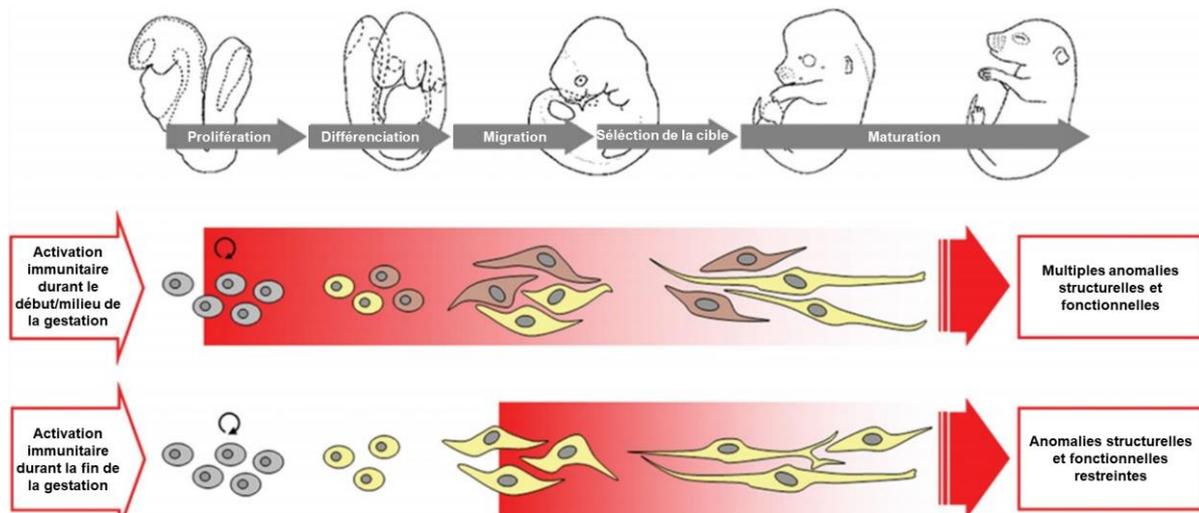


Figure 15. Modèle hypothétique illustrant l'impact d'un stress immunitaire prénatal durant la gestation.

Une infection au début/milieu de la grossesse peut affecter le neuro-développement du fœtus en influençant la différenciation des précurseurs (en gris) en un type de neurones donné (en jaune ou marron). Il peut aussi conduire à des défauts dans la migration cellulaire, la sélection de la cible et la maturation (indiqué par les cellules allongées). Un stress durant la gestation tardive peut interférer particulièrement avec la migration cellulaire, la sélection de la cible et la synaptogénèse, conduisant à des phénotypes pathologiques plus limités. Adapté de Meyer et al., 2007

survient durant le premier trimestre (Brown et al., 2004). Une comparaison des effets d'une infection virale chez la souris durant le début/milieu de la grossesse par rapport à une infection virale induite durant la grossesse tardive montre qu'elles conduisent toutes à des anomalies fonctionnelles du cerveau. Toutefois, l'infection virale peut précipiter des symptômes neuropathologiques dissociables en fonction du stade prénatal de l'infection (Meyer et al., 2006; Meyer et al., 2007; Fatemi et al., 2008) car elle affecte différents types de processus en fonction de la période touchée. Lorsque l'infection se produit au début de la gestation, l'inflammation médiée par les cytokines influence des processus liés à la prolifération cellulaire et à la différenciation dans le cerveau fœtal (**Figure 19**). La sélection des cibles neuronales et la maturation des synapses peuvent également être affectées par la sécrétion de cytokine (Meyer et al., 2007). Lorsque l'infection se produit tardivement durant la gestation, celle-ci impactera plutôt la migration cellulaire, l'organisation et la maturation des synapses. Dans ce dernier cas, les effets à long-terme seront plus restreints aux niveaux structurel et fonctionnel comparé à l'infection précoce (**Figure 19**). Une restriction affecte sans doute aussi le développement du cerveau fœtal de la même manière que le stress provoqué par l'infection virale ou bactérienne.

Le stress prénatal agit sur la programmation de la réponse au stress, principalement à travers l'axe HPA. La progéniture provenant de femelles gestantes qui ont subi une restriction présente une sécrétion prolongée de corticostérone après le stress et un nombre réduit de récepteurs centraux aux glucocorticoïdes (Maccari et al., 2003). Durant la première semaine post-natale, une diminution de la prolifération cellulaire est observée dans l'hippocampe, concomitante avec une augmentation de l'activité de la caspase-3. Ce stress augmente également le contenu en facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau ou Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) chez les mâles et réduit le nombre de récepteurs à la sérotonine 5-HT_{1A} dans l'hippocampe ventral (Van den Hove et al., 2006).

Les périodes prénatales constituent des périodes de forte vulnérabilité au stress, qui peuvent conduire à long terme au développement d'une anxiété, d'une addiction et/ou une dépression. Ces périodes constituent des phases du développement pendant lesquelles un stress peut affecter la prolifération des progéniteurs, la différenciation des neurones, leur migration ou leur maturation. Les effets exacts de ce stress dépendent de la période prénatale à laquelle il est subi. Toutefois, il existe également des périodes post-natales durant lesquelles le stress peut rendre vulnérable au développement de maladies psychiatriques. Durant ces périodes critiques, le stress altère la maturation des connexions neuronales qui sont particulièrement sensibles aux stimuli extérieurs.

II.2.2. Neuro-développement tardif : périodes concernées et mécanismes impliqués

L'enfance précoce et le début de l'adolescence sont les deux périodes post-natales particulièrement sensibles aux effets du stress (Andersen and Teicher, 2008; Eiland and Romeo, 2013; Romeo, 2013; Baker et al., 2014; Suri et al., 2015; Bondar et al., 2018). Ces périodes correspondent aux phases de maturation des circuits émotionnels, mais aussi des circuits sensoriels, dont la maturation dépend particulièrement des inputs sensoriels. Cette période peut être légèrement différente en fonction du circuit mais les mécanismes qui régulent la durée et le timing des périodes critiques ainsi que ce processus de maturation sont les mêmes.

II.2.2.1. Périodes critiques connues et acteurs moléculaires impliqués

II.2.2.1.1. Exemples de périodes critiques

Trois systèmes ont été étudiés en détail : la représentation oculaire dans le cortex visuel des mammifères, l'empreinte filiale dans le cerveau antérieur des canards et des poules et l'apprentissage du chant dans le cerveau antérieur des oiseaux chanteurs.

Dans le système de représentation oculaire, lorsque les deux yeux perçoivent des stimuli visuels, ils transmettent l'information à la couche corticale IV via des axones provenant du thalamus. Ces projections du thalamus sur la couche IV du cortex visuel sont fortement modelées par les expériences visuelles durant le premier mois suivant la naissance. Lorsqu'un œil est fermé de manière prolongée durant cette période (privation mono-oculaire) les neurones du cortex visuel perdent leur capacité à répondre aux projections provenant de cet œil, ce qui conduit à la perte sélective de ces projections et induit la formation de nouvelles connexions au bénéfice de l'œil ouvert (Antonini and Stryker, 1993). En conséquence, le circuit dans la couche IV se retrouve dominé par les signaux provenant de l'œil resté ouvert. Lorsque cette période critique se ferme, le motif typique de la représentation oculaire ne peut être rétabli même si les signaux provenant des deux yeux sont restaurés, une propriété qui caractérise bien la définition d'une période critique du développement (Wiesel and Hubel, 1965).

L'empreinte filiale chez les canards et les poules est un autre exemple de période critique. Durant les premiers jours suivant leur éclosion, ces animaux mémorisent les stimuli auditifs et visuels qui permettent d'identifier leurs parents (Bolhuis and Honey, 1998). Cette

empreinte modifie l'architecture et les propriétés biochimiques d'un groupe de neurones particulier et les rend fonctionnellement sélectifs au stimulus imprégné (Horn, 2004). Lorsque cette période d'empreinte filiale se termine, la préférence pour cette empreinte ne change plus même après avoir vécu d'autres expériences.

Les oiseaux chanteurs mémorisent le chant qu'ils vont chanter (Konishi, 1985). Normalement, ils apprennent leur chant de leur père, le seul sexe à chanter. Cependant, en l'absence du chant du père, ces oiseaux apprennent d'autres dialectes de chants ou des chants d'autres espèces d'oiseaux. L'apprentissage du chant est associé à des changements structurels et fonctionnels dans le noyau magnocellulaire et le néo-striatum antérieur, qui sont essentiels pour l'apprentissage du chant (Nixdorf-Bergweiler et al., 1995; Doupe, 1997). Pour certaines espèces, l'apprentissage du chant n'a lieu que durant une période très limitée du développement, tandis que pour d'autres l'apprentissage ne s'arrête jamais.

Plus récemment, une période critique a été identifiée pour le système de peur chez l'homme et le rongeur. L'acquisition de la peur, mesurée par la capacité à développer une réponse de peur conditionnée, n'apparaît pas avant les jours 13-14 postnataux (P13-14) chez la souris (Akers et al., 2012). Le processus d'extinction de la peur durant la période critique de développement de ce circuit P13-17 conduit à un effacement permanent de la peur chez les souris. Après P24, la réponse de peur est en partie gardée en mémoire (Kim and Richardson, 2010).

II.2.2.1.2. Mécanismes régulant les périodes critiques

a. Rôle des cellules exprimant la parvalbumine

Des études utilisant des souris transgéniques proposent que les interneurons corticaux GABAergiques, responsables de la balance Excitation/Inhibition sont essentiels pour le déclenchement de l'ouverture de la période critique (Hensch and Fagiolini, 2005). Les interneurons inhibiteurs, qui constituent approximativement 20% des neurones corticaux sont très variables en termes de composition moléculaire, de formes, de propriétés électrophysiologiques et de cibles, modulant ainsi l'activité des circuits de différentes manières (Kawaguchi and Kubota, 1997; Kepecs and Fishell, 2014).

Les cellules exprimant la parvalbumine (cellules PV) sont une classe d'interneurones qui se développe plus tard avec l'expérience et qui est nécessaire à la régulation des périodes critiques (Kuhlman et al., 2011). Lors de l'instauration d'une privation mono-oculaire durant la

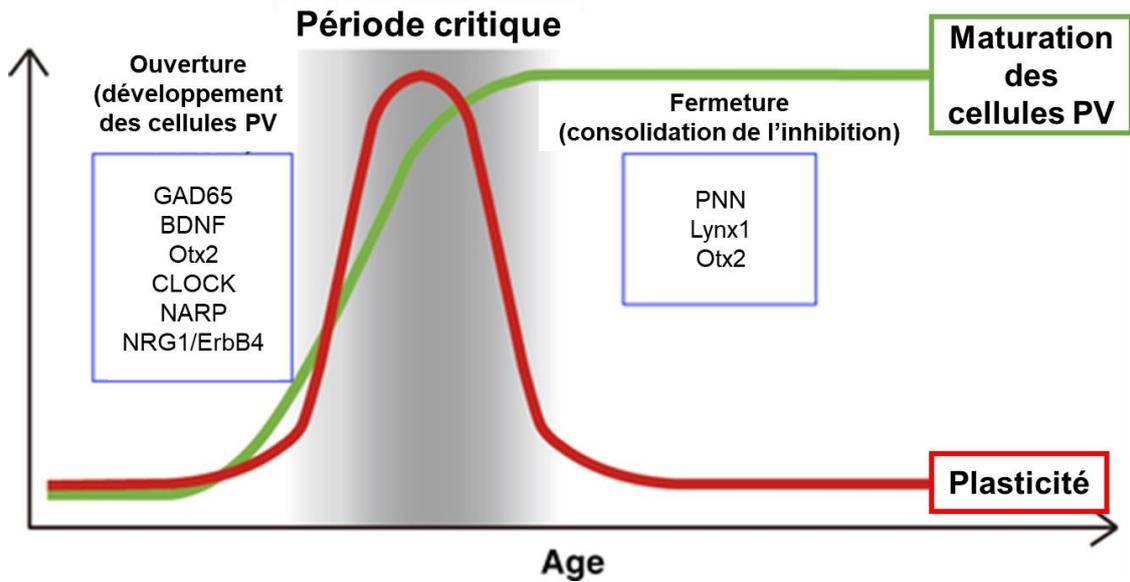


Figure 16. Mécanismes moléculaires contrôlant la période critique.

La période critique s'ouvre durant l'augmentation des fonctions inhibitrices associées au développement des cellules PV. Le BDNF, Otx2 et CLOCK promeuvent le développement des cellules PV tandis que NARP et NRG1/ErbB4 renforcent les inputs sur les cellules PV. Les PNN, Lynx1 et Otx2 qui contribuent à la maturation et à la consolidation des fonctions inhibitrices des cellules PV limitent la réactivation de la période critique chez l'adulte. Adapté de Sakai and Sugiyama, 2018

période critique, les cellules PV détectent le déséquilibre des signaux visuels et régulent l'activité des neurones excitateurs (Yazaki-Sugiyama et al., 2009; Kuhlman et al., 2013). Cette régulation par les cellules PV rend les dendrites des neurones pyramidaux plastiques et un élagage de ces projections a lieu grâce au recrutement de l'activateur du plasminogène (tPA), une protéase de la matrice extracellulaire (Mataga et al., 2004). Ce processus se produit durant les trois premiers jours qui suivent la privation mono-oculaire et des changements structuraux au niveau des axones thalamo-corticaux se produisent dans les deux semaines (Antonini and Stryker, 1993).

La réponse aux changements dans les signaux sensoriels durant la période critique commence donc par une modulation de l'activité des cellules PV qui provoque une réorganisation structurelle des circuits, incluant celles des neurones excitateurs.

b. Molécules impliquées dans la régulation des périodes critiques

Les facteurs impliqués dans l'ouverture de la période critique jouent un rôle dans le développement des cellules PV. L'acide décarboxylase glutamique 65 (GAD65), une enzyme nécessaire à la conversion du glutamate en GABA est nécessaire à la plasticité de la période critique (Hensch et al., 1998). Le BDNF, le facteur de transcription Otx2 et le régulateur circadien CLOCK participent au développement des cellules PV et à l'ouverture de la période critique (Sakai and Sugiyama, 2018) (**Figure 20**). Otx2 joue un rôle particulièrement important pour l'ouverture et la fermeture de cette période critique grâce à sa capacité à se transloquer dans les cellules PV en réponse au stimulus adapté.

Des molécules médiant le développement des synapses excitatrices sur les cellules PV sont également impliquées dans la régulation de la période critique : la délétion de la protéine de liaison au récepteur au glutamate NARP (neuronal activity regulated pentraxin), la Neuregulin-1 (NRG1) ou son récepteur tyrosine-protéine kinase 4 (erbB4) empêchent la maturation des synapses excitatrices (Gu et al., 2013; Sun et al., 2016). Au contraire, l'absence de la protéine de liaison aux CpG méthylé MeCP2 conduit à une maturation précoce des synapses excitatrices qui à long terme se traduit dans le système visuel par la perte de la vision (Durand et al., 2012). Dans le cas de la privation mono-oculaire, la diminution des signaux excitateurs due à la fermeture de l'œil réduirait temporairement l'activité des cellules PV. Cette réduction temporaire de la réponse des cellules PV est suivie par un remodelage de l'activité du circuit qui renforce les signaux provenant de l'œil ouvert. La protéase tPA et la protéine de

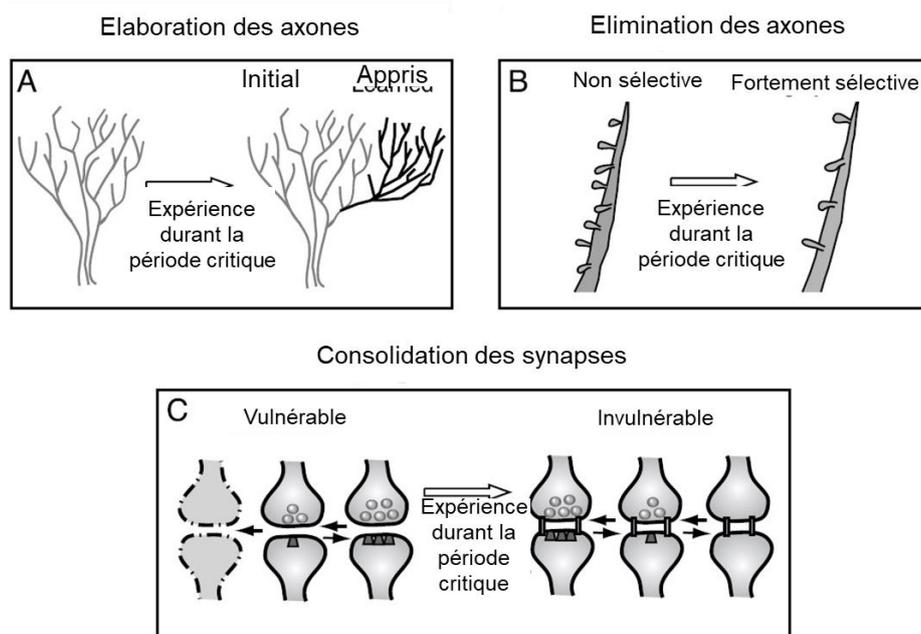


Figure 17. Mécanismes des changements architecturaux qui sous-tendent les périodes critiques.

A, Elaboration des nouvelles connexions instruites par l'expérience. **B,** Elimination sélective des synapses inutilisées. **C,** Consolidation des synapses par les CAMs. Adapté de Knudsen, 2004

liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline 5 ou insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5) sont activés pour rééquilibrer le circuit visuel (Sakai and Sugiyama, 2018). La modulation de la transmission synaptique des synapses excitatrices sur les cellules PV est donc le déclencheur de la plasticité.

Des facteurs ferment également activement la période de plasticité d'un point de vue fonctionnel et structurel. Les modulateurs de la neurotransmission cholinergique tels que Lynx1 contribuent à la fermeture de la période critique en renforçant la fonction inhibitrice des cellules PV (Morishita et al., 2010). Les réseaux péri-neuronaux ou perineuronal nets (PNNs), une matrice extracellulaire qui se forme également graduellement autour des cellules PV au fur et à mesure de leur maturation, ainsi que des composants de la myélinisation des axones, tels que le récepteur NOGO, réduisent la plasticité (McGee et al., 2005).

II.2.2.2. Mécanismes des changements architecturaux

L'élaboration des axones et la formation des synapses ainsi que leur élimination sont des mécanismes qui altèrent l'architecture durant les périodes critiques (Knudsen, 2004).

La capacité d'élaborer des axones corrèle avec des niveaux élevés de protéines associées à la croissance et de facteurs neurotrophiques, en particulier le BDNF, des niveaux faibles de facteurs inhibant la croissance axonale, et avec l'activation des récepteurs NMDA et des récepteurs glutamatergiques essentiels à la plasticité synaptique (Katz and Shatz, 1996; Huberman and McAllister, 2002) (**Figure 21 A**). Ce mécanisme est utilisé durant la période critique associée à la représentation oculaire dans le cortex visuel.

L'élimination des axones et des synapses concerne les neurones qui ne contribuent pas à représenter le stimulus appris. Cela permet de restreindre l'étendue des motifs potentiels de connectivité. Ce mécanisme est utilisé durant la période critique associée à l'apprentissage du chant (**Figure 21 B**).

Contrairement aux deux autres mécanismes, la consolidation des synapses a été impliquée mais pas démontrée comme influençant la plasticité durant les périodes critiques. Les molécules d'adhésion cellulaire ou cell adhesion molecules (CAMs) de différentes sortes peuvent être insérées entre les synapses qui sont fonctionnellement fortes (Benson and Huntley, 2012). Les CAMs sont des molécules très stables qui peuvent réticuler les membranes pré- et post-synaptiques et ainsi renforcer leurs liaisons pour les rendre invulnérables à l'élimination, même si elles perdaient leur efficacité fonctionnelle (**Figure 21 C**).

Des stress subis à des périodes du développement particulier peuvent donc avoir des effets très néfastes sur l'état psychiatrique à long-terme. Cela est notamment dû à la présence de périodes critiques du développement pendant lesquels les facteurs génétiques et environnementaux peuvent influencer la formation et la maturation de circuits neuronaux. Ces périodes critiques sont régulées par différents acteurs dont le facteur de transcription Otx2 (Orthodenticle homeobox 2) qui est indispensable au développement du système nerveux et dont le maintien de l'expression est aussi nécessaire dans des régions spécifiques du cerveau aux stades postnataux. Il régule donc l'ouverture et la fermeture des périodes critiques en interaction avec les réseaux péri-neuronaux. Il est donc nécessaire d'en connaître les caractéristiques pour mieux comprendre son fonctionnement et l'étendue de ses fonctions.

III. Le facteur de transcription *Otx2*

III.1. *Otx2* un gène évolutivement très conservé

Otx2 est un facteur de transcription qui appartient à la famille multigénique OTX. Cette famille de gènes a été identifiée dans une variété d'organismes dans tous les grands groupes du règne animal, des Cnidaires, chez lesquels il n'existe qu'un seul gène, aux vertébrés qui possèdent entre trois et cinq gènes paralogues (Acampora et al., 2005) (**Figure 22**). Les événements de duplication de ce gène ne sont pas précisément datés, cependant des analyses de séquences suggèrent que la première duplication à partir du gène ancestral aurait eu lieu à l'apparition des Céphalocordés mais avant la radiation évolutive des Gnathostomes donnant ainsi les paralogues *Otx2*, *Otx1* et *Otx5/Crx*, le plus éloigné évolutivement (Germot et al., 2001). Ces duplications se sont suivies d'une diversification fonctionnelle des différents paralogues qui est bien illustrée dans les expériences d'inactivation de gènes chez la souris. *Otx1* et *Otx2* sont largement exprimés dans le cerveau durant le développement et leurs fonctions se chevauchent dans les endroits où ces deux facteurs de transcription sont co-exprimés (Suda et al., 1997; Acampora et al., 1999). L'absence d'*Otx1* conduit à des défauts tels que l'épilepsie, des anomalies du cortex cérébral, une expansion du mésencéphale, un défaut des glandes lacrymales et de l'oreille interne (Acampora et al., 2005). L'absence d'*Otx2* conduit à des défauts plus graves car sa délétion précoce conduit à l'absence de la partie antérieure du cerveau, qui est létale au huitième jour de gestation (Acampora et al., 1995). *Crx* quant à lui est spécifiquement exprimé dans les photorécepteurs rétiniens et les pinéaloctes de l'épiphyse. Sa délétion complète ne permet pas le développement des segments externes des photorécepteurs et perturbe la synchronisation du rythme circadien (Furukawa et al., 1999).

La famille des gènes OTX présente une forte conservation entre espèces (Simeone et al., 1992). Il est possible d'intervertir certains de ces gènes OTX entre différentes espèces et de maintenir leurs fonctions essentielles. Ainsi, remplacer le gène *Otx1* chez la souris par le cDNA humain d'*Otx2* h*Otx2*(1)/h*Otx2*(1) empêche le développement du phénotype épileptique et les anomalies du cortex cérébral, et améliore le phénotype associé au mésencéphale, aux yeux et aux glandes lacrymales (Acampora et al., 1999). De la même manière, les gènes humains OTX1 et OTX2 sont capables de prendre le relais chez la drosophile dont le gène *Otd*, homologue des gènes OTX chez la drosophile, est mutant (Leuzinger et al., 1998).

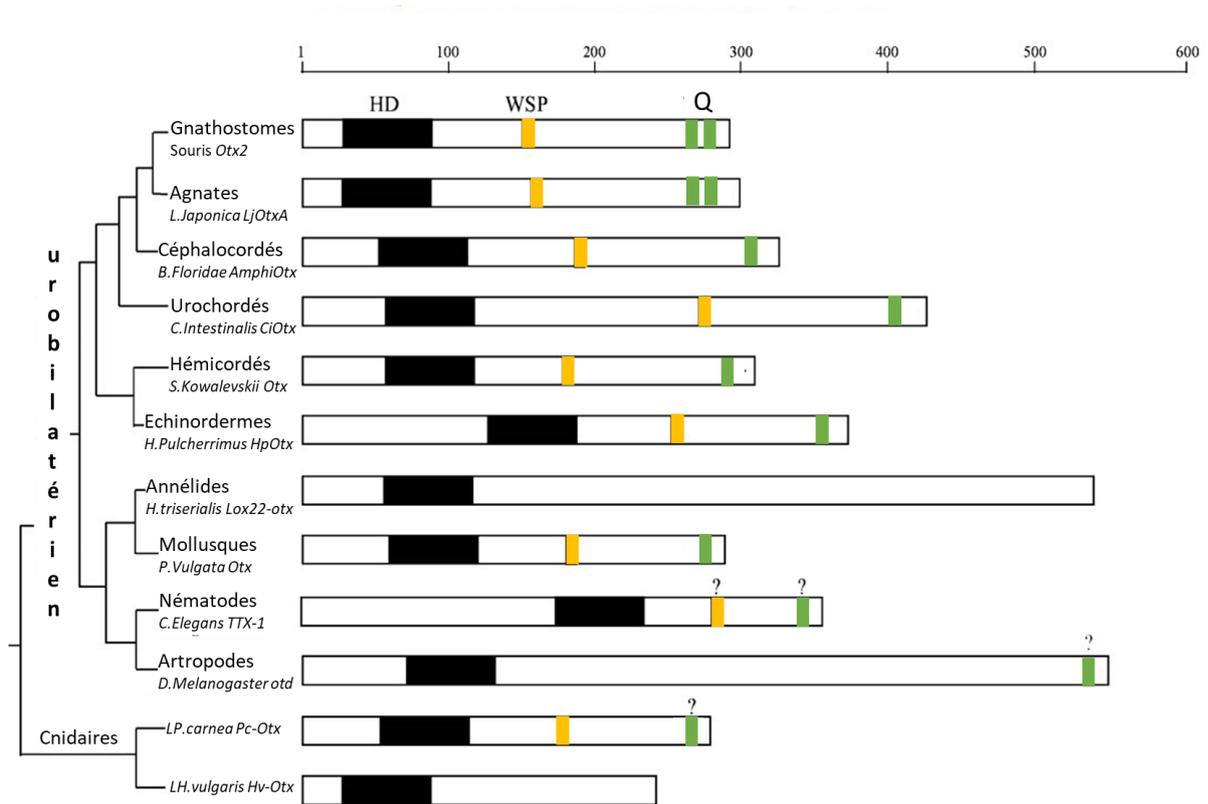


Figure 18. Structure et domaines conservés des protéines OTX chez les métazoaires.

La position évolutive est indiquée. L'homéodomaine (HD), le domaine WSP (WSP) et la « queue OTX » ou (Q) sont représentés respectivement en noir, orange et vert. Les points d'interrogations (?) mentionnent une homologie partielle ou réduite du domaine conservé. En ce qui concerne la protéine Ttx1 de *Caenorhabditis elegans*, plusieurs formes sont référencées dans les banques. Seule est représentée la plus longue. Adapté de Acampora et al. (2005)

Les protéines Otx ne sont surtout très conservées qu'au niveau de l'homéodomaine, qui est de type bicoïde, avec la présence d'une lysine caractéristique dans toutes les espèces. La longueur totale des protéines est variable, mais la position de cet homéodomaine, composée de 61 acides aminés, est fortement conservée près de l'extrémité N-terminale (**Figure 22**) (Acampora et al., 2005). Cet homéodomaine se caractérise par une lysine en position 50, qui est le 9^{ième} acide aminé de la troisième hélice alpha (Galliot et al., 1999). L'homéodomaine permet à la protéine Otx2 de se lier à l'ADN en reconnaissant la séquence spécifique 5'-TAATCC-3' sous forme monomérique (Simeone et al., 1993; Chatelain et al., 2006). Deux autres domaines des gènes OTX semblent avoir une fonction trans-activatrice (Chau et al., 2000). Le premier domaine, appelé « la queue OTX » (Q), qui n'est pas présent dans l'homologue OTD, est une séquence signature. Ce motif d'à peu près 20 acides aminés qui est dupliquée en tandem dans les protéines OTX des vertébrés est localisé à l'extrémité C-terminale. Le deuxième domaine est le domaine WSP (Tryptophane, Sérine, Proline), également absent dans l'homologue OTD, est un hexapeptide conservé depuis les Deutérostomes retrouvé en position C-terminale de l'homéodomaine (Acampora et al., 2005).

III.2. Caractéristiques moléculaires d'Otx2

Le gène *Otx2* murin possède une organisation semblable à celle du gène OTX2 humain, avec 8 exons dont seuls les 3 derniers sont codants. Courtois et collègues ont identifié 3 types de transcrits à partir de ce gène, qui ne diffèrent que par leur séquence 5', laissant supposer que leurs sites d'initiation sont distincts. Ils ont confirmé la présence de ces trois promoteurs, nommés A, B et C, du plus éloigné au plus proche de l'ATG initiant la séquence codante (**Figure 23 A**) (Courtois et al., 2003). Ces trois promoteurs ont une activité spatiotemporelle différente, parfois complémentaire. Les transcrits C sont principalement retrouvés dans les stades précoces du développement, notamment dans les cellules embryonnaires et leur expression diminue avec le temps. L'activité des promoteurs A et B connaît une évolution inverse, suggérant que les transcrits C constituent la forme embryonnaire tandis que les transcrits A et B prennent la relève plus tard au cours du développement. En plus de posséder trois promoteurs, le gène *Otx2* possède des sites d'épissages alternatifs, augmentant ainsi le nombre d'ARNm différents transcrits (**Figure 23 B**). La traduction de ces transcrits conduit à la production de 2 isoformes protéiques : Otx2, la plus abondamment produite, constituée de

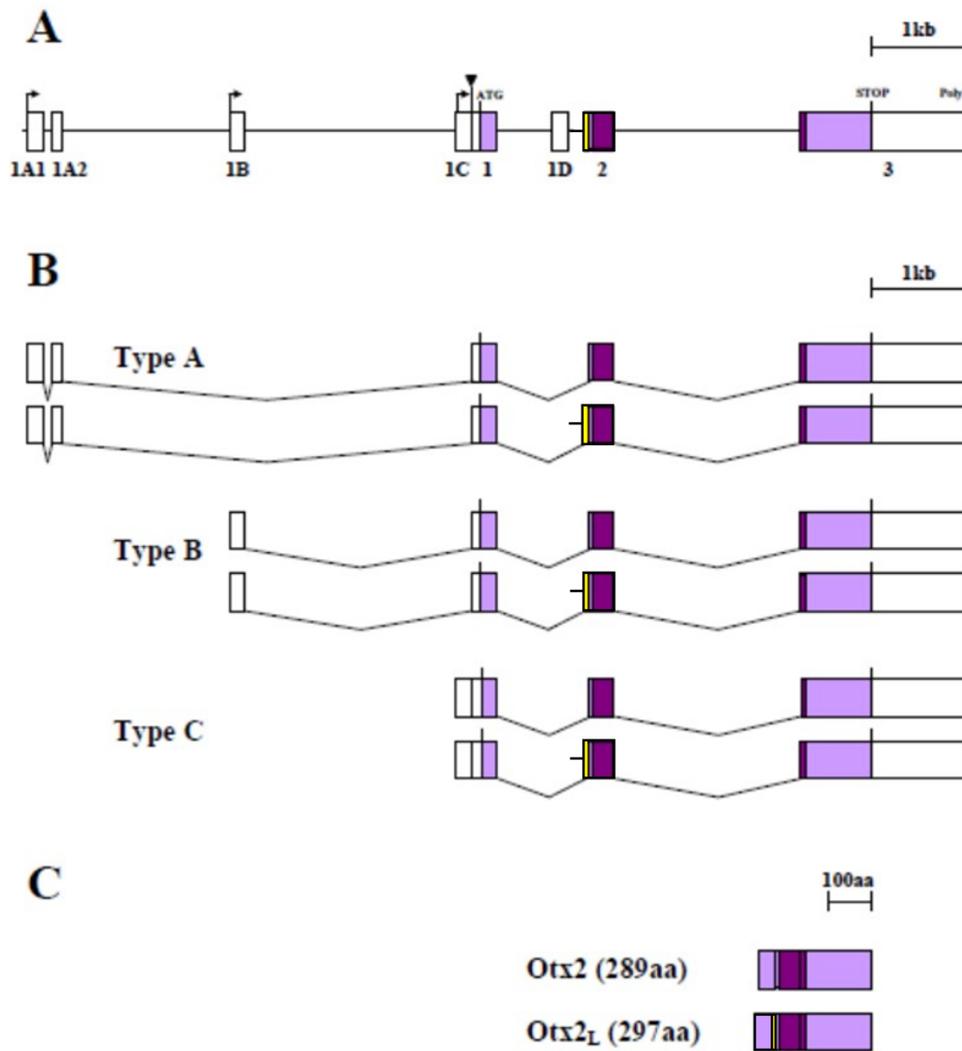


Figure 19. Organisation et expression du locus Otx2 chez la souris.

A, Structure du locus Otx2. Les exons sont représentés par des rectangles dont les parties colorées représentent les régions codantes. Le rectangle jaune représente la région codant les 8 acides aminés supplémentaires de la protéine Otx2L et le rectangle violet foncé, la région codant l'homéodomaine. B, Structure des trois types de transcrits produits à partir du locus Otx2. C, Organisation des protéines Otx2 et Otx2L. Adapté de Courtois et al. (2003).

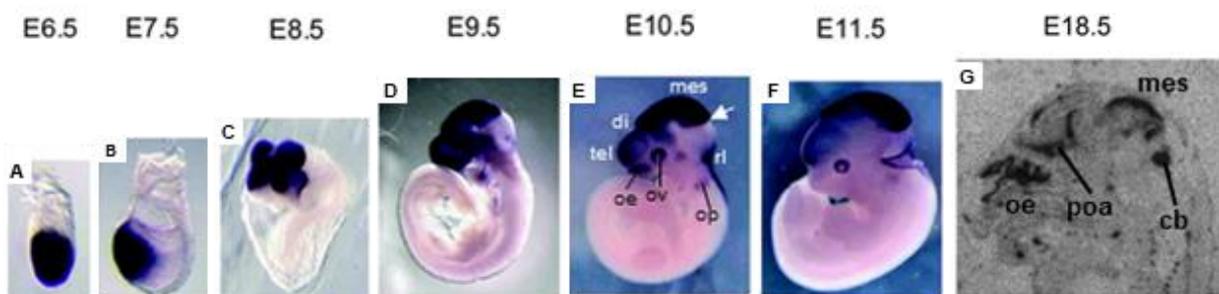


Figure 20. Dynamique d'expression du gène Otx2 au cours du développement de la souris. Hybridation in situ illustrant l'expression d'Otx2 entre E6.5 et E11.5 (embryon entier) et à E18.5 (section sagittale). La flèche indique l'isthme ; di, diencéphale ; mes, mésencéphale ; tel, télencéphale ; oe, épithélium olfactif ; op, placode optique ; ov, vésicule optique ; rl, rhombic lip ; poa, preoptic area ; cb, cervelet. Adapté de Fossat et al., 2005

289 acides aminés, et *Otx2L* la forme plus longue, constituée de 297 acides aminés (**Figure 23 C**). *Otx2L* possède 8 acides aminés (GPWASCPA) en plus par rapport à *Otx2*, situés 5 acides aminés en amont de l'homéodomaine. Cette isoforme longue est minoritaire, mais l'élongation se trouvant juste en amont de l'homéodomaine pourrait modifier les propriétés de liaison à l'ADN. Son rôle reste encore à élucider.

Les transcrits *Otx2* sont impliqués dans diverses fonctions au cours du développement allant de la mise en place de l'axe antéro-postérieur à la spécification de diverses structures du cerveau.

III.3. Fonctions clés d'*Otx2* dans le développement du système nerveux

Otx2 est exprimé tout au long du développement (**Figure 24**). Il est détecté très tôt, dans le blastocyste à E3.5 et dans l'épiblaste entier et l'endoderme viscéral antérieur à E5.5 chez la souris (Kimura et al., 2001). Durant le processus de gastrulation, l'expression se restreint à la partie antérieure de l'embryon (Ang et al., 1996). Sa délétion à ce stade conduit à un défaut du processus de gastrulation et conduit à une perte de la partie rostrale du cerveau. *Otx2* est également requis dans l'endoderme viscéral antérieur, « l'organisateur de la tête » pour la spécification normale du neuro-ectoderme antérieur (Acampora et al., 1995; Kimura et al., 2000). L'expression d'*Otx2* persiste dans l'endoderme viscéral pendant qu'elles migrent antérieurement entre E5.5 et E6.5. La délétion d'*Otx2* empêche la migration de ces cellules vers le pôle antérieur (Kimura et al., 2000). Plus tard au cours du développement, l'expression d'*Otx2* couvre encore la plus grande partie du cerveau antérieur et le neuro-épithélium du mésencéphale.

Au niveau de mésencéphale ventral, l'expression d'*Otx2* coïncide avec la limite entre le mésencéphale et le rhombencéphale. Elle est d'ailleurs nécessaire au positionnement correct de la frontière entre ces deux zones (Midbrain-Hindbrain Barrier ou MHB) où l'organisateur isthmique (Iso) va se former (**Figure 24 E**). Cette expression souligne la fonction d'*Otx2* dans la délimitation anatomique des territoires du mésencéphale et du rhombencéphale. Cette région organisatrice pousse les régions à se différencier en territoire mésencéphalique ou rhombencéphalique. *Otx2* est chargé de spécifier la partie rostrale du rhombencéphale tandis que *Gbx2* joue un rôle dans la spécification de la partie caudale du rhombencéphale. En effet, dans le rhombomère 1, l'expression d'*Otx2* conduit à la différenciation de cette région en futur

cervelet (Di Giovannantonio et al., 2014). Plus tard, l'expression d'*Otx2* dans le diencephale contribue à l'établissement et au positionnement des frontières de la *zona limitans intrathalamica*, qui induit les territoires adjacents en thalamus, pré-thalamus et pré-tectum (Scholpp et al., 2007). Durant l'embryogénèse tardive, *Otx2* est encore exprimé dans différentes régions du télencéphale, incluant l'éminence ganglionnaire antérieure, le septum adjacent au diencephale, le striatum, l'hippocampe, la partie ventrale du bulbe olfactif, mais aussi dans le mésencéphale, la glande pinéale, les plexus choroïdes, le cervelet, ainsi que dans les organes sensoriels tels que l'oreille interne, la rétine, et l'épithélium olfactif (**Figure 24**) (Beby and Lamonerie, 2013).

Son expression va ensuite progressivement se restreindre à peu de zones dont la MHb et l'IPN. Le rôle d'*Otx2* dans ces structures était jusqu'alors inconnu. Nous nous sommes donc lancés dans l'étude des fonctions du gène *Otx2* dans le développement du HIPS chez la souris. Les principaux résultats de cette étude sont décrits dans l'article intitulé « Developmental Requirement of Homeoprotein *Otx2* for Specific Habenulo-Interpeduncular Subcircuits » par Ruiz-Reig et al., 2019, qui est présenté dans les parties suivantes.

III.4. Fonctions du gène *Otx2* dans le développement du HIPS

III.4.1. Fonction du gène *Otx2* dans le développement de la MHb

Otx2 est exprimé tout au long du développement de l'habénula. Il est déjà exprimé dans les précurseurs de la MHb situés dans la zone ventriculaire, qui sont *Dbx1+*. Les neurones générés à partir de ces précurseurs occupent dans l'habénula des positions latérales pour les premiers formés à plus médianes pour les derniers. Au moment de leur naissance, ces neurones maintiennent une expression forte d'*Otx2*. Cependant, au fur et à mesure qu'ils s'éloignent de la zone ventriculaire, leur niveau d'expression d'*Otx2* diminue. La MHb présente ainsi un gradient d'expression d'*Otx2* pendant sa formation, et maintient une expression forte au niveau de la ligne médiane où se trouvent les derniers neurones nés. Ce gradient d'expression d'*Otx2* sera maintenu tout au long de la vie. Les neurones qui maintiennent une forte expression d'*Otx2* près du ventricule sont appelés neurones *Otx2*^{High}. Lorsque l'on réalise une délétion d'*Otx2* dès le stade progéniteurs des neurones de l'habénula, bien que les premiers neurones de la MHb soient toujours générés au jour embryonnaire 12.5 (E12.5), les derniers neurones qui normalement naissent à E16.5 sont absents. Ceci touche aussi bien les neurones SP+ que

ChAT+ (**Figure 25 A et B**). Cette absence n'est pas causée par la mort cellulaire des progéniteurs ou des neurones post-mitotiques mais plutôt par un épuisement du pool de progéniteurs épithalamiques, conséquence d'une réduction du nombre de cycles cellulaires avant différenciation, consécutive à la délétion d'*Otx2*. En proportion les neurones SP+ sont plus affectés car ils sont majoritaires parmi ceux qui naissent tardivement. Corrélativement, la délétion d'*Otx2* dans les neurones *Otx2*^{High} affecte principalement les projections substance-P-ergiques de la dMHb sur les parties latérales de l'IPN caudal. Ces neurones *Otx2*^{High} de la MHb projettent donc préférentiellement dans les parties latérales de l'IPN caudal (**Figure 25 C**).

III.4.2. Fonction développementale d'*Otx2* dans l'IPN

Les progéniteurs de l'IPN, contrairement à ceux de l'habénula, n'expriment pas *Otx2* à ce stade. C'est seulement juste après qu'ils sont générés entre E9.5 et E10.5 dans le rhombomère 1, qu'ils commencent à exprimer *Otx2*. Ces neurones migrent alors en trois étapes pour former l'IPN. La première étape est une migration tangentielle depuis la zone progénitrice où ils sont générés vers la ligne médiane du rhombomère, sans traverser celle-ci. Ils migrent ensuite de manière radiale vers la région ventrale du rhombomère 1 durant la deuxième étape, qui est terminée à E15.5 pour la plupart d'entre eux. Durant la troisième étape, les neurones qui ont atteint le rhombomère ventral s'agrègent pour former une structure bilatérale. A E18.5 d'autres neurones continuent de migrer pour atteindre le rhombomère ventral. Une partie des neurones *Otx2*⁺ localisés dans la partie ventrale se compactent vers la ligne médiane pour former le Med cIPN (sous-noyau central de l'IPN caudal).

Lorsqu'une délétion d'*Otx2* est réalisée avant que les cellules ne puissent l'exprimer, les neurones migrent anormalement. Ils semblent ne pas engager de migration tangentielle vers la ligne médiane et migrent directement radialement jusqu'à la partie ventrale du rhombomère 1 (**Figure 26**). Une explication avancée par cette étude serait que le défaut de migration est dû à la diminution notable de l'expression de DCC dans les cellules recombinaisons de l'IPN. Le couple Nétrine/DCC est bien connu pour son rôle dans la migration, et notamment la migration tangentielle, il pourrait donc bien être à l'origine du défaut de migration observé. Cette hypothèse a depuis été corroborée par une étude de l'effet de la délétion de DCC, qui montre le même phénotype de migration anormale des cellules *Otx2*⁺ (García-Guillén et al., 2020).

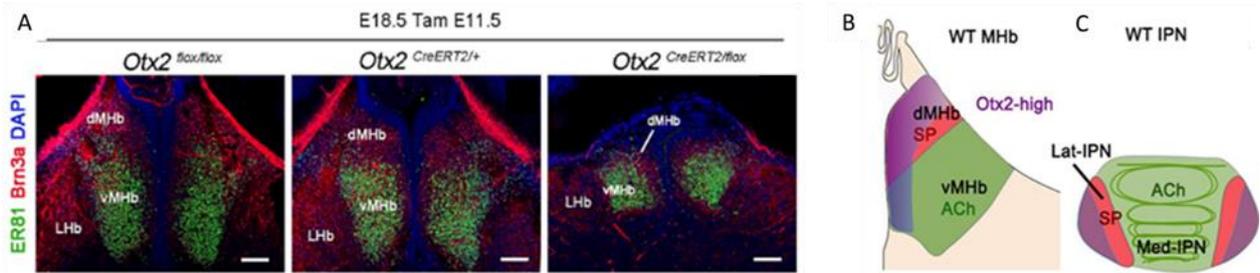


Figure 21. Effets de la délétion conditionnelle d'Otx2 dans la MHB

A, Immunomarquage de Er81 (Etv1) et Brn3a sur des sections coronales au niveau de l'habénula dans des embryons à E18.5 qui ont reçu une injection de tamoxifène à E11.5. B,C, Illustration schématique de sections coronales au niveau de l'habénula et de l'IPN montrant différentes populations de neurones habénulaires (J) et de leurs projections respectives dans l'IPN (K) avec le même code couleur. Barre d'échelle : A, 100 μ m. Adapté de Ruiz-Reig et al.,2019

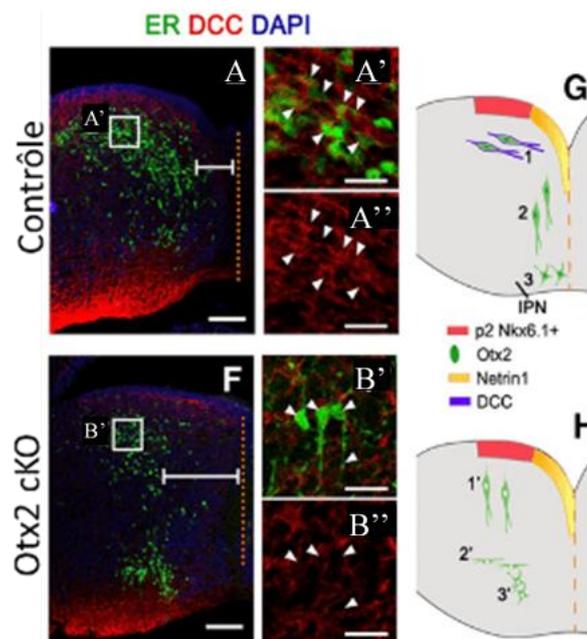


Figure 22. Effets de la délétion d'Otx2 dans l'IPN.

A,B, Immunofluorescence pour ER et DCC sur sections transversales d'embryons contrôles et mutants à E13.5 montrant la localisation anormale des cellules ER⁺ dans l'aire dorsale (B',B'', tête de flèches blanches) comparées à celle des cellules contrôles ER⁺ (A',A'', tête de flèches blanches). C, D, Illustration schématique du mécanisme de migration des précurseurs de l'IPN. Dans la condition contrôle, les cellules Otx2⁺ sont générées à partir du domaine Nkx6.1 (domaine progéniteur 2, aire rouge), et grâce à l'expression de DCC (contour violet) migrent tangentiellement vers la ligne médiane dorsale qui exprime fortement la Nétrine 1 (G1). Ces neurones Otx2⁺ réduisent ensuite leur expression de DCC, ce qui leur permet de ne pas rester emprisonnés à ce niveau et de migrer radialement vers une position plus ventrale (G2) pour former l'IPN (G3). Chez les souris mutantes, en l'absence d'Otx2, les neurones de l'IPN qui expriment beaucoup moins DCC ne sont plus attirés vers la ligne médiane et migrent précocement radialement (H1') puis s'installent précocement (H2') à une position plus dorsale et latérale que les neurones Otx2 des souris contrôles (H3'). Barre d'échelle : A-B, 100 μ m ; A'-B', 25 μ m. Adapté de Ruiz-Reig et al.,2019

III.5. Fonctions post-natales d'*Otx2*

III.5.1. Régions d'expression post-natale d'*Otx2*

Au-delà de la naissance et des étapes de développement du système nerveux central (SNC) où il joue un rôle important, le gène *Otx2* reste exprimé dans plusieurs régions du SNC comme le thalamus, le colliculus supérieur, le cervelet, et dans des structures dérivées du SNC comme la rétine ou les plexus choroïdes.

Dans la rétine, *Otx2* est exprimé dans l'épithélium pigmenté rétinien ou Retinal Pigmented Epithelium (RPE), les photorécepteurs, dont les corps cellulaires sont localisés dans la couche nucléaire externe ou Outer Nuclear Layer (ONL), mais aussi dans les cellules bipolaires situées dans la couche nucléaire interne ou Inner Nuclear Layer (INL) (**Figure 27 A**). *Otx2* est impliqué dans la spécification du RPE (Martinez-Morales 2001), la spécification des photorécepteurs (Nishida 2003), et dans la différenciation terminale et la maturation des cellules bipolaires (Koike et al., 2007). La délétion d'*Otx2* à P0 dans les progéniteurs rétiniens conduit à une réduction du nombre de cellules bipolaires différenciées. La délétion d'*Otx2* dans l'ensemble des cellules exprimant *Otx2* dans la rétine aux stades postnataux conduit à une dégénérescence lente des photorécepteurs à partir de vingt jours suivant la délétion et à une dystrophie du RPE, mais n'a pas d'effets sur la survie des cellules bipolaires (Béby et al., 2010). La délétion ciblée d'*Otx2* dans les photorécepteurs ne conduit pas à leur dégénérescence lorsque son expression est maintenue dans le RPE, démontrant un effet protecteur non-autonome de la protéine *Otx2* produite par le RPE sur les photorécepteurs (Housset et al., 2013).

Le corps genouillé latéral dorsal ou dorsal Lateral Geniculate Nucleus (dLGN) qui relaie l'information visuelle de la rétine vers le cortex contient également une sous-population de neurones exprimant *Otx2* au-delà des stades embryonnaires. Une partie de ces neurones *Otx2*⁺ migre du vLGN vers le dLGN (**Figure 27 B**). L'expression d'*Otx2* est nécessaire à cette migration ou à la survie post-natale de ces neurones. En effet, la délétion d'*Otx2* à P0 conduit à une absence des neurones *Otx2*⁺ dans la région du dLGN. Les interneurons *Otx2*⁺ de la dLGN régulent l'excitabilité des neurones thalamo-corticaux de ce noyau et l'absence de ces neurones à la suite de la délétion du gène *Otx2* conduit à leur désinhibition (Golding et al., 2014). *Otx2* est donc impliqué dans l'assemblage post-natal des circuits inhibiteurs locaux au sein du système visuel.

Le colliculus supérieur, un autre relais sous-cortical de la voie optique, maintient aussi l'expression d'*Otx2* après la naissance. Ces neurones *Otx2*⁺ sont principalement localisés dans

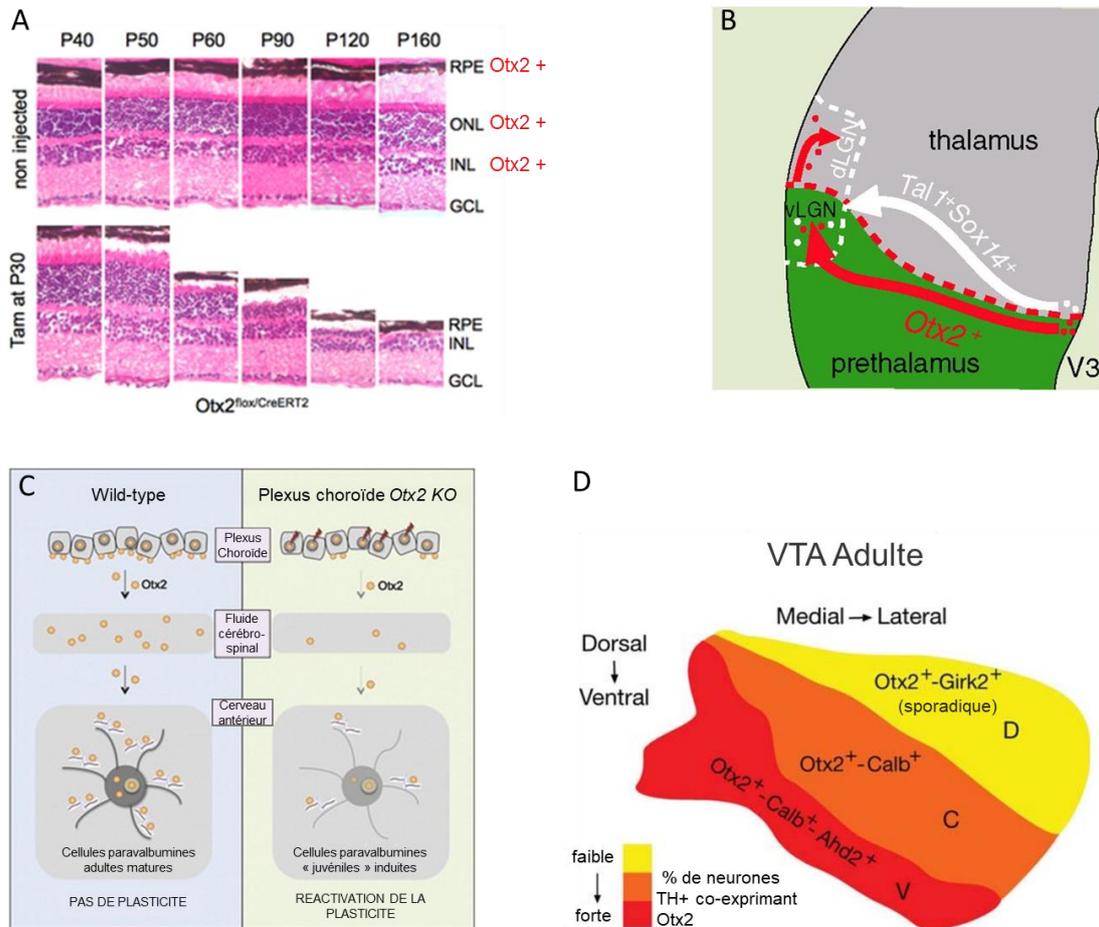


Figure 23. Fonctions post-natales d'Otx2.

A, Structure de la rétine, Otx2 est exprimé dans le RPE, l'ONL et l'INL. La délétion d'Otx2 conduit à la dégénérescence des photorécepteurs – Image tirée de Béby et al., 2010. **B**, Migration des neurones Otx2⁺ du troisième ventricule (V3) au corps genouillé latéral ventral (vLGN) sur une voie séparée des Otx2⁻. Vers P0 une partie des neurones Otx2⁺ migre du vLGN vers le dLGN – Schéma tiré de Golding et al., 2014. **C**, Les plexus choroïdes sécrètent Otx2 dans le liquide cébrospinal vers le cortex. La délétion d'Otx2 conduit à la réactivation de la plasticité corticale – Schéma tiré de Spatzza et al., 2013. **D**, Répartition des neurones Otx2⁺ dans la VTA – Schéma tiré de Di Salvio et al., 2010. RPE : épithélium pigmenté rétinien, ONL : couche nucléaire externe, INL : couche nucléaire interne

la partie superficielle du colliculus supérieur. Ses fonctions post-natales n'ont toutefois pas encore été élucidées.

Le septum maintient également une expression post-natale d'*Otx2* principalement au niveau du noyau septo-hypothalamique mais aussi dans d'autres parties du septum. *Otx2* joue un rôle essentiel dans la spécification du septum durant l'embryogénèse mais ses fonctions post-natales n'ont pas encore été étudiées.

Les plexus choroïdes continuent également d'exprimer *Otx2*. Ces cellules épithéliales régulent la composition du fluide cérébrospinal et contrôlent la composition en molécules de signalisation dans le liquide qui baigne le cerveau. Les plexus choroïdes sécrètent *Otx2* dans le fluide cérébrospinal. La protéine est transportée vers le cortex où elle contrôle l'ouverture et la fermeture des périodes critiques (Spatazza et al., 2013). La délétion post-natale d'*Otx2* réactive la plasticité des circuits corticaux adultes. (**Figure 27 C**). La synthèse et la sécrétion d'*Otx2* dans le fluide cérébrospinal par les plexus choroïdes régulent également les niveaux d'anxiété chez les souris (Vincent et al., in press). Les souris hétérozygotes pour le gène *Otx2* présentent un phénotype anxieux qui est sauvé par une surexpression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes. Ce phénotype anxieux est également reproduit par une diminution de l'expression d'*Otx2* spécifiquement dans les plexus choroïdes.

La VTA est également une région qui maintient l'expression d'*Otx2* après la naissance. Presque tous les neurones *Otx2*⁺ de la VTA expriment la tyrosine hydroxylase (TH) (93%), une enzyme nécessaire à la biogénèse des catécholamines utilisée comme marqueur des neurones dopaminergiques, et sont principalement localisés dans la partie centrale et ventrale de la VTA (Di Salvio et al., 2010) (**Figure 27 D**). Une étude récente a montré, qu'une séparation maternelle chronique appliquée spécifiquement durant le stade post-natal tardif (P10-20) crée une susceptibilité à l'anxiété et à la dépression qui est révélée à la suite d'un stress chronique de défaite sociale à l'âge adulte (Peña et al., 2017). Une analyse transcriptomique des modifications de l'expression génétique résultant du stress post-natal tardif a permis de mettre en lumière le rôle d'*Otx2* dans la réponse au stress. En effet, la séparation maternelle conduit à une diminution de l'expression d'*Otx2* dans la VTA. Bien que cette expression revienne à son niveau normal après le stress, la diminution transitoire de l'expression d'*Otx2* contribue à créer cette susceptibilité à long-terme.

Au niveau du cervelet, *Otx2* est exprimé dans une sous-population de cellules granulaires situées dans les lobes postérieurs. Les précurseurs des cellules granulaires prolifèrent jusqu'à P15 chez la souris. La délétion d'*Otx2* durant la période de prolifération des

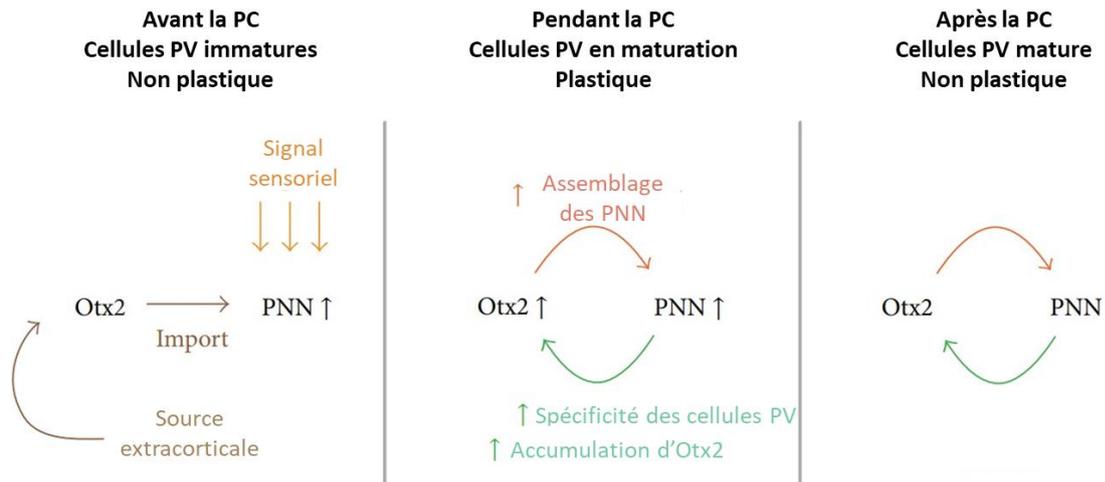


Figure 24. Boucle de rétroaction Otx2-PNN pour la plasticité de la période critique.

A l'ouverture de la période critique (PC), l'activité sensorielle induit la formation initiale des réseaux péri-neuronaux (PNNs), permettant l'internalisation d'Otx2 extra-cortical par les cellules PV. Durant la PC, l'augmentation du contenu en Otx2 des cellules PV stimule l'assemblage des PNN. A leur tour, les PNNs assurent l'accumulation spécifique d'Otx2 dans les cellules PV. Chez l'adulte le transfert constant d'Otx2 dans les cellules PV grâce à la boucle de rétroaction positive avec les PNNs maintient les cellules PV dans leur état mature.

précurseurs conduit à l'atrophie des lobes postérieurs du cervelet (El Nagar et al., 2018). Toutefois, la délétion post-natale d'*Otx2* dans le cervelet dans la lignée de souris *Otx2^{fllox/fllox};En1^{Cre/+}* ne provoque pas de défaillance motrice ou de défaillance dans les comportements d'exploration d'après les tests moteurs : analyse des empreintes pour évaluer l'ataxie et le dandinement, test d'accélération sur un rotarod pour évaluer des déficits d'équilibre et des problèmes de coordination éventuels (Borgkvist et al., 2006).

III.5.2. *Otx2* et plasticité neuronale

L'expression d'*Otx2* s'éteint dans le cortex avant la naissance. On a pourtant détecté la présence de la protéine *Otx2* dans les cellules PV du cortex visuel, impliquant un transfert de cette protéine depuis des cellules productrices éloignées. Des composants des aires visuelles périphériques tels que la rétine, les colliculi ou le thalamus, et ou les plexus choroïdes représentent des sources post-natales d'*Otx2* extracellulaire (Sugiyama et al., 2009; Spatazza et al., 2013). En effet, les transcrits d'*Otx2* ne sont pas détectés dans le cortex visuel ni le rapporteur transcrit à partir du locus *Otx2*. Il a notamment été montré que l'ablation des deux yeux (énucléation) conduit à une réduction du niveau cortical de la protéine *Otx2* (Sugiyama et al., 2008). La protéine extracellulaire *Otx2* provenant de ces sources régule l'ouverture et la fermeture des périodes critiques de manière cellulaire non-autonome. Une infusion d'*Otx2* exogène dans le cortex accélère la maturation des cellules PV et le timing de la période critique tandis que la délétion d'*Otx2*, en dehors de la région corticale, empêche la maturation de ces cellules (Sugiyama et al., 2008). Durant la période critique, un signal sensoriel induit la formation initiale de PNNs autour des cellules PV. Les études récentes montrent qu'*Otx2* se lie alors aux glyco-protéines à sulfate de chondroïtine (CSPG) présentes dans les PNNs via ses motifs de liaison aux glycosaminoglycanes (Beurdeley et al., 2012) et interagit également avec un CSPG majeur, l'agrécan (Hou et al., 2017). La petite quantité de PNNs produite initialement en réponse au signal sensoriel est nécessaire pour ouvrir la période critique en capturant *Otx2* et en favorisant son accumulation dans les cellules PV. Une séquence d'internalisation positivement chargée permet l'internalisation d'*Otx2* dans les cellules PV (Sugiyama et al., 2009). Tout comme pour la maturation des cellules PV, la production des PNNs par ces cellules dépend de l'expérience (Hou et al., 2017). Puisque le gène codant pour l'enzyme de synthèse du sulfate de chondroïtine appelé *CSGalNacT1* est une cible d'*Otx2* (Sakai et al., 2017), l'internalisation continue d'*Otx2* accélère la formation des PNNs, qui à son

tour consolide la fonction des cellules PV et ferme la période critique (**Figure 28**). Le transfert d'Otx2 vers les cellules PV du cortex dépend donc des expériences sensorielles, et Otx2 agit comme un messager des expériences sensorielles. L'inhibition de l'internalisation chez l'adulte, en infusant un peptide qui interfère avec l'interaction d'Otx2 avec les PNNs, ou en infusant un anticorps exogène pour emprisonner Otx2, conduit à une diminution de l'activité des circuits PV et à une réactivation de la période critique (Beurdeley et al., 2012; Hou et al., 2017). L'augmentation mutuellement dépendante de la quantité de Otx2-PNNs induit donc une cascade d'évènements à deux étapes différentes, respectivement, déterminant l'ouverture et la fermeture de la période critique.

La co-localisation d'Otx2 avec les cellules PV est observée à travers le cortex et montre une corrélation entre les signaux Otx2 et le développement des cellules PV (Spatazza et al., 2013). Otx2 est donc un régulateur clé de la maturation expérience-dépendante des cellules PV relative à la plasticité juvénile.

III.5.3. Les gènes régulés par Otx2 identifiés aux stades postnataux

Comme il a été évoqué précédemment, Otx2 régule l'expression de gènes impliqués dans la maturation des cellules PV. Une analyse par séquençage après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) et un séquençage ARN spécifique aux interneurones (RNA seq) a permis d'identifier que parmi ces gènes figurent *Gad1/2* (GAD67/65) et *Ntrk2* (récepteur TrkB) (Sakai et al., 2017). Otx2 régule également des gènes impliqués dans la transcription, le développement neural, la signalisation et le métabolisme. De manière intéressante, parmi les gènes régulés par Otx2 en période post-natale (le cortex à P28) et qui ne le sont pas durant l'embryogénèse, figurent des gènes impliqués dans le transport ionique et le transport vésiculaire, dont les transporteurs d'ions potassium tel que *Kv3.1* qui fait partie d'une famille de canaux connue pour réguler les potentiels d'actions rapide des cellules PV matures. Cela suggère qu'Otx2 pourrait réguler directement des gènes impliqués dans les fonctions des cellules PV.

La délétion d'*Otx2* affecte l'expression de gènes régulant le stress oxydatif dans les cellules PV, tel que *Oxr1* (oxidation resistance-1) qui est impliqué dans la protection contre la neurodégénérescence induite par le stress dans le cervelet et dans la morphologie des mitochondries (Oliver et al., 2011; Wu et al., 2016). Une dérégulation de la balance redox dans les cellules PV a déjà été rapportée comme diminuant les PNNs environnants, conduisant à une

période critique anormale (Morishita et al., 2015). Les PNNs protègent les cellules PV du stress oxydative, et sont eux-mêmes vulnérables aux effets d'un tel stress (Cabungcal et al., 2013). En comparant les gènes différentiellement régulés entre des souris contrôles et des souris ayant subi une délétion conditionnelle globale d'Otx2 à P28, Sakai et collègues ont également identifié une modification de l'expression de gènes immédiats-précoces (*Fos*, *Fosb*, *Jun*, *Junb*, *Arc*, *Npas4*) qui peuvent être activés par le cAMP ou les ions calcium en réponse à des stimuli extracellulaires. Certains de ces gènes sont dépendant de l'activité (*Junb*, *Jund*, *Arc*) et se caractérisent par la présence de sites de liaison d'Otx2 spécifiques du stade post-natal (P28) (Sakai et al., 2017).

Otx2 fait donc partie d'une famille de gènes évolutivement très conservée, présente des Cnidaires aux Vertébrés, soulignant l'importance de ses fonctions. En effet, dès le début du développement son expression est requise pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Sa délétion précoce dans le développement conduit à un phénotype « sans tête » qui est létal. Plus tard, son expression est requise pour la formation de différentes structures sensorielles telles que la rétine ou l'oreille interne. La protéine Otx2 joue aussi un rôle important dans le développement du thalamus, du cervelet, de la VTA, de la MHb et de l'IPN. Aux stades postnataux son expression est maintenue dans très peu de régions à savoir la rétine et les aires visuelles comme le thalamus ou les colliculi, le cervelet, les plexus choroïdes, la VTA et les structures qui nous intéressent la MHb et l'IPN. De manière intéressante, Otx2 semble également marquer un sous-circuit Otx2 dépendant au sein du HIPS ce qui suggère qu'il joue un rôle particulier au sein de ce sous-circuit. En plus de ses rôles dans le maintien des fonctions visuelles et dans la régulation des périodes critiques dans les aires corticales, Otx2 joue un rôle critique dans les circuits de récompense : une diminution de l'expression d'Otx2 durant une période spécifique de l'enfance dans la VTA, un élément majeur du système de récompense, crée une susceptibilité à l'anxiété et la dépression. Toutes ces évidences suggèrent qu'Otx2 pourrait jouer également un rôle important dans la régulation des fonctions du HIPS, notamment dans le développement des maladies psychiatriques comme l'anxiété, la dépression ou l'addiction.

Objectifs

Le HIPS émerge comme un composant clé du système de récompense, évolutivement conservé chez tous les vertébrés. Les études récentes, consistant principalement à altérer artificiellement ses fonctions chez l'adulte ont permis d'associer des dysfonctionnements du HIPS au développement de maladies psychiatriques tels que l'addiction, l'anxiété et la dépression. Cependant, selon l'hypothèse neuro-développementale, ces maladies peuvent prendre leur origine durant des périodes critiques du développement pendant lesquelles, des facteurs environnementaux et génétiques affectent le développement et la maturation des circuits neuronaux. Tel pourrait être le cas du HIPS

Ce travail de thèse vise à mieux comprendre comment ces facteurs génétiques et environnementaux affectant le développement du HIPS peuvent conduire à l'apparition de troubles psychiatriques. Le facteur environnemental étudié ici est un modèle de stress chronique qui est connu pour induire des symptômes psychiatriques en fonction de sa durée, de son intensité et de sa chronicité. Nous nous sommes focalisés sur les fonctions d'Otx2 dans ce processus pour plusieurs raisons. Il est important pour le développement du HIPS et son expression est maintenue tout au long de la vie dans ce système. Il semble délimiter un sous-circuit particulier du HIPS. Une diminution de son expression affecte même à des stades tardifs les structures dans lesquelles il est exprimé. C'est un gène de susceptibilité aux maladies psychiatriques et une diminution de son expression dans une autre structure du système de récompense, la VTA, récapitule les effets d'un stress précoce entraînant une prédisposition à l'anxiété et à la dépression.

Cette thèse a donc à 5 objectifs :

- 1- Etudier les relations de connectivité entre les neurones Otx2+ de la MHb et ceux de l'IPN
- 2- Identifier la période critique du développement du HIPS
- 3- Etudier l'impact d'un stress chronique pendant cette période critique sur le développement d'une anxiété et/ou d'une dépression à long-terme
- 4- Etudier les effets d'une délétion d'Otx2 dans le HIPS sur ces comportements
- 5- Analyser les effets de l'interaction Otx2 – stress

Matériel et méthodes

I. Les animaux

Toutes les souris utilisées ont été générées et entretenues dans les locaux de l'animalerie de l'Institut de Biologie Valrose, Nice, France. Toutes les lignées de souris sont maintenues dans le fond génétique 129/Sv. Seuls les mâles ont été utilisés dans cette étude pour éviter les effets dus au dimorphisme sexuel. Les souris *Otx2*^{CreERT2/+} et *Otx2*^{fl^{ox}/fl^{ox}} ont été générées comme décrit précédemment (Fossat et al., 2006). Lisa V Goodrich a aimablement fourni la lignée *Ngn1*^{CreERT2/+}; *Ai14/Ai14* (Koundakjian et al., 2007). L'allèle Ai14 de cette lignée est utilisé comme rapporteur de l'expression de *Ngn1*^{CreERT2/+} pour toutes nos expérimentations. Des souris adultes ont été utilisées pour les injections virales de DREADD. Les tests comportementaux ont été effectués durant la phase de jour du cycle jour/ nuit de 12h. Les délétions post-natales ont été achevées en injectant en intrapéritonéal (IP) 15-30 µl de tamoxifène chez les nouveau-nés à P0 à une concentration de 2,5mg/ml avec des seringues à insuline de 300 µl. Tous les protocoles expérimentaux et les procédures ont été réalisés en suivant les règles de l'Union Européenne et ont été approuvés par les comités éthiques local et du ministère français.

II. Microinjection du DREADD viral

Les animaux ont été anesthésiés par une injection en IP d'un mélange de Tiletamine-Buprenorphine-Zolepam-Xylazine (TBZX) (60 mg/kg). Le dessus du crâne de l'animal est tondu, et un gel de Xylocaïne est appliqué sur le crâne avant l'incision et dans les oreilles pour limiter la douleur générée par les barres d'oreille de l'appareil. Après la désinfection de la zone à inciser, chaque animal est successivement placé et maintenu sur un cadre stéréotaxique. Les yeux sont protégés du dessèchement grâce à l'application d'ocry-gel. La canule est implantée unilatéralement à partir du bregma selon l'atlas de Paxinos et Franklin (2004). L'implantation est faite successivement à gauche puis à droite dans la MHb selon les coordonnées : A/P= -1,5 ; D/V= -2,75 ; latéral= +/- 0,2. 500 nl de suspension du vecteur AAV exprimant l'activateur DREADDs hM3D couplé aux protéines G_q (pAAV9-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry, 100 µL au titrage $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL) (Cat No. 44361-AAV9 ; Addgene, USA) sont injectés à une vitesse de 100 nl/ms dans les souris *Otx2*^{CreERT2/+} (n=5) et dans les souris contrôles *Otx2*^{+/+} (n=3) bilatéralement. A la fin de l'injection, la canule est laissée en place pour infuser pendant 5 min avant son retrait. A la fin de la chirurgie, un anti-inflammatoire (metacam, 0,5 mg/ml) est

administré par une injection IP. Le traitement anti-inflammatoire est poursuivi pendant 3 jours post-opératoire.

Dix jours après la transfection du virus, le tamoxifène (Sigma-Aldrich) dilué dans l'huile de tournesol à une concentration de 10mg/ml est injecté en IP à 5 µl/g du poids de la souris pour induire l'activation de la CRE, et donc l'expression du DREADD dans les neurones de la MHb.

Dix jours après l'injection de tamoxifène, la Clozapine N-oxide hydrochloride (CNO hydrochloride) (SML2304, Sigma-Aldrich) diluée dans le DMSO est injectée en IP à une concentration de 0,3 mg/kg. Les souris sont gardées au calme pendant 7h, pour laisser l'expression de *Egr1* retourner à son niveau basal, puis rapidement sacrifiées. Les souris *Otx2*^{CreERT2/+} (n=5) injectées avec le vecteur AAV sont divisées en deux groupes : un sous-groupe qui a reçu l'injection de CNO (n=3) tandis que l'autre partie des souris ne l'a pas reçue (n=2) constitue un groupe contrôle permettant de vérifier que sans le CNO le DREADD n'est pas activé.

III. Protocole de stress

Les souris sont placées dans des seringues percées, adaptées à la taille des animaux à chaque stade étudié, pour restreindre au maximum leurs mouvements. Cette restriction a été employée sous sa forme aiguë (une seule restriction de 2h) ou chronique (2h/jour tous les jours). Pour les analyses visant à étudier l'activité neuronale aux différentes périodes développementales, les animaux sont immédiatement sacrifiés à la fin du stress aigu ou du dernier stress chronique. Les animaux contrôles ne subissent pas de stress et sont immédiatement sacrifiés lorsqu'ils atteignent l'âge adéquat.

A la fin de la batterie de tests comportementaux, les animaux de chaque condition sont divisés en deux groupes : ceux qui subissent une dernière restriction de 2h avant la collecte des cerveaux et ceux qui sont directement sacrifiés.

IV. Ingestion de sucrose

La bouteille d'eau est remplacée par une solution de sucrose à 30% pour la nuit. Le sacrifice a lieu le lendemain matin.

V. Tests comportementaux

Durant le comportement 1 les niveaux d'anxiété sont évalués dans le test du champ ouvert, et le test du labyrinthe en croix surélevé. Durant le comportement 2 ces mêmes tests sont réalisés, les niveaux de dépression sont également évalués grâce au test de la curiosité et le test de la nage forcée (**Voir Figure 37 A**).

Les animaux sont acclimatés 1h dans la salle de comportement avant le début des tests. Toutes les vidéos sont acquises et analysées grâce au logiciel EthoVision XT. Pour tous les tests, l'arène est nettoyée à l'éthanol 70% à la fin du passage de chaque souris.

a. Test du champ ouvert

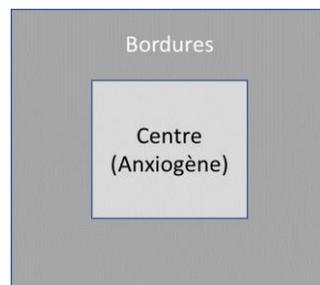


Figure 25. Schéma illustrant l'aspect et la délimitation des régions dans le champ ouvert

Le test du champ ouvert est utilisé pour mesurer les niveaux d'anxiété et le comportement ambulateur de la souris. Ce test s'effectue dans une arène dont les murs et le sol sont en PVC noir. La boîte est de dimension (40 L x 40 l x 30 H cm) et se divise en aire de bordure (50% de l'arène totale) et en aire centrale (50% de l'arène totale), modérément illuminé à 60 lux (**Figure 29**). Les souris sont individuellement placées sur un coin de l'arène et le comportement est enregistré pendant 5 min. Le temps passé au centre du champ, la latence pour explorer le centre du champ, le nombre d'entrées au centre de l'arène, la vitesse de déplacement moyenne et la distance totale parcourue sont les paramètres mesurés.

b. Test du labyrinthe en croix surélevé

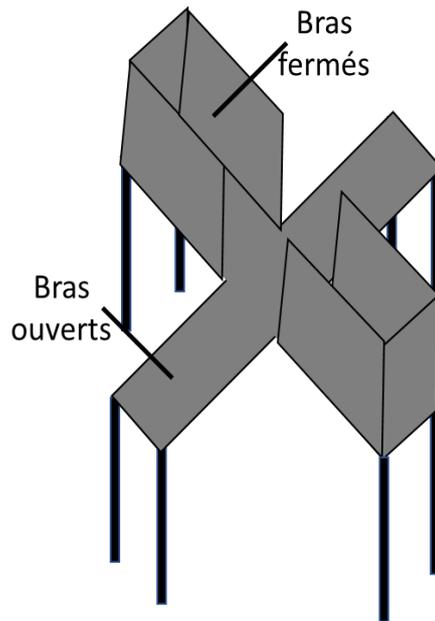


Figure 26. Schéma illustrant le labyrinthe en croix surélevé et ses deux bras ouverts et deux bras fermés

Le test de la croix surélevée permet de mesurer les niveaux d'anxiété. Cet équipement consiste en deux bras ouverts (50 x 5 cm), qui constituent une zone anxiogène pour la souris, et deux bras fermés (50 L x 5 x 16 H cm) qui s'étendent depuis une plateforme centrale (5 x 5 cm), élevée à hauteur de 50 cm au-dessus du sol (**Figure 30**). La souris est placée au centre de la plateforme, la tête faisant face à un des bras fermés et la vidéo est enregistrée pendant 5 min. La latence à explorer les bras ouverts et le temps total passé dans ces bras ouverts sont mesurés.

c. Test de curiosité

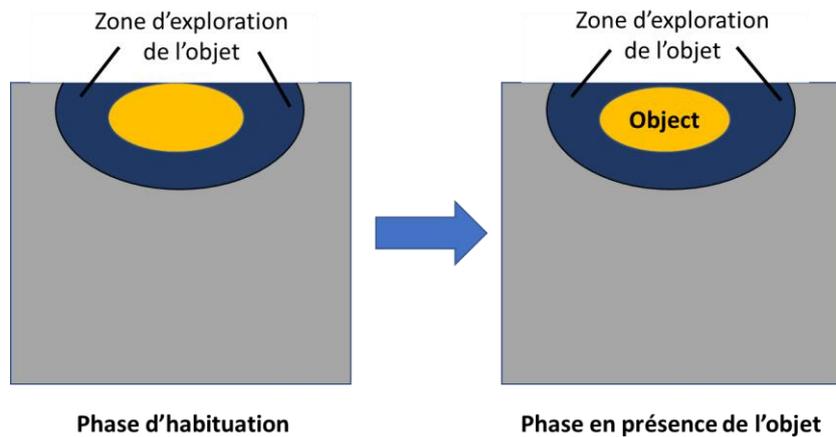


Figure 27. Schéma illustrant le principe du test de curiosité.

A gauche : exploration en l'absence de l'objet, à droite : exploration en présence de l'objet.

Ce test permet de mesurer le niveau de curiosité des animaux, qui est affaibli en cas de dépression. Les souris sont placées en face d'une zone d'exploration d'un objet positionné sur le milieu d'un côté de la boîte, délimité par un cylindre perforé. Le temps d'exploration sans l'objet est mesuré pendant 5 min pour permettre à l'animal de s'habituer à son environnement (Phase d'habituation). Un objet est ensuite introduit à l'intérieur du cylindre et la souris replacée en face de cette zone. Le temps passé en présence de l'objet est mesuré pendant 5 min (Phase exploration de l'objet) (**Figure 31**). Le pourcentage du temps passé dans la zone d'exploration de l'objet, en présence de l'objet, est ensuite calculé et correspond à la variable utilisée pour les différentes conditions. Cette variable permet également de définir des sous-groupes : les animaux qui passent un pourcentage de temps $\leq 40\%$ dans la zone d'exploration sont catégorisés dans le sous-groupe anxieux, ceux qui passent un pourcentage de temps $\geq 60\%$ sont des animaux classés dans le sous-groupe curieux, ceux qui passent entre 40 et 60% de leur temps dans la zone d'exploration de l'objet sont classés comme indifférents.

d. Test de la nage forcée

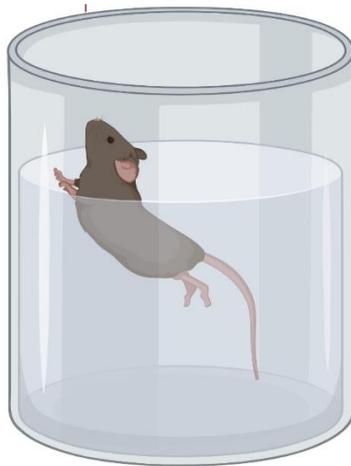


Figure 28. Illustration de test de la nage forcée.

Le test de la nage forcée a été utilisé pour mesurer le niveau de dépression des souris. Les souris sont placées individuellement dans un cylindre transparent, d'où la souris ne peut s'échapper, rempli d'eau sur une hauteur de 25 cm (23-25°C ; 12 cm de diamètre ; 30 cm de hauteur) pendant 6 min (**Figure 32**). La hauteur de l'eau est suffisante pour que les souris n'aient pas pied. Le temps d'immobilité pendant les 4 dernières minutes est mesuré sur le logiciel EthoVision XT. L'immobilité est définie comme l'absence de mouvement, excepté ceux nécessaires pour maintenir la tête de la souris en dehors de l'eau. L'eau est changée entre chaque session.

VI. Immunohistochimie et analyses histologiques

Les animaux utilisés pour identifier les périodes critiques du développement sont immédiatement sacrifiés à la fin du dernier stress ou à la fin du stress aigu, les cerveaux sont disséqués et directement congelés dans le composé Tissue-Tek OCT à -80°C (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Afin de conserver la fluorescence endogène du rapporteur, les animaux ayant été transfectés par le DREADD sont perfusés avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% tout comme les souris $Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2/+};Ai14/Ai14$, les souris $Otx2^{lox/lox};Ngn1^{CreERT2/+};Ai14/Ai14$ et leurs équivalents contrôles $Otx2^{lox/lox};Ai14/Ai14$ utilisées pour étudier les effets anatomiques de la délétion d'*Otx2* dans la MHB, l'activité neuronale en réponse au stress entre P30-36 et issus des

batteries d'analyses comportementales. Ces cerveaux sont ensuite post-fixés toute la nuit dans la PFA 4% à 4°C puis cryo-protégés par incubation dans du 30% PBS sucrose, avant d'être congelés dans le composé Tissue-Tek OCT à -80°C jusqu'à utilisation.

Les yeux sont prélevés sur les souris après dislocation cervicale et placés dans du PBS froid. Un petit trou est fait au niveau de l'*ora serrata*. Les yeux sont ensuite fixés dans la PFA 4% pendant 2h à température ambiante. Les yeux sont ensuite cryo-protégés par une incubation sur la nuit dans une solution de PBS contenant 20% de sucrose, puis congelés dans l'OCT et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Les cerveaux sont coupés en sections coronales de 16 µm sur cryostat Microm HM550 et les sections sont montées sur des lames SuperFrost + (Fisher Scientific).

Les yeux sont coupés au cryostat à une épaisseur de 14 µm et les coupes recueillies sur lames SuperFrost.

Les sections directement congelées sont d'abord post-fixées une heure dans de la PFA 4% fraîche avant le début des immunofluorescences. Avant l'étape commune de blocage, les sections provenant des souris perfusées des génotypes *Otx2*^{+/+};*Ngn1*^{CreERT2/+};*Ai14/Ai14*, *Otx2*^{flox/flox};*Ngn1*^{CreERT2/+};*Ai14/Ai14* et leur équivalent contrôle *Otx2*^{flox/flox};*Ai14/Ai14* subissent un traitement de démasquage des antigènes pour mieux révéler le signal *Otx2* qui est affaibli par l'étape de fixation. Cette étape consiste à incuber les lames dans un tampon de citrate, pH 6, pendant 8 min à 95°C. Une seconde étape de traitement au PBS-Glycine (glycine 100 mM), permet d'atténuer le bruit de fond. Le reste des étapes est identique entre les différentes conditions. Brièvement, les lames sont incubées dans une solution de blocage (PBS avec 0,2% de Triton et 10% de sérum fœtal bovin ou FBS) pendant 1h. Les anticorps primaires sont incubés toute la nuit à 4°C dans une solution de PBS avec 0,1% de Triton et 10% de FBS. Les anticorps secondaires sont ensuite incubés pendant 2h dans du PBS avec 0,1% de Triton et 10% de FBS. Les sections sont ensuite incubées 10 min dans le DAPI (1µg/ml).

Les anticorps primaires utilisés sont : souris anti-Brn3a (Merck/Millipore, 1:250), lapin anti-Er81 (don généreux de Silvia Arber, 1:1000), chèvre anti-Otx (R&D Systems, 1 :500), lapin anti Fos (SySy 1 :2000), lapin anti-Egr1 (cell signaling 1 :500), WFA biotynylée (vector laboratories, 1 :500).

Les anticorps secondaires (Jackson ImmunoResearch, 1:500) ont été utilisés : anti-lapin Alexa Fluor™ 488, anti-lapin Alexa Fluor™ 647, anti-chèvre Cy3, anti-souris Alexa Fluor™ 647, Conjugué streptavidine Alexa Fluor™ 488.

VII. Microscopie

Les images de la rétine ont été prises sur microscope confocal Zeiss 780 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Le reste des images a été pris sur microscope à plein champ AxioObserver - Zeiss (2011) avec une caméra sCMOS ANDOR Neo et sur stéréomicroscope couplé à une caméra digitale (Zeiss axioplan2). Les images ont été traitées en utilisant le logiciel ImageJ et les figures ont été montées en utilisant Adobe Photoshop.

VIII. Analyses statistiques

Les classements sont effectués en regroupant tous les animaux du même génotype (souris stressé et non stressé). Un rang est alors attribué aux animaux en fonction de la valeur de la variable (temps passé dans les bras ouverts de la croix surélevée), ordonnés de manière croissante.

Les outliers (valeur 1,5 fois supérieure à l'intervalle interquartile au-dessus du 75^{ième} percentile ou valeur 1,5 fois inférieure à l'intervalle interquartile en dessous du 25^{ième} percentile) ont été retirés des analyses statistiques.

Les analyses statistiques ont été faites sur le logiciel R. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM.

La comparaison de la moyenne entre deux groupes a été faite en utilisant le t-test de Student, lorsque les variances sont égales et le t-test incluant la correction de Welch lorsque celle-ci ne l'est pas.

Les anova ont été calculées en utilisant la fonction ANOVA du progiciel « car », et les différences d'effectifs ont été corrigés en prenant en compte une erreur de type III. Les comparaisons entre trois groupes ont été faites en utilisant un test ANOVA unidirectionnel.

Les effets de l'interaction entre le stress chronique et la délétion d'Otx2 ont été révélés en utilisant un test ANOVA bidirectionnel.

IX. Schémas

Les figures 32 et Figure 38A ont été réalisées à partir de Biorender.

Résultats

I. Le HIPOPS est un circuit interconnecté au sein du HIPS

I.1. Les neurones *Otx2*^{High} de la MHb projettent sur les neurones *Otx2*⁺ du cIPN

Le HIPS est reconnu comme un circuit critique impliqué dans l'anxiété, la dépression et la motivation. Cependant les différentes études menées lui attribuent des fonctions différentes voire contradictoires car les techniques utilisées ne permettent pas de cibler les mêmes régions du HIPS. Tous les neurones de la MHb sont glutamatergiques mais d'autres neurotransmetteurs sont co-synthétisés. Une sous-population de neurones de la MHb, proche de la zone progénitrice exprime également le facteur de transcription *Otx2*, codé par un gène de prédisposition aux maladies psychiatriques. L'IPN est principalement GABAergique mais le rIPN contient aussi des neurones glutamatergiques. Le cIPN quant à lui est constitué de sous-noyaux exprimant soit *Pax7* soit *Otx2*. Le HIPS est donc un circuit complexe probablement constitué de sous-circuits contrôlant différentes fonctions. Il est nécessaire de caractériser ces différents sous-circuits pour mieux comprendre les fonctions du HIPS. Une étude du rôle développemental d'*Otx2* dans la MHb et dans l'IPN ont donc été réalisées au sein du laboratoire et a permis de démontrer que :

- *Otx2* est nécessaire pour la génération des derniers neurones normalement produits dans la MHb que l'on appelle les neurones *Otx2*^{High} car ils maintiennent une forte expression d'*Otx2* même aux stades postnataux
- *Otx2* est nécessaire pour assurer la migration des neurones qui vont former l'IPN

J'ai été particulièrement impliquée dans la deuxième partie de cette étude, où nous avons analysé les projections des neurones *Otx2*^{High} de la MHb. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence d'un sous-circuit entièrement dépendant du gène *Otx2* dans le HIPS.

Ces résultats ont été publiés dans le journal *Journal of Neuroscience* sous le titre : « Developmental Requirement of Homeoprotein *Otx2* for Specific Habenulo-Interpeduncular Subcircuits » par Nuria Ruiz-Reig, [Malalaniaina Rakotobe](#), Ingrid Bethus, Gwenaëlle Le Menn, Hannah-Isadora Huditz, Hélène Marie, Thomas Lamonerie, et Fabien D'Autréaux.

Development/Plasticity/Repair

Developmental Requirement of Homeoprotein *Otx2* for Specific Habenulo-Interpeduncular Subcircuits

Nuria Ruiz-Reig,¹ Malalaniaina Rakotobe,¹ Ingrid Bethus,² Gwenaëlle Le Menn,¹ Hannah-Isadora Huditz,¹ Hélène Marie,² Thomas Lamonerie,¹ and Fabien D'Autr  aux¹

¹Universit   Côte d'Azur, Centre National de la Recherche Scientifique, Inserm, Institut de Biologie Valrose, 06108 Nice, France, and ²Universit   Côte d'Azur, Centre National de la Recherche Scientifique Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire, Nice, France

The habenulo-interpeduncular system (HIPS) is now recognized as a critical circuit modulating aversion, reward, and social behavior. There is evidence that dysfunction of this circuit leads to psychiatric disorders. Because psychiatric diseases may originate in developmental abnormalities, it is crucial to investigate the developmental mechanisms controlling the formation of the HIPS. Thus far, this issue has been the focus of limited studies. Here, we explored the developmental processes underlying the formation of the medial habenula (MHb) and its unique output, the interpeduncular nucleus (IPN), in mice independently of their gender. We report that the *Otx2* homeobox gene is essential for the proper development of both structures. We show that MHb and IPN neurons require *Otx2* at different developmental stages and, in both cases, *Otx2* deletion leads to disruption of HIPS subcircuits. Finally, we show that *Otx2*⁺ neurons tend to be preferentially interconnected. This study reveals that synaptically connected components of the HIPS, despite radically different developmental strategies, share high sensitivity to *Otx2* expression.

Key words: circuits formation; genetic models; homeoprotein; neuronal migration; psychiatric diseases; reward circuits

Significance Statement

Brain reward circuits are highly complex and still poorly understood. In particular, it is important to understand how these circuits form as many psychiatric diseases may arise from their abnormal development. This work shows that *Otx2*, a critical evolutionary conserved gene implicated in brain development and a predisposing factor for psychiatric diseases, is required for the formation of the habenulo-interpeduncular system (HIPS), an important component of the reward circuit. *Otx2* deletion affects multiple processes such as proliferation and migration of HIPS neurons. Furthermore, neurons expressing *Otx2* are preferentially interconnected. Therefore, *Otx2* expression may represent a code that specifies the connectivity of functional subunits of the HIPS. Importantly, the *Otx2* conditional knock-out animals used in this study might represent a new genetic model of psychiatric diseases.

Introduction

Mounting evidence suggests that mood disorders and drug addiction are associated with abnormalities of brain reward circuits. The “neurodevelopmental hypothesis,” which was formulated 50

years ago and continuously receives support, states that these disorders take root during development. However, few studies have thus far focused on the development of reward circuits. An important component of these circuits, the habenulo-interpeduncular system (HIPS), composed of the medial habenula (MHb) connected to the interpeduncular nucleus (IPN) via the fasciculus retroflexus, represents a major connection between the limbic system in the forebrain and the monoaminergic systems in the midbrain and hindbrain. The HIPS is thought to be a regulator of mood and reward (for review, see McLaughlin et al., 2017), although major controversies remain (Yamaguchi et al., 2013; Hsu et al., 2016). The circuitry between MHb and IPN is classically subdivided into two parts. The dorsal part of the MHb

Received July 25, 2018; revised Dec. 6, 2018; accepted Dec. 16, 2018.

Author contributions: F.D. wrote the first draft of the paper. N.R.-R., I.B., and F.D. designed research; N.R.-R., M.R., I.B., G.L.M., H.-I.H., and F.D. performed research; H.M. and T.L. contributed unpublished reagents/analytic tools; N.R.-R., M.R., G.L.M., H.-I.H., T.L., and F.D. analyzed data; N.R.-R., T.L., and F.D. wrote the paper.

This work was supported by the University of Nice (CSI funding) and the National Center for Scientific Research (CNRS). N.R.-R. is funded by a postdoctoral fellowship from the City of Nice, France (Aide Individuelle aux Chercheurs, 2016). We would like to particularly thank Aliz  e Costantini for preliminary data, Aurélie Biancardini for mouse husbandry, Renaud Rebillard and Mouna Sekoni Khemiri for genotyping. We thank Alexandra Pierani for the *Dbx1*^{Cre} line; Naomi Galili, Jonathan Epstein, and Clayton A. Buck for the Gscl antibodies; Silvia Arber for the Er81 antibodies; Paola Bovolenta and Michele Studer for ISH probes; and the iBV PRISM platform, especially Magali Mondin and Simon Lachambre.

The authors declare no competing financial interests.

N. Ruiz-Reig's present address: Institute of Neuroscience of the Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium.

Correspondence should be addressed to Fabien D'Autréaux at dautreaux@unice.fr.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1818-18.2018>

Copyright    2019 the authors 0270-6474/19/391005-15\$15.00/0

(dMHB), which expresses *Tac1* and contains substance P, targets the lateral interpeduncular nucleus (Lat-IPN), whereas the ventral part of the MHB (vMHB), which expresses *Chat* and contains acetylcholine, targets the medial IPN (Contestabile et al., 1987). These anatomically and genetically distinct parts may support different functions (Yamaguchi et al., 2013).

Although dysregulation of HIPS development may lead to mood disorders such as anxiety, not much is known about this issue in mammals. It has been shown that early patterning of the epithalamus, giving rise to the habenula, critically depends on signals expressed by the zona limitans intrathalamica (ZLI) such as *Shh* (Chatterjee et al., 2014) and that the transcription factor *Brn3a* is crucial for differentiation and maintenance of habenular neurons (Quina et al., 2009; Serrano-Saiz et al., 2018). The homeodomain transcription factor *Otx2* is expressed in the epithalamus. This expression is conserved from fish to humans (Simeone et al., 1992; Mori et al., 1994; Larsen et al., 2010), suggesting an evolutionary conserved function. In particular, *Otx2* expression in the habenula has been reported (Courtois et al., 2003; Mallika et al., 2015), although little is known about its dynamics during development. Regarding IPN development, the origin of the different IPN subparts has been studied in the chick (Lorente-Cánovas et al., 2012). IPN neurons originate from isthmic and rhombomere 1 (r1) regions. They can be divided into three main groups: the *Nkx6.1*⁺ prodromal domain, the *Pax7*⁺ rostral IPN (rIPN) and the caudal IPN (cIPN), largely *Otx2*⁺ with one subpopulation *Pax7*⁺/*Otx2*⁻. To form the IPN, IPN neurons migrate long distances through specific routes. Little is known about molecular pathways that guide them. One study reported that *Shh* deletion affected rIPN but not cIPN formation (Moreno-Bravo et al., 2014). Another study reported that the knock-out of the IPN-restricted *Gooseoid like* (*Gscl*) homeobox gene led to the disappearance of some molecular markers while the IPN was still forming. Interestingly, *Gscl* mutants were shown to exhibit abnormal sleep patterns (Funato et al., 2010).

Considering that abnormalities of HIPS development may lead to mood disorders, it is expected that genes controlling HIPS development may be recognized as susceptibility genes linked to these diseases. One particularly interesting candidate for mood disorders is *Otx2*. It is a susceptibility gene for bipolar disorders (Sabuncuyan et al., 2007; Jukic et al., 2015) and is already known to play important functions in reward circuits. In mice, *Otx2* downregulation in the ventral tegmental area (VTA) is induced by early stress and is tightly linked to the risk of developing depressive and anxiety-like disorders (Peña et al., 2017). Beyond the reward system, *Otx2* is essential for the development of brain, cerebellum, pineal gland, and eye (for review, see Beby and Lamonerie, 2013). The role of *Otx2* specifically in HIPS development has yet to be investigated and the list of genes known to be involved in this development is very short. In this study, we therefore investigated whether *Otx2* is important for the formation of both the habenula and the IPN. We report crucial and multiple functions of this developmental gene at multiple steps of HIPS development.

Materials and Methods

Mice and tamoxifen injections. All mice used in this study were maintained in the animal facilities of the Institut de Biologie Valrose at Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France. To visualize *Otx2* expression pattern we used the reporter mouse line, in which *Otx2* protein is fused to the fluorescence protein GFP (*Otx2-GFP*^{+/+}; Fossat et al., 2007). *Otx2*^{CreERT2} and *Otx2*^{flox/flox} mice were generated as described previously (Fossat et al., 2006). The *Dbx1*^{Cre} mouse line (Bielle et al.,

2005) was obtained from A. Pierani (Institut Jacques Monod, Paris, France). Cre lines were mated with reporter mouse lines *ROSA26*^{YFP} (Srinivas et al., 2001) and *TAU*^{GFP-NLSlacZ} (obtained from The Jackson Laboratory and developed by S. Arber; Hippenmeyer et al., 2005). All mouse lines were maintained in the 129/Sv background. Embryonic day 0.5 (E0.5) corresponded to the day that a vaginal plug was detected. Tamoxifen (Sigma-Aldrich) diluted in sunflower oil at 10 mg/ml was injected in pregnant females at 5 μ g/bodyweight. The care and handling of the animals prior or during the experimental procedures followed European Union rules and were approved by the French Animal Care and local ethic Committee (CIEPAL NCE/2015-202).

Immunohistochemistry and in situ hybridization. Preparation of the brains for vibratome and cryostat sections were performed as described previously (Ruiz-Reig et al., 2018). Immunohistochemical staining was performed in a vibratome (80 μ m) and cryostat (12–16 μ m) sections using the following primary antibodies: chicken anti-GFP (Aves Laboratories, 1:2000), sheep anti-GFP (AbD Serotec, 1:200), mouse anti-*Brn3a* (Merck/Millipore, 1:250), rabbit anti-Er81 (generous gift frp, Silvia Arber, 1:1000), rabbit anti-Ki67 (Abcam, 1:100), goat anti-*Otx* (R&D Systems, 1:500), mouse anti-*Pax7* (DSHB, 1:200), rabbit anti-*Gscl* (generous gift from Naomi Galili and Clayton A. Buck, University of Pennsylvania, 1:200; Galili et al., 1998), mouse anti-*Nkx6.1* (DSHB, 1:100), mouse anti-GATA3 (Santa Cruz Biotechnology, 1:50), mouse anti-EN1 (DSHB, 1:100), rabbit anti-*Pax6* (Merck/Millipore, 1:500), mouse IgM anti-RC2 (DSHB, 1:500), rabbit anti-ER (Thermo Fisher Scientific, 1:200), rabbit anti-GABA (Sigma-Aldrich, 1:1000), guinea pig anti-VGlu1 (Synaptic Systems, 1:500), rabbit anti-substance P (Millipore, 1:500), goat anti-DCC (R&D Systems, 1:400), and goat anti-ChAT (Millipore, 1:500). Alexa Fluor secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:500) were also used. Prior incubation of adult brain sections with mouse antibodies, a blocking step of 2 h with mouse Fab fragments was performed. Primary antibodies against *Brn3a*, *En1*, *Gata3*, and *Pax7* required prior antigen retrieval treatment (citrate buffer, pH 6, for 10 min at 95°C). Notes on goat anti-*Otx* (R&D Systems): these antibodies are known to recognize to some levels other homologous proteins to *Otx2*, such as *Otx1*, *Crx*, and maybe *Otp* (suggested by the expression pattern in the hypothalamus). For that reason, we used the *Otx2*-GFP line to monitor *Otx2* expression with more precision. Nevertheless, these antibodies are useful in many cases because their affinity to *Otx2* largely exceeds their affinity to other molecules. In the habenula and the IPN of *Otx2* cKO animals, the absence of anti-*Otx2* immunoreactivity suggested that these cells do not express other homologs or at an undetectable level, at least in the absence of *Otx2*.

In situ hybridization was performed in cryosections (12–16 μ m) as described previously (Martinez-Lopez et al., 2015). The following probes were used: *Gbx2* (Wassarman et al., 1997), *Shh* (Echelard et al., 1993), *Dbx1* (Lu et al., 1994), and *Netrin1* (Serafini et al., 1996). *Tac1* and *Dcc* probes were prepared by PCR based on the Allen Atlas website with the following primers: *Tac1* forward: CCCCTGAACGCACTATCTATTC, *Tac1* reverse: TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGGAAACATGCTGCTAGGATA, *Dcc* forward: ATGGTGACCAAGAACAGAAAGGT, *Dcc* reverse: TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATCACTGCTACAATACCACG.

EdU, BrdU injections, and TUNEL staining. To label dividing cells, pregnant females were subjected to intraperitoneal injection of EdU and BrdU (50 mg/kg body weight). Embryos were collected at different embryonic stages and processed for EdU staining (Click-iT EdU Imaging Kits; Invitrogen). For BrdU staining, vibratome sections were pretreated with HCl 2 N during 30 min followed by a 10 min incubation with borate buffer and immunodetection using primary antibody mouse anti-BrdU (Invitrogen, 1:50). To detect cell death, we used TUNEL staining (*In situ* Cell Death Detection Kit, TMR red; Roche) in vibratome sections. Positive controls, performed by pretreating sections with DNase1 (1500 U/ml) for 10 min at room temperature, validated the efficiency of the TUNEL assay.

Stereotaxic injections. Before surgical procedures, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of an anesthetic combination (ketamine 87 mg/ml, xylazine 13 mg/ml) at a dosage of 1 ml/kg. After verification of deep anesthesia by pinching the tail, mice were placed on

Table 1. Summary of datasets and statistics

Figure	Datasets	Parameter tested	<i>t</i> test <i>p</i> -value	<i>T</i> value	df	Significance
1A–H	E11.5, E13.5, E15.5, E18.5 (each stage <i>n</i> = 3)	GFP/Ki67 and GFP/Brn3a IFS	NA	NA	NA	NA
1I	E18.5 (<i>n</i> = 3)	GFP/Brn3a/Er81 IFS	NA	NA	NA	NA
1J	E18.5 (<i>n</i> = 3)	<i>Tac1</i> ISH	NA	NA	NA	NA
1K–O	P0 (each injection stage <i>n</i> = 3)	Labeling EdU	NA	NA	NA	NA
2A–E''	E13.5 (each genotype <i>n</i> = 3)	YFP/Otx2/DAPI IF, Shh ISH and Gbx2 ISH	NA	NA	NA	NA
2F–F'', graph G	E18.5 (each genotype <i>n</i> = 4)	Mean Brn3a ⁺ area	[a] vs [c] <i>p</i> < 0.001; [b] vs [c] <i>p</i> < 0.01; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.64	6.28; 3.97; 0.49	6; 6; 6	***, **, ns
		Mean Er81 ⁺ area	[a] vs [c] <i>p</i> < 0.01; [b] vs [c] <i>p</i> = 0.048; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.66	4.55; 2.48; 0.46	6; 6; 6	**, ns; ns
		Mean Brn3a ⁺ Er81 [−] area	[a] vs [c] <i>p</i> < 0.001; [b] vs [c] <i>p</i> < 0.001; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.58	9.71; 7.75; 0.58	6; 6; 6	***, ***, ns
2F–F'', graph H	E18.5 ([a] and [b] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 4)	Mean Brn3a ⁺ cells	[a] vs [c] <i>p</i> < 0.01; [b] vs [c] <i>p</i> < 0.01; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.72	6.13; 5.41; 0.39	5; 5; 4	**, ***, ns
		Mean Er81 ⁺ cells	[a] vs [c] <i>p</i> = 0.028; [b] vs [c] <i>p</i> = 0.042; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.64	3.06; 2.72; 0.50	5; 5; 4	*, *, ns
		Mean Brn3a ⁺ Er81 [−] cells	[a] vs [c] <i>p</i> < 0.01; [b] vs [c] <i>p</i> < 0.01; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.25	6.52; 5.69; 1.33	5; 5; 4	**, ***, ns
2I–I'', graph K	E18.5 (each genotype <i>n</i> = 3)	Mean EdU ⁺ (E13.5 injection) cells in MHb	[a] vs [c] <i>p</i> = 0.84; [b] vs [c] <i>p</i> = 0.36; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.62	0.22; 1.02; 0.54	4; 4; 4	ns; ns; ns
2J–J'', graph L	E18.5 ([a] <i>n</i> = 4) ([b] and [c] <i>n</i> = 3)	Mean EdU ⁺ (E15.5 injection) cells in MHb	[a] vs [c] <i>p</i> = 0.033; [b] vs [c] <i>p</i> = 0.011; [a] vs [b] <i>p</i> = 0.62	2.92; 4.45; 0.53	5; 4; 5	*, *, ns
3A–C'	All stages (each genotype <i>n</i> = 3), controls (<i>n</i> = 1)	TUNEL staining	NA	NA	NA	NA
3D–E'4, graph F	E13.5 ([a] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 4) E15.5 ([a] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 5)	Mean MHb VZ length	E13.5 [a] vs [c] <i>p</i> = 0.28; E15.5 [a] vs [c] <i>p</i> < 0.001	1.21; 7.91	5; 6	ns; ***
3D–E'4, graph G	E13.5 ([a] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 4) E15.5 ([a] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 5)	Mean Ki67 ⁺ cells	E13.5 [a] vs [c] <i>p</i> = 0.022; E15.5 [a] vs [c] <i>p</i> = 0.019	3.29; 3.20	5; 6	*, *
3D–E'4, graph H	E13.5 ([a] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 4) E15.5 ([a] <i>n</i> = 3) ([c] <i>n</i> = 5)	Mean BrdU ⁺ EdU [−] cells	E13.5 [a] vs [c] <i>p</i> = 0.45; E15.5 [a] vs [c] <i>p</i> < 0.01	0.81; 4.27	5; 6	ns; **
4A	E15.5 (<i>n</i> = 3)	<i>Dbx1</i> ISH	NA	NA	NA	NA
4B–D	E18.5 (<i>n</i> = 3)	YFP/Brn3a/Pax6 and Otx2/Brn3a/Pax6 IFS	NA	NA	NA	NA
4F–H, graph H	E18.5 (<i>n</i> = 3)	Mean Brn3a ⁺ ; ER81 ⁺ ; Brn3a ⁺ ER81 [−] cells	[d] vs [e] <i>p</i> < 0.001; [d] vs [e] <i>p</i> = 0.038; [d] vs [e] <i>p</i> < 0.01	10.36; 3.05; 6.01	4; 4; 4	***, *, **
4I–N	E18.5 (each genotype <i>n</i> = 3)	EdU/Brn3a IF and Nurr1 IF/Tac1 ISH	NA	NA	NA	NA
5B,C	P10 (<i>n</i> = 3)	GFP/Pax7 and GFP/Gscl IFS	NA	NA	NA	NA
5D–Dd4	E11.5 (<i>n</i> = 3)	Labeling GFP and several markers IFS	NA	NA	NA	NA
5E,F	P0 (<i>n</i> = 3)	Labeling EdU/GFP IF	NA	NA	NA	NA
5G,H	E13.5 E18.5 (<i>n</i> = 5) E15.5 (<i>n</i> = 6)	GFP IF	NA	NA	NA	NA
5J,M	Adult (<i>n</i> = 2)	GFP/GABA IF	NA	NA	NA	NA
6A–D	E13.5, E15.5 (each genotype <i>n</i> = 3)	ER/RC2 IF	NA	NA	NA	NA
6E–L	E18.5 (each genotype <i>n</i> = 3)	Several markers IF	NA	NA	NA	NA
7A–F	E13.5 (each genotype <i>n</i> = 3)	DCC ISH, Netrin1 ISH and ER/DCC IF	NA	NA	NA	NA
8A–D	P29 (<i>n</i> = 3)	Several markers IF	NA	NA	NA	NA
8F,G	P60 (<i>n</i> = 3)	eYFP/SP IF	NA	NA	NA	NA
8H,I	P21 (each genotype <i>n</i> = 3)	ChAT/SP IF	NA	NA	NA	NA

The lines of the table follow from top to bottom the number of the main figures by ascending order. All data shown in the manuscript are presented and the details of the statistical analyzes performed are indicated when applicable. *T* value, *df*, and significance are shown in respective order of the *t* test *p*-values. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

[a], *Otx2*^{flax/flax}; [b], *Otx2*^{CreERT2/+}; [c], *Otx2*^{CreERT2/flax}; [d], *Dbx1Cre;Otx2*^{flax/+}; [e], *Dbx1Cre;Otx2*^{flax/flax}; *df*, degree of freedom; *n*, number of animals used; NA, not applicable; ns, not significant; IF, immunofluorescence; ISH, *in situ* hybridization.

a stereotaxic apparatus (Stoelting). The bregma coordinates used for unilateral injections were as follows: MHb, anterior/posterior (AP) −1.6, medial/lateral (ML) +0.25, dorso/ventral (DV) −2.75. The incisor bar was leveled with the interaural line. One hole was drilled and injections of AAVs expressing EYFP upon Cre recombination were performed at a speed of 100 nl/min with a 500 nl total volume (pAAV-Ef1a-DIO

ChETA-EYFP; Penn Core). The cannula was left in place for 5 min to infuse before removal and suture of the skin.

Imaging, experimental design, and statistical analysis. Images were captured with a laser scanning confocal microscope (Zeiss 780) and with a stereomicroscope coupled to a digital camera (Zeiss axioplan2). Images were processed using ZEN and ImageJ software and figures were pre-

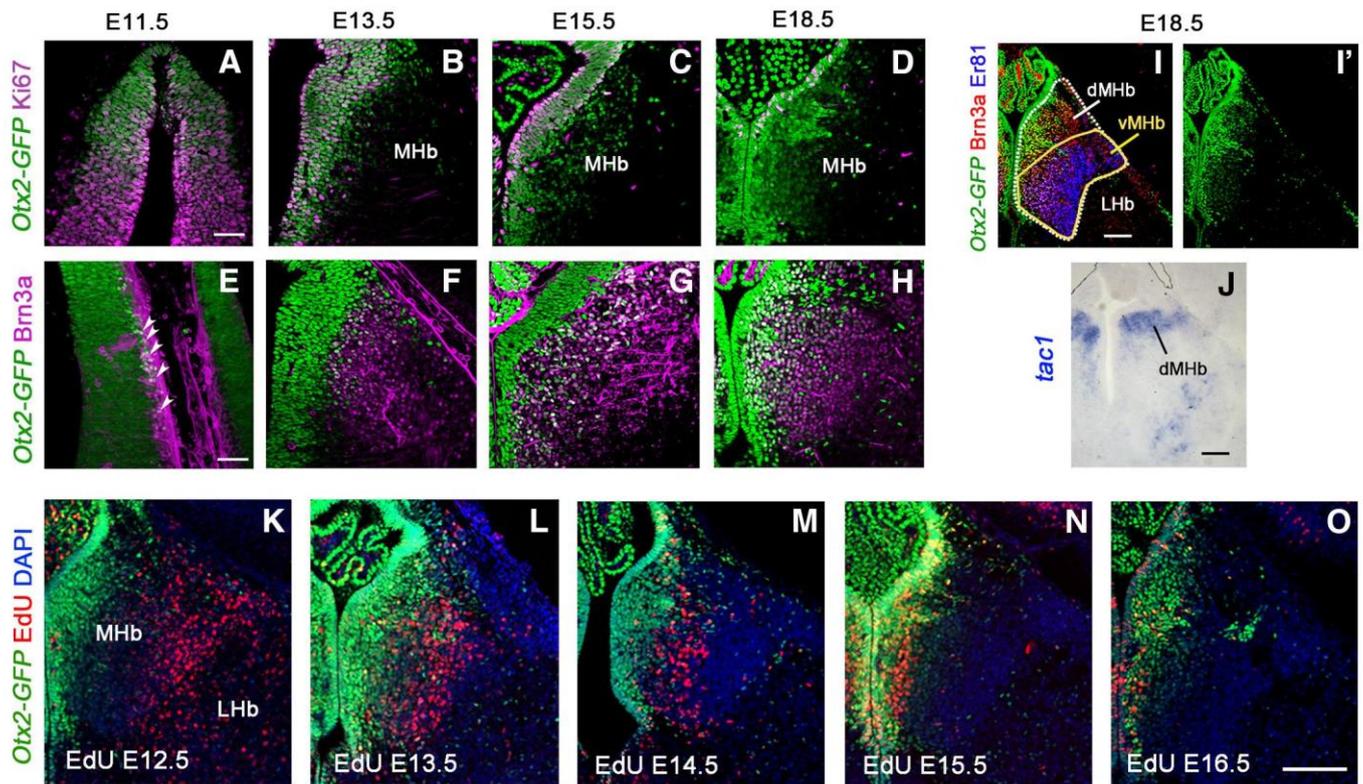


Figure 1. Temporal expression of Otx2 and neurons birth-dating in the medial habenula. **A–H**, Coronal sections of *Otx2-GFP* mouse embryos at different stages of development showing the expression of Otx2 (GFP^{+}) in progenitor cells labeled with Ki67 in the ventricular zone of the Hb (**A–D**) and the expression of Otx2 (GFP^{+}) in medial habenular neurons labeled with Brn3a (**E–H**). White arrowheads in **E** show few postmitotic neurons double labeled with Otx2 (GFP^{+}) and Brn3a at E11.5. **I, I'**, Coronal section of E18.5 *Otx2-GFP* mouse embryo immunolabeled for Brn3a to mark all MHb neurons and for Er81 to mark the ventral MHb. GFP colocalized with both markers in the medial part of the MHb. **J**, *In situ* hybridization for *Tac1* showing the dorsal part of the MHb. **K, O**, Immunofluorescence of GFP (Otx2) and EdU labeling in coronal sections at the level of the MHb in P0 *Otx2-GFP* brains when EdU was injected at different embryonic stages. Scale bars: **A–H** (shown in **A** and **E**), 50 μm ; **I–O** (shown in **I, J**, and **O**), 100 μm .

pared using the Adobe Photoshop and Illustrator CS5 software package. A minimum of three animals and three slices per animal were used for all the analyses and quantifications (see Table 1 for details). All quantifications are presented as the mean \pm SE. For convenience when presenting statistics, groups of data from *Otx2*^{flox/flox}, *Otx2*^{CreERT/+}, and *Otx2*^{CreERT/flox} were named *a–c*, respectively. The lines *Dbx1*^{Cre}; *Otx2*^{flox/+} and *Dbx1*^{Cre}; *Otx2*^{flox/flox} were named *d* and *e*, respectively. When comparing two groups of data between mutants and controls using Student's *t* test, unequal variance was first rejected by performing the *F* test when $p > 0.05$. All statistical comparisons failed to show unequal variance. Unpaired, two-tailed *t* test assuming equal variance was then used to compare mean data from two groups. The size of samples (*n*), degree of freedom, and *p*-values are indicated for each data comparison (Table 1). The exact *p*-values are indicated when $p > 0.01$. Minimal statistical significance was fixed at $p < 0.05$. *p*-values are represented on the graphs as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results

Otx2 is expressed throughout the development of the habenula

We undertook the precise description of *Otx2* expression both temporally and topographically in the habenula (Fig. 1). Because antibodies against Otx2 recognize to some extent other homologous proteins such as Otx1, we used an *Otx2-GFP* knock-in mouse that expresses a version of Otx2 fused to GFP to strictly monitor *Otx2* expression (Fossat et al., 2007). To determine whether *Otx2* is expressed in neural progenitors or in postmitotic neurons, we compared *Otx2-GFP* expression with Ki67 staining, a cell proliferation marker, and with Brn3a staining, a well known postmitotic marker of medial habenular neurons (Quina et al.,

2009). In the epithalamus region, the progenitor domain was doubly labeled with Otx2 and Ki67 at each stage analyzed starting from E11.5, indicating sustained *Otx2* expression during neurogenesis (Fig. 1*A–D*). Only rare cells were Brn3a⁺ at E11.5, corresponding to cells exiting the proliferative zone (Fig. 1*E*, arrowheads). From E13.5 on, *Otx2* was coexpressed with Brn3a in immature postmitotic neurons once they had moved outside of the proliferative domain. *Otx2* expression decreased as cells migrated away from the midline with a medial-high, lateral-low expression gradient (Fig. 1*F–H*). At E18.5, development of the habenula appeared completed and the medial and lateral habenula (MHb and LHb, respectively) could be anatomically recognized. *Otx2* expression was restricted to the MHb, whereas Brn3a was expressed in all neurons of the MHb and in some sparse neurons of the LHb (Quina et al., 2009). We used another marker, Er81 (also known as ETV1), to visualize the two main subparts of the habenula; the vMHb (Er81⁺) and dMHb (Er81[−]) that correspond to cholinergic and substance P-ergic subregions, respectively (Fig. 1*I, J*). Interestingly, *Otx2* expression was not restricted to one of these subparts but exhibited a mediolateral gradient in the MHb, with highly expressing neurons in the medial part (*Otx2*^{High}) and neurons presenting low to absent expression (*Otx2*^{Low}) in the lateral part (Fig. 1*I'*). Proportionally, *Otx2*^{High} neurons contributed to a large part of the dMHb and to a small part of the vMHb (Fig. 1*I, I'*). To understand how neurogenesis occurs and populates the different parts of the habenula, we analyzed animals at P0 that had been injected with EdU at various stages of development. The medial habenula started to be

clearly labeled at E12.5 and this labeling followed a wave from lateral to medial parts with a peak of density for the most medial part at E15.5 (Fig. 1K–O). As described previously (Angevine, 1970), habenula neurogenesis occurs via a centrifugal mode, with the early-born neurons settling outside and the later-born neurons occupying a ventricular position. Therefore, the latest-born habenular neurons are those that strongly maintain *Otx2* expression, whereas the earliest-born neurons found in the lateral part are characterized by low or absent expression of *Otx2* (Fig. 1K–O).

Otx2 deletion leads to neurogenesis defects in the Hb

We next tested whether *Otx2* is required for the formation of the Hb. According to our birth-dating analysis, MHb neurons start to appear from ~E12.5 for the most lateral part and are all born before E17.5 (Fig. 1K–O). Because they all derive from *Otx2*⁺ progenitors, we took advantage of the *Otx2*^{CreERT2/+} and *Otx2*^{flox/flox} mouse lines (Fossat et al., 2006) to inactivate *Otx2* from E11.5 by an intraperitoneal injection of tamoxifen (TamE11.5). We then compared *Otx2*^{CreERT2/flox(TamE11.5)} conditional mutants with *Otx2*^{flox/flox(TamE11.5)} control littermates or with *Otx2*^{CreERT2/+ (TamE11.5)} embryos (from *Otx2*^{+/+} females) as additional controls at E18.5 (Fig. 2).

Otx2 deletion induced at E11.5 does not affect early patterning of the diencephalon

Because early *Otx2* ablation has been shown previously to affect forebrain patterning, we first verified that *Otx2* ablation at E11.5 did not affect early steps of diencephalon development, which would prevent analysis of a direct role of *Otx2* in Hb formation. It was shown in zebrafish, for example, that in hypomorphic mutants for *Otx1* and *Otx2* expression, the ZLI was not induced properly (Scholpp et al., 2007), leading to the disappearance of the thalamus. We therefore analyzed the expression of molecular markers of the ZLI and thalamic region. At E13.5, 2 d after tamoxifen injection, *Otx2* was already largely absent from the forebrain of mutant mice, indicating high recombination efficiency (Fig. 2C,C'), whereas both controls showed unaltered *Otx2* expression (Fig. 2A–B'). High recombination efficiency in the progenitors expressing *Otx2* at the time of injection (Fig. 1) was also demonstrated using a *Rosa26::flox-stop-flox-YFP(R26^{YFP})* reporter line of Cre activity. Indeed, a large number of cells generated from these progenitors and labeled with YFP was found in the dorsal diencephalic region (Fig. 2B,C). The ZLI, marked by *Shh*, was properly induced at its correct location in all mice (Fig. 2D–D'). The thalamic region, labeled with *Gbx2* transcripts, was present and displayed a normal size in all mice (Fig. 2E–E'). These data rule out an indirect effect of *Otx2* deletion at E11.5 that would alter early patterning of the diencephalon.

Otx2 deletion specifically affects the pool of late born habenular neurons

We then investigated whether *Otx2* deletion could affect subsequent development of the epithalamus region and particularly the formation of the MHb. To visualize the different subparts of the habenula in *Otx2*^{CreERT2/flox(TamE11.5)} conditional mutants, we used the three markers *Brn3a*, *Er81*, and *Otx2*. We observed a large reduction in MHb area ($44 \pm 5.6\%$ and $47 \pm 3.8\%$ reduction relative to *Otx2*^{CreERT2/+} and *Otx2*^{flox/flox} controls, respectively) and number of habenular *Brn3a*⁺ cells ($37 \pm 3.1\%$ and $40 \pm 2.6\%$ reduction relative to *Otx2*^{CreERT2/+} and *Otx2*^{flox/flox} controls, respectively; Fig. 2F–H, Table 1). Moreover, counts of *Brn3a*⁺ and *Er81*⁺ MHb neurons revealed a reduction that was more pronounced in the *Er81*⁻/*Brn3a*⁺ (dMHb) population than in the *Er81*⁺/*Brn3a*⁺ (vMHb) population (Fig. 2G,H, Table

1). Therefore, *Otx2* deletion preferentially affected *Er81*⁻/*Brn3a*⁺ neurons that compose the dMHb. These data were compatible with the fact that the *Otx2*^{High} region was the one preferentially reduced because it proportionally contributes more to the dMHb (Fig. 1I). To further test this possibility and in the absence of specific molecular markers of this subpopulation except *Otx2*, we used the fact that *Otx2*^{High} neurons are born later than *Otx2*^{Low} neurons (Fig. 1K–O). In control animals, as expected, E13.5 and E15.5 EdU injections preferentially labeled *Otx2*^{Low} and *Otx2*^{High} cells, respectively (Fig. 2I–L, Table 1). In *Otx2*^{CreERT2/flox(TamE11.5)} mice, no difference could be statistically detected in early born neurons compared with any of the two controls (Fig. 2K, Table 1). By contrast, a very large decrease was seen in the late-born pool normally populating the *Otx2*^{High} region (Fig. 2L, Table 1). These data demonstrate that *Otx2* deletion preferentially affects late-born MHb neurons, which would normally maintain strong expression of *Otx2*.

Otx2 deletion affects the proliferation of Hb progenitors

To understand the mechanisms behind the decreased number of late-born neurons, we investigated two possibilities. This decrease may result either from the loss of *Otx2* in the progenitors affecting progenitor proliferation and generation of late-born neurons or from increased cell death of progenitor or postmitotic cells. In the absence of evidence of cell death (Fig. 3A–C'), we were left with the abnormal progenitor proliferation hypothesis. One immediate observation was that the thickness of the ventricular zone (VZ) appeared reduced in mutants at E15.5 but was not affected at E13.5 (Fig. 3D–E', 4F, Table 1). Measures of the number of proliferative progenitors labeled with anti-Ki67 revealed a small and large decrease at E13.5 and E15.5, respectively (Fig. 3G, Table 1). We performed EdU/BrdU experiments to measure the number of cells exiting the S phase as a function of time and in proportion to the total number of Ki67 cells (Fig. 3H, Table 1). Cells singly labeled with BrdU were considered as the cells exiting the S phase within 1 h. Interestingly, the number of cells exiting the S phase was largely increased in the mutant ($207 \pm 12.6\%$ of control), showing that the S phase is shorter in the absence of *Otx2*. It therefore appears that *Otx2* deletion leads to a premature reduction of the pool of epithalamic progenitors that may be explained by an alteration of their cell cycle.

Reduction of the pool of late-born neurons is not due to a potential secondary effect of *Otx2* deletion in tissues other than the habenula

To confirm that the phenotype we observed is due to a deletion of *Otx2* in habenular progenitors and not to an indirect effect of the concomitant deletion of *Otx2* in adjacent tissues such as choroid plexus and pineal gland, we restricted the deletion of *Otx2* to the MHb using a *Dbx1::Cre* driver line. *Dbx1* is expressed in epithalamic VZ (Vue et al., 2007). We confirmed this by following the *Dbx1* cell lineage using the *R26^{YFP}* reporter line. At E18.5, in *Dbx1::Cre;R26^{YFP}*, all habenular *Brn3a*⁺ neurons were YFP⁺ (Fig. 4B,C). Only rare cells that were *Brn3a*⁻ were also YFP⁻ in the MHb region. These cells are yet to be defined, but their strong *Pax6* expression makes them clearly distinct from other cell populations in the MHb (Fig. 4C, white arrowheads). In *Dbx1::Cre;Otx2*^{flox/flox} mutants, *Otx2* expression was largely absent from the habenula region at E18.5 compared with control mice (Fig. 4D,E), confirming that *Dbx1::Cre* line is an efficient tool to delete *Otx2* in habenular progenitors. *Otx2* deletion in *Dbx1::Cre;Otx2*^{flox/flox} led to a significant reduction in *Brn3a*⁺ cells (Fig. 4F–H, Table 1). This effect was again more pronounced in the *Er81*⁻/*Brn3a*⁺ than in the *Er81*⁺/*Brn3a*⁺ population, suggest-

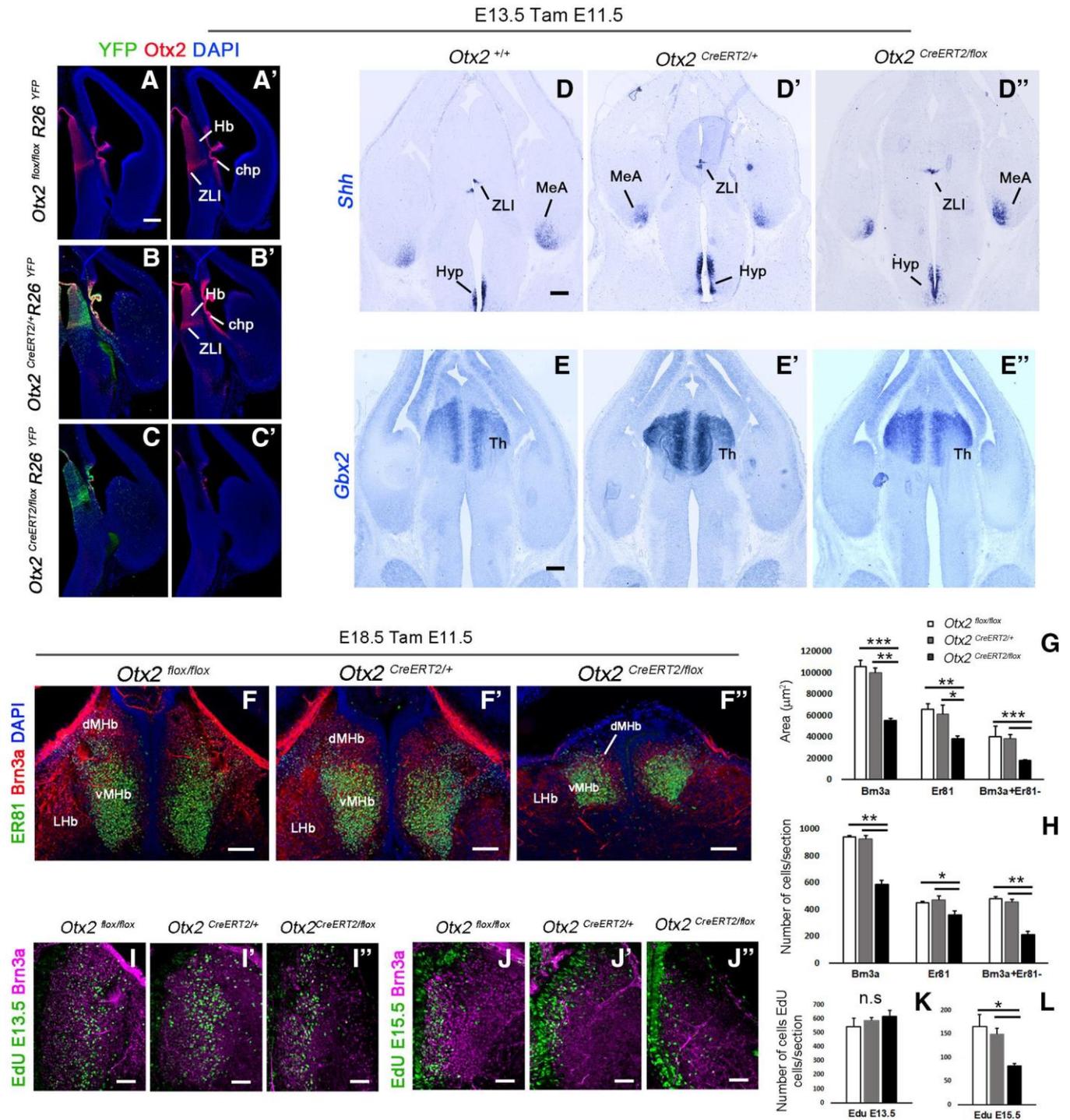


Figure 2. Conditional deletion of *Otx2* produces habenular hypoplasia. **A–C**, Coronal sections of E13.5 control and mutant embryos injected with tamoxifen at E11.5 showing the expression of the reporter YFP and *Otx2* in the diencephalon. **D–E**, *In situ* hybridization for *Shh* (**D–D'**) and *Gbx2* (**E–E'**) in coronal section of E13.5 mutant and control mice injected with tamoxifen at E11.5. **F–F''**, Immunostaining for Er81 (Etv1) and Brn3a in coronal sections at the level of the habenula in E18.5 embryos that have been injected with tamoxifen at E11.5 stage. **G**, Graph representing the average area in square micrometers of the MHB per coronal section at E18.5. The MHB areas are significantly reduced in mutant mice (black column, *Otx2*^{CreERT2/flx}) compared with control mice (white and gray columns, *Otx2*^{flx/flx} and *Otx2*^{CreERT2/+} respectively). **H**, Graph representing the average numbers of Brn3a⁺ cells, Er81⁺ cells, and Brn3a⁺Er81⁻ cells per coronal section in the MHB at E18.5. The number of Brn3a⁺ cells in the MHB is reduced in mutant mice compared with control mice. However, the reduction of the number of Er81⁺ cells in the ventral MHB is less severe compared with the reduction of the Brn3a⁺Er81⁻ cells in the dorsal MHB. **I–L**, Edu labeling combined with Brn3a immunostaining in coronal sections showing Edu⁺ cells in the MHB in control and mutant E18.5 embryos when the Edu was injected in pregnant females at E13.5 (**F–H**) and E15.5 (**I–K**). **K, L**, Graph representing the average number of Edu cells in the MHB per coronal section in control and mutant E18.5 embryos. Note that the number of Edu cells does not change significantly when the Edu was injected at E13.5. However, there were fewer Edu⁺ cells in mutant mice compared with controls when Edu was injected at E15.5. n.s., Nonsignificant. *p*-values are represented on the graphs as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. However, there were fewer Edu⁺ cells in mutant mice compared with controls when Edu was injected at E15.5. MeA, Medial amygdala; Hyp, hypothalamus; Th, thalamus. Scale bars, **A–E'** (shown in **A, D, and E**), 100 µm; **F–F''**, 100 µm; **I–J'**, 50 µm.

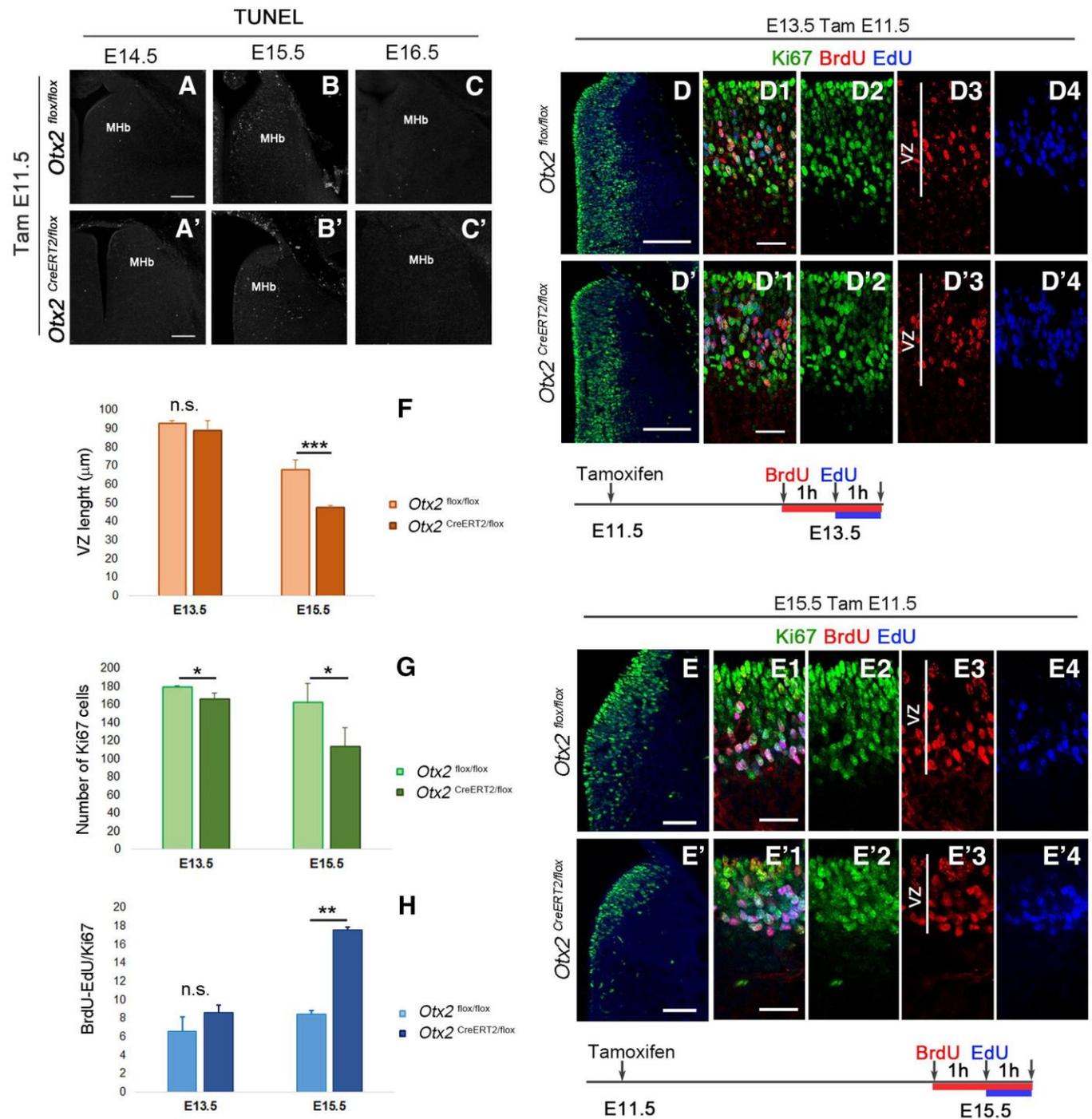


Figure 3. Loss of *Otx2* alters habenular progenitor cell cycle. *A–C'*, TUNEL staining to detect cell death in coronal sections at the level of the MHb at different embryonic stages in control (*A–C*) and *Otx2* mutant embryos (*A'–C'*) injected with tamoxifen at E11.5. *D–E'*, Immunofluorescence for Ki67 labeling progenitor cells in the habenular region in coronal section at E13.5 (*D, D'*) and E15.5 (*E, E'*) of control (*D, E*) and mutant (*D', E'*) embryos tamoxifen injected at E11.5. *D1–E'4*, High magnification of the VZ showing immunolabeling of Ki67 and BrdU cells and EdU staining in control and mutant mice at E13.5 (*D1–D'4*) and E15.5 (*E1–E'4*) when BrdU was injected 2 h and EdU 1 h before pregnant females were killed. Graphs representing the length in micrometers of the VZ (*F*), the average number of Ki67 cells in coronal section per area (*G*), and the average number of BrdU⁺EdU⁻ cells relative to the area (*H*) in control and mutant E13.5 and E15.5 embryos. *p*-values are represented on the graphs as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. n.s., Nonsignificant. Scale bars, *A–C'* (shown in *A*, and *A'*), 100 μm ; *D–E'*, 100 μm ; *D1–E'4* (shown in *D1, D'1, E1*, and *E'1*), 25 μm .

ing that, as in *Otx2*^{CreERT2/flax} mice, late-born neurons were preferentially affected (Fig. 4*H*, Table 1). We confirmed this by showing that the number of neurons marked with EdU injections at E15.5 was strongly decreased, whereas neurons labeled at E13.5 seemed unaffected (Fig. 4*I–L*). These results also showed that *Otx2* deletion does not specifically affect the classically described substance P-ergic/*tac1*-expressing or cholinergic/*Er81*-expressing

neurons of the dMHb and vMHb, respectively (see also Introduction section). Instead, it affects the late-born neurons independently of their neurotransmitter content. Consistent with this idea, only a partial reduction of *Er81*⁺ neurons (Fig. 4*F, G*) and *Tac1*-expressing neurons (Fig. 4*M, N*) was observed in *Otx2* cKO.

In conclusion, *Otx2* seems to control the development of the MHb by sustaining the expansion of the progenitor pool, thus

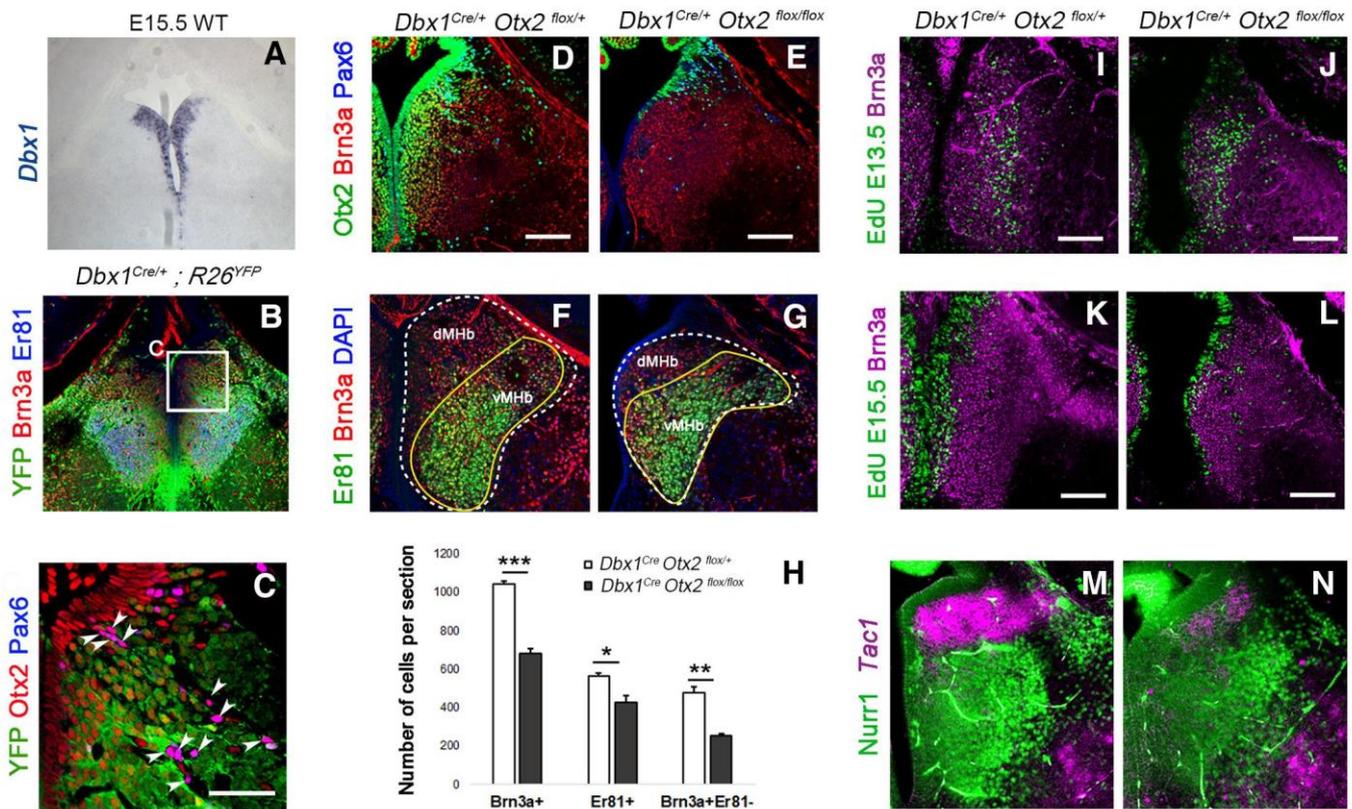


Figure 4. Specific deletion of *Otx2* in *Dbx1* domain. **A**, *Dbx1* expression pattern in the ventricular zone of the MHb at E15.5. **B**, **C**, Coronal section of a E18.5 *Dbx1^{Cre/+}* control embryo revealing *Dbx1* lineage in the habenula. Immunofluorescence for YFP, Brn3a, and Er81 (*Etv1*) (**B**). High magnification of a similar area as indicated in **B** showing *Otx2/Pax6⁺* cells that are negative for YFP and therefore not generated from *Dbx1⁺* progenitors (**C**). **D**, **E**, Immunostaining in coronal sections for *Otx2*, Brn3a, and Pax6 in control (**D**) and *Otx2* conditional mutant embryos (**E**) at E18.5. **F**, **G**, Immunolabeling for Er81 and Brn3a in coronal sections of control and mutant E18.5 embryos. **H**, Graph representing the average number of Brn3a⁺ cells (Brn3a⁺), Er81⁺ cells (Er81⁺), and Brn3a⁺Er81⁻ (Brn3a⁺Er81⁻) cells per coronal section in the MHb of control and *Otx2* mutant E18.5 embryos. **I–L**, EdU staining and Brn3a immunolabeling in coronal sections of the MHb in E18.5 control and *Otx2* mutant embryos when the EdU was injected at E13.5 (**I**, **J**) and E15.5 (**K**, **L**). **M**, **N**, *In situ* hybridization using *Tac1* RNA probe in combination with immunostaining of Nurr1, a marker of the VMHb, in coronal sections of control (**M**) and *Otx2* cKO animals (**N**) at E18.5. *p*-values are represented on the graphs as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. Scale bars, **A**, **B**, 175 microns, **C**, 50 microns (shown in **C**); **D–L**, 100 microns, **M**, **N**, 75 microns (shown in **D**, **E**, **I–L**).

affecting the total number of derived neurons. This effect is due to cell-autonomous *Otx2* activity in Hb progenitors.

Otx2 is also expressed in the unique output of the Hb, the IPN

We then studied *Otx2* expression in the main target of the medial habenula, the IPN, using the *Otx2-GFP* knock-in line. The IPN, which is located in the basal plate of rhombomere 1 (r1), is composed of several subnuclei (Lorente-Cánovas et al., 2012; Fig. 5A). We confirmed that *Otx2⁺* neurons only populated the cIPN (Fig. 5A–C). The cIPN could be further divided into lateral (Lat-cIPN) and medial subnuclei (Med-cIPN) (Fig. 5B,C). *Otx2⁺* neurons composed the Lat-cIPN and the central-most part of the Med-cIPN, whereas a *Pax7⁺Otx2⁻* population was located between them (Fig. 5B). The *Otx2* population could be further characterized by the specific expression of the *Gscl* protein (Fig. 5C). We then investigated how the cIPN forms and looked for *Otx2⁺* cells at earlier stages. Cell cohorts expressing *Otx2* in basal r1 could already be detected at E11.5 (Fig. 5D). These cells were found in the outer ventricular zone, in between *Ki67⁺* cells, or in the mantle layer at the level of the *Nkx6.1⁺* progenitor domain (Fig. 5Dd1,Dd2). Some rare cells starting to accumulate *Otx2-GFP* in the progenitor zone were also weakly *Nkx6.1⁺*; however, none coexpressed *Ki67* (Fig. 5Dd1,Dd2). These results suggest that *Otx2* expression is induced in cells generated from *Nkx6.1⁺* progenitors soon after they become postmitotic and start to downregulate *Nkx6.1* expression. To further narrow down the

origin of *Otx2*-expressing cells, we explored additional markers and found that the *Otx2⁺* population expressed *Gata3* and GABA, but not *En1*, and therefore could be defined as the equivalent of a subset of spinal cord V2b GABAergic neurons (Karunaratne et al., 2002) (Fig. 5Dd1,Dd2,M). To characterize the timing of neurogenesis of *Otx2⁺* IPN neurons, we injected EdU at several stages of development and analyzed animals at P0. *Otx2⁺* IPN cells were only marked when EdU was injected at E9.5 and E10.5, but not later (Fig. 5E–F'). We concluded that *Otx2⁺* IPN neurons were generated between E9.5 and E10.5. These cells then started to migrate in three successive steps (Fig. 5G–I). At E13.5 (Fig. 5G), cells were seen as a stream going tangentially toward the midline (Step 1) without crossing it and turning down to migrate radially toward the ventral r1 (Step 2). At E15.5 (Fig. 5H), many cells had already reached the ventral r1 and started to aggregate (Step 3) as bilateral nuclei, whereas others were still on the migration path. At E18.5 (Fig. 5I), some sparse *Otx2⁺* cells could still be seen in the dorsal region and close to the midline in the migration path. In the ventral region, *Otx2⁺* cells were also compacting in the midline, thus contributing to Lat-cIPN and Med-cIPN (Fig. 5I). This organization was maintained until adulthood (Fig. 5J). In addition, this analysis revealed additional expression of *Otx2* in r1, in GABAergic cells of the median and paramedian raphe (MnR and PMnR, respectively), in the nucleus incertus, and around the dorsal tegmental nucleus (Fig. 5K–M).

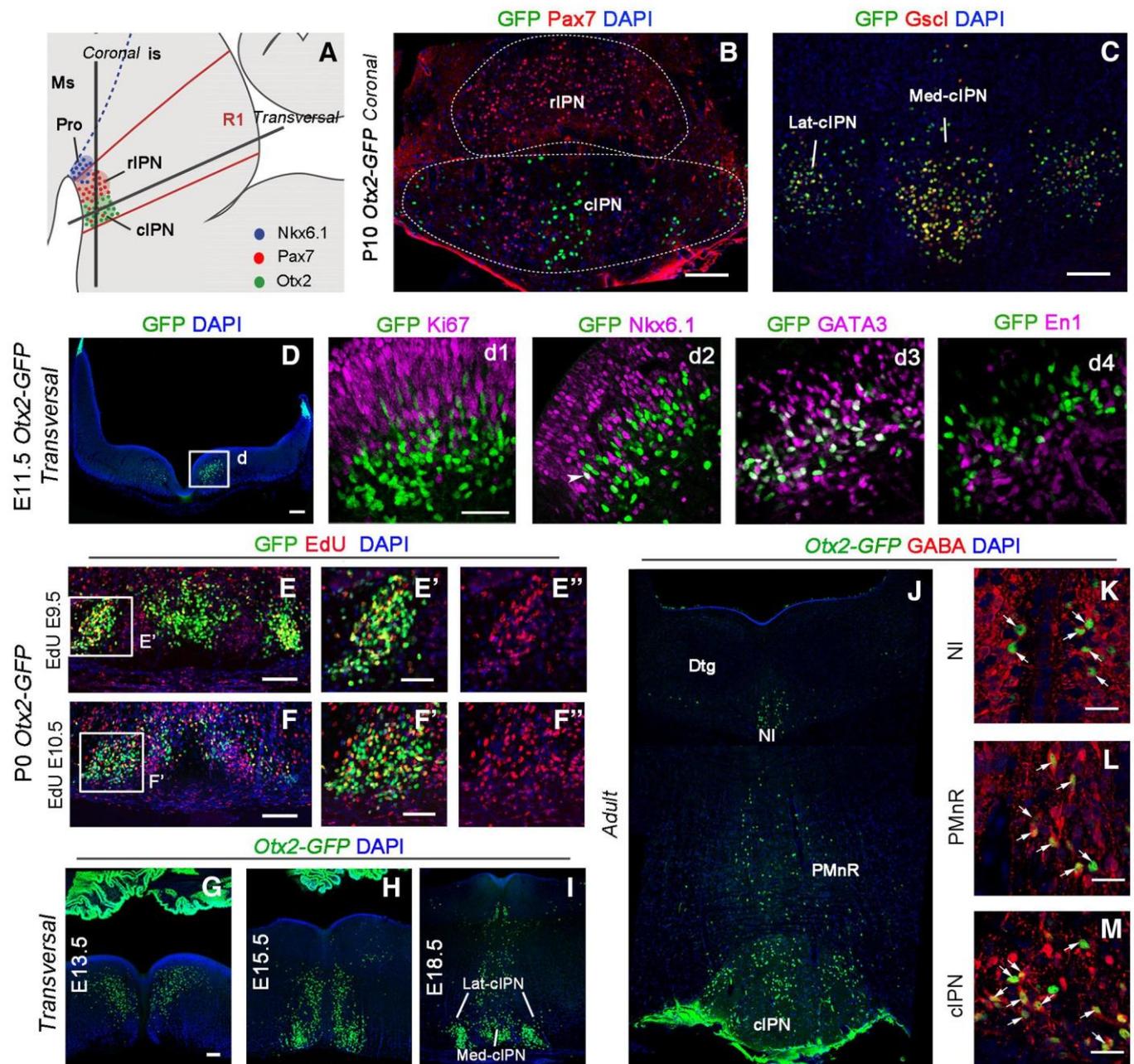


Figure 5. *Otx2* expression pattern in the IPN. **A**, Schematic illustration of a sagittal section of IPN subnuclei in the ventral r1 in embryonic brain. **B**, Coronal section of P10 *Otx2*-GFP mouse brain at the level of the IPN. The rostral IPN is characterized by high density of Pax7 neurons. *Otx2* neurons (GFP) in the cIPN form two subnuclei, the medial and the lateral one, with some Pax7 neurons in between. **C**, Coronal section of the IPN showing colocalization between *Otx2* and *Gscl* in the cIPN. **D**, Transversal section of E11.5 *Otx2*-GFP embryo at the level of the r1 showing *Otx2* neurons in the basal plate. **Dd1–Dd4**, High magnification of the box area indicated in **D** showing potential *Otx2* neurons (GFP⁺) in r1 that also contain *Ki67* (**Dd1**), *Nkx6.1* (**Dd2**), *GATA3* (**Dd3**), and *En1* (**Dd4**) at embryonic stage E11.5. **E, F**, High magnification of the IPN area on P0 *Otx2*-GFP embryo showing colocalization between *Otx2* (GFP⁺) and *Edu* injected at E9.5 (**E**) and E10.5 (**F**). **E'–F'**, High magnification of the boxed area. **G–M**, Immunolabeling in transversal section of the r1 in *Otx2*-GFP embryos showing the distribution of *Otx2* neurons (GFP⁺) in the basal plate at different embryonic (**G–I**) and adult stages (**J–M**). **K–M**, Colocalization between *Otx2* and GABA in the nucleus incertus, PMnR, and cIPN. Ms, Mesencephalon; is, isthmus; Pro, prodromal division of the IPN; Dtgm dorsal tectal nucleus; NI, nucleus incertus. Scale bars, **B–D** and **G–I**, 100 μ m; **Dd1–Dd4** (shown in **Dd1**) and **E'–F'** (shown in **E'** and **F'**), 50 μ m; **K–M**, 25 μ m.

These results show that IPN neurons are generated from *Nkx6.1*⁺ progenitors, start to express *Otx2* soon after they become postmitotic, and migrate extensively through tangential and then radial migration paths to finally concentrate in the Lat-cIPN and Med-cIPN.

Otx2 deletion leads to migration defects of IPN neurons

We then tested whether *Otx2* expression is also required for the development of the IPN. Because *Otx2* is not expressed at the progenitor stage (Fig. 5*Dd1*), we could test whether *Otx2* plays a

postmitotic role in the migration and formation of the caudal IPN. From our EdU birth-dating experiments, we concluded that the cell population fated to express *Otx2* and form the caudal IPN is already born by E11.5 (Fig. 5*E–F'*). We therefore took advantage of our *Otx2*^{CreERT2/flox} mouse line to inactivate *Otx2* at E11.5, when IPN neurons are already born. To follow the recombined cells in *Otx2*^{CreERT2/flox(tamE11.5)} mutants, we used two complementary tools: anti-ER antibodies to recognize Cre-ERT2 protein produced from the *Otx2*^{CreERT2} allele and the *R26R*^{YFP} Cre reporter line to trace recombined cells. As described above, IPN

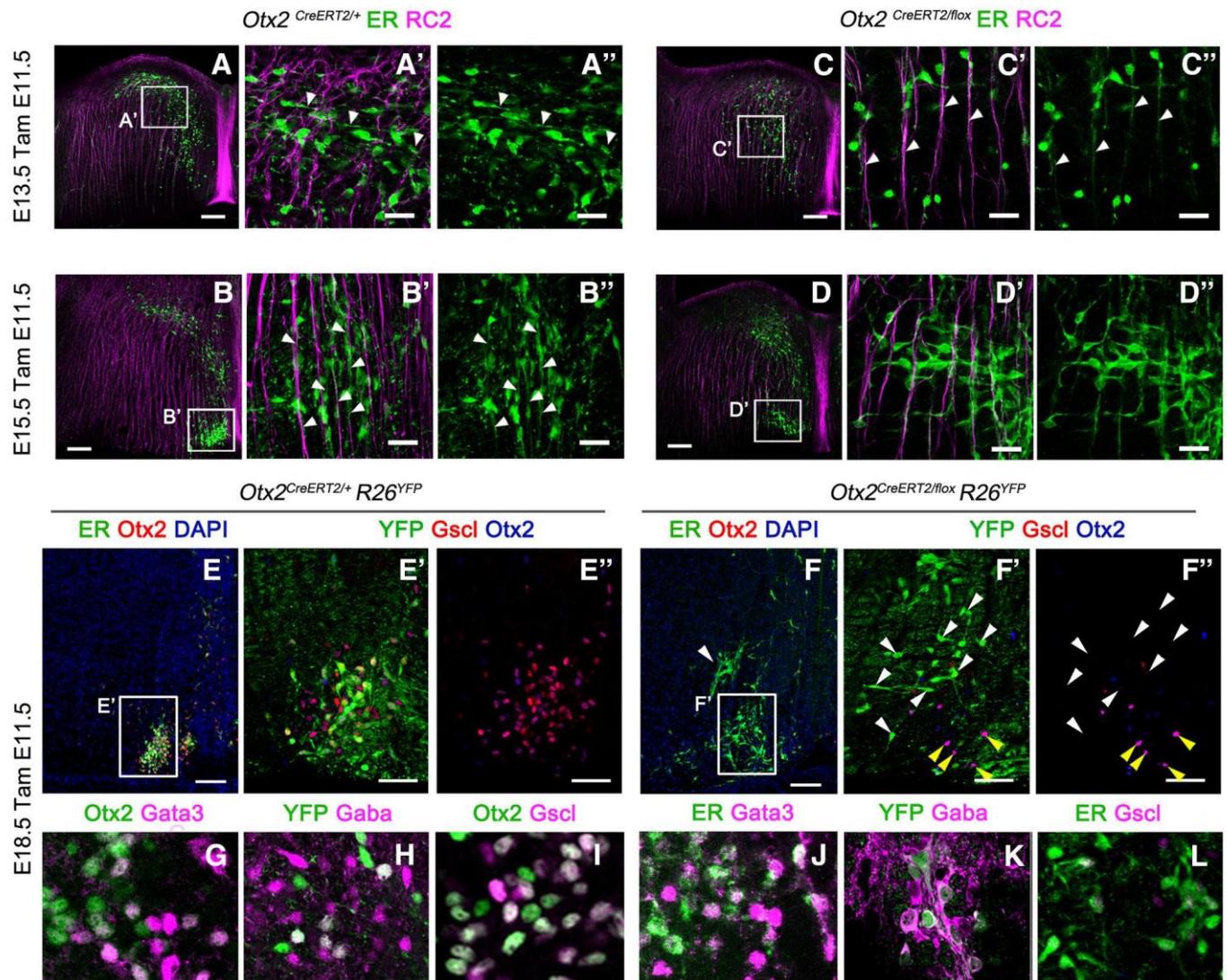


Figure 6. Migrational defects in IPN neurons due to Otx2 deletion is not a consequence of fate switch. **A–D**, Immunofluorescence to visualize Otx2 neurons (ER) and radial glia cells (RC2) in transversal section of r1 at the levels of the caudal IPN in control (**A, B**) and mutant (**C, D**) embryos at the E13.5 and E15.5 stages injected with tamoxifen at E11.5. **A'–D'**, High magnification of the area indicated in **A–D**. The white arrowheads indicate the orientation of the Otx2⁺ cells leading process with respect to the radial glia. **E, F**, Immunofluorescence for CreERT2 (ER) and Otx2 in transversal sections of E18.5 control and mutant embryos showing the disposition of Otx2⁺ cells when the migration is completed. The white arrowhead in **F** indicates the aberrant position of ER⁺ cells that have lost the expression of Otx2. (**E'–F'**), High magnification of the area indicated in **E** and **F** showing cells labeled with YFP, Gscl, and Otx2 in the caudal IPN. Note that the YFP⁺ cells are the one that lose the expression of both Otx2 and Gscl and are mislocalized (white arrowheads), whereas the Otx2⁺ cells that are not recombined migrate properly (yellow arrowheads), indicating a cell-autonomous defect. **G–L**, Immunofluorescence in transversal sections of E18.5 control and mutant embryos showing the expression of the main V2b interneurons markers in Otx2⁺ cells. Scale bars, **A–F**, 100 μ m; **E'–F'**, 50 μ m; **A'–D'**, **G–L**, 25 μ m.

neurons reach the ventral r1 through three successive steps. At E13.5, in control *Otx2*^{CreERT2/+} (TamE11.5), *R26R*^{YFP} animals, the leading processes of Otx2 cells labeled with anti-ER antibodies were projecting toward the midline and perpendicular to radial glia cells, indicating that Otx2⁺ cells were migrating tangentially (Fig. 6A–A'', white arrowheads, phase 1). At E15.5, Otx2⁺ cells changed their direction with their leading processes aiming ventrally following the radial glia (Fig. 6B–B'', white arrowheads, phase 2). At E18.5, Otx2⁺ cells had already reached the cIPN (Fig. 6E–E'', phase 3). We then analyzed cell migration in *Otx2*^{CreERT2/flox(tamE11.5)} mutants. At E13.5, Otx2 KO cells labeled with anti-ER antibodies and showing no detectable Otx2 precociously migrated ventrally along the radial glia, skipping the first step of tangential migration toward the midline (Fig. 6C–C'', white arrowheads, phase 1'). At E15.5, some of these cells had reached the ventral part but in a more lateral position (Fig. 6D–D'', phase 2'). Finally, at E18.5, sparse mutant cells were found

more dorsally and laterally compared with control cells (Fig. 6F–F'', white arrowheads, phase 3'). Interestingly, the rare non-recombined cells that had retained Otx2 and were not YFP-immunoreactive were found at their correct location (Fig. 6F', F'', yellow arrowheads), pointing to a cell-autonomous function of Otx2.

These results demonstrate a role of Otx2 at the postmitotic level in the HIPS. Cells that normally form the caudal IPN do not migrate properly in the absence of Otx2. Impaired motility seems unlikely because these cells are still able to migrate radially. The major defect seems to be an aberrant or absent tangential migration toward the floor plate that could be the consequence of abnormal expression of guidance molecule receptors in these cells. Alternatively, this phenotype could be due to a change of cell identity that translates into an alternative migration behavior. However, these cells kept their expression of Gata3 (Fig. 6G, J) and their GABAergic nature (Fig. 6H, K). This implies that, de-

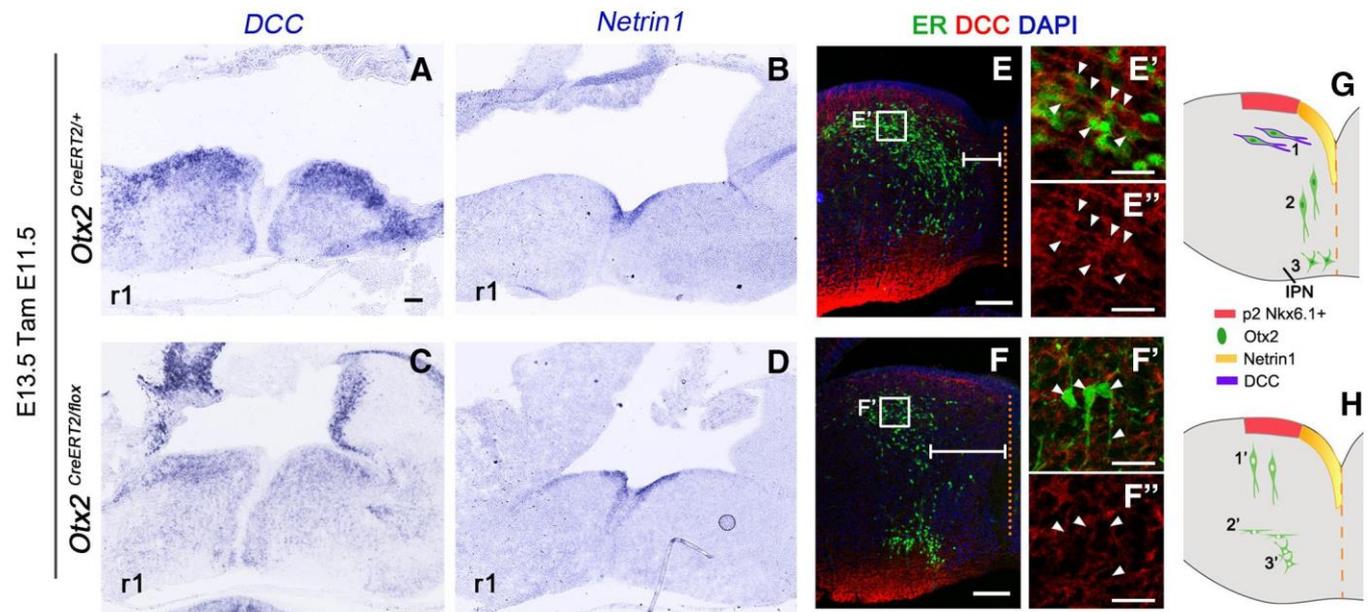


Figure 7. Aberrant expression of DCC expression in *Otx2* mutant mice. **A–D**, *In situ* hybridization for Netrin1 (**A**, **B**) and DCC (**C**, **D**) in transversal sections of r1 in E13.5 control and *Otx2* mutant embryos tamoxifen injected at E11.5. **E**, **F**, Immunofluorescence for ER and DCC in transversal section of control and mutant E13.5 embryos showing the disposition of ER⁺ cells with respect the midline (dashed orange line) indicated with the white lines. **E'**–**F''**, High magnification of the area indicated in **E** and **F** showing decreased DCC staining in mutant ER⁺ cells located in the dorsal area (**F'**, **F''**, white arrowheads) compared with control ER⁺ cells (**E'**, **E''**, white arrowheads). **G**, **H**, Schematic illustration of our hypothesized mechanism for IPN precursor migration. This illustration shows the different migration phases in control and mutant embryos of IPN precursors. In control conditions, Otx2⁺ cells are generated from Nkx6.1 domain (progenitor domain 2, red area) and, due to DCC expression (violet contour), migrate tangentially toward the dorsal midline highly expressing Netrin1 (**G1**). After that, Otx2 neurons downregulate DCC expression, which may allow them to not stay trapped at this level and start to migrate radially to more ventral position (**G2**) to finally form the IPN (**G3**). In mutant mice, in the absence of Otx2 and due to a weaker expression of DCC, IPN neurons are no longer attracted to midline position. Instead, they start a radial migration precociously (**H1'**) and therefore they settle down earlier (**H2'**), resulting in an aberrant disposition of IPN neurons in more dorsal and lateral position compared with control mice (**H3'**). Scale bars: **A–F**, 100 μ m; **E'–F''**, 25 μ m.

spite the absence of *Otx2*, these cells most likely retain their identity as V2b interneurons. However, one marker, *Gscl*, was found to be absent (Fig. 6E–F', I, L), demonstrating that *Otx2*-ablated cells were molecularly affected. Because *Gscl* has no known role in migration, we sought for other cues that might explain the migration defect of *Otx2*-ablated cells. Few guidance molecules secreted by hindbrain floor plate have been shown to attract neurons toward it. The most documented mechanism is based on Dcc/Netrins interplay (Bloch-Gallego et al., 1999; Kim et al., 2015). We hypothesized that IPN cells may express Dcc at E13.5 and be attracted to the known source of Netrin in the floor plate. Expression of Dcc was indeed found at particularly high levels in Otx2⁺ cells at the most dorsal location in r1 (Fig. 7A, E–E''). To test whether deletion of *Otx2* affected Dcc/Netrin guidance, we analyzed *Netrin 1* and *Dcc* mRNA expression by *in situ* hybridization. Although *Netrin 1* expression was unaltered in the absence of *Otx2* (Fig. 7B, D), *Dcc* expression was decreased in the dorsally located IPN cells that had lost *Otx2* (Fig. 7A, C, E–E'', F–F'', white arrowheads). This could explain why these cells were no longer attracted toward the floor plate and precociously started to migrate radially. Such lack of attraction was clearly visible by measuring the distance between the Otx2 cells and the midline, which was always wider in mutant mice compared with control (Fig. 7E, F, white lines). Therefore, in the absence of *Otx2*, IPN cells retained their V2b characteristics but failed to migrate tangentially, most likely due to a defect in the Dcc/Netrin signaling mechanism (Fig. 7G, H).

Otx2 developmental requirement is shared by interconnected subcircuits with specific outputs

Next, we investigated whether shared *Otx2* expression by a subset of habenular neurons and IPN neurons could endow them with

specific connectivity properties. Because specific parts of the system retain high expression of *Otx2* and require *Otx2* activity to develop properly, we tested whether these specific parts formed interconnected subcircuits that would consequently share HIPS subfunctions.

Otx2⁺ subcircuit between the Hb and the IPN

The classical description of the connectivity between the habenula and the IPN, as described in the Introduction, is divided between substance P-ergic fibers from the dMHb connecting the Lat-IPN and cholinergic vMHb neurons that connect to the Med-IPN. *Otx2* expression does not follow this division, but instead follows neuronal birth date, with late-born Otx2^{high} neurons being closer to the midline. We therefore tested whether Otx2^{high} neurons have specific targets in the IPN. To clearly visualize axon terminals from Otx2 neurons, we used *Otx2*^{CreERT2/+}; *Tau*^{GFP-lacZ/+} mice, which express myristylated GFP upon Cre-mediated recombination (Hippenmeyer et al., 2005). We injected tamoxifen at E15.5 to label Otx2^{High} cells and analyzed the brain at postnatal stages (Fig. 8A). In the IPN, GFP⁺ fibers mainly innervated the Lat-cIPN and were largely doubly labeled with SP (Fig. 8B–B''). To visualize potential synaptic connections between Otx2^{High} habenular and Otx2⁺ IPN neurons, we first labeled the cytoplasm of Otx2⁺ neurons with anti-ER (Fig. 8C, C'). We then doubly labeled GFP⁺ habenular fibers for GFP and VGlut1, a synaptic marker of habenular neurons that are all glutamatergic. This also allowed us to exclude potential confounds with endings from Otx2⁺ IPN neurons that are GABAergic. Interestingly, doubly labeled GFP⁺/V-Glut1⁺ terminals were found decorating the cell surface of IPN cells marked with anti-ER antibodies (Fig. 8D–D''). Because we could not formally rule out that the glutamatergic fibers in the IPN were exclusively

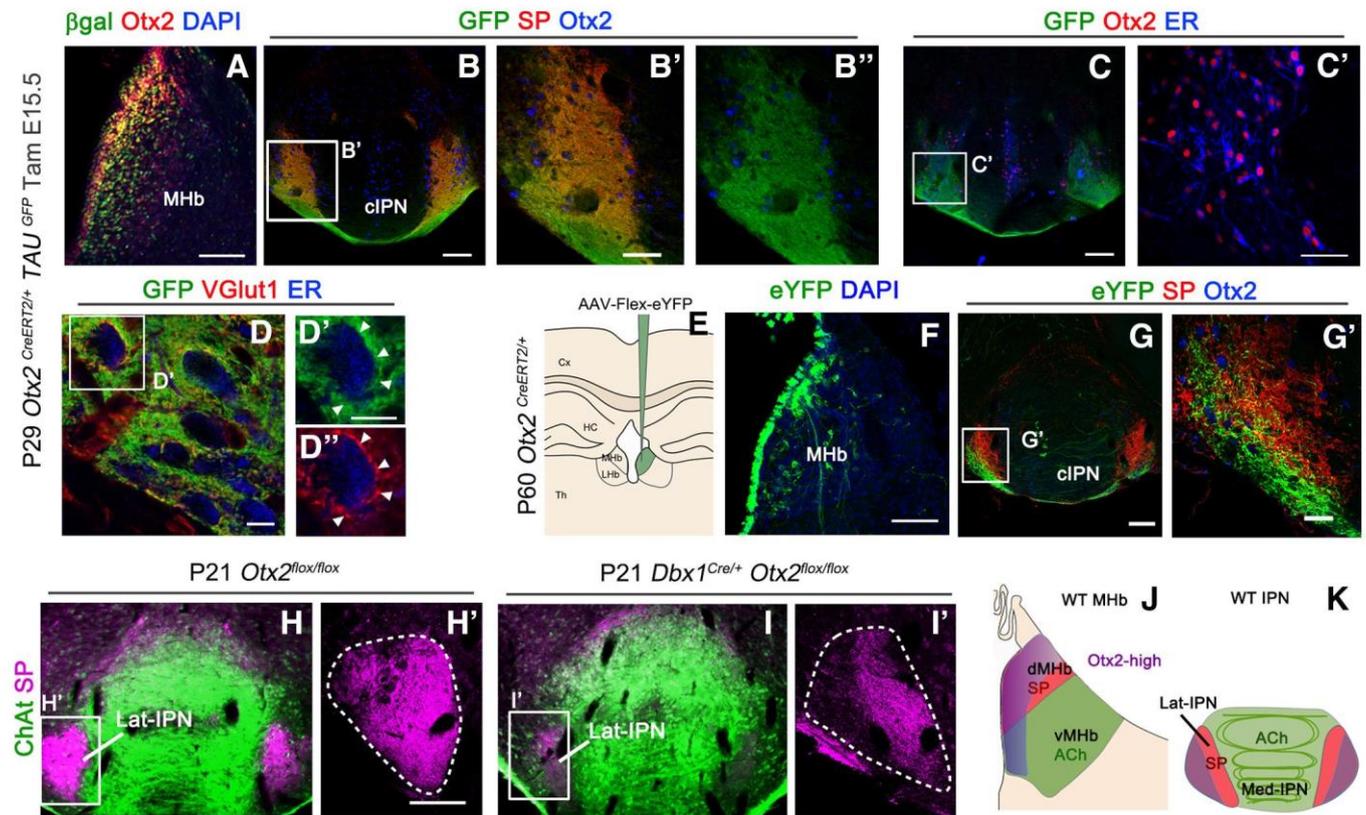


Figure 8. Otx2 expression in interconnected subcircuits. **A**, Coronal section of P29 control mice showing the expression of β -gal⁺ cells when tamoxifen was injected at E15.5 and Otx2 expression in the MHb. **B**, Immunofluorescence for GFP, substance P (SP) and Otx2 in the caudal IPN in coronal section. **B'**, **B''**, High magnification of the area indicated in **B** showing colocalization between GFP and SP fibers in the Otx2⁺ region at the level of the lateral and caudal IPN. **C**, Immunofluorescence for GFP, Otx2, and ER in the caudal IPN in coronal section. **C'**, High magnification of the area indicated in **C** showing that all the Otx2 neurons are labeled with ER. **D**, Immunofluorescence for GFP, VGlut1, and ER in the laterocaudal IPN. **D'**, High magnification of the area indicated in **D** showing GFP terminals labeled with VGlut1 in contact with Otx2 cells labeled with anti-ER antibodies. **E**, Schematic illustration of an EYFP-expressing associated adenovirus that has been stereotaxically injected at the level of the MHb. **F**, Coronal section of the MHb showing neurons labeled with eYFP after virus injection. **G**, Coronal section of the IPN showing EYFP fibers from the MHb and SP fibers in the caudal and lateral IPN, where Otx2 IPN neurons are localized. **G'**, High magnification of the area indicated in **G** showing that EYFP and SP fibers correspond to two different populations. **H–I'**, Immunostaining of ChAT and SP on coronal sections at the level of the IPN of control (**H**, **H'**) and Otx2 cKO mutant (**I**, **I'**) at P21. **H'** and **I'** correspond to a high magnification of the white frame in **H** and **I**, respectively. **J**, **K**, Schematic illustration of a coronal sections at the level of the habenula and IPN showing the different populations of habenular neurons (**J**) and their respective field of projections in the IPN (**K**) with the same color code. Cx, Cerebral cortex; HC, hippocampus; Th, thalamus. Scale bars: **A–C**, **F**, **G**, 100 μ m; **B'**, **C'**, 50 μ m; **D**, **D'**, 10 μ m; **G'**, 25 μ m.

from habenular neurons, we took advantage of the late expression of Otx2 in the HIPS that is maintained in the adult brain to specifically label these cells. We stereotaxically injected an inducible AAV construct that expresses eYFP upon Cre recombination (AAV-DIO-EYFP) in the habenula of Otx2^{CreERT2/+} adult mice (Fig. 8E). Two weeks after transduction, mice were tamoxifen injected for 2 consecutive days and brains were analyzed 2 weeks later (Fig. 8F–G'). In all analyzed brains, only a subset of cells belonging to the Otx2^{High} population expressed eYFP⁺, probably due to their stronger expression of CreERT2 and thus to their higher recombination efficiency. These cells were concentrated in the medial-most part of the dMHb, with rare cells found in the vMHb (Fig. 8F). Again, the fibers coming from these neurons were mainly found in the Lat-cIPN. Interestingly, these fibers formed a bundle that had only partial overlap with the more laterodorsally located SP⁺ fibers (Fig. 8G–G'). Therefore, the medial-most part of Otx2^{High} neurons is specifically connected to the lateral-most region of the Lat-cIPN.

Otx2 is required for connecting the Otx2⁺ Hb-IPN subcircuit
Finally, because Otx2 deletion impairs the generation of Otx2^{High} neurons (see above), we tested whether this could lead to connectivity defects between the MHb and the Lat-cIPN. Because Otx2 deletion of in Otx2^{CreERT2/flox(tamE11.5)} mice is lethal at birth, we

used *Dbx1::Cre;Otx2^{flox/flox}* mutants that are viable and fertile to study dMHb and vMHb projections clearly identifiable only at postnatal stages. Cholinergic innervations from the vMHb were still present without obvious defects in Otx2 cKO (Fig. 8H,I). By contrast, SP fibers were largely reduced, especially in the lateral-most region that corresponds to the terminal field of innervation from Otx2^{High} neurons of the MHb (Fig. 8H–I').

Together, these results show an Otx2-linked chronotopic organization of habenular projections with late-born Otx2^{High} habenular neurons preferentially targeting the lateral region of the cIPN, where they establish synaptic contacts with Otx2 GABAergic neurons (Fig. 8J,K). Furthermore, genetic ablation of Otx2^{High} habenular neurons in Otx2cKO leads to subcircuit disruption between these neurons and the Lat-cIPN.

Discussion

Here, we have described for the first time the role of Otx2 in HIPS development. We reveal the complex pattern of Otx2 expression and demonstrate that, in the absence of Otx2, the habenular progenitors have an altered cell cycle, giving rise to fewer late-born neurons, whereas early-born populations are unaffected. In the IPN, Otx2 acts at the postmitotic level, playing a new role in neuron migration. We show that Otx2 functionally contributes to

the building of specific subcircuits of the HIPS. Habenular late-born neurons, highly expressing and depending on *Otx2*, target IPN neurons also expressing and depending on *Otx2*. *Otx2* expression therefore marks specific HIPS subcircuits that intersect with the classical dichotomy of substance-P-ergic dMHb contacting the Lat-IPN and cholinergic vMHb contacting the Mid-IPN. The expression of *Otx2* may therefore be a better marker of conserved and important subfunctions of the HIPS.

***Otx2* and habenular neurogenesis**

Otx2 deletion affects the cell cycle of habenular progenitors, leading to reduced number of late-born neurons. We excluded that these progenitors die or exhibit slower proliferation because, if this were the case, then it should have caused a reduced number or delayed generation of early-born neurons as well, which we did not observe. We thus hypothesized that these progenitors display an equivalent rate of proliferation but differentiate earlier, resulting in a decreased number of neurons. We found a shorter S phase in mutant progenitors. In medulloblastoma, *Otx2* was shown to control the G₁-S and G₂-M transitions (Bunt et al., 2012; El Nagar et al., 2018). The G₁-S transition is particularly important for neuron precursors because it is the time when the decision to proliferate or to undergo their last division is made. In the cortex, a shorter S-phase correlates with lower proliferative potential (Arai et al., 2011). It is thus likely that, in the absence of *Otx2*, habenular progenitors have a decreased proliferative potential, leading to precocious depletion of the progenitor pool and thus to fewer neurons.

Our results cannot be explained by other known mechanisms affecting habenular size. First, we did not detect any patterning defect that could lead to smaller habenula. Second, we did not detect any obvious habenular asymmetry unlike previous results (Concha and Wilson, 2001) or any symmetry alteration in *Otx2* mutants. We also tested the role of *Otx2* in postmitotic cells by ablating *Otx2* when all neurons are born (F. D'Autréaux and N. Ruiz-Reig, personal communication). Contrary to what happens when *Brn3a* is deleted (Muzyka et al., 2018), we did not detect any effects on identity or survival of habenular neurons. Therefore, *Otx2* deletion affects habenular precursor proliferation rather than maintenance of habenular neuron identity and survival.

***Otx2* roles in migration**

Otx2 expression, which is initiated at the postmitotic stage in IPN neurons, is required for their tangential migration. This is the first report of an *Otx2* role in tangential migration and one of the rare studies exploring migration of the numerous hindbrain cells. We ruled out cell fate switch to explain altered migration behavior and showed a Netrin/Dcc interplay defect in *Otx2* mutants. *Netrin-1* is expressed in a timely manner in the floor plate to attract IPN neurons. *Otx2*⁺ IPN neurons express high and low levels of Dcc during tangential and radial migration, respectively. In the mutant, newborn neurons displayed weak Dcc expression that may explain their lack of attraction and their precocious radial migration. *Otx2* has known roles in migration. In the mouse embryo, the proximo-distal axis conversion to definitive anteroposterior axis requires *Otx2*. It controls the migration of distal visceral endoderm cells by repressing Wnt signaling and promoting β -catenin degradation (Kimura-Yoshida et al., 2005). Canonical Wnt signaling is known to affect migration but not preferentially tangential migration. We thus do not think that a defect of this pathway can explain the phenotype of mutant IPN cells. Cre-mediated deletion of *Shh* using the *En1* promoter was shown to affect the migration of the rIPN neurons, sparing the

Otx2⁺ cIPN (Moreno-Bravo et al., 2014). We found that *Otx2* cIPN neurons do not express *En1*. Furthermore, high *En1* expression seems to occur at a more rostral location than the region generating the cIPN (F. D'Autréaux, personal communication). This may explain why the caudal IPN is not affected in this study.

***Otx2* functions are highly context dependent**

The search for a general rule of *Otx2* functions has left many scientists with more questions than answers. Studies in the developing mouse brain have revealed highly context-dependent (Buecker et al., 2014; Kaur et al., 2015) and time-dependent (Fossat et al., 2006) functions of *Otx2*. We found here that *Otx2* plays radically different functions depending on which stage and cell type is considered. At the progenitor stage, *Otx2* controls the proliferative status of epithalamus cells. In the IPN, *Otx2* acts postmitotically to control the migration of IPN precursors. We could not directly test for migration defect of *Otx2*^{high} habenular neurons in the absence of *Otx2* because they are not generated. However, *Otx2*^{low} habenular neurons seemed to conserve their centrifugal mode of migration. In fact, if newborn neurons are simply laterally pushed away by younger ones, then they may marginally rely on migration cues to form the habenula, which would explain why *Otx2* is not required for such “passive” migration. A recent study (Kaur et al., 2015) showed a role for *OTX2* in self-renewal and migration of neural precursors. In this study, *OTX2* overexpression in a cell context yielded the same effect on proliferation as *OTX2* knock-down in another one. Furthermore, genes affected in the two cell contexts were nonoverlapping. Developmental genes can thus be recruited at several time points, even in the same tissue, to play nonoverlapping functions with nonoverlapping partners or gene targets. This suggests that analysis of gene targets and partners may not be sufficient to reach a conclusion on the common mechanisms that underlie the multiple functions of *Otx2*.

***Otx2* functions from an evolutionary perspective**

A good way of considering the multiple roles of *Otx2* is from an evolutionary point of view. The link between *Otx2* and the visual system has been largely described (for review, see Beby and Lamonerie, 2013). In a more general way, *Otx2* appears as a marker of sensory-related circuits (Harden et al., 2006; Sen et al., 2013; Steventon et al., 2016). Here, we show that *Otx2* is critical for both habenula and IPN development. *Otx2* is evolutionary conserved and its expression pattern and functions are equally highly conserved (Sen et al., 2013). It is therefore tempting to try to predict from its expression pattern potentially conserved and important brain circuits. Investigating *Otx2* expression outside of the visual pathway, we found that it strikingly marked numerous regions implicated in emotional processing such as the VTA, the lateral septum, the periaqueductal gray, the laterodorsal and dorsal tegmentum, the nucleus incertus, the medial raphe, and the HIPS. These subcircuits, as well as *Otx2* itself, may thus perform conserved and important functions in the limbic system. Actually, this *Otx2*⁺ circuit inside the limbic system might still be related to the visual pathway. In zebrafish, the MHb is a target of visual inputs through a thalamic structure not precisely defined (Zhang et al., 2017). This structure has been recently described as the perihabenular nucleus in mammals (Fernandez et al., 2018). It would be interesting to verify whether it expresses *Otx2* as well. In zebrafish, the habenula is asymmetric with predominant dMHb and small vMHb homologs on the left side. Interestingly, this is the side preferentially targeted by the visual pathway. Because *Otx2* mostly affects the dMHb, one can also predict that the

functions associated with this part of the habenula will be preferentially affected. However, the exact functions of the dMHB remain elusive and Otx2 deletion restricted to the habenula may help to solve these issues.

Conclusions

We found that *Otx2* expression delineates a specific subcircuit of the HIPS and is also required for this circuit to form. The HIPS is a modulator of aversion and reward processing and is involved in brain disorders such as anxiety, depression, and addiction. It is thus reasonable to hypothesize that abnormal expression of *Otx2* in the HIPS may lead to psychiatric diseases. There is now evidence that some mood disorders may take root during development. Therefore, to find the causes of these disorders, we need to focus on the developmental mechanisms shaping the structures involved. This study paves the way to investigate specific subfunctions of the HIPS from a developmental perspective.

References

- Angevine JB Jr (1970) Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. an autoradiographic study. *J Comp Neurol* 139:129–187. [CrossRef Medline](#)
- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F, Huttner WB (2011) Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2:154. [CrossRef Medline](#)
- Bebry F, Lamonerie T (2013) The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp Eye Res* 111:9–16. [CrossRef Medline](#)
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Nême N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of cajal-retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8:1002–1012. [CrossRef Medline](#)
- Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C (1999) Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J Neurosci* 19:4407–4420. [CrossRef Medline](#)
- Buecker C, Srinivasan R, Wu Z, Calo E, Acampora D, Faial T, Simeone A, Tan M, Swigut T, Wysocka J (2014) Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* 14:838–853. [CrossRef Medline](#)
- Bunt J, Hasselt NE, Zwijnenburg DA, Hamdi M, Koster J, Versteeg R, Kool M (2012) OTX2 directly activates cell cycle genes and inhibits differentiation in medulloblastoma cells. *Int J Cancer* 131:E21–E32. [CrossRef Medline](#)
- Chatterjee M, Guo Q, Weber S, Scholpp S, Li JY (2014) Pax6 regulates the formation of the habenular nuclei by controlling the temporospatial expression of *shh* in the diencephalon in vertebrates. *BMC Biol* 12:13. [CrossRef Medline](#)
- Concha ML, Wilson SW (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat* 199:63–84. [CrossRef Medline](#)
- Contestabile A, Villani L, Fasolo A, Franzoni MF, Gribaudo L, Oktedalen O, Fonnum F (1987) Topography of cholinergic and substance P pathways in the habenulo-interpeduncular system of the rat. an immunocytochemical and microchemical approach. *Neuroscience* 21:253–270. [CrossRef Medline](#)
- Courtois V, Chatelain G, Han ZY, Le Novère N, Brun G, Lamonerie T (2003) New *Otx2* mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J Neurochem* 84:840–853. [CrossRef Medline](#)
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417–1430. [CrossRef Medline](#)
- El Nagar S, Chakroun A, Le Greneur C, Figarella-Branger D, Di Meglio T, Lamonerie T, Billon N (2018) *Otx2* promotes granule cell precursor proliferation and *shh*-dependent medulloblastoma maintenance in vivo. *Oncogenesis* 7:60. [CrossRef Medline](#)
- Fernandez DC, Fogerson PM, Lazzarini Ospri L, Thomsen MB, Layne RM, Severin D, Zhan J, Singer JH, Kirkwood A, Zhao H, Berson DM, Hattar S (2018) Light affects mood and learning through distinct retina-brain pathways. *Cell* 175:71–84.e18. [CrossRef Medline](#)
- Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T (2006) Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* 7:824–830. [CrossRef Medline](#)
- Fossat N, Le Greneur C, Béby F, Vincent S, Godement P, Chatelain G, Lamonerie T (2007) A new GFP-tagged line reveals unexpected *Otx2* protein localization in retinal photoreceptors. *BMC Dev Biol* 7:122. [CrossRef Medline](#)
- Funato H, Sato M, Sinton CM, Gautron L, Williams SC, Skach A, Elmquist JK, Skultchi AI, Yanagisawa M (2010) Loss of gooseoid-like and DiGeorge syndrome critical region 14 in interpeduncular nucleus results in altered regulation of rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18155–18160. [CrossRef Medline](#)
- Galili N, Epstein JA, Leconte I, Nayak S, Buck CA (1998) *Gscl*, a gene within the minimal DiGeorge critical region, is expressed in primordial germ cells and the developing pons. *Dev Dyn* 212:86–93. [CrossRef Medline](#)
- Harden MV, Newton LA, Lloyd RC, Whitlock KE (2006) Olfactory imprinting is correlated with changes in gene expression in the olfactory epithelia of the zebrafish. *J Neurobiol* 66:1452–1466. [CrossRef Medline](#)
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005) A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* 3:e159. [CrossRef Medline](#)
- Hsu YW, Morton G, Guy EG, Wang SD, Turner EE (2016) Dorsal medial habenula regulation of mood-related behaviors and primary reinforcement by tachykinin-expressing habenula neurons. *eNeuro* 3:ENEURO.0109-16.2016. [CrossRef Medline](#)
- Jukic MM, Carrillo-Roa T, Bar M, Becker G, Jovanovic VM, Zega K, Binder EB, Brodski C (2015) Abnormal development of monoaminergic neurons is implicated in mood fluctuations and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 40:839–848. [CrossRef Medline](#)
- Karunaratne A, Hargrave M, Poh A, Yamada T (2002) GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Dev Biol* 249:30–43. [CrossRef Medline](#)
- Kaur R, Aiken C, Morrison LC, Rao R, Del Bigio MR, Rampalli S, Werbowetski-Ogilvie T (2015) OTX2 exhibits cell-context-dependent effects on cellular and molecular properties of human embryonic neural precursors and medulloblastoma cells. *Dis Model Mech* 8:1295–1309. [CrossRef Medline](#)
- Kim M, Fontelonga T, Roesener AP, Lee H, Gurung S, Mendonca PRF, Mastick GS (2015) Motor neuron cell bodies are actively positioned by Slit/Robo repulsion and Netrin/DCC attraction. *Dev Biol* 399:68–79. [CrossRef Medline](#)
- Kimura-Yoshida C, Nakano H, Okamura D, Nakao K, Yonemura S, Belo JA, Aizawa S, Matsui Y, Matsuo I (2005) Canonical wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm. *Dev Cell* 9:639–650. [CrossRef Medline](#)
- Larsen KB, Lutterodt MC, Møllgård K, Møller M (2010) Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *J Histochem Cytochem* 58:669–678. [CrossRef Medline](#)
- Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San-Miguel R, Hidalgo-Sánchez M, Ferrán JL, Puelles L, Aroca P (2012) Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev Biol* 361:12–26. [CrossRef Medline](#)
- Lu S, Wise TL, Ruddle FH (1994) Mouse homeobox gene *dbx*: sequence, gene structure and expression pattern during mid-gestation. *Mech Dev* 47:187–195. [CrossRef Medline](#)
- Mallika C, Guo Q, Li JY (2015) Gbx2 is essential for maintaining thalamic neuron identity and repressing habenular characters in the developing thalamus. *Dev Biol* 407:26–39. [CrossRef Medline](#)
- Martinez-Lopez JE, Moreno-Bravo JA, Madrigal MP, Martinez S, Puelles E (2015) Red nucleus and rubrospinal tract disorganization in the absence of *Pou4f1*. *Front Neuroanat* 9:8. [CrossRef Medline](#)
- McLaughlin I, Dani JA, De Biasi M (2017) The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *J Neurochem* 142:130–143. [CrossRef Medline](#)
- Moreno-Bravo JA, Perez-Balaguer A, Martinez-Lopez JE, Aroca P, Puelles L, Martinez S, Puelles E (2014) Role of *shh* in the development of molecularly characterized tegmental nuclei in mouse rhombomere 1. *Brain Struct Funct* 219:777–792. [CrossRef Medline](#)
- Mori H, Miyazaki Y, Morita T, Nitta H, Mishina M (1994) Different spatio-temporal expressions of three *otx* homeoprotein transcripts during zebrafish embryogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 27:221–231. [CrossRef Medline](#)
- Muzyka VV, Brooks M, Badea TC (2018) Postnatal developmental dynam-

- ics of cell type specification genes in Brn3a/Pou4f1 retinal ganglion cells. *Neural Dev* 13:15. CrossRef Medline
- Peña CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, Issler O, Loh YE, Leong T, Kiraly DD, Goodman E, Neve RL, Shen L, Nestler EJ (2017) Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science* 356:1185–1188. CrossRef Medline
- Quina LA, Wang S, Ng L, Turner EE (2009) Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *J Neurosci* 29:14309–14322. CrossRef Medline
- Ruiz-Reig N, Andres B, Lamonerie T, Theil T, Fairén A, Studer M (2018) The caudo-ventral pallidum is a novel pallial domain expressing Gdf10 and generating Ebf3-positive neurons of the medial amygdala. *Brain Struct Funct* 223:3279–3295. CrossRef Medline
- Sabunciyan S, Yolken R, Ragan CM, Potash JB, Nimgaonkar VL, Dickerson F, Llenos IC, Weis S (2007) Polymorphisms in the homeobox gene OTX2 may be a risk factor for bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:1083–1086. CrossRef Medline
- Scholpp S, Foucher I, Staudt N, Peukert D, Lumsden A, Houart C (2007) Otx1, Otx2 and Irx1b establish and position the ZLI in the diencephalon. *Development* 134:3167–3176. CrossRef Medline
- Sen S, Reichert H, VijayRaghavan K (2013) Conserved roles of ems/Emx and otd/Otx genes in olfactory and visual system development in *Drosophila* and mouse. *Open Biol* 3:120177. CrossRef Medline
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001–1014. CrossRef Medline
- Serrano-Saiz E, Leyva-Díaz E, De La Cruz E, Hobert O (2018) BRN3-type POU homeobox genes maintain the identity of mature postmitotic neurons in nematodes and mice. *Curr Biol* 28:2813–2823.e2. CrossRef Medline
- Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E (1992) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687–690. CrossRef Medline
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1:4. CrossRef Medline
- Steventon B, Mayor R, Streit A (2016) Directional cell movements downstream of Gbx2 and Otx2 control the assembly of sensory placodes. *Biol Open* 5:1620–1624. CrossRef Medline
- Vue TY, Aaker J, Taniguchi A, Kazemzadeh C, Skidmore JM, Martin DM, Martin JF, Treier M, Nakagawa Y (2007) Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol* 505:73–91. CrossRef Medline
- Wassarman KM, Lewandoski M, Campbell K, Joyner AL, Rubenstein JL, Martinez S, Martin GR (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* 124:2923–2934. Medline
- Yamaguchi T, Danjo T, Pastan I, Hikida T, Nakanishi S (2013) Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* 78:537–544. CrossRef Medline
- Zhang BB, Yao YY, Zhang HF, Kawakami K, Du JL (2017) Left habenula mediates light-preference behavior in zebrafish via an asymmetrical visual pathway. *Neuron* 93:914–928.e4. CrossRef Medline

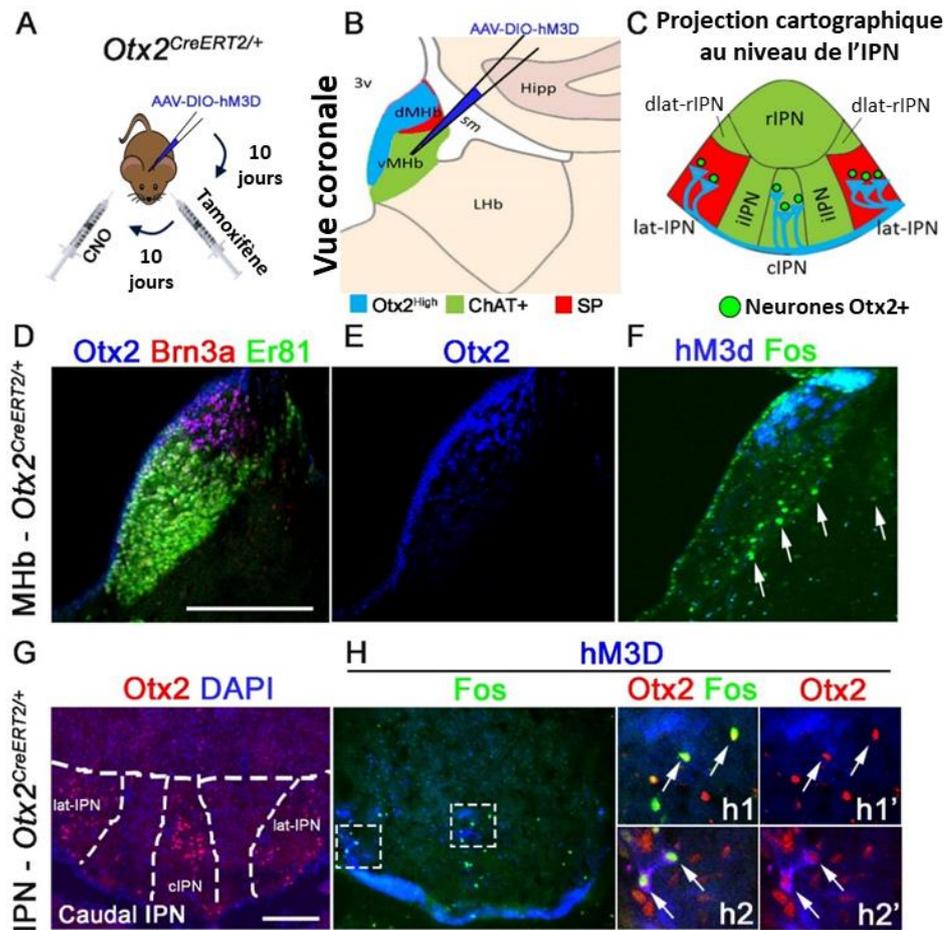


Figure 29. Effets de l'activation chémo-génétique des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb.

A, Illustration schématique de l'induction du DREADD activateur dans les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb dans les souris $Otx2^{CreERT2/+}$ ($n=3$). **B**, Illustration schématique sur des sections coronales au niveau de la MHb représentant la localisation des neurones substance P+ (en rouge), ChAT+ (en vert), $Otx2^{High}$ (en bleu). **C**, Illustration schématique sur des sections coronales dans les régions de l'IPN où projettent les neurones $Otx2^{High}$ substance-P-ergiques (en rouge) et cholinergiques (en vert) de la MHb et localisation des neurones $Otx2+$ dans l'IPN. **D-F**, Immunomarquage sur des sections coronales au niveau de la MHb pour $Otx2$ (en bleu), Brn3a (en rouge), Er81 (en vert) (**D-E**), et sur une section adjacente hM3D (en bleu), Fos (en vert) (**F**). Les flèches représentent les neurones Fos+ en dehors de la zone $Otx2^{High}$ de la MHb. **G-H**, Immunomarquage sur des sections coronales au niveau de l'IPN pour $Otx2$ (en rouge), coloration au DAPI (en bleu) (**G**), et sur une section adjacente Fos (en vert), hM3D (en bleu) (**H**). **h1-h2'**, Agrandissement de la zone en **H** montrant l'immunomarquage hM3D (en bleu), Fos (en vert) au niveau du cIPN (sous-noyau central de l'IPN caudal) (**h1-h1'**) et au niveau du lat-IPN (sous-noyaux latéraux de l'IPN caudal) (**h2-h2'**). Les flèches représentent la superposition des marquages entre hM3D, Fos et $Otx2$. Barre d'échelle, **D,G**, 100 μm .

I.2. Les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb modulent l'activité des neurones $Otx2^+$ du cIPN

Nous avons démontré que les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb projettent sur les sous-noyaux $Otx2^+$ de l'IPN caudal, révélant l'existence d'un sous-circuit $Otx2$ dépendant dans le HIPS (Ruiz-Reig et al., 2019). Cependant, aucune étude fonctionnelle n'a pu démontrer une réelle activation de ces neurones $Otx2^+$ de l'IPN caudal par les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb.

Pour répondre à cette question, nous avons injecté par stéréotaxie, dans la MHb de souris $Otx2^{CreERT2/+}$ et chez les contrôles $Otx2^{+/+}$ un vecteur AAV exprimant le DREADD activateur hM3D, un récepteur couplé à la protéine Gq, floxé et fusionné au rapporteur fluorescent mCherry dont l'expression est sous le contrôle du promoteur synapsin (**Figure 33 A et B**). Pour visualiser l'activité du HIPS, nous nous sommes servis des marqueurs *Egr1* et *Fos* qui sont induits en réponse à une activité neuronale (Tyssowski et al., 2018). Les neurones $Otx2^{High}$ comprennent des neurones de la dMHb et les neurones de la vMHb les plus proches du ventricule (**Figure 33 B,D-E**). Ces neurones projettent dans les régions $Otx2^+$ de l'IPN caudal, à savoir les sous-noyaux latéraux et le sous-noyau central et devraient donc être activés en réponse à l'activation des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb par le DREADD (**Figure 33 C**).

Comme attendu, chez les souris $Otx2^{CreERT2/+}$, l'injection de CNO active le DREADD dans les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb (**Figure 33 F**). L'activation de ces neurones augmente l'expression de *Fos* dans l'IPN caudal, reflétant une augmentation de son activité neuronale (**Figure 33 G,H**). De plus, seuls les neurones $Otx2^+$ de l'IPN caudal expriment *Fos* aussi bien dans le sous-noyau central (**Figure 33 h1-h1'**) que les sous-noyaux latéraux (**Figure 33 h2-h2'**). Donc, l'activation forcée des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb stimule spécifiquement l'activité des neurones $Otx2^+$ du cIPN.

Nous avons par ailleurs vérifié la spécificité de l'induction de l'activité du DREADD (**Figure 34**). Nous avons confirmé qu'il est exprimé sur le site de transfection ipsi-latéral (**Figure 34**), mais pas sur le site contra-latéral non injecté (**Figure 34 B**). Nous avons également vérifié que l'activation du DREADD est bien due à l'effet du CNO et non pas à un effet indirect de la clozapine métabolique qui en dérive, un effet secondaire rapporté dans la littérature (Mahler and Aston-Jones, 2018). Chez les souris contrôles, le DREADD ne peut pas être activé dans la MHb sans injection de CNO (**Figure 34 C**). De plus, chez les souris contrôles, en l'absence de recombinaise Cre inducible, le DREADD ne peut pas s'exprimer. (**Figure 34 D**).

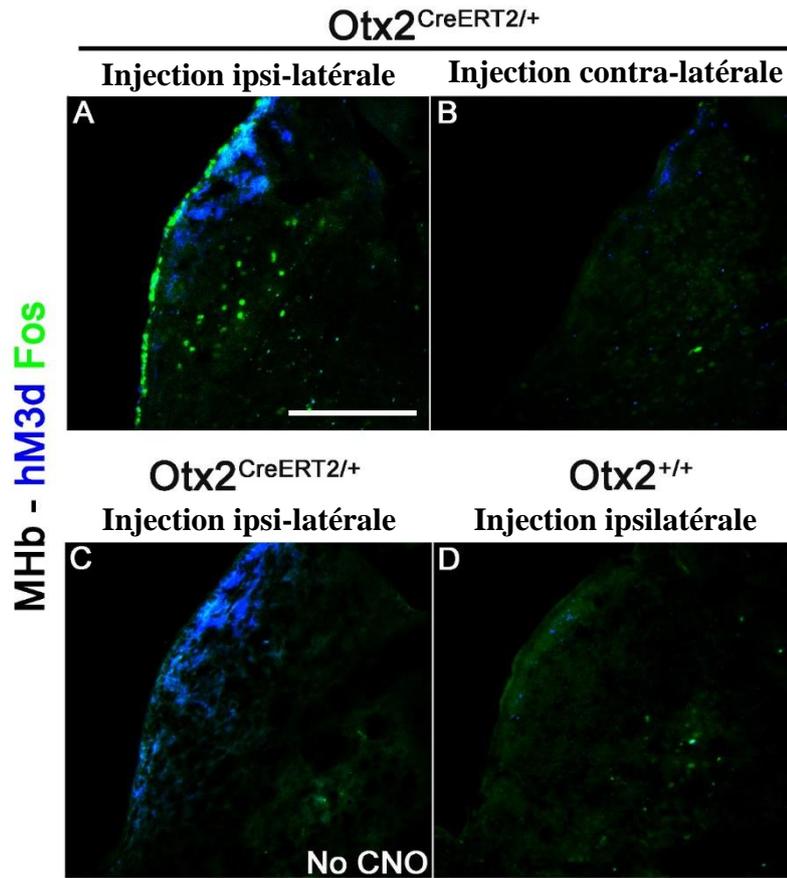


Figure 30. Spécificité de l'activation chémo-génétique des neurones Otx2^{High} de la MHB.

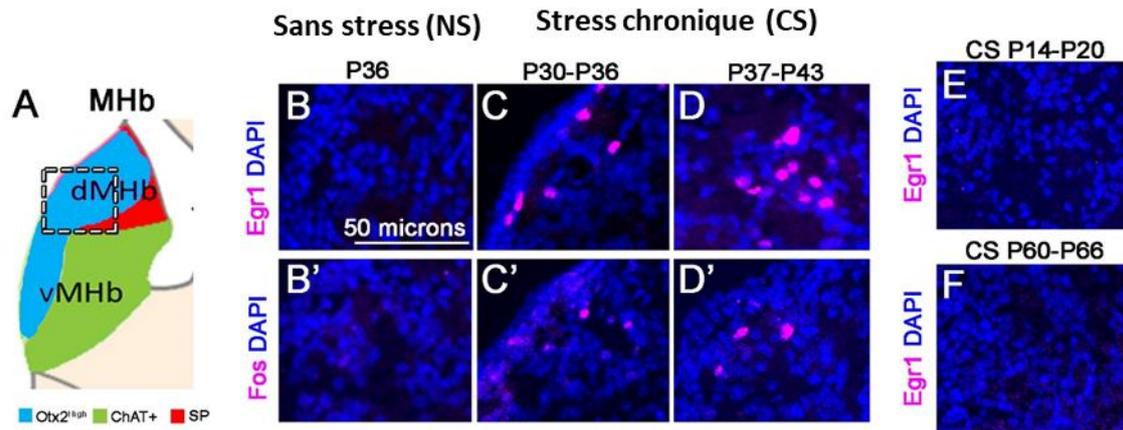
A-C, Immunomarquage sur des sections coronales au niveau de la MHB pour hM3d (en bleu) et Fos (en vert), dans les souris Otx2^{CreERT2/+} injectées avec le CNO (n=3) du côté ipsi-latéral transfecté avec le DREADD activateur (**A**), du côté contra-latéral non transfecté (**B**), et dans les souris non injectées avec le CNO (n=2) (**C**). **D**, Immunomarquage de sections de souris Otx2^{CreERT2/+} transfectées avec le DREADD activateur au niveau de la MHB et injectées avec le CNO (n=3). Barre d'échelle : 100 µm

Ces résultats montrent que les neurones $Otx2^{High}$ sont capables de moduler l'activité des neurones $Otx2+$ du cIPN et confirment l'idée selon laquelle ces neurones forment un sous-circuit au sein du HIPS, marqué par l'expression d' $Otx2$, et que nous appellerons par la suite le HIPOPS (Habenulo-InterPeduncular- $Otx2$ -Positive-System). De manière intéressante, dans la MHb, l'immuno-réactivité à Fos n'est pas seulement observée dans les neurones exprimant le DREADD. De nombreux neurones dans la MHb et certains dans la LHb expriment également Fos alors qu'ils n'expriment pas le DREADD (**Figure 34F**). Cette observation suggère que les neurones $Otx2^{High}$ peuvent moduler directement ou indirectement l'activité de ces neurones en plus de celle des neurones $Otx2+$ du cIPN.

II. Le HIPS présente une période critique de développement post-natale

II.1. Le HIPS présente une période de forte sensibilité au stress chronique

Un dysfonctionnement du HIPS peut conduire à des pathologies psychiatriques telles que l'anxiété et la dépression. Ces pathologies peuvent se développer à la suite de stress trop intenses et/ou répétés et selon l'hypothèse neuro-développementale, les périodes critiques du développement constituent des périodes de plus forte susceptibilité (Ansorge et al., 2007; Baker et al., 2014; Pervanidou and Chrousos, 2018). Pour comprendre comment une altération physiologique du HIPS peut conduire à ces pathologies, nous avons recherché si le HIPS présentait une période critique de développement post-natale. Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole de stress qui puisse être appliqué chez les souris à différents stades postnataux, et nous avons comparé l'activité du HIPS à ces stades pour identifier celui où le HIPS y serait le plus sensible. Nous voulions créer un modèle de stress précoce qui serait suffisamment fort pour induire une susceptibilité à long-terme sans pour autant déclencher immédiatement des symptômes psychiatriques (modèle de stress à « deux coups »). Nous avons donc choisi d'utiliser un stress chronique de type restreinte (Buynitsky and Mostofsky, 2009). Nous avons appliqué ce stress deux heures par jour, uniquement pendant sept jours, de manière à ne pas recouvrir plusieurs périodes développementales. L'effet de ce stress sur l'activité neuronale a été testé avant le sevrage, durant l'enfance tardive (P14-20), et à deux périodes de l'adolescence après sevrage, correspondant à la transition vers l'adolescence (P30-36) et au



G Stades de la vie humaine



Âges équivalents chez la souris

Figure 31. Activité neuronale de la MHb en réponse à un stress chronique subi à différentes périodes post-natales.

A, Illustration schématique d'une section coronale au niveau de la MHb représentant la localisation des neurones substance P⁺ (en rouge), ChAT⁺ (en vert), Otx2^{High} (en bleu) et la zone d'expression forte d'Egr1 et Fos en réponse au stress chronique (encadrée) représentée entre (B-F et B'-D'). B-F, Immunomarquage Egr1 (en magenta) sur des sections coronales correspondant à la zone encadrée en A et coloration au DAPI (en bleu) en l'absence de stress à P36 (n=3) (B), en réponse à un stress chronique entre P30-36 (n=2) (C), entre P37-43 (n=3) (D), entre P14-20 (n=2) (E), entre P60-66 (n=2) (F), respectivement. B'-D', Immunomarquage sur des sections coronales montrant la zone encadrée en A pour Fos (en magenta) et le DAPI (en bleu) en absence de stress à P36 (B'), en réponse à un stress chronique entre P30-36 (C'), entre P37-43 (D'), respectivement. G, Schéma comparatif des stades de la vie humaine et des âges équivalents chez la souris.

milieu de l'adolescence (P37-43) (Laviola et al., 2003; Eiland and Romeo, 2013; Peña et al., 2017). Nous avons aussi testé l'effet du même stress sur des souris adultes (P60-66) afin d'avoir un point de comparaison. A la fin du dernier stress, les animaux ont été directement sacrifiés et l'activité neuronale du HIPS a été visualisée grâce aux marqueurs d'activité neuronale Fos et Egr1 (Krox-24, Zif-268) (Tyssowski et al., 2018), et comparée avec celle d'animaux contrôles qui n'ont pas subi de stress aux différents stades étudiés (P20, P36, P43, P69 respectivement).

Nous constatons qu'en l'absence de stress, la MHb n'est pas activée (**Figure 35 B et B'**). En comparaison, à la fin du dernier stress chronique, Fos et Egr1 sont fortement induits (**Figure 35 C,D et C',D'**). Nous constatons toutefois qu'aux différents stades étudiés, l'expression de Fos est toujours plus faible que celle d'Egr1 (**Figure 35 C,D versus Figure 35 C',D'**). Egr1 semble donc être un marqueur de l'activité neuronale plus sensible pour détecter des changements d'activité dans le HIPS. Cette induction est particulièrement visible en réponse à un stress chronique subi après le sevrage, plus précisément à la préadolescence (P30-36) et au milieu de l'adolescence (P37-43) (**Figure 35 C-D'**) contrairement aux stades correspondant à l'enfance tardive ou à l'âge adulte où le même stress n'induit pas l'activité de la MHb (**Figure 35 E-F**).

De la même manière, l'activation de l'IPN est plus forte et plus évidente à l'adolescence (**Figure 36 B-F**). Comparée à cette période, l'activité de l'IPN est beaucoup plus faible durant l'enfance tardive et à l'âge adulte (**Figure 36 G-H**). De manière intéressante, les neurones Otx2^{High} de la MHb et les neurones Otx2⁺ de l'IPN caudal respectivement, sont relativement plus immuno-réactifs à Egr1, comparés aux autres neurones de ces régions (**Figure 36 C-H**).

Pour identifier si le HIPOPS est spécifiquement recruté en réponse à un stress chronique, nous avons testé les effets d'un stress aigu sur l'activité du HIPS. Ce type de stress active aussi des neurones du HIPS, cependant ces neurones sont principalement localisés en dehors du sous-circuit HIPOPS et aux extrémités des sous-noyaux latéraux de l'IPN caudal (**Figure 36 I**). Ces neurones Otx2⁺ activés par un stress aigu se caractérisent par une identité moléculaire différente. En effet, ils expriment la parvalbumine (**Figure 37 A**) et sont entourés de PNNs seulement à partir de P36 (**Figure 37 B**). Ces neurones Otx2⁺ à l'extrémité des sous-noyaux de l'IPN caudal sont les seuls neurones à être Otx2⁺PV⁺ dans l'IPN et à être marqués par la WFA, une lectine qui détecte spécifiquement les PNNs. Nous les avons donc appelés les neurones Otx2^{PNN+}. La majorité des neurones activés par un stress chronique sont Otx2⁺. Toutefois, ceux localisés aux extrémités latérales sont majoritairement Egr1⁻ indiquant que les neurones Otx2^{PNN+} sont silencieux durant un stress chronique (**Figure 36 D-H**).

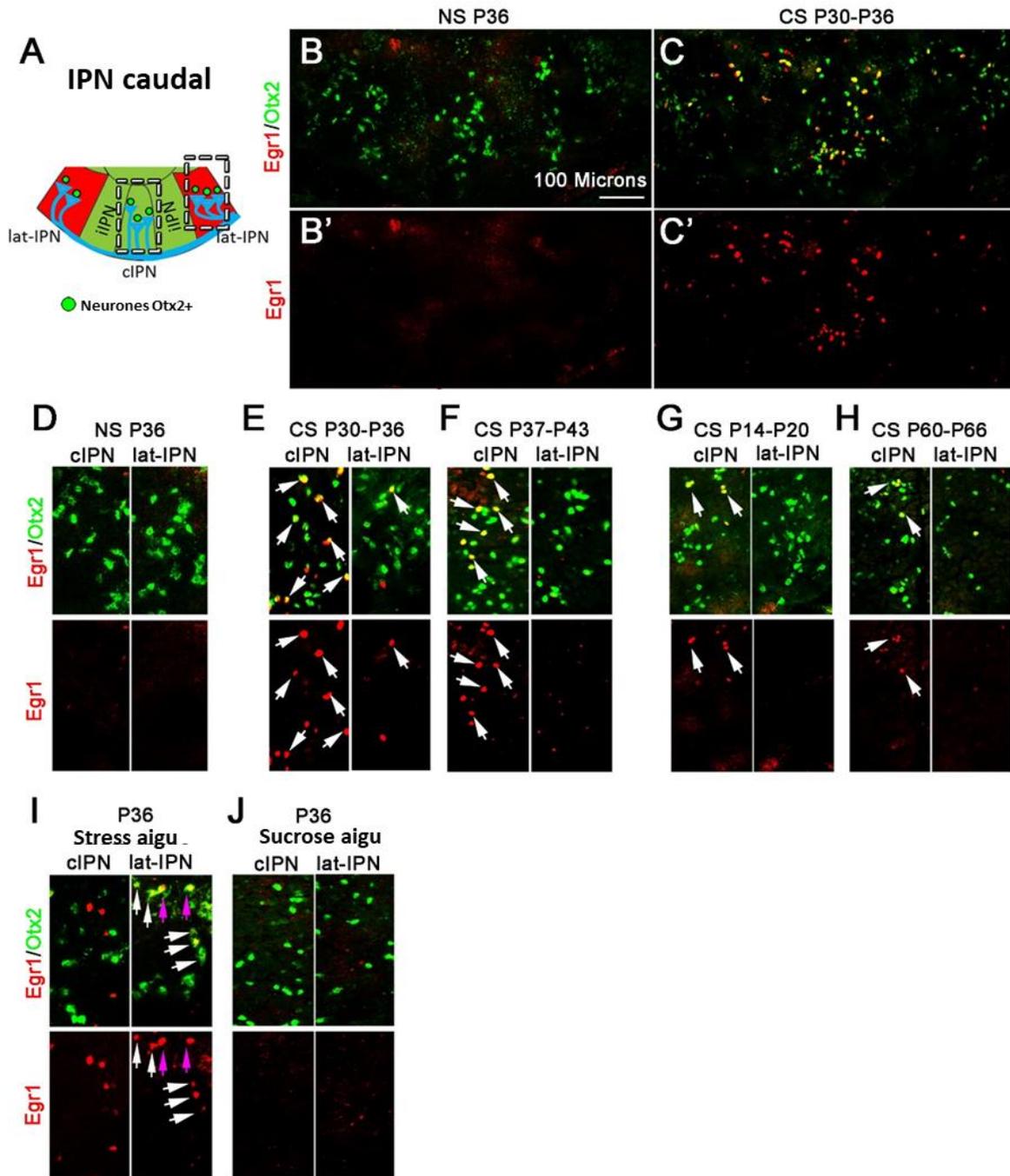


Figure 32. Activité neuronale de l'IPN en réponse à un stress subi à différentes périodes post-natales.

A, Illustration schématique d'une section coronale au niveau de la région de l'IPN caudal où projettent les neurones Otx2^{High} substance-P-ergiques (en rouge) et cholinergiques (en vert) de la MHB et localisation des neurones Otx2⁺ dans l'IPN. Les régions encadrées correspondent à l'IPN central (cIPN) et latéral (lat-IPN). B-C', Immunomarquage Egr1 (en rouge) et Otx2 (en vert) sur des sections coronales au niveau de l'IPN caudal en absence de stress à P36 (B et B') et en réponse à un stress chronique entre P30-36 (C et C'). D-J, Immunomarquage Egr1 (en rouge) et Otx2 (en vert) sur des sections coronales correspondant aux zones encadrées en A en absence de stress à P36 montré entièrement en B et B' (n=3) (D), en réponse à un stress chronique entre P30-36, montré entièrement en C et C' (n=2) (E), en réponse à stress chronique entre P37-43 (n=3) (F), entre P14-20 (n=2) (G) entre P60-66 (n=2) (H), en réponse à un stress aigu à P36 (n=2) (I), en réponse à une consommation aiguë de sucrose à P36 (n=2) (J). Les flèches de couleur blanches indiquent la superposition entre Egr1 et Otx2. Les flèches de couleur rose indiquent les mêmes neurones que dans la Figure 37.

Pour vérifier que l'activité du HIPS observée est spécifiquement causée par un stress, nous avons analysé la réponse du HIPS à un stimulus agréable. Nous avons pour cela exposé les souris à une boisson sucrée. Contrairement au stress, la boisson sucrée n'a provoqué qu'une faible réponse de l'IPN confirmant la spécificité de la réponse du HIPS à un événement stressant (**Figure 36 J**).

Ces résultats suggèrent que le HIPS est sensible aux effets d'un stress chronique. Cette activation est spécifiquement liée à la réponse du HIPS au stress et n'est pas observée en réponse à un stimulus agréable. De manière intéressante, ce stress chronique fait intervenir plus particulièrement le HIPOPS, un sous-circuit du HIPS dépendant d'Otx2, ce qui suggère une implication spécifique d'Otx2 dans la réponse du HIPS au stress pendant l'adolescence. Plus le stress est intense, plus l'activité du HIPOPS est élevée, contrairement aux autres sous-circuits du HIPS. De plus, l'activité de la MHb semble bien responsable de l'activité des neurones Otx2⁺ du cIPN, étant donné la forte corrélation qui existe entre leurs niveaux d'activité aux différents stades étudiés. Une population particulière de neurones Otx2⁺ a été identifiée dans l'IPN, que nous avons décidé d'appeler les neurones Otx2^{PNN+}. Ces neurones répondent à un stress aigu mais pas à un stress chronique. De plus, nous avons identifié que la période pré-adolescente et adolescente provoque un pic d'activité lié au stress chronique que l'on ne retrouve pas durant l'enfance tardive ni chez l'adulte. Nous émettons l'hypothèse que cette période est une période critique de maturation du HIPOPS.

III. Un stress chronique durant la période critique de développement du HIPS crée une susceptibilité aux maladies psychiatriques à long-terme

Pour confirmer que la période de puberté (voir **Figure 35G**) constitue une période critique de développement du HIPS, nous avons étudié les effets à long-terme du protocole de stress décrit ci-dessus. Le stress chronique a été appliqué entre P30-36 (restreinte juvénile/préadolescente) car l'activité du HIPOPS commence à être recrutée durant cette période de transition vers l'adolescence, une période déjà décrite comme plus sensible au stress et associée aux formes les plus sévères de désordres affectifs (Andersen and Teicher, 2008; Eiland and Romeo, 2013; Romeo, 2013). Comme expliqué précédemment, nous avons employé un stress qui crée une

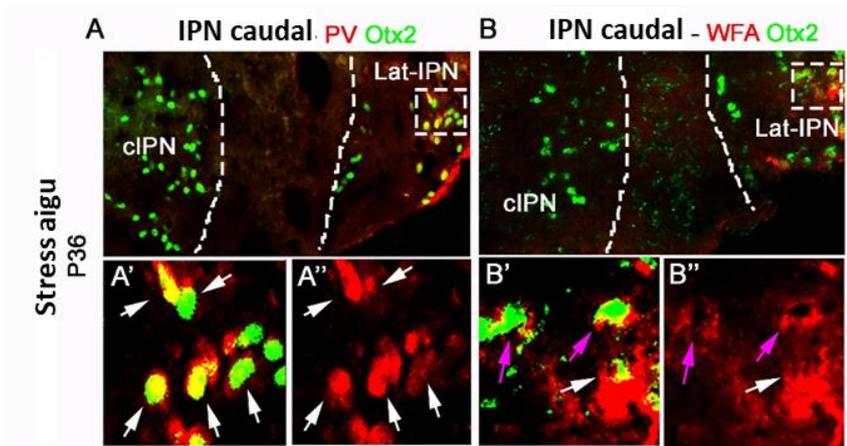


Figure 33. Signature moléculaire des neurones $Otx2^+$ des sous-noyaux latéraux de l'IPN caudal

A, Immunomarquage PV (en rouge) et $Otx2$ (en vert) de sections coronales au niveau de l'IPN caudale après à un stress aigu à P36. **A'-A''**, Agrandissement de la zone encadrée en **A**. Les flèches blanches montrent la superposition des marquages PV et $Otx2$. **B**, Immunomarquage sur des sections coronales au niveau de l'IPN caudale pour WFA, reconnaissant les PNN, (en rouge) et $Otx2$ (en vert) en réponse à un stress aigu à P36. **B'-B''**, Agrandissement de la zone encadrée en **B**. Les flèches blanches montrent la superposition des marquages WFA et $Otx2$. Les flèches magenta montrent les mêmes cellules $Egr1^+$ que ceus montrés dans la **figure 36** après un stress aigu.

susceptibilité. Afin de distinguer les comportements liés à la réaction directe au stress des effets de ce stress sur le développement de symptômes psychiatriques à moyen-terme, les effets comportementaux ne sont pas mesurés immédiatement à la fin du premier stress mais quinze jours après (P51, comportement 1). Pour tester les effets sur l'activité exploratrice et les niveaux d'anxiété, nous avons utilisé le test du champ ouvert, le test de la transition jour-nuit et le test de la croix surélevée. Un second stress au début de l'âge adulte entre P63-69 (restreinte adulte) est ensuite appliqué pour révéler la susceptibilité créée par le premier stress. Nous avons choisi d'appliquer, pour ce second stress, le même protocole que pour le premier stress afin de nous assurer que les effets observés ne sont pas dus aux effets du stress adulte seul. Les effets comportementaux à long-terme de ce protocole de stress sur l'anxiété sont par la suite étudiés un mois après le dernier jour de stress (P100, comportement 2) en mesurant les mêmes paramètres que lors de la première analyse. Les tests d'anxiété sont suivis d'un test de curiosité et du test de la nage forcée qui permettent de mesurer les niveaux de dépression. Les animaux sont ensuite sacrifiés à la fin des tests comportementaux à partir de P130 pour des analyses histologiques directement ou après une dernière restriction de 2h pour étudier les effets à long-terme du stress sur l'activité neuronale du HIPS (**Figure 38 A**). Pour toutes ces études, les souris utilisées sont uniquement des mâles afin d'éviter les variations dues au dimorphisme sexuel.

III.1. Un seul stress chronique imposé durant la période critique n'induit pas d'effets comportementaux

Quinze jours après la fin du premier stress chronique, nous avons étudié les effets de ce stress sur l'activité exploratoire, en mesurant la distance parcourue et la vitesse moyenne au centre du champ ouvert (**Figure 38 B et C**). Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les animaux contrôles et stressés ce qui suggère que le premier stress n'affecte pas la locomotion chez ces animaux. La fréquence d'entrée des souris au centre du champ, une zone considérée comme anxiogène chez les rongeurs a aussi été analysée. Celle-ci ne diffère pas significativement entre les souris contrôles et stressées (**Figure 38 D**). Les rongeurs ont une aversion naturelle pour les espaces ouverts (thigmotactisme positif). Nous avons mesuré le temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**Figure 38 E**). Nous n'avons pas relevé de différences dans ce test.

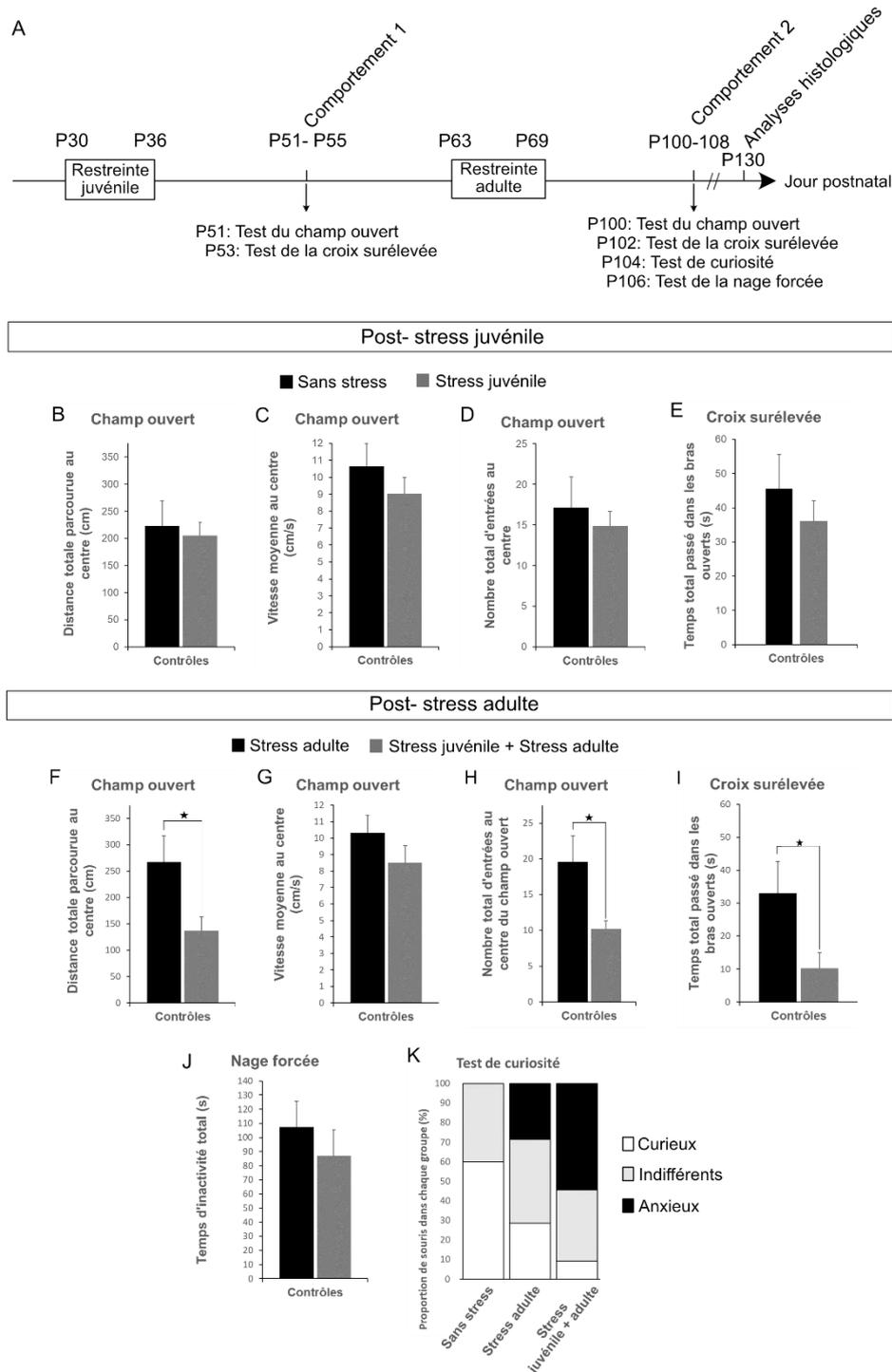


Figure 34. Effets du stress adolescent sur les niveaux d'anxiété et de dépression à long-terme.

A, Illustration du protocole expérimental. **B-E**, Mesures comparées de la distance totale parcourue au centre du champ ouvert (**B**), de la vitesse moyenne au centre du champ ouvert (**C**), du nombre total d'entrées au centre du champ ouvert (**D**), du temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**E**) entre animaux non stressés ($n=6-7$) et animaux ayant subi le stress préadolescent ($n=10-12$) à partir de P51. **F-K**, Résultats comportementaux des mêmes animaux à partir de P100 après un stress chronique adulte : distance totale parcourue au centre du champ ouvert (**F**), vitesse moyenne au centre du champ ouvert (**G**), nombre total d'entrées au centre du champ ouvert (**H**), temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**I**), temps total d'inactivité dans le test de la nage forcée (**J**), pourcentage de souris dans les sous-groupes curieux, indifférents et anxieux dans le test de curiosité (**K**). Les barres d'erreur représentent la SEM. * $P < 0.05$, test-t bilatéral

Une restriction de 2 heures, répétée une fois par jour entre P30 et P36, n'est donc pas suffisamment forte pour provoquer des effets visibles sur le comportement moteur ni sur l'anxiété.

III.2. Le stress adulte précipite les symptômes psychiatriques chez les souris ayant subi un premier stress à l'adolescence

Après cette première série de tests comportementaux (comportement 1), un second stress chronique est appliqué aux mêmes souris au début de l'âge adulte entre P63 et P69 pour révéler la susceptibilité aux pathologies psychiatriques que nous espérons avoir créée à la suite du stress adolescent. Les souris naïves utilisées comme contrôles durant le comportement 1 subissent le stress adulte et servent de contrôles aux souris qui auront subi les deux stress chroniques (souris CS x2). On constate qu'un mois après la fin du stress adulte, la distance parcourue au centre par les souris CS x2 est plus faible que celle parcourue par les souris qui n'ont subi que le stress adulte (souris contrôles adultes) (**Figure 38 F**). Nous avons confirmé que cette différence n'est pas due à un défaut de locomotion puisque la vitesse moyenne des souris CS x2 au centre du champ ouvert n'est pas significativement différente de celle des souris contrôles adultes (**Figure 38 G**). Le nombre d'entrées au centre du champ ouvert et le temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé diminue également chez les souris CS x2, par rapport aux souris contrôles adultes (**Figures 38 H et I respectivement**). Le test de la nage forcée, ne montre pas de différence sur le temps d'immobilité totale des souris CS x2 (**Figure 38 J**). Nous avons déterminé le temps passé par la souris à proximité d'un objet, ce qui nous a permis de classer les souris dans les différents groupes : curieux, indifférent et anxieux. Les souris curieuses sont celles qui passent plus de temps près de l'objet que dans le reste de l'espace, un comportement attendu lorsqu'un nouvel objet est introduit dans leur environnement. Les souris qui passent autant de temps près de l'objet que loin de celui-ci sont classées dans le groupe indifférent. Cette indifférence peut être considérée comme un symptôme de la dépression. Les souris qui passent plus de temps loin de l'objet sont considérées comme anxieuses. La proportion de souris indifférentes ne semble pas varier entre les souris qui n'ont subi aucun stress, les souris contrôles adultes et les souris CS x2. En comparaison, le pourcentage de souris anxieuses augmente chez les souris contrôles adultes et est encore plus important chez les souris CS x2 qui ont aussi subi le stress juvénile (**Figure 38 K**).

Ces résultats montrent que la combinaison du stress adolescent et du stress adulte rend les souris plus anxieuses, comme nous avons pu le mesurer dans le test du champ ouvert et le test du labyrinthe en croix surélevé : diminution du nombre d'entrées et de la distance parcourue au centre du champ ouvert, et diminution du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé. Le test de la nage forcée, n'a pas permis de révéler de symptômes dépressifs, des résultats confirmés par l'absence de changement significatif du groupe de souris indifférentes dans le test de la curiosité. L'absence de symptômes après le premier stress chronique, qui ne sont révélés qu'après le stress chronique adulte, prouve que le stress adolescent a créé une susceptibilité à l'anxiété à long-terme. Le stress employé est de courte durée et d'intensité moyenne mais induit tout de même des effets à long-terme. La période P30-36 est donc une période critique, qui sensibilise au développement d'une anxiété à long-terme et associée à une augmentation de l'activité du HIPOPS particulièrement accrue en réponse à un stress chronique.

III.3. Une délétion permanente post-natale d'Otx2 dans la dMHb seule n'a pas d'effets sur le comportement

Le HIPOPS est le sous-circuit recruté durant un stress chronique subi pendant la période de préadolescence et adolescence. Nous voulions ensuite identifier les fonctions du HIPOPS dans la réponse au stress et déterminer le rôle d'Otx2 dans ce sous-circuit. Nous avons donc étudié les effets de la délétion d'Otx2 dans les neurones Otx2^{High} de la dMHb. Nous nous sommes focalisés sur les effets de cette délétion sur l'activité du HIPOPS et sur le développement de symptômes psychiatriques, en interaction ou non avec un stress.

III.3.1. La lignée transgénique Ngn1Cre est un outil spécifique pour induire une délétion d'Otx2 dans la MHb

a) Protocole d'induction

Pour induire une délétion conditionnelle d'Otx2 dans les neurones Otx2^{High} de la dMHb (cKO) nous avons utilisé la lignée transgénique *Otx2^{lox/lox};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* (**Figure 39 A**). Cette lignée exprime la recombinaison inducible au tamoxifène CreERT2 sous le contrôle du promoteur du gène *Ngn1*, qui code un facteur de transcription transitoirement exprimé dans les

progéniteurs intermédiaires. *Ngn1* régule la différenciation neuronale et la spécification neuronale de sous-types neuronaux à travers le système nerveux central et périphérique. Il est exprimé dans tous les progéniteurs thalamiques dont ceux donnant naissance à l'habénula (Vue et al., 2007; Kim et al., 2011). Pour étudier les fonctions post-natales d'*Otx2* dans les neurones *Otx2*^{High} de la MHb sans affecter leur naissance, nous avons injecté du tamoxifène à P0. La délétion d'*Otx2* à P0 permet de cibler ces neurones après leur sortie de mitose, ce qui permet de ne pas affecter le développement de la MHb. La recombinaison peut être suivie grâce au rapporteur tdTomato, codé par la construction Ai14 (**Figure 39 A**).

Nous avons d'abord vérifié que le transgène *Ngn1*^{CreERT2} est bien exprimé dans les neurones *Otx2*^{High} de la MHb. Nous observons que chez les souris contrôles *Otx2*^{+/+}; *Ngn1*^{CreERT2}; *AiA4/Ai14*, le rapporteur tdTomato est bien exprimé dans les neurones *Otx2*^{High} (**Figures 39 b et b'**). Le transgène *Ngn1*^{CreERT2} permet donc de cibler les neurones de la MHb. Il est exprimé plus précisément dans la partie dorsale de la MHb, correspondant à la région activée par le stress à l'adolescence (**Figures 39 B et B'**). Comme chez les souris contrôles, nous observons bien, chez les cKO, une recombinaison dans la dMHb (**Figures 39 D et D'**) au niveau de la région contenant des neurones *Otx2*^{High}, accompagnée d'une délétion efficace d'*Otx2* dans les neurones tdTomato+ (**Figures 39 d et d'**).

b) Effets de la délétion d'Otx2 sur l'anatomie du HIPS

Nous avons vérifié que la délétion d'*Otx2* à P0 dans la MHb n'affecte pas la survie de ces neurones ni leur projection sur l'IPN. La présence de neurones tdTomato⁺ dans la dMHb des souris cKO prouve que la délétion d'*Otx2* n'affecte pas la survie de ces neurones (**Figures 39 D et D'**). Cela a été confirmé par la mesure de l'aire totale de la MHb qui ne montre aucune différence entre les contrôles et les souris cKO (**Figure 39 F**). Le transgène *Ngn1*^{CreERT2} marque bien le sous-circuit HIPOPS puisque les neurones *Otx2*^{High} de la dMHb, qui sont tdTomato+, (**Figures 39 B et B'**) projettent sur les parties latérales de l'IPN caudal (Lat-IPN) (**Figures 39 C et C'**) et plus particulièrement sur les neurones *Otx2*⁺ de cette région (**Figure 39 c1**). Chez les souris cKO, les neurones *Otx2*^{High} de la dMHb qui sont tdTomato+ (**Figures 39 E et E'**) projettent bien sur les parties latérales du cIPN et les neurones *Otx2*⁺ de ces régions sont bien entourés par ces projections tdTomato+ (**Figure 39 e'**).

Ces résultats suggèrent que la délétion d'*Otx2* n'induit pas de modification anatomique majeure du HIPS, qui semble conserver son intégrité et sa connectivité.

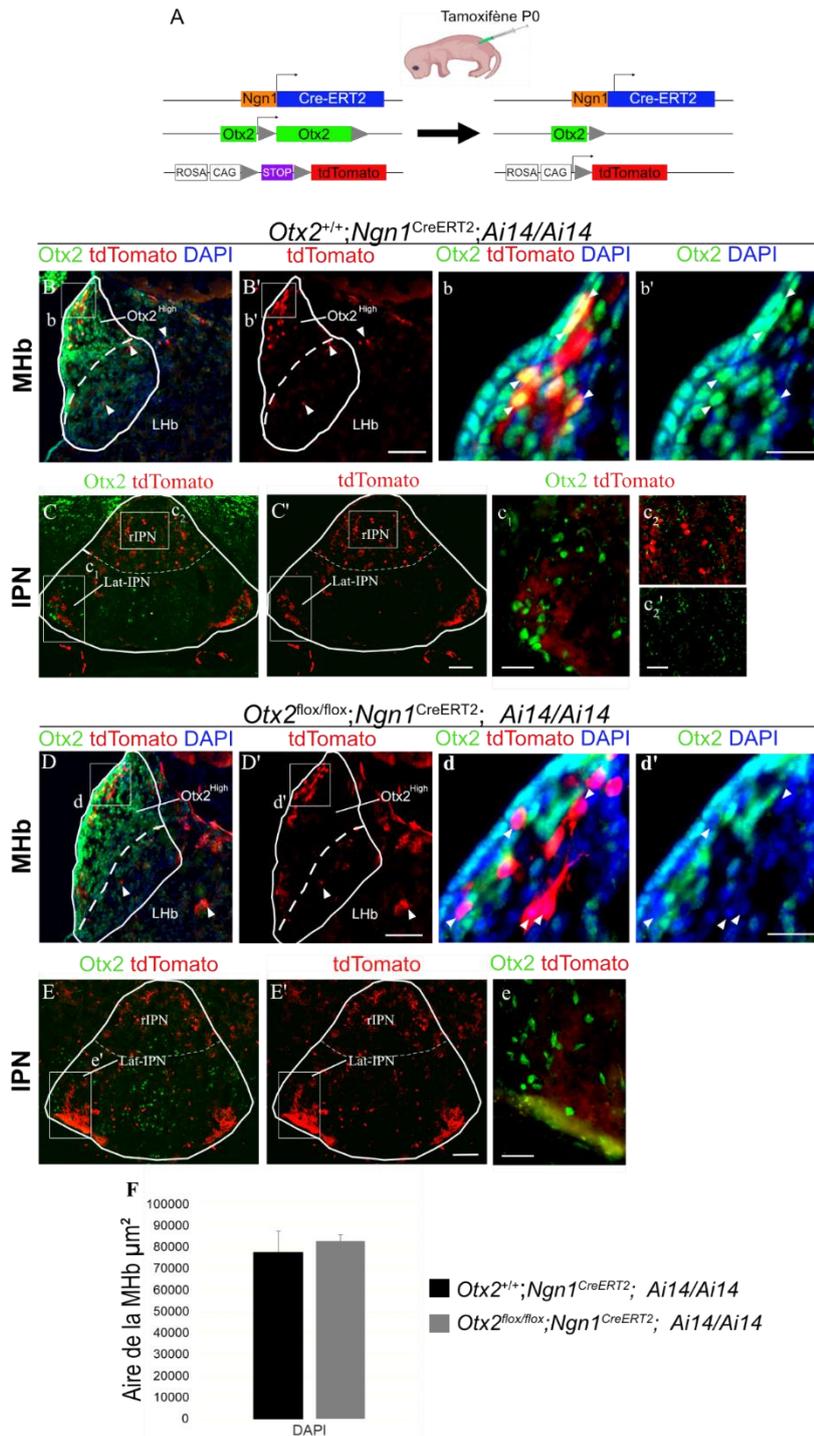


Figure 35. Activité du transgène $Ngn1^{CreERT2}$ et effets de la délétion d' $Otx2$ dans le HIPS.

A, Schéma représentant la combinaison génétique utilisée pour induire la recombinaison et visualiser les neurones cKO $Otx2$. **B-C'**, Immunomarquage $Otx2$ (en vert), $tdTomato$ (en rouge), et coloration au DAPI (bleu) de sections coronales au niveau de la MHb (**B-B'**) et de l'IPN (**C-C'**) dans les animaux contrôles ($n=3$). Les flèches représentent les cellules gliales $tdTomato^+$. **b-b'**, Agrandissement de la zone encadrée en **B**. Les flèches représentent la superposition des marquages entre $Otx2$ et $tdTomato$. **c₁-c₂'**, Agrandissement de la zone encadrée en **C** du Lat-IPN (**c₁**) et du rIPN (**c₂** et **c₂'**). **D-E'**, Immunomarquage $Otx2$ (en vert), $tdTomato$ (en rouge), et coloration au DAPI (en bleu) de sections coronales au niveau de la MHb (**D-D'**) et de l'IPN (**E-E'**) dans les animaux cKO ($n=3$). Les flèches représentent les cellules gliales $tdTomato^+$. **d-d'**, Agrandissement de la région encadrée en **D**. Les flèches représentent la superposition des marquages entre $Otx2$ et $tdTomato$. **e**, Agrandissement de la zone en **E**. **F**, Mesure de l'aire totale de la MHb en μm^2 chez les animaux contrôles ($n=3$) et chez les animaux cKO ($n=3$). Barre d'échelle : **B'**, **C'**, **D'**, **E'** = 100 μm . **c**, **e** = 50 μm . **b'**, **c₁'**: 25 μm . Les barres d'erreur représentent la SEM

c) Description des régions co-exprimant le transgène *Ngn1^{CreERT2}* et *Otx2*

Nous voulions également nous assurer que les effets comportementaux que nous allions obtenir seraient dus à la délétion d'*Otx2* dans la MHb. Nous avons donc recherché chez les souris contrôles *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2};AiA4/Ai14*, les autres zones potentielles de co-expression d'*Otx2* et de *Ngn1^{CreERT2}* lorsque le transgène est exprimé à P0. En dehors de la zone *Otx2^{High}*, quelques cellules gliales sont tdTomato+ (**Figures 39 B et B'**). Ces cellules, caractérisées par leurs nombreuses ramifications, n'expriment normalement pas *Otx2*. Plusieurs neurones de l'IPN rostral expriment également le rapporteur tdTomato (**Figures 39 c2-c2', E-E'**). Cette région de l'IPN n'exprimant normalement jamais *Otx2*, il est improbable que sa délétion y produise quelque effet. La délétion d'*Otx2* dans le HIPS ne cible donc que le sous-circuit HIPOPS. Dans la rétine, *Ngn1Cre^{ERT2}* n'est exprimé ni dans le RPE ni dans les cellules bipolaires à P0, deux régions qui expriment fortement *Otx2* (**Figure 40 A**). Cependant, une co-localisation d'*Otx2* et de la tdTomato existe dans quelques photorécepteurs (**Figure 40 a et a'**). La délétion d'*Otx2* dans les photorécepteurs seule n'affecte pas leur survie (Housset et al., 2013) et ne génère pas de phénotype sur les niveaux d'anxiété (Pensieri et al., article en cours de soumission). Il est donc peu probable qu'une délétion limitée à ces rares cellules ait un rôle dans les effets que nous voulons étudier. Quelques cellules tdTomato+ sont visibles dans les plexus choroïdes (**Figure 40 B**) mais ces cellules ne sont pas *Otx2*+ (**Figure 40 b et b'**). De très rares neurones de la VTA expriment le transgène *Ngn1Cre^{ERT2}* à P0 (**Figure 40 C**), mais là encore, les cellules tdTomato ne sont pas *Otx2*+ (**Figure 40 D**). Au niveau des colliculi supérieurs, de rares neurones sont tdTomato+ mais il n'y a pas de co-localisation avec *Otx2* (**Figure 40 d et d'**). *Ngn1Cre^{ERT2}* n'est pas exprimé dans le septum (**Figure 40 E**) ni dans LGN à P0 (**Figure 40 F**). Enfin, le rapporteur tdTomato est largement exprimé dans le cervelet mais principalement en dehors de la couche de cellules granulaires marquée intensément au DAPI (**Figure 40 G**). On ne peut cependant exclure une expression du transgène dans des cellules exprimant *Otx2*, mais une étude détaillée a montré que la délétion d'*Otx2* dans le cervelet n'induit pas de phénotype moteur dans la lignée de souris *Otx2^{flox/flox};En1^{Cre}* (Borgkvist et al., 2006).

La lignée de souris *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* permet donc d'étudier spécifiquement les effets de la délétion d'*Otx2* dans le HIPS à P0 sur les symptômes anxieux et dépressifs.

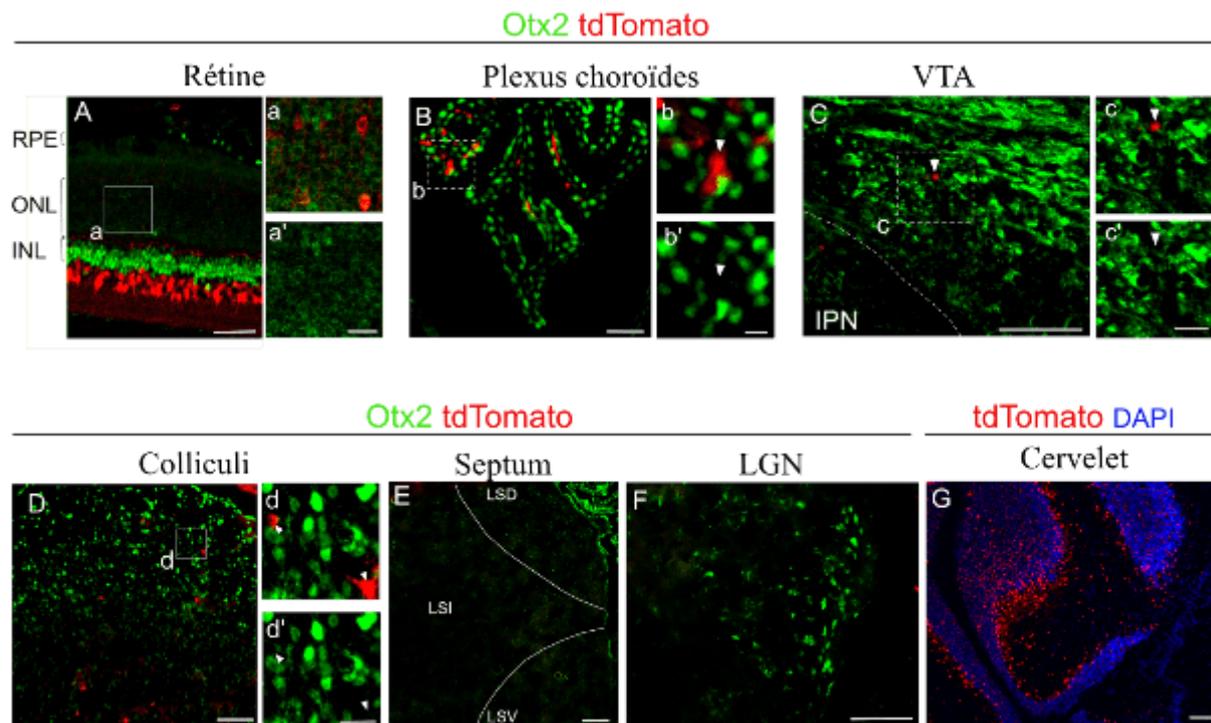


Figure 36. Régions exprimant Otx2 et la tdTomato

A-F, Immunomarquage Otx2 (en vert) et tdTomato (en rouge) de sections de rétine (**A**), et de sections coronales de plexus choroïdes (**B**), VTA (**C**), colliculi (**D**), septum (**E**) et LGN (**F**) de souris *Ngn1^{CreERT2};AiA4/Ai14*. **a-a'**, Agrandissement de la zone de la rétine encadrée en **A**. **b-b'**, Agrandissement de la zone du plexus choroïdes encadrée en **B**. **c-c'**, Agrandissement de la région de la VTA encadrée en **C**. **d-d'**, Agrandissement de la région des colliculi encadrée en **D**. **G**, Immunomarquage tdTomato (rouge) et coloration au DAPI (en bleu), de sections coronales de cervelet de souris *Ngn1^{CreERT2};AiA4/Ai14*.

RPE : épithélium rétinien pigmenté. ONL : Couche nucléaire externe contenant les photorécepteurs. INL : Couche nucléaire interne contenant les cellules bipolaires. LSD : Septum latéro-dorsal. LSI : Septum latéro-intermédiaire. LSV : Septum latéro-ventral. LGN : Corps genouillé latéral. Barre d'échelle : A-G = 100 μ m. a', b', c', d' = 25 μ m

III.3.2. La délétion d'*Otx2* seule ne modifie pas les niveaux basaux d'anxiété et de dépression

Avant d'étudier les effets de la délétion d'*Otx2* sur la réponse au stress adolescent, nous avons d'abord vérifié que le transgène *Ngn1^{CreERT2}* et la délétion d'*Otx2* seuls n'ont pas d'effet sur les niveaux d'anxiété et de dépression. Pour cela, nous avons comparé le comportement de souris adultes contrôles *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* et *Otx2^{flox/flox};Ai14/Ai14* avec celui de souris *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2};Ai14;Ai14* en absence de stress. Nous constatons que ni le transgène et ni la délétion d'*Otx2* ne perturbent significativement les capacités motrices. En effet, la vitesse moyenne au centre du champ ouvert n'est pas significativement différente entre les trois conditions (**Figure 41 B**). Il en est de même pour les niveaux d'anxiété. La distance parcourue au centre (**Figure 41 A**), le nombre total d'entrées au centre du champ ouvert (**Figure 41 C**) et le temps passé dans les bras ouverts dans le labyrinthe de la croix surélevée (**Figure 41 D**) ne diffèrent pas significativement. Il en est de même des paramètres mesurant la dépression : ni le transgène *Ngn1^{CreERT2}* ni la délétion d'*Otx2* n'affectent le temps d'immobilité dans le test de la nage forcée (**Figure 41 E**).

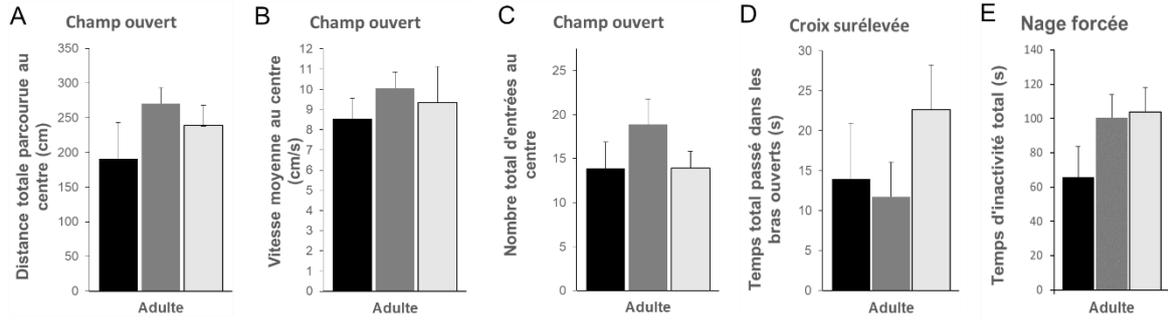
Le transgène *Ngn1^{CreERT2}* et la délétion d'*Otx2* n'affectent donc pas significativement les capacités motrices, les niveaux basaux d'anxiété et de dépression chez les souris dans des conditions standards d'élevage.

III.3.3. Une délétion permanente post-natale d'*Otx2* dans la MHb protège de l'apparition de symptômes psychiatriques

Pour pouvoir mettre en évidence les effets de la délétion d'*Otx2* sur le comportement en condition de stress, nous avons comparé les effets comportementaux du stress « à deux coups » entre les souris contrôles *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* et *Otx2^{flox/flox};Ai14/Ai14* et les souris *Otx2* cKO. Contrairement aux souris contrôles, qui, comme attendu, deviennent anxieuses après avoir subi les deux stress, les souris cKO semblent résistantes aux effets du stress (**Figure 41 F**). L'effet de la délétion d'*Otx2* sur l'anxiété observé n'est pas dû à un effet du transgène *Ngn1^{CreERT2}* puisque l'effet combiné des deux stress est le même sur les souris *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* et *Otx2^{flox/flox};Ai14/Ai14*. Cette résistance ne semble pas être due à un changement de niveau basal d'anxiété après le stress précoce car le stress juvénile seul ne modifie pas les niveaux d'anxiété d'après les résultats obtenus après le test du champ ouvert

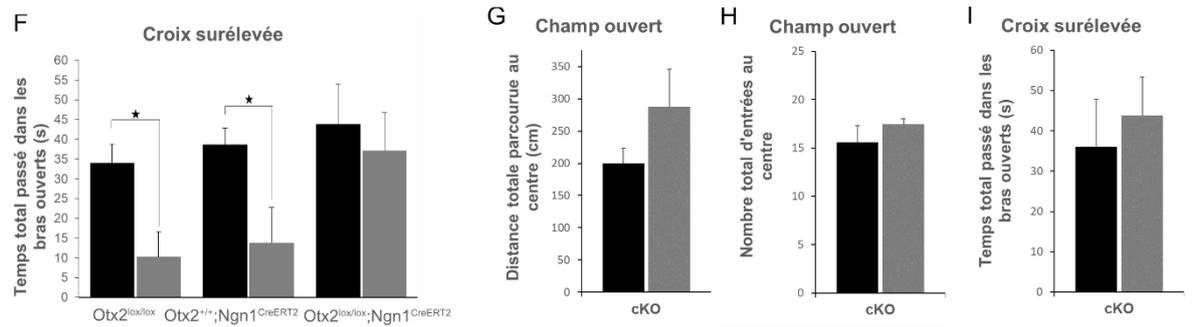
Sans stress

■ *Otx2*^{+/+}; *Ngn1*^{CreERT2}; *Ai14*/*Ai14* ■ *Otx2*^{flox/flox}; *Ngn1*^{CreERT2}; *Ai14*/*Ai14* □ *Otx2*^{flox/flox} *Ai14*/*Ai14*



Avec stress

■ Stress juvénile ■ Stress juvénile + adulte ■ Sans stress ■ Stress juvénile



■ Stress adulte ■ Stress juvénile + adulte

□ Curieux □ Indifférent ■ Anxieux

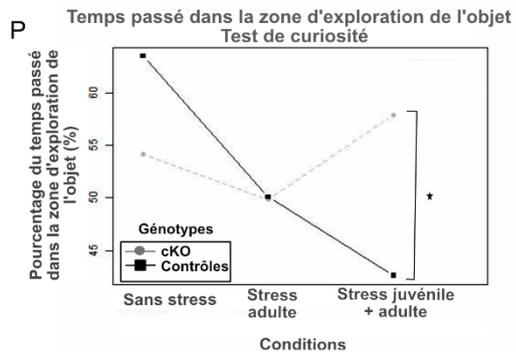
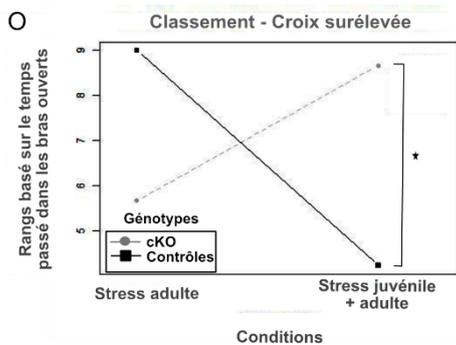
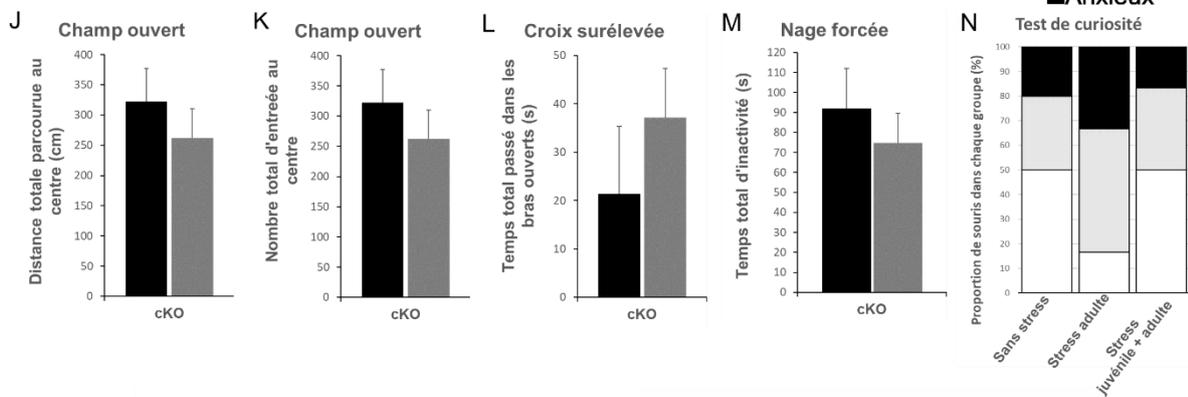


Figure 37. Effets de la délétion d'Otx2 seule et effets de son interaction avec le stress chronique

A-E, Analyse comparée des niveaux d'anxiété (**A-D**) et de dépression (**E**) de souris contrôles *Otx2^{lox/lox};Ai14/Ai14* (n=10) et *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* (n=7) et de souris cKO (n=8-10) adultes non stressées, comprenant une mesure de la distance totale parcourue au centre du champ ouvert (**A**), de la vitesse moyenne au centre du champ ouvert (**B**), du nombre total d'entrées au centre du champ ouvert (**C**), du temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**D**), et du temps total d'inactivité dans le test de la nage forcée (**E**). **F**, Analyse comparée des niveaux d'anxiété de souris contrôles *Otx2^{lox/lox};Ai14/Ai14* (n=10-12) et *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* (n=6) et de souris cKO (n=12) après stress juvénile et stress adulte. **G-I** : Analyses comportementales d'animaux non stressés (n=5-6) et d'animaux ayant subi le stress préadolescent (n=12) à partir de P51 comprenant une mesure de la distance totale parcourue au centre du champ ouvert (**G**), du nombre total d'entrées au centre du champ ouvert (**H**), du temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**I**). **J-N**, Analyses comportementales des mêmes animaux à partir de P100 après stress chronique adulte comprenant une mesure de la distance totale parcourue au centre du champ ouvert (**J**), du nombre total d'entrées au centre du champ ouvert (**K**), du temps total passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**L**), du temps total d'inactivité dans le test de la nage forcée (**M**), et du pourcentage de souris dans les sous-groupes curieux, indifférents et anxieux dans le test de curiosité (**N**). **O**, Graphe d'interaction représentant l'effet de la délétion d'Otx2 et l'effet du stress chronique juvénile associé au stress adulte sur le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé (F(3,30)=0,1098, Effet de l'interaction p=0,0249). **P**, Graphe d'interaction représentant l'effet de la délétion d'Otx2 et l'effet du stress chronique juvénile associé au stress adulte ou du stress adulte seul sur le temps passé dans la zone d'exploration de la zone de curiosité (F(1,38)=6,7127, Effet de l'interaction p=0,01350). Les barres d'erreur représentent la SEM. *P < 0.05, ANOVA unidirectionnelle pour les figures **A-E**, test-t bilatéral pour les figures **F-M**, ANOVA bidirectionnelle pour les figures **O** et **P**.

(**Figure 41 G et H**) et du test du labyrinthe en croix surélevé (**Figure 41 I**). Comparées aux souris cKO contrôles adultes, les souris cKO CS x2 ne sont ni anxieuses (**Figure 41 J-M**), ni dépressives (**Figure 41 M**). De manière intéressante, le test de curiosité révèle que les souris cKO contrôles adultes se comportent de la même manière que les souris qui n'ont pas eu de délétion d'Otx2, par rapport à leurs contrôles non stressés respectifs : après le stress adulte, la proportion de souris anxieuses augmente légèrement (**Figure 38 M et Figure 41 N**). Toutefois, en l'absence d'Otx2 dans les neurones Otx2^{High} de la dMHB, lorsque les souris subissent à la fois le stress juvénile et adulte, le phénotype anxieux ne s'aggrave pas, bien au contraire la proportion de souris anxieuses est la même que celle observée chez les souris contrôles qui n'ont subi aucun stress (**Figure 41 N**).

Nous voulions ensuite confirmer que la résilience observée chez ces souris qui ont pourtant subi les deux stress, est bien due à la délétion d'Otx2. Nous avons donc étudié l'interaction paramétrique entre la délétion génétique et les conditions stressantes. Chez les souris contrôles qui maintiennent un niveau d'expression normal d'Otx2, la combinaison des deux stress a normalement un effet anxiogène dans le test de la croix surélevé (**Figure 41 O**). Au contraire, la délétion d'Otx2 dans les neurones Otx2^{High} de la dMHB a un effet positif sur les niveaux d'anxiété en réduisant ceux-ci. Cette interaction est également retrouvée dans le

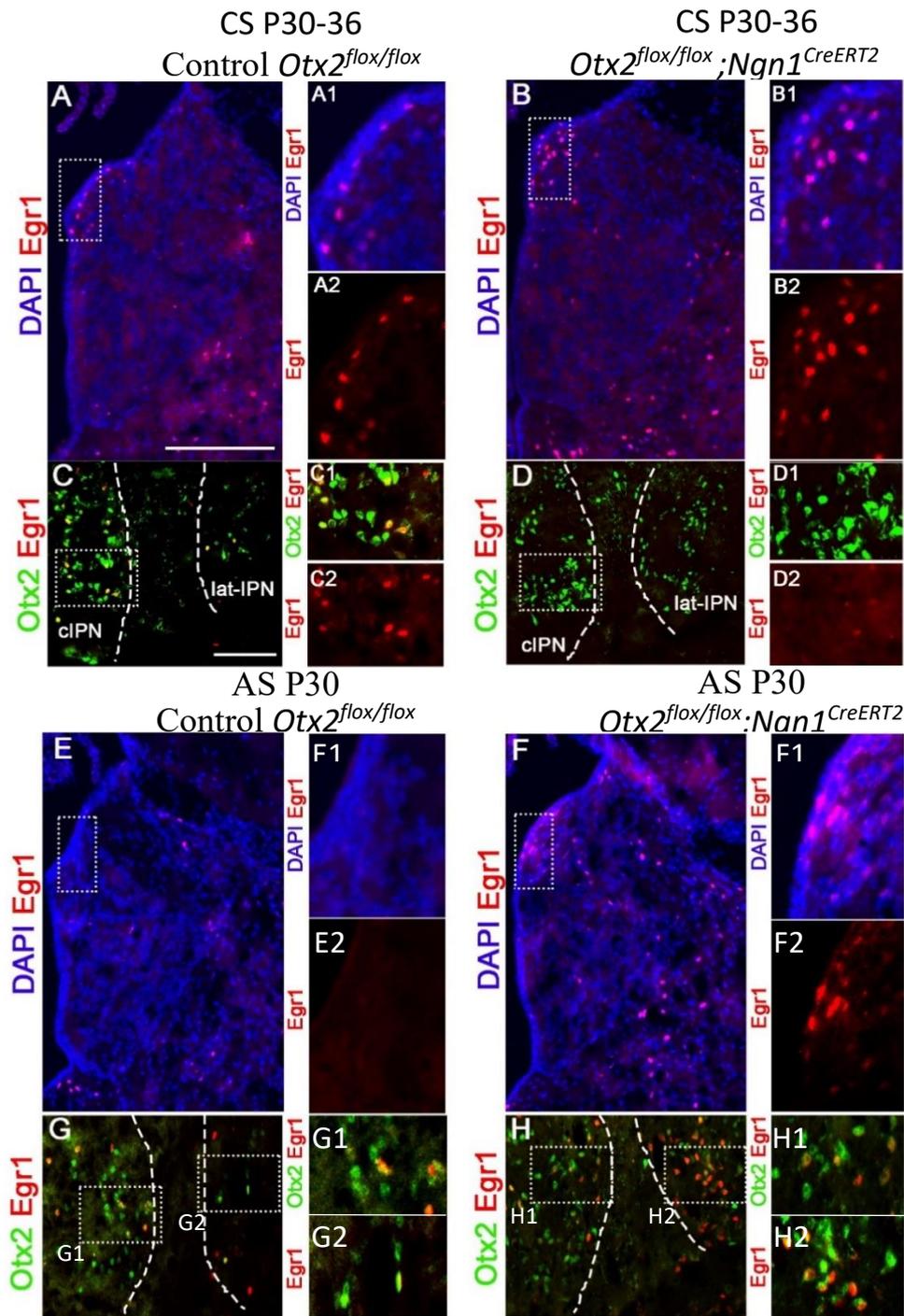


Figure 38. Effets de la délétion d'Otx2 dans la dMHb sur la réponse au stress préadolescent.

A-B et E-F, Immunomarquage Egr1 (en rouge) et coloration au DAPI (en bleu) de sections coronales au niveau de la MHb de souris contrôles qui ont subi un stress chronique entre P30-36 (n=3) (**A**), un stress aigu à P30 (n=3) (**E**) et de souris cKO qui ont subi un stress chronique entre P30-36 (n=2) (**B**) et un stress aigu à P30 (n=3) (**F**). **A1-A2**, Agrandissement de la zone encadrée en **A**. **B1-B2**, Agrandissement de la zone encadrée en **B**. **E1-E2**, Agrandissement de la zone encadrée en **E**. **F1-F2**, Agrandissement de la zone encadrée en **F**. **C-D et G-H**, Immunomarquage Egr1 (en rouge) et Otx2 (en vert) sur des sections coronales au niveau de l'IPN chez les contrôles qui ont subi un stress chronique entre P30-36 (n=3) (**C**), un stress aigu à P30 (n=3) (**G**) et chez les cKO qui ont subi un stress chronique entre P30-36 (n=2) (**D**) et un stress aigu à P30 (n=3) (**H**). **C1-C2**, Agrandissement de la zone encadrée en **C**. **D1-D2**, Agrandissement de la zone encadrée en **D**. **G1 et G2**, Agrandissement de la zone encadrée en **G** représentant le cIPN et le Lat-IPN respectivement. **H1 et H2**, Agrandissement de la zone encadrée en **H** représentant le cIPN et le Lat-IPN respectivement.

test de curiosité : si la proportion de souris curieuses est légèrement plus faible chez les souris cKO comparée aux contrôles en absence de stress, les deux stress augmentent la proportion de souris anxieuses chez les contrôles tandis qu'elle ne varie pas chez les cKO (**Figure 41 P**). Cette interaction dans le test de curiosité n'est retrouvée qu'en comparant les comportements des souris non stressées et des souris CS x2 avec ou sans la délétion d'*Otx2* mais pas chez les souris contrôles adultes. Ces résultats soulignent l'effet d'interaction entre le niveau d'*Otx2* et le stress uniquement quand celui-ci est subi durant la préadolescence.

La délétion d'*Otx2* dans la dMHb protège donc des effets de prédisposition du stress juvénile sur les niveaux d'anxiété et sur la curiosité à long-terme. Ces résultats mettent également en évidence la spécificité des effets protecteurs de la délétion d'*Otx2* sur le stress juvénile puisque la proportion de souris anxieuses augmente lorsque le stress n'est subi qu'à l'âge adulte chez ces cKO dans le test de curiosité. Cet effet protecteur serait donc la conséquence de l'altération de l'interaction entre *Otx2* et un stress chronique durant la période préadolescente.

III.3.4. La délétion d'*Otx2* dans les neurones *Otx2*^{High} de la dMHb conduit à une réponse bimodale de l'IPN en réponse à un stress chronique préadolescent

Pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la résilience des souris *Otx2*^{flox/flox};*Ngn1*^{CreERT2};*Ai14/Ai14*, nous avons analysé l'activité du HIPOPS en réponse au stress préadolescent chez ces animaux. Bien que la dMHb y apparaisse même plus active que chez le contrôle à la fin du stress chronique préadolescent, l'IPN ne s'active pas chez les souris cKO (**Figure 42 A-D**). Pour vérifier que la délétion d'*Otx2* dans les neurones *Otx2*^{High} de la dMHb n'entraîne pas une perte de la capacité de l'IPN à s'activer, nous avons analysé l'activité du HIPOPS en réponse à un stress aigu. Nous constatons que chez les souris cKO, les neurones *Otx2*⁺ de l'IPN s'activent bien en réponse à un stress aigu et présentent une activation augmentée corrélée à une activation de la dMHb dès P30 (**Figure 42 E-G**). Cela est d'autant plus intéressant que normalement, un stress aigu n'est pas capable d'induire l'activation de la MHb, même à la période préadolescente qui constitue la période de plus forte sensibilité au stress (**Figure 42 E et F**).

Nous avons ensuite testé si cette réponse biphasique au stress précoce due à la délétion d'*Otx2* dans la dMHb impacte la réponse du HIPS au stress à long-terme. Pour cela, nous avons

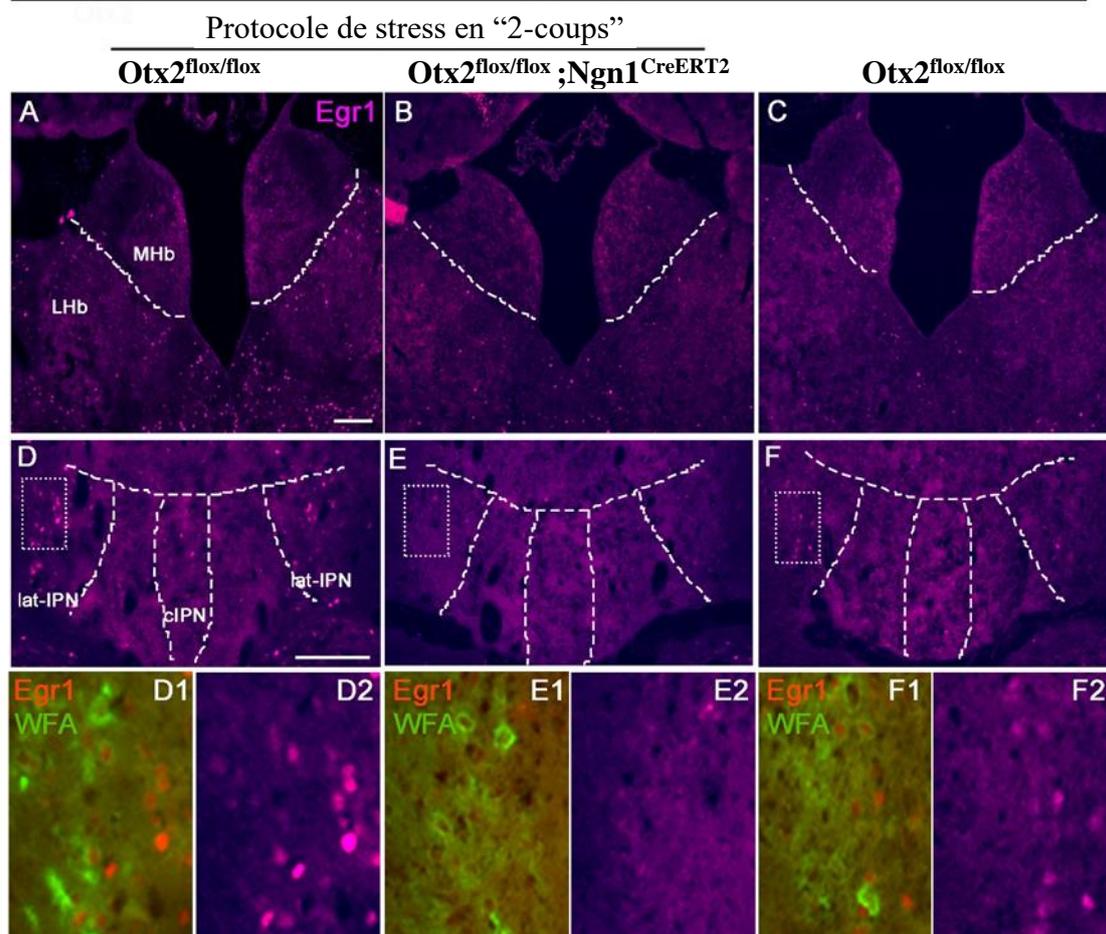


Figure 39 Effets de la délétion d'Otx2 dans la dMHb sur l'activité neuronale du HIPOPS à long-terme en réponse à un dernier stress aigu.

A et D, Immunomarquage Egr1 (en magenta) de sections coronales de souris contrôles (n=4) après le protocole de stress en « 2 coups » et le dernier stress aigu, au niveau de la MHb (**A**) et de l'IPN (**D**), et de souris cKO (n=3) dans la MHb (**B**) et l'IPN (**E**). **C et F**, Immunomarquage Egr1 (magenta) de sections coronales de souris contrôles qui n'ont subi que le stress aigu avant le sacrifice (n=2) au niveau de la MHb (**C**) et de l'IPN (**F**). **D1-F2**, Agrandissement sur les régions encadrées en (**D**), (**E**), (**F**) marquées avec la WFA (en vert), Egr1 (rouge) chez les souris contrôles (**D1 et D2**) et les souris cKO ayant subi le stress en « 2 coups » et le dernier stress aigu (**E1 et E2**) et les souris contrôles n'ayant subi que le dernier stress aigu avant sacrifice (**F1 et F2**).

comparé l'activité neuronale des souris contrôles et cKO qui ont subi ou pas le protocole de stress à « 2 coups ». Après avoir effectué la batterie de tests comportementaux, nous avons révélé les effets des deux stress en appliquant un stress aigu juste avant le sacrifice. Chez les souris contrôles qui ont subi les deux stress, nous constatons que l'activité du HIPOPS est plus élevée en réponse au dernier stress aigu (**Figure 43 A et D**). Chez les souris cKO, dans les mêmes conditions, l'activité de ce sous-circuit est relativement faible après le dernier stress aigu (**Figure 43 B et E**) et ressemble à l'activité observée chez des animaux qui n'ont subi que le stress aigu avant sacrifice (**Figure 43 C, F**). Nous constatons que seuls les neurones PNN⁺ sont activés chez ces souris qui n'ont subi que le dernier stress aigu (**Figure 43 F1, F2**). De manière intéressante, chez les souris qui ont subi les deux stress mais pas la délétion d'*Otx2*, les neurones PNN⁺ ne sont pas les seuls neurones *Otx2*⁺ à être *Egr1*⁺ en réponse au dernier stress aigu subi avant le sacrifice (**Figure 43 D1, D2**). En effet, dans les sous-noyaux latéraux ainsi que dans le sous-noyau central de l'IPN caudal, beaucoup de neurones sont à la fois PNN⁺ *Egr1*⁺. Au-delà de l'effet de ce protocole de stress sur l'activité du HIPOPS, cette hypersensibilité au stress se reflète également dans d'autres régions du cerveau répondant au stress telles que la LHb (**Figure 43 A**). En fort contraste avec cette hypersensibilité, chez les animaux cKO ayant subi le protocole de stress, le HIPOPS ainsi que les autres régions sont faiblement activés. Ils sont beaucoup plus comparables à ceux observés chez des animaux qui n'ont pas subi le protocole de stress (**Figure 43 B**).

La délétion d'*Otx2* modifie donc la réponse normale du HIPOPS en une réponse biphasique qui se décompose en une phase d'hyper-activation de ce sous-circuit dès le début du stress, suivie par une phase d'inhibition de l'IPN lorsque le stress devient chronique. A long-terme, cette délétion d'*Otx2* empêche le HIPOPS, et sans doute d'autres régions impliquées dans la réponse au stress, de devenir hyper-sensible à ce stress. L'hyper-activation du HIPOPS dès le premier jour de stress et l'inhibition de l'IPN lorsque le stress devient chronique est corrélée à une protection des souris cKO contre le développement de symptômes anxieux.

Ces résultats suggèrent que les facteurs génétiques, tels que le gène *Otx2*, interagissent avec l'environnement pour réguler l'activité du sous-circuit HIPOPS durant l'adolescence. Bloquer cette interaction rend les souris résilientes aux effets inducteurs d'anxiété à long-terme d'un stress chronique préadolescent. Les effets particulièrement forts du stress chronique préadolescent sur l'activité du HIPOPS, l'apparition des PNNs, marqueurs de maturité des cellules PV⁺, durant cette période, et les effets comportementaux suggèrent que la

préadolescence constitue la période critique du développement du HIPOPS. Ces résultats suggèrent également que ce sous-circuit HIPOPS est directement impliqué dans le développement d'une anxiété à long-terme et que les expériences vécues durant sa période critique de développement établissent la manière dont ce sous-circuit répondra aux futures expériences stressantes.

Discussion

Ce travail de thèse met tout d'abord en évidence l'existence d'un sous-circuit dépendant d'Otx2 dans le HIPS. Ce sous-circuit est constitué des neurones Otx2^{High} de la MHb, derniers neurones nés dans cette région et des neurones Otx2+ localisés dans les sous-noyaux latéraux et le sous-noyau central de l'IPN caudal.

Jusqu'ici, aucune étude ne s'est intéressée à l'identification d'une période critique de développement du HIPS. Dans cette étude, nous avons identifié une période de développement pendant laquelle le HIPS est plus sensible au stress. En effet, un stress chronique préadolescent entre P30 et P36 induit un pic d'activation du HIPS, que l'on ne retrouve à aucune autre période. De manière intéressante, ce stress chronique fait intervenir plus particulièrement le HIPOPS, ce qui suggère une implication spécifique d'Otx2 dans la réponse du HIPS au stress.

Le développement de maladies psychiatriques fait suite à une susceptibilité créée par des facteurs environnementaux et génétiques pendant les périodes critiques du développement. Ces maladies se déclenchent souvent à la suite d'une accumulation d'expériences délétères, plus tard dans la vie. Dans ce contexte, nous voulions créer un modèle de stress qui suive ce processus. Les résultats comportementaux ont permis de confirmer que le stress juvénile employé n'a pas entraîné le développement de symptômes psychiatriques directs. Le deuxième stress, subi à l'âge adulte, a révélé l'apparition d'un groupe de souris anxieuses. Ces résultats confirment que le stress préadolescent crée un terrain propice au développement de l'anxiété, enclenché par un stress postérieur adulte. L'utilisation d'un groupe de souris contrôle qui n'a subi que le stress adulte nous a permis de confirmer que l'effet anxieux révélé est au moins dû à un effet combinatoire du stress préadolescent et du stress adulte. Si ce protocole de stress a pu induire des symptômes anxieux, il n'a toutefois pas réussi à induire de symptômes dépressifs. La comparaison de l'activité neuronale aux différentes périodes développementales et les résultats comportementaux permettent de conclure qu'un stress chronique préadolescent active le HIPOPS qui module la susceptibilité à l'anxiété. L'absence d'effet de ce stress chronique sur les niveaux de dépression ne nous permet toutefois pas de conclure quant au rôle du HIPOPS dans la modulation de la susceptibilité à la dépression. Le pic d'activité du HIPOPS spécifiquement durant la préadolescence ainsi que la capacité de ce stress à induire une susceptibilité à l'anxiété chronique à long-terme soutiennent l'hypothèse selon laquelle cette période est une période critique de maturation du HIPOPS. L'apparition des PNNs, un marqueur de maturation neuronale, durant cette période préadolescente dans une sous-population de neurones Otx2+ de l'IPN soutient d'autant plus cette hypothèse.

Nous avons également montré l'implication d'*Otx2* dans ces fonctions du HIPOPS. La délétion seule d'*Otx2* dans les neurones *Otx2*^{High} de la dMHb ne semble pas conduire à des défauts cellulaires majeures au niveau des neurones *Otx2*^{High} de la MHb recombines ni au niveau de leurs projections. En dehors de la MHb, seuls les photorécepteurs et le cervelet co-expriment *Otx2* et le transgène *Ngn1Cre*^{ERT2}. Toutefois, la délétion d'*Otx2* dans le cervelet et les photorécepteurs n'affectent pas les capacités locomotrices et le niveau basal d'anxiété, respectivement, chez les souris cKO (Simeone, et al., 2011 ; Pensieri et al., article en cours de soumission). De manière intéressante, la délétion d'*Otx2*, grâce à ce transgène, dans la dMHb, rend les souris résilientes à l'anxiété normalement provoquée par le stress adolescent combiné au stress adulte. De plus, le test de curiosité suggère que la délétion d'*Otx2* n'est protectrice que lorsque le stress est vécu durant la préadolescence. En effet, les animaux contrôles et cKO qui n'ont subi que le stress adulte réagissent de la même manière à celui-ci. Nous n'avons cependant pas pu déceler d'effets sur la dépression en utilisant le test classique de la nage forcée. L'absence de phénotype dépressif dans les souris contrôles masque malheureusement des effets potentiels de cette délétion d'*Otx2* sur les niveaux de dépression. Ces résultats mettent en évidence la présence d'une interaction entre les niveaux d'*Otx2* et le stress chronique qui régule au moins les niveaux d'anxiété.

Chez les animaux cKO, cette protection contre les effets à long-terme du stress se traduit par une réponse bimodale du HIPOPS en réponse au stress chronique préadolescent. En effet, la dMHb semble hyperactivée dès le premier jour du stress chronique préadolescent, corrélée à une plus forte activation de l'IPN, suivie toutefois par une phase d'inhibition de l'IPN à la fin de ce stress chronique. Cette inhibition de l'IPN le dernier jour du stress chronique préadolescent semble jouer un rôle dans la résilience à l'anxiété chez les cKO, puisque les neurones *Otx2*⁺ de l'IPN sont fortement activés chez les contrôles. Il semblerait donc que le niveau d'expression d'*Otx2* et un stress environnemental, durant la période préadolescente, modulent l'activité du HIPOPS. Ces deux facteurs interagissent particulièrement durant la préadolescence et fixeraient, à long-terme, le seuil de sensibilité du HIPOPS aux futurs stress, rendant les individus résilients ou susceptibles à l'anxiété. Les différents points soulevés par ces résultats et qui sont à éclaircir sont détaillés ci-dessous.

1. *Otx2* marque un sous-circuit spécifique du HIPS appelé le HIPOPS

Le rôle crucial que joue *Otx2* dans le développement du HIPS et la maintenance de son expression dans un sous-circuit de ce système posent la question d'un éventuel rôle d'*Otx2* dans l'établissement de la connexion entre les neurones *Otx2*^{High} de la MHb et les neurones *Otx2*⁺ de l'IPN caudal. Les neurones de la MHb projettent sur l'IPN par le biais de molécules de guidage. La sémaphorine 3F (Sema3F), exprimée par le prosomère 1, empêche leurs axones de traverser ce domaine via son effet répulsif médié par le récepteur DCC, tandis que la nétrine, sécrétée par la plaque du plancher permet de les diriger vers l'IPN (Aizawa et al., 2011). Il a notamment été montré qu'*Otx2* peut réguler l'expression de DCC dans les neurones *Otx2* de l'IPN (Ruiz-Reig et al., 2019; García-Guillén et al., 2020). La délétion d'*Otx2* pourrait donc affecter l'expression de DCC et le guidage des axones des neurones *Otx2*^{High} vers l'IPN. Toutefois, la délétion d'*Otx2* dans les neurones de la MHb à E11.5 ne supprime pas l'expression de DCC dans ces neurones (D'Autréaux et al., unpublished results). L'expression de la ténascine-C, une molécule de la matrice extracellulaire qui favorise la croissance des axones et qui est exprimée au niveau de la limite entre les prosomères p1 et p2 peut également être régulée par *Otx2* et pourrait aussi affecter le guidage de ces axones (Nguyen Ba-Charvet et al., 1998). Pour tester l'effet de la délétion d'*Otx2* dans la MHb sur le guidage des axones, il faudrait induire la délétion d'*Otx2* juste après la naissance de ces neurones, car la délétion d'*Otx2* dans leurs progéniteurs empêche leur production, mais avant que ces neurones ne commencent à projeter vers l'IPN. Dans cette étude, la délétion d'*Otx2* dans la MHb à P0 dans la lignée transgénique *Ngn1*^{CreERT2}, mais aussi au stade embryonnaire E16.5 (D'Autréaux et al., résultats non publiés), stades auxquels les neurones *Otx2*^{High} sont générés, n'altère pas les projections des neurones *Otx2*^{High} de la MHb vers les neurones *Otx2*⁺ de l'IPN. Il semble donc que l'expression d'*Otx2* au niveau de la MHb ne soit pas nécessaire à l'établissement de ses projections vers l'IPN. Les observations faites dans cette étude invalident aussi l'hypothèse selon laquelle l'expression d'*Otx2* dans la MHb pourrait être requise pour la formation des synapses ou pour leur maintien. En effet, nos résultats confirment que même lorsque la délétion d'*Otx2* est induite dans la lignée transgénique *Ngn1*^{CreERT2} à P0, une augmentation de l'activité de la MHb corrèle avec celle de l'IPN, d'après l'expression de *Egr1* dans le HIPOPS, en réponse au stress aigu à P30. Ces résultats suggèrent que les neurones *Otx2*^{High} de la MHb, même en l'absence de l'expression d'*Otx2*, sont capables de réguler l'activité de l'IPN en conditions

normales et confirme le maintien de la connectivité entre les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb et les neurones $Otx2+$ de l'IPN.

La formation de ces synapses pourrait toutefois être dépendante de l'expression d' $Otx2$ au niveau postsynaptique. L'expression d' $Otx2$ dans l'IPN pourrait favoriser une reconnaissance ciblée de ses neurones par les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb et consolider les synapses ainsi formées en régulant l'expression de molécules d'adhésion. En effet, $Otx2$ peut réguler l'expression des glycoprotéines NCAM et R-cadherin. Leur expression dans l'IPN pourrait donc favoriser la formation des synapses entre les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb et les neurones $Otx2+$ de l'IPN et ainsi contribuer à former le HIPOPS (Nguyen Ba-Charvet et al., 1998; Rhinn et al., 1999). Il n'existe pas encore de lignée transgénique qui permette d'induire une délétion d' $Otx2$ spécifiquement dans les neurones de l'IPN aussi bien au stade embryonnaire que chez l'adulte, toutefois puisque la délétion d' $Otx2$ dans la MHb ne semble pas affecter la formation des synapses entre les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb et les neurones $Otx2+$ de l'IPN, ni leur maintien, la délétion d' $Otx2$ dans l'IPN dans la lignée $Otx2^{lox/CreERT2}$ vers E16.5 permettrait de tester cela. Nous avons notamment déjà commencé à analyser les effets d'une telle délétion sur l'état des projections des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb sur l'IPN aux stades postnataux. Les résultats suggèrent que les neurones de l'IPN migrent à leur position attendue et que les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb sont générés. Cependant, les projections de ces derniers sur les neurones $Otx2+$ des sous-noyaux latéraux de l'IPN caudal semblent manquer, suggérant que les synapses n'ont pas pu s'établir (D'Autréaux et al. ; résultats non publiés). Pour confirmer que la délétion d' $Otx2$ dans l'IPN affecte l'établissement des synapses entre la MHb et l'IPN, nous pourrions vérifier la capacité de la MHb à activer l'IPN dans ces conditions. Pour ce faire, nous pourrions induire la délétion d' $Otx2$ dans l'IPN dans la lignée $Otx2^{lox/CreERT2}$, à partir de E16.5, et exprimer le DREADD activateur dans les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb chez l'adulte. L'immunomarquage du DREADD permettrait de localiser l'endroit où projettent les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb (normalement dans les sous-noyaux latéraux de l'IPN caudal). Cela permettrait également de vérifier si dans ces conditions, la chémo-activation des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb est toujours capable d'induire l'activation des neurones $Otx2+$ latéraux de l'IPN. L'étude des effets d'une délétion post-natale d' $Otx2$ dans l'IPN, par stéréotaxie, et une observation de l'effet de cette délétion sur les projections des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb sur les neurones $Otx2+$ de l'IPN permettrait de vérifier si l'expression de ce facteur de transcription dans l'IPN est également requise pour le maintien des synapses dans le HIPOPS. Si la délétion post-natale d' $Otx2$ dans l'IPN n'affecte pas les projections des

neurones $Otx2^{High}$ de la MHb sur ces neurones mais qu'elles sont affectées par la délétion embryonnaire d'*Otx2*, cela confirmera son rôle dans l'établissement mais pas dans le maintien de ces projections.

Dans cette étude nous avons mis en évidence l'existence du sous-circuit HIPOPS dans le HIPS. Ce facteur de transcription est nécessaire au développement du HIPS, toutefois son rôle dans la formation et le maintien des synapses dans le HIPOPS n'est pas encore compris. La délétion d'*Otx2* dans l'IPN pourrait affecter ces deux processus et nécessite des expériences supplémentaires pour le prouver. La présence de ce sous-circuit au sein du HIPS suggère qu'il exerce des fonctions dans ce système, qui dépendent de l'expression d'*Otx2*.

2. Le HIPOPS pourrait être impliqué dans différentes fonctions du HIPS

Le fait que les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb sécrètent différents types de neurotransmetteurs et projettent dans différents sous-noyaux $Otx2+$ de l'IPN caudal suggère que ces neurones pourraient être impliqués dans différentes fonctions du HIPOPS. Une étude a notamment mis en évidence que les deux sous-domaines de la MHb qui affectent la peur et l'anxiété, ne reçoivent pas les mêmes afférences : la dMHb du HIPS reçoit principalement ses afférences du noyau du lit de la commissure antérieure tandis que la vMHb reçoit principalement ses afférences du septum triangulaire (TS) (Yamaguchi et al., 2013).

Dans nos expériences, si nous avons pu constater une activation des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb en réponse au stress chronique adolescent, nous n'avons pas observé d'activation de la vMHb aussi bien en condition de stress chronique que de stress aigu aux différents stades étudiés. Étonnamment, les neurones $Otx2^{High}$ de la vMHb n'expriment que très peu *Egr1* et pourtant les neurones $Otx2+$ du sous-noyau central de l'IPN sont activés après les sept jours de stress chroniques préadolescent. Il se pourrait donc que si les neurones $Otx2^{High}$ de la dMHb sont principalement recrutés en réponse à un stress, la vMHb pourrait être impliquée dans d'autres fonctions, à savoir la réponse à la peur, la mémoire associée à la peur, dans la dépendance à des substances addictives, ou encore dans la réponse à un autre type de stress (un stress imprédictible ou un stress beaucoup plus intense) ou un stimulus douloureux. Il serait donc intéressant de dissocier le rôle de ces deux groupes de neurones, même si les neurones $Otx2^{High}$ sont majoritairement localisés dans la dMHb. Pour essayer de comprendre le rôle des neurones de la vMHb, nous pourrions commencer par analyser l'expression d'*Egr1* ou de *Fos*

après un stress chronique imprédictible préadolescent, après une stimulation avec une odeur de prédateur (comme l'urine de renard) ou encore un stress chronique de type footshock pendant la préadolescence. Nous pourrions également analyser le comportement de souris, en réponse à une activation spécifique des neurones $Otx2^{High}$ de la vMHb, au travers différents types de tests comportementaux : tests d'anxiété, de dépression, de peur, de mémoire, de nouveauté ou encore tests locomoteurs. Pour activer spécifiquement ces neurones nous pourrions injecter un DREADD activateur inductible dans la vMHb de souris $ChAT^{CreERT2}$, au plus près du ventricule pour essayer de ne viser que les neurones $Otx2^{High}$ de cette région, activer ce DREADD par une injection de tamoxifène et analyser les performances de ces animaux dans les tests comportementaux.

Nos expériences d'activation chémo-génétique mettent également en évidence l'existence de circuits locaux : alors que le DREADD est uniquement exprimé dans la zone de la MHb où résident les neurones $Otx2^{High}$, son activation entraîne également l'activation de nombreux neurones dans la partie latérale de la MHb (dans la région $ChAT+$ $vglut2+$) et l'activation de quelques neurones de la LHb. Ceci confirme l'existence d'une communication interne dans la MHb et potentiellement des afférences minimales de la MHb vers la LHb (Kim and Chang, 2005). Il se pourrait que l'activation de la LHb par le DREADD soit un effet indirect passant par l'activation d'une région intermédiaire, l'IPN par exemple, serait également une afférence de la LHb (Groenewegen et al., 1986; Lima et al., 2017). Toutefois l'IPN est GABAergique et son activation ne devrait donc pas activer la LHb, ou il faudrait imaginer que l'IPN inhibe un noyau intermédiaire, lui-même inhibiteur de la LHb. Bien que l'IPN soit la principale cible de la MHb, les afférences de la MHb vers la LHb pourraient constituer une voie de régulation secondaire du HIPOPS. En effet, la LHb régule également les niveaux d'anxiété, de dépression mais aussi l'addiction (Lecca et al., 2014; Browne et al., 2018). La LHb, qui est glutamatergique, et l'IPN, qui est GABAergique, projettent tous deux sur des régions communes telles que le raphé médian (MnR), le raphé dorsal (DR) et la substance grise périaqueducule (PAG). Les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb pourraient donc réguler finement l'activité de ces cibles via la voie inhibitrice principale constituée par le HIPOPS et via une voie activatrice secondaire impliquant la LHb, qui elle-même peut être inhibée par l'activité de l'IPN. Un marquage antérograde de la MHb dans les souris $Otx2^{CreERT2/+}$ est toutefois nécessaire pour démontrer l'existence des projections des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb vers la LHb.

Pour mieux comprendre les fonctions du HIPOPS au sein du HIPS, il faudrait également étudier les connexions du HIPOPS pour déterminer si ce sous-circuit partage les mêmes

connexions que le reste du HIPS. Un marquage rétrograde des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb permettrait d'identifier les afférences et un marquage antérograde des neurones $Otx2+$ de l'IPN permettrait d'identifier les efférences du HIPOPS. Nous pourrions notamment transfecter la MHb ou l'IPN avec un AAV-DIO-EYFP dans nos souris $Otx2^{CreERT2/+}$ pour marquer spécifiquement les efférences et les afférences des neurones $Otx2+$ du HIPS. Nous avons notamment commencé à rechercher les cibles des neurones $Otx2+$ de l'IPN. Nous avons notamment effectué un marquage antérograde de l'IPN dans les souris $Otx2^{CreERT2/+}$ en utilisant un AAV AAV-DIO-EYFP. Nos résultats suggèrent que ces cibles sont principalement caudales à l'IPN et incluent le noyau incertus, la substance grise périaqueducule, le noyau du tegmentum latéro-dorsal et dorsal, le raphé médian ou encore le raphé dorsal, des régions du système limbique qui expriment également $Otx2$. Ces résultats suggèrent que sous-circuit agit sur des régions directement impliquées dans la régulation de l'humeur, la réaction de peur et dans la réponse aux stress. Ces résultats sont à approfondir, notamment l'identification des afférences des neurones $Otx2^{High}$ de la MHb, et une validation fonctionnelle de ses connexions par un outil comme le DREADD, comme celle faite ici pour prouver l'existence du sous-circuit HIPOPS, est indispensable. Une telle étude pourrait peut-être révéler l'existence d'un sous-circuit du système limbique, dans lequel $Otx2$ constituerait le marqueur génétique général, et qui serait spécialisé dans la réponse à un stress chronique. Il a notamment déjà été montré qu'une séparation maternelle chronique pendant l'enfance tardive provoque une diminution de l'expression d' $Otx2$ dans la VTA (Peña et al., 2017). Ainsi, un stress chronique durant des périodes critiques du développement pourrait modifier le niveau d'expression d' $Otx2$ dans les autres régions du système de récompense qui maintiennent l'expression d' $Otx2$ aux stades postnataux. La présence d'un phénotype « hypoanxieux » chez les animaux hétérozygotes pour $Otx2$ montre en tout cas l'implication de ce facteur de transcription dans la régulation de l'anxiété (Vincent et al., in press).

Le HIPOPS se caractériserait donc potentiellement par des connexions différentes de celles du HIPS et qui pourraient être en partie dépendantes de l'expression d' $Otx2$, au moins dans certaines de ses cibles. Les autres rôles potentiels du HIPOPS restent également à approfondir. Dans la suite de ce projet, nous nous sommes notamment focalisés sur la réponse du HIPS au stress, mais d'autres types de stimuli pourraient révéler d'autres fonctions du HIPOPS.

3. Egr1 et Fos sont de bons indicateurs de la réponse du HIPOPS au stress

Pour détecter la sensibilité du HIPOPS au stress, nous nous sommes servis des marqueurs d'activité neuronale Fos ou Egr1, qui nous renseignent sur l'activité neuronale en réponse au stress de manière indirecte. Les marqueurs d'activité neuronale sont régulés par une variété de stimuli environnementaux, incluant le stress, les tâches d'apprentissage activant la libération de facteurs de croissance, la sécrétion d'hormones, plusieurs voies de signalisation intracellulaires (MAPK ou AKT, etc...), les programmes de transcription relatifs à l'activité neuronale mais aussi à la plasticité synaptique (Duclot and Kabbaj, 2017; Gallo et al., 2018). Ils constituent des médiateurs critiques de l'interaction gènes-environnement. A ce titre, ils ont été un sujet d'étude intense pour comprendre comment les stimuli environnementaux déclenchent une réponse rapide suivie de neuro-adaptations durables sur l'activité neuronale et la plasticité. Egr1 représente un facteur clé pour l'intégration de la perception de l'environnement et pour sa traduction en une réponse appropriée. Il n'est donc pas étonnant que ce type de marqueurs soit associé aux maladies psychiatriques dans lesquelles la plasticité neuronale et l'activité sont altérées. Egr1 est notamment impliqué dans les troubles de l'humeur provoqués par le stress tels que l'anxiété ou la dépression. Si les marqueurs d'activité neuronale sont largement exprimés en réponse à un stress aigu, indiquant une activation des régions impliquées dans l'adaptation au stress, la majorité de ces régions cessent d'exprimer ces marqueurs lorsque le stress devient chronique, indiquant une certaine forme d'habituation (Girotti et al., 2006). Initialement adaptatif, le maintien de cette activation dans certaines régions du cerveau, peut submerger le mécanisme de rétroaction et induire une neuro-plasticité structurelle et fonctionnelle à l'origine de maladies psychiatriques. L'expression de ces marqueurs peut donc être également altérée dans des conditions de dépression, d'anxiété ou de peur (Ko et al., 2005). Si nous ne pouvons pas faire la distinction entre un changement d'activité neuronale et un processus de plasticité synaptique, les changements significatifs d'expression des marqueurs neuronaux que nous avons pu détecter indiquent que le HIPS répond au stress d'une manière ou d'une autre et nous renseignent sur un possible état pathologique du système. Les informations apportées par ces marqueurs d'activité neuronale sont donc tout aussi intéressantes qu'une mesure directe de l'activité neuronale par électrophysiologie puisqu'elles nous informent sur des changements potentiellement durables, relatifs à la réponse au stress. Une étude électrophysiologique devra toutefois être réalisée pour mesurer spécifiquement les changements d'activité immédiats du HIPS en réponse au stress. Cela étant dit, ces marqueurs

d'activité neuronale nous ont permis de détecter des effets différentiels du stress chronique sur la réponse du HIPOPS au stress.

4. La préadolescence, est une période de susceptibilité à l'anxiété mettant en jeu le HIPOPS

Pour identifier une période critique de développement du HIPS, nous avons choisi de stresser les animaux à différentes périodes développementales afin d'identifier une période spécifique pendant laquelle le HIPS réagit particulièrement plus au stress qu'à une autre période donnée. Contrairement aux autres études dans lesquelles les souris non sevrées sont stressées par séparation maternelle, nous avons choisi d'utiliser un stress chronique de type restreinte, à tous les stades, pour être sûr que les effets mesurés ne soient pas dus à l'application de différents types de stress. Ce type de stress, plutôt psychologique, permet également de s'affranchir d'éventuels effets liés à la douleur, comme ce que l'on pourrait obtenir avec un stress de type chocs électriques, puisque le HIPS est également impliqué dans la perception de la douleur (Mészáros et al., 1985). Une restreinte sur des animaux non sevrés implique toutefois que ces animaux soient séparés de leur mère durant les deux heures de restreinte. La restreinte chez des jeunes animaux a donc probablement un effet plus dommageable que chez les animaux déjà sevrés. Malgré cela, l'enfance tardive n'est pas la période au cours de laquelle nous avons observé une réaction particulièrement plus élevée du HIPS au stress. En effet, un stress chronique de sept jours, vécu durant la préadolescence, est ce qui augmente particulièrement la réponse du HIPOPS au stress. Ces neurones activés par un stress chronique juvénile sont principalement localisés dans la dMHb du HIPOPS. De manière intéressante, l'adolescence est la seule période au cours de laquelle nous avons été capables de détecter l'expression de *Egr1* et de *Fos* dans les neurones *Otx2^{High}* de la MHb, malgré une légère activité de l'IPN en réponse à ce protocole de stress. Cela montre tout d'abord que les neurones *Otx2^{High}* de la MHb sont bien recrutés particulièrement en réponse à un stress chronique adolescent. Aux autres stades étudiés, un stress chronique n'est pas capable d'induire l'expression de *Fos* et *Egr* dans la MHb, ce qui est pourtant le cas de sa cible, l'IPN.

La première hypothèse expliquant l'absence de l'expression de ces marqueurs neuronaux dans la MHb est qu'en dehors de la période adolescente, il se pourrait que l'activité de l'IPN soit modulée par ses autres afférences (**Figure 44 et figure 45**). La deuxième hypothèse est que les marqueurs d'activité neuronale employés dans cette étude ne

permettraient pas de détecter leur activité, peut-être trop faible aux autres stades. Pour tester ces deux hypothèses nous pourrions transférer un DREADD inhibiteur dans la MHb chez l'adulte. Si l'absence de marquage pour Egr1 et Fos dans la MHb reflète bien une absence d'activité de la MHb, lorsqu'on inhibe son activité en utilisant un DREADD inhibiteur, l'activité de l'IPN ne devrait pas être affectée. Si cette activité est différente, cela suggèrera que ces marqueurs neuronaux ne reflètent pas l'activité neuronale de la MHb.

La troisième hypothèse est que ce stress chronique est uniquement perçu comme étant stressant durant l'adolescence, une période qui constituerait donc bien la période de sensibilité élevée du HIPOPS au stress. Ce stress étant de moyenne intensité et appliqué pendant une durée assez courte, il se pourrait qu'aux autres périodes, il ne soit perçu comme tel par les animaux. Un dosage de la corticostérone à ces différentes périodes, pendant et à la fin de ce protocole de stress serait nécessaire pour étayer cette hypothèse.

La quatrième hypothèse est que l'adolescence constituerait la seule période de réelle plasticité synaptique entre la MHb et l'IPN. L'expression des marqueurs d'activité neuronale que nous observons serait nécessaire à cette période pour ce processus de plasticité, et constituerait alors un argument appuyant l'hypothèse selon laquelle l'adolescence est la période critique de développement du HIPS. Étonnamment, la région du HIPOPS activée correspond à la région de la MHb qui se met à sécréter l'IL-18 en réponse à une restriction aiguë de 2h et à un stress chronique de 6 heures par jour, répété pendant trois semaines, chez des rats adultes (Sugama et al., 2002). Aucun mécanisme expliquant la fonction de cette cytokine dans le HIPS n'a cependant été avancé. Cette étude suggère que l'IL-18 un senseur qui permet de percevoir les stimuli stressants dans la MHb. La période adulte correspond cependant à une période au cours de laquelle nous n'observons pas d'augmentation d'expression d'Egr1 ou de Fos. La sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire semble cependant associée à une altération de la potentialisation à long-terme via l'activation de la MAPK p38 (Curran and O'Connor, 2001). Nous pourrions supposer qu'en dehors de la période adolescente, des mécanismes se mettent en place pour limiter la plasticité synaptique entre les neurones Otx2^{High} de la MHb et les neurones Otx2⁺ de l'IPN, comme la sécrétion de ce type de cytokine, ce qui favoriserait cette quatrième hypothèse. Une injection de son antagoniste l'IL-18BP au niveau de l'IPN pourrait permettre d'induire une LTP plus importante en dehors de l'adolescence.

Nous confirmons toutefois que la MHb est capable de s'activer à tout âge. En effet, l'activation des neurones de la MHb par le DREADD induit une augmentation de l'expression de Fos dans la MHb chez l'adulte confirmant que ces neurones peuvent être stimulés chez

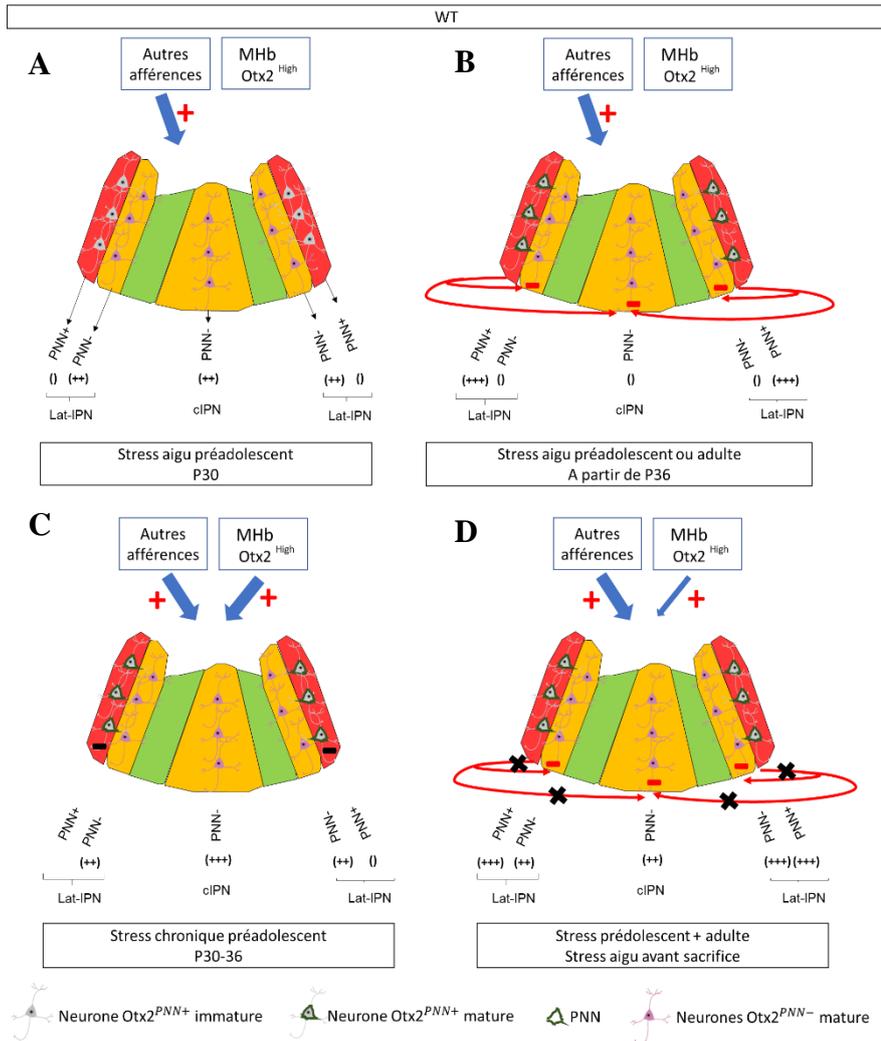


Figure 40. Modèle hypothétique de l'activité du HIPOPS en réponse à un stress aigu ou chronique entre durant la préadolescence chez les souris contrôles.

A, Activité neuronale du HIPOPS en réponse à un stress aigu à P30. L'IPN est surtout stimulé par ses autres afférences. Les neurones Otx2^{PNN+} (PNN+) ne sont pas encore matures et ne réagissent pas au stress. Les Otx2^{PNN-} (PNN-) sont activés en réponse au stress. **B**, Activité neuronale du HIPOPS en réponse à stress aigu à partir de P36. L'IPN est surtout stimulé par ses autres afférences. Les neurones Otx2^{PNN+} (PNN+) deviennent matures et s'entourent de PNNs. Ils sont activés par le stress aigu et inhibent les neurones Otx2^{PNN-} (PNN-). **C**, Activité neuronale du HIPOPS en réponse à un stress chronique entre P30-36. Les neurones Otx2^{High} de la MHb sont activés par le stress chronique et contribuent à l'activité de l'IPN. Les neurones Otx2^{PNN+} sont inhibés par le stress chronique, ce qui lève l'inhibition sur les neurones Otx2^{PNN-} (PNN-). **D**, Activité neuronale du HIPOPS en réponse à un stress aigu après le stress « en deux coups ». L'IPN est surtout stimulé par ses autres afférences mais la MHb contribue aussi légèrement. Les neurones Otx2^{PNN+} sont activés par le stress chronique mais ne sont pas capables d'inhiber les neurones Otx2^{PNN-} (PNN-). () : Pas d'activation, (++) : Activation moyenne, (+++) : Forte activation. Les (+) rouges indiquent une activation. Les flèches rouges indiquent une inhibition. Les tirets rouges indiquent une inhibition des neurones Otx2^{PNN-} (PNN-). Les tirets noirs indiquent une inhibition des neurones Otx2^{PNN+} (PNN+). Les neurones Otx2^{High} de la MHb, les autres afférences de l'IPN et les sous-noyaux de l'IPN caudal sont représentés. La partie latérale de l'IPN caudale (Lat-IPN) est divisée en une région, à l'extrémité extérieure qui contient les neurones Otx2+ qui vont devenir PNN+ à partir de P36. Les neurones de la zone interne du Lat-IPN sont PNN- tout comme les neurones du sous-noyau centre (cIPN).

l'adulte, ou qu'une stimulation intense de la MHb peut rendre le HIPOPS plus plastique. Une étude a notamment identifié un switch du type de transmission synaptique au sein de la dMHb au cours du développement. Cette transmission synaptique dans la dMHb est principalement glutamatergique durant la période de développement post-natal précoce (mesurée à P14-15). Au cours de la transition développementale vers l'âge adulte, cette transmission décroît au profit d'une transmission synaptique GABAergique, qui reste excitatrice même chez l'adulte, et qui est médiée par des récepteurs de type GABA-A (mesurée P60-120) (Koppensteiner et al., 2016). Ce shift de transmission glutamatergique/GABAergique semble d'ailleurs être un processus rare puisqu'il n'a pas encore été décrit dans d'autres régions du système nerveux. La période préadolescente pourrait correspondre à la période pendant laquelle la transmission GABAergique prendrait le relais sur la transmission glutamatergique, conférant ainsi à la dMHb des propriétés uniques qui la rendrait particulièrement plus sensible aux effets d'un stress, et contribuerait ainsi à l'enclenchement du processus de la maturation des neurones $Otx2^{PNN+}$ de l'IPN. Une mesure électrophysiologique de l'activité neuronale de la dMHb est nécessaire pour confirmer cela.

Bien que la comparaison de l'activité neuronale aux différents stades développementaux et les résultats comportementaux suggèrent que la préadolescence correspond à la période critique de développement du HIPS, une analyse comportementale basée sur le protocole de stress en « 2 coups » mais remplaçant le stress pré-adolescent par un stress chronique appliqué à une autre période (comme la période de l'enfance tardive ou une autre période adulte) confirmerait que l'anxiété révélée ici est bien due spécifiquement aux effets d'un stress subi durant la période préadolescente et non pas uniquement due à la combinaison de deux stress à des périodes quelconques. L'apparition des PNN durant cette période, pointe toutefois vers l'existence d'une réelle période critique du HIPOPS à la préadolescence.

5. La préadolescence représenterait une période de transition de l'activité neuronale associée à l'apparition des PNN dans le HIPOPS

Nos résultats ont également mis en évidence l'existence d'une sous-population de neurones $Otx2^{PV+}$ qui commencent à être visiblement entourés de PNNs, un marqueur de maturation de ce type d'interneurones, à partir de P36. Nous avons appelé ces neurones les neurones $Otx2^{PNN+}$. Ils sont localisés aux extrémités des sous-noyaux latéraux de l'IPN caudal (**Figure 44**). Contrairement au reste du HIPOPS, les neurones $Otx2^{PNN+}$ n'expriment pas *Egr1*

en réponse à un stress chronique préadolescent. Étonnamment, nous observons l'inverse, lorsque le stress appliqué à P36 est un stress aigu. En effet, dans cette situation, le HIPOPS ne semble pas trop s'activer, à l'exception des neurones $Otx2^{PNN+}$. Avant P36, nous observons le contraire ; lorsque le stress aigu est appliqué à P30, la plupart des neurones du HIPOPS sont activés, à l'exception des neurones localisées dans la région qui deviendra $PNN+$ à partir de P36 (**Figure 37**). Cela suggère que la maturation des neurones $Otx2^{PNN-}$ serait plus précoce que celle des neurones $Otx2^{PNN+}$. La maturation des neurones $Otx2^{PNN+}$ pourrait donc induire à un switch dans le recrutement des neurones du HIPOPS. D'après cette hypothèse, lorsque la maturation des neurones $Otx2^{PNN+}$ du HIPOPS commence, leur capacité à inhiber les neurones $Otx2^{PNN-}$ du HIPOPS, en réponse à un stress, augmenterait (**Figure 44 A et B**). Le rôle des neurones $Otx2^{PNN+}$ pourrait être de limiter l'activité des neurones $Otx2^{PNN-}$ du HIPOPS en réponse à un stress, puisque le maintien de cette activation serait délétère à long-terme. En effet, l'activité des neurones $Otx2^{PNN-}$ en réponse à un stress chronique entre P30-36 est associée à une augmentation de la susceptibilité à l'anxiété pathologique à long-terme. Contrairement aux neurones $Otx2^{PNN+}$, les neurones $Otx2^{PNN-}$ seraient déjà matures à P30. Lorsque le stress chronique démarre à P30, les neurones $Otx2^{PNN+}$ seraient donc incapables d'inhiber l'activité des neurones $Otx2^{PNN-}$ entraînant des modifications du circuit à long-terme qui favoriseraient le développement de symptômes anxieux (**Figure 44 C et D**). Ces modifications conduiraient notamment à une hypersensibilisation des neurones $Otx2^{PNN-}$, voire des autres régions du cerveau impliquées dans la réponse au stress (**Figure 44 D**). Cette hypersensibilisation est probablement due à un effet général du stress chronique préadolescent sur les régions impliquées dans la réponse au stress mais impliquerait toutefois une régulation par le HIPOPS puisque la délétion d'*Otx2* dans les neurones $Otx2^{High}$ de la MHB ne conduit pas aux mêmes effets après le stress chronique préadolescent (**Figure 43**).

Pour vérifier que les neurones $Otx2^{PNN+}$ sont incapables d'inhiber l'activité des neurones $Otx2^{PNN-}$ à P30, nous pourrions artificiellement avancer l'ouverture de la période critique du HIPOPS en activant les neurones $Otx2+$, destinés à devenir $PNN+$, à P30 à l'aide d'un DREADD activateur, durant un stress aigu. Si l'activation des neurones $Otx2^{PNN-}$ observée à P30 est due à la maturation tardive des neurones $Otx2^{PNN+}$, leur activation à P30 devrait inhiber les neurones $Otx2^{PNN-}$. Pour confirmer que l'activation prolongée des neurones $Otx2^{PNN-}$ entre P30-36 est à l'origine du phénotype comportemental observé chez l'adulte, nous pourrions également retarder artificiellement la fermeture de la période critique du HIPOPS en appliquant le stress entre P30-36 tout en inhibant l'activité des neurones $Otx2+$ de l'IPN pendant ce stress

à l'aide d'un DREADD inhibiteur dans les souris $Otx2^{CreERT2}$. Le stress adulte ainsi que les tests comportementaux suivraient ensuite. Si les tests comportementaux montrent que cette inhibition durant le stress adolescent n'induit pas d'effets à long-terme sur l'anxiété, cela confirmera le rôle de l'inhibition des neurones $Otx2^{PNN+}$ dans la protection contre les effets délétères de l'activation des neurones $Otx2^{PNN-}$ de l'IPN.

En plus de rendre les neurones $Otx2^{PNN-}$ du HIPOPS plus sensibles aux effets de stress futurs, ne pas inhiber ces neurones durant le stress chronique préadolescent pourrait potentiellement conduire à la mise en place et au renforcement d'un sous-circuit qui accroîtrait la vulnérabilité à l'anxiété dans le HIPOPS. Les cellules PV+ sont très sensibles au stress (Hu et al., 2010; Holland et al., 2014; Goodwill et al., 2018). Un stress chronique préadolescent pourrait notamment affecter le timing de la maturation des neurones $Otx2^{PNN+}$. Un immunomarquage suivant l'apparition des PNNs en présence ou en absence de stress entre P30-36 serait nécessaire pour identifier un effet potentiel du stress chronique préadolescent sur leur apparition. Il faut toutefois un très bon marqueur des PNNs qui permette de bien visualiser leur apparition. Les PNNs eux-mêmes sont également sensibles au stress, et leur apparition qui est nécessaire pour induire la maturation des cellules PV+, peut être influencée par un stress chronique (Filipović et al., 2013; de Araújo Costa Folha et al., 2017; Yu et al., 2020). Ce stress préadolescent pourrait également altérer l'activité GABAergique dans le HIPOPS, à long-terme. En effet, des travaux rapportent qu'un stress chronique peut entraîner une altération de la capacité d'inhibition des cellules PV+ (Hu et al., 2010; Holm et al., 2011). Dans un cas, le stress préadolescent pourrait diminuer les capacités inhibitrices des neurones $Otx2^{PNN+}$ à long-terme. Ce type de stress réduirait donc la capacité des neurones $Otx2^{PNN+}$ à inhiber les neurones $Otx2^{PNN-}$ dans le HIPOPS. Ainsi, à la suite du stress préadolescent suivi du stress adulte, un simple stress aigu conduirait à une hyper-activation de tous les neurones $Otx2^+$ du HIPOPS. Dans l'autre cas, l'absence de l'activité des neurones $Otx2^{PNN+}$ durant cette période particulière de maturation affaiblirait les efférences inhibitrices des neurones $Otx2^{PNN+}$ sur les neurones $Otx2^{PNN-}$. Même si les neurones $Otx2^{PNN+}$ peuvent s'activer à partir de P36, la perte de leurs efférences sur les neurones $Otx2^{PNN-}$ ne leur permettrait pas d'inhiber ces neurones (**Figure 44 C et D**).

Passée la phase de maturation, si les neurones $Otx2^{PNN+}$ sont capables d'inhiber les neurones $Otx2^{PNN-}$ dans le HIPOPS, en réponse à un stress aigu à partir de P36, il se pourrait qu'ils soient tout de même très sensibles aux effets d'un stress chronique. Une étude a montré que si un stress aigu n'affecte pas l'expression de la PV, un stress chronique, correspondant à

un modèle de dépression, conduit à la réduction de son expression dans les régions CA1, CA3 et DG de l'hippocampe (Filipović et al., 2013). Les PNNs protègent les cellules PV+ des effets du stress oxydatif provoqué par des stress environnementaux (Cabungcal et al., 2013; Yamada et al., 2015). Toutefois, les PNNs eux-mêmes sont affectés par le stress oxydatif. Ainsi, un stress chronique postérieur à P36 diminuerait temporairement le niveau de PV et donc lèverait l'inhibition transitoirement jusqu'à la fin du stress. La protection initiale par les neurones $Otx2^{PNN+}$ durant les premiers jours de stress serait donc cruciale pour protéger des effets délétères du stress chronique.

Pour vérifier que les neurones $Otx2^{PNN+}$ sont capables d'inhiber les neurones $Otx2^{PNN-}$ en réponse à un stress aigu et que cela implique un switch dans le recrutement des neurones du HIPOPS lié à l'apparition des PNNs, nous pourrions induire la dégradation des PNNs et observé les conséquences d'un stress aigu à P36 sur l'activité du HIPOPS. En effet, dans ces conditions, les neurones $Otx2^{PNN+}$ sont activés mais pas les neurones $Otx2^{PNN-}$. La dégradation des PNNs pourrait être effectuée à l'aide d'enzymes telles que la chondroïtinase ABC ou la hyaluronidase, qui sont capables de dégrader les polysaccharides contenus dans les PNNs (Deepa et al., 2006). Il serait ainsi possible de tester si en l'absence de PNNs, les neurones de la région PNN^+ perdent leur capacité à s'activer et si cela entraîne une désinhibition des neurones $Otx2^{PNN-}$ du HIPOPS qui seraient alors actifs même en réponse à un stress aigu. Nous pourrions également induire l'expression d'un rapporteur dans la ligné transgénique $PV^{CreERT2}$ pour vérifier si ces neurones projettent sur les neurones $Otx2^{PNN-}$. Nous pourrions également inhiber les neurones $Otx2^{PNN+}$ en transfectant un DREADD inhibiteur dans la ligné transgénique $PV^{CreERT2}$ pour inhiber spécifiquement l'IPN grâce à une injection locale de tamoxifène après la maturation de ces neurones. Nous pourrions alors inhiber ces neurones durant un stress aigu et observer l'effet sur l'activité des neurones $Otx2^{PNN-}$ en utilisant Fos ou Egr1.

L'implication des PNN dans la maturation du HIPOPS et dans sa réponse au stress pendant la période préadolescente reste spéculative. Toutefois, de nombreux travaux ont déjà montré que la maturation des cellules PV+ contrôlait l'ouverture et la fermeture des périodes critiques dans d'autres régions et nécessitait la formation des PNNs (Hou et al., 2017; Lee et al., 2017). L'apparition des PNNs observée dans le HIPOPS durant cette période pré-adolescente renforce donc nos résultats qui suggèrent qu'il s'agit de la période critique de développement du HIPOPS. Il serait donc intéressant de comprendre les mécanismes qui se mettent en place dans la région PNN^+ de l'IPN caudal durant un stress chronique subi à cette période.

6. La délétion d'*Otx2* dans la MHb protège des effets délétères du stress pré-adolescent

La lignée transgénique *Otx2^{lox/lox};Ngn1^{CreERT2};Ai14/Ai14* a été utilisée pour analyser les fonctions du HIPOPS et a permis de cibler assez spécifiquement les neurones de la dMHb. Si nos résultats suggèrent que la délétion d'*Otx2* n'affecte ni la survie ni les projections des neurones *Otx2^{High}* recombines de la MHb, nous n'avons cependant pas vérifié si des changements d'identité n'affectent pas ces neurones. Une analyse RNA-seq permettrait d'identifier les changements d'expression induits par la délétion d'*Otx2* dans les neurones recombines mais également des changements de l'activité neuronale.

Nos résultats comportementaux mettent en évidence la présence d'une interaction entre les niveaux d'*Otx2* et le stress chronique qui régule, au moins les niveaux d'anxiété. La délétion d'*Otx2* semble avoir un effet positif sur le comportement de ces animaux, elle pourrait permettre aux animaux de s'habituer à des stress, même pendant les périodes de sensibilité, voire rendre l'expérience positive. Cette lignée transgénique semble représenter un bon modèle de résistance à l'anxiété. Il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression d'*Otx2* pendant le stress chronique juvénile pour corrélés ceux-ci à la réponse du HIPOPS au stress, et déterminer si un stress chronique induit durant cette période augmente le niveau d'expression d'*Otx2* dans les neurones *Otx2^{High}* de la dMHb, un effet contraire aux résultats du cKO d'*Otx2* que nous avons obtenus ici.

Nous avons donc montré qu'une délétion d'*Otx2* dans le HIPOPS protège les animaux du développement d'une vulnérabilité à l'anxiété. Toutefois, dans notre modèle, les animaux perdent l'expression d'*Otx2* dès la naissance. La protection conférée par la délétion d'*Otx2* que nous observons n'est peut-être donc pas seulement due à un effet d'*Otx2* spécifique à la période critique préadolescente. Une délétion transitoire d'*Otx2* spécifiquement durant la période de stress préadolescente permettrait de s'assurer que la protection contre les effets délétères du stress est bien due à l'absence d'*Otx2* pendant le stress juvénile et non pas à d'autres types de modifications subtiles du circuit que nous n'aurions pas pu détecter. La transfection d'un virus herpès exprimant un petit ARN interférent *Otx2* conviendrait pour répondre à cette problématique. Cet outil a notamment été utilisé pour montrer l'effet spécifiquement délétère de la diminution de l'expression d'*Otx2* durant l'enfance tardive dans la VTA (Peña et al., 2017). Si nous ne pouvons pas écarter les effets de la délétion d'*Otx2* qui ne concernent pas la réponse au stress, nous avons tout de même étudié les effets de cette délétion sur le dMHb pendant le stress juvénile, qui expliqueraient le comportement de résilience à l'anxiété.

7. La délétion d'*Otx2* dans la MHb accélère le recrutement de la dMHb

L'hyper-sensibilité de la dMHb au début de la période de stress pré-adolescente chez les souris cKO *Otx2* ne semble pas être cohérente avec un effet protecteur à long terme de la délétion d'*Otx2*. En effet, chez les souris contrôles, une forte activation de la dMHb pendant le stress préadolescent corrèle avec une augmentation de la chronicité du stress, qui est associée à une susceptibilité accrue à l'anxiété. Nous nous attendrions donc plutôt à ce qu'une forte activation de la dMHb chez nos souris cKO *Otx2* les rendent plus anxieuses à l'âge adulte. Cependant, le résultat des tests comportementaux montre qu'au contraire, cette délétion rend les souris résilientes à l'anxiété. Le nombre de neurones *Egr1*⁺ dans la dMHb et dans les neurones *Otx2*^{PNN-} de l'IPN est plus élevé chez les animaux cKO que chez les animaux contrôles, et ce, dès le premier jour de stress à P30 (**Figure 45 A**). Toutefois, contrairement aux souris contrôles chez lesquelles l'IPN exprime *Egr1* en réponse à un stress chronique entre P30-36, chez les souris cKO, l'IPN perd l'expression d'*Egr1*. Il semblerait donc que la rapide hyper-activation des neurones de la dMHb dès le premier jour de stress chez les souris cKO soit rapidement suivie d'une phase d'hypo-activation de l'activité de l'IPN, malgré le maintien d'une forte activité de la dMHb (**Figure 45 B**). Cette phase d'hypo-activation de l'IPN pourrait donc fixer le seuil de sensibilité du HIPOPS à de futurs stress à un niveau plus élevé que chez les contrôles. Après le « stress en deux coups », un simple stress aigu ne parvient donc pas à activer le HIPOPS, qui se comporte alors comme celui d'un animal contrôle qui n'a pas vécu d'évènement stressant (**Figure 45 C**). Que les PNNs soient impliqués ou pas dans ce processus, la phase d'hypo-activation pourrait expliquer pourquoi certains fonds génétiques développent une résilience aux maladies psychiatriques plutôt qu'une susceptibilité, à la suite d'un trauma. Un niveau d'expression plus faible d'*Otx2*, au moins durant ces périodes de développement, constitueraient un facteur important dans le développement de cette résilience. Cela expliquerait le phénotype hypo-anxieux observés chez les souris hétérozygotes (Vincent et al., in press).

En fonction du niveau d'expression d'*Otx2*, un stress environnemental vécu durant ces périodes fixerait, à long-terme, le seuil de sensibilité du HIPOPS aux futurs stress. Ce seuil de sensibilité dépendrait de la rapidité de recrutement de l'activité des neurones *Otx2*^{High} de la MHb et de la maturation des neurones *Otx2*^{PNN+} de l'IPN. Plus vite les neurones *Otx2*^{High} de la MHb seraient recrutés en réponse au stress préadolescent, plus vite la maturation des neurones *Otx2*^{PNN+} de l'IPN se ferait, plus vite ils inhiberaient l'activité des neurones *Otx2*^{PNN-} et plus le

HIPOPS rendrait les souris résilientes face aux effets délétères du stress. Les mécanismes sous-jacents à la résilience conférée par la délétion d'*Otx2* reste encore assez flous et doivent être approfondis. L'accélération de la phase de maturation du HIPOPS chez les souris cKO doit également être vérifiée par immunomarquage après chaque séance de stress entre P30-36 pour suivre l'avancée de la formation des PNNs et l'expression de la PV, et identifier si la délétion d'*Otx2* dans les neurones $Otx2^{High}$ de la MHb en est responsable et si cela est lié à une modification de l'activité de ces neurones. Il reste également à comprendre comment cette hyper-activation précoce conduit à une l'hypo-activation de l'IPN le dernier jour de stress.

Jusqu'ici, les périodes critiques ont été associées à un mécanisme de maturation des régions corticales $Otx2^-$, par la version extracellulaire sécrétée d'*Otx2* (Bernard and Prochiantz, 2016; Lee et al., 2017). Le HIPOPS représente le premier cas d'étude de la période critique au sein de neurones $Otx2^+$; les neurones PV^+ expriment eux-mêmes le facteur de transcription *Otx2*. La régulation de la maturation des neurones $Otx2^{PNN+}$ de l'IPN pourrait être régulée par la sécrétion d'*Otx2* vers ces neurones depuis des sources d'*Otx2* exogène telles que la MHb, la VTA ou toutes autres régions exprimant *Otx2*. Une analyse de l'activité des neurones $Otx2^{PNN+}$ en réponse à un stress aigu à P36 dans nos animaux *Otx2* cKO grâce à la lignée transgénique *Ngn1Cre^{ERT2}* permettrait de vérifier si la dMHb est la source exogène d'*Otx2* dans l'IPN. Une altération de l'activité des neurones $Otx2^{PNN+}$, une modification de l'expression de la PV ou une altération des PNNs permettrait de confirmer cette hypothèse. Il se pourrait également que les neurones $Otx2^{PNN+}$ eux-mêmes, ou les neurones $Otx2^{PNN-}$ sécrètent *Otx2* pour initier leur maturation. Il se pourrait également que le processus de maturation du HIPOPS ne soit pas le même que celui des régions corticales, et implique un rôle de la protéine endogène *Otx2*. La délétion d'*Otx2* dans les neurones $Otx2^{PNN+}$ grâce à la lignée transgénique $PV^{CreERT2}$ permettrait de savoir si l'expression d'*Otx2* dans les neurones $Otx2^{PNN+}$ est nécessaire à leur maturation. Il serait également possible d'empêcher le transfert d'*Otx2* dans les neurones $Otx2^{PNN+}$ en incubant dans l'IPN un anticorps qui se lierait à la version sécrétée d'*Otx2* et qui empêcherait ainsi son internalisation dans l'IPN.

L'hypothèse du transfert d'*Otx2* sécrété dans les neurones $Otx2^{PNN+}$ reste à être testée ainsi que le mécanisme de maturation du HIPOPS. Toutefois, notre étude évoque pour la première fois un rôle éventuel d'*Otx2* dans la maturation des interneurones qui l'expriment dans l'IPN.

Les modèles animaux d'anxiété induite par le stress et de troubles de l'humeur se sont principalement focalisés sur la période précédant le sevrage ou la période adulte. Dans cette étude, nous avons identifié une période de développement impliquant la réponse du HIPOPS au stress. Cette période de développement est une période connue de vulnérabilité aux maladies psychiatrique (Dahl, 2004). En effet, la vulnérabilité à l'addiction aux drogues, à l'anxiété et à la dépression est accrue durant l'adolescence et l'exposition préalable à un stress joue un rôle important dans ce processus. Une étude comparant les effets d'un même stress appliqué à différentes périodes confirment que cette période est particulièrement sensible aux développement de pathologies induites par le stress (Cymerblit-Sabba et al., 2015). Il est donc important d'étudier plus en détail le rôle du HIPOPS dans la réponse au stress durant cette période. Nous avons mis en évidence une interaction entre les niveaux d'expression d'*Otx2* et les effets d'un stress chronique préadolescent dans le HIPOPS qui influence les niveaux d'anxiété. Ces travaux sont à approfondir mais ils pourraient permettre d'élucider les mécanismes conduisant à une susceptibilité ou à une résilience à l'anxiété induite par le stress.

Annexe

Title: Stress and Otx2 interact during critical periods of habenulo-interpeduncular system development and modulate resilience or susceptibility to long-term anxiety

Abbreviated title: Resilience or susceptibility to stress induced anxiety: Otx2 in control at the level of the habenula

Malalaniaina Rakotobe, Niels Fjerdingsstad, Nuria Ruiz-Reig, Thomas Lamonerie^{1*} and Fabien D'Autréaux^{1*}.

Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Institut de Biologie Valrose, 06108 Nice, France.

****Co-Corresponding authors:*** Pr Thomas Lamonerie and Dr. Fabien D'Autréaux, Institute of Biology Valrose (IBV), UMR7277, U1091, UNS, 7th floor, Sc.Nat.Building, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2 France. Emails: Thomas.LAMONERIE@univ-cotedazur.fr, Fabien.D'AUTREAU@univ-cotedazur.fr

Footnote: ¹These authors contributed equally to the work

Conflict of interest: The authors of this manuscript declare no competing financial interests.

Acknowledgements: We would like to particularly thank Benjamin Lapijover and Erwann Touzet for preliminary data, Aurélie Biancardini for mouse husbandry, Mouna Sekoni Khemiri for genotyping. We would like to thank Olivier Deschaux and Michèle Studer for sharing behavioral equipment and software. We would like to thank Lisa V. Goodrich for the *Ngn1^{CreERT2}* line and Silvia Arber for the Er81 antibodies. We would like to thank the iBV PRISM and Histo-pathology platforms and especially Simon Lachambre and Samah Rekima. This work was supported by the University of Nice (CSI fundings, Programme de Recherches Avancées UCA^{JEDI}), the National Center for Scientific Research (CNRS), the french ministry (MESR fellowship). The present address of N.R.-R is at the Institute of Neuroscience of the Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium.

Abstract

Enduring stressful events during sensitive periods of brain development can have major impact on the way individuals will cope with stress later on. Although many will become more prone to develop excessive anxiety or depression, some appear to be resilient. The mechanisms underlying these different responses are unknown, however, the key answers may reside in the way genes of development and environmental stressors interact to shape the circuits controlling emotions. Here we studied the role of the habenulo-interpeduncular system (HIPS), a critical node of reward circuits, in the process of an early stress induced anxiety. We found that a subcircuit of this system reacts particularly to chronic stress applied during the sexual maturation period. This circuit is characterized by the expression of *Otx2*, which we already found, controls its formation. We now prove that *Otx2* is also required to control the plastic response of this brain network upon chronic stress. We further show that deletion of *Otx2* restricted to the HIPS counteract the stress-induced anxiety. Together, these results demonstrate that *Otx2* and stress interact, around puberty, to shape the stress-response of the HIPS, revealed here as a key modulator of susceptibility/resilience to develop anxiety. This work also places the homeobox gene, *Otx2*, as a master regulator of HIPS development and function.

Introduction

Early stressful events can influence the genetic programming of specific neuronal circuits underlying emotional and cognitive coping with stressful events experienced later in life (Horowitz et al., 2012; Hegde and Mitra, 2020). Individuals that went through such traumatic early events, consequently, are more prone to develop pathologies such as anxiety and mood disorders. Although the effect of stressful environment is critical, it is not clear how developmental genes and environment interact and what mechanisms set susceptibility or, on the contrary, resistance to develop psychiatric diseases (Callaghan et al., 2013). Furthermore, although some studies are testing how different developmental periods contribute to stress-induced pathologies, it is not known if these critical periods involve common or distinct circuits (Pena et al., 2019).

We do not have yet a full knowledge of the brain circuits involved in stress-induced anxiety and mood disorders. Nevertheless, an integrated core network of brain regions that regulate emotions stands out. It is composed of various brainstem nuclei, including the major monoaminergic systems of the brain, the hypothalamus, amygdala, basal ganglia and several regions of prefrontal cortex (Price and Drevets, 2010). A relatively new recognized player in this network is the medial habenula (MHb) and its unique output the interpeduncular nucleus (IPN) (McLaughlin et al., 2017). Although the role of the HIPS (Habenulo-Interpeduncular System) is now under active study, the complexity of this system has let scientists without clear understanding of cell-specific basis to explain the many associated functions, sometimes with contradictory conclusions on that matter. For example, one study in mice concluded on a role of the dMHb in controlling fear responses and learning¹³, whereas another study found no effect on that parameter (Yamaguchi et al., 2013; Hsu et al., 2014), however, it showed that this circuit is

involved in motivation and hedonic state. What is clear is that the HIPS stands as a critical and integrative node of the DDC (Dorsal Diencephalic Conduction) system that forms with the MHB (Medial Forebrain Bundle) the feedback from cortical and subcortical regions to the brainstem in order to achieve adapted emotional responses.

We have recently characterized the mechanisms of development of a genetically-recognizable circuit inside the HIPS (Ruiz-Reig et al., 2018). The habenula- and interpeduncular-parts of this subcircuit both critically require the expression of *Otx2* to develop and are marked by it, throughout development and into adulthood. The part where *Otx2* is highly expressed in the medial habenula (*Otx2*^{High}) corresponds to the central-most part of both the dorsal MHb (dMHb) and ventral MHb (vMHb). It also corresponds to the latest born habenular neurons and targets preferentially IPN regions that contain high density of *Otx2*⁺ IPN neurons. We have been able to show that *Otx2*^{High} neurons establish synaptic contacts with *Otx2*⁺ IPN neurons (Ruiz-Reig et al., 2018). Accordingly, we named this subcircuit the HIPOPS (Habenulo-InterPeduncular-*Otx2*-Positive-System). *Otx2* is a developmental gene encoding a homeoprotein with many important brain functions. Its expression is highly conserved throughout evolution (Ranade et al., 2008; Sen et al., 2013), making it a good marker of conserved brain circuits. Based on all these evidences about *Otx2* and HIPS functions, we hypothesize that the HIPOPS plays important and conserved functions inside the reward system.

Beyond the HIPOPS, *Otx2* marks several other interconnected brain regions that also belong to the reward circuits. One of these, the VTA (Ventral Tegmental Area), requires the expression of *Otx2* to develop properly in utero. It was recently shown that *Otx2* plays also major roles during specific critical periods of post-natal development of the VTA (Pena et al., 2017). Early life stress (ELS) reduced *Otx2* expression in the VTA only during the stress period and this reduction was the main factor through which ELS induced long-term susceptibility to develop a depressive-like behavior. Thus, *Otx2* is an important player of critical periods of neuronal development and disturbing its expression may lead to long-term effects on brain functions related to the reward system. In these particular periods, an association between *Otx2* expression and the maturation of one type of cells, the parvalbumin cells (PV cells), seems to be one of the driving forces that makes these periods, critical windows of development (Lee et al., 2017). During these developmental phases, the circuits are more plastic and are subject to long term changes, under the influence of environmental cues (Hensch, 2005). One of those changes is the appearance of perineuronal nets (PNNs), notably, around PV cells. PNNs may lock and stabilize existing synaptic contacts. It is believed that these periods are sensitive temporal windows when susceptibilities or resistance to pathologies may take place (Reh et al., 2020). Coincidentally, *Otx2* is linked to pathologies involving the reward system. It was found as a susceptibility gene for bipolar diseases and stress-related disorders (Sabunciyani et al., 2007; Maheu and Ressler, 2017). Because HIPS dysfunctions may be involved in these diseases, it is possible that the role of *Otx2* in critical periods of HIPOPS development is important in the process.

To study the impact of stress in animal models, several types of stress have been applied with psychological or physical components. Among common environmental stresses used to mimic human trauma in rodent models, restraint presents numerous advantages. The psychological and physiological changes induced by the restraint result from the distress and aversive nature of being deprived of freedom of movement. As this procedure is painless, it does not have the confounding effects of pain or injury associated with other physical stresses. It can be applied at any stage of post-natal development including pre- and post-weaning period, contrary to maternal separation or social defeat, and its intensity (time per session and number of sessions) can be modulated over a wide range. Most importantly, it is a validated form of stress that can induce long-term anxiety-like and depression-related behaviors in rodents when applied with sufficient intensity (Chiba et al., 2012; Seewoo et al., 2020).

In this study, we used restraint to search for the existence of a critical period of HIPOPS development under the influence of environmental stressors. We found that such temporal window exists. Individuals

enduring restraint stress during this period present a specific hyperactivity of the HIPOPS compared to other circuits of the HIPS. These changes induce long-term modifications of the circuit that render the animals more prone to develop anxiety and mood disturbances later on. Furthermore, *Otx2* is a contributing factor as reducing its expression specifically in the HIPOPS modifies the stress response and abolishes this long-term susceptibility.

Material and methods

Animals

All mice used were generated and maintained in the animal house of the Institut de Biologie Valrose, Nice, France. All mouse lines were kept in the 129/Sv background. Only males were used in this study to avoid having effects due to sexual dimorphism. *Otx2*^{CreERT2/+} and *Otx2*^{fllox/fllox} mice were generated as described previously (Fossat et al., 2006). The *Ngn1*^{CreERT2/+}; *Ai14/Ai14* line was kindly provided by Lisa V. Goodrich (Koundakjian et al., 2007). The *Ai14* allele was used as the reporter of *Ngn1*^{CreERT2/+} expression. Adult mice were used for viral injection of DREADDs. Behavioral tests were done during the day cycle of the 12h day/night cycle. Post-natal deletion *Otx2* was achieved injecting intraperitoneally 15-30µl of tamoxifen in neonates at P0 at a concentration of 2,5mg/ml with 300µl insulin syringes. Care and handling of the animals prior or during the experimental procedures followed European Union rules and were approved by the French Animal Care and local ethic Committees.

DREADDs microinjections

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection (IP injection) with a mix of Tiletamine-Buprenorphine-Zolazepam-Xylazine (TBZX) (60 mg/kg). Xylocaine gel was applied on the skull prior to the incision and in the ear to lessen the pain perception. After disinfection of the area of incision, each mouse was successively placed and maintained on the stereotaxic apparatus. The eyes were protected from drying with ocry-gel. The cannula was implanted unilaterally from the bregma based on Paxinos et Franklin (2004). The implantation was successively made on the left and then on the right side, in the MHb according to these coordinates : A/P= -1,5 ; D/V= -2,75 ; lateral= +/- 0,2. 500 nl of the activating Gq- coupled DREADDs hM3D receptor (pAAV9-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry, 100 µL from titer $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL) (Cat No. 44361-AAV9; Addgene, USA) were injected at a speed of 100 nl/ms in *Otx2*^{CreERT2/+} or *Otx2*^{fllox/fllox} and *Otx2*^{+/+} control mice bilaterally. At the end of the injection, the cannula was left in place for infusion for 5 min at the site of injection before withdrawal. At the end of the surgery, an anti-inflammatory (Metacam; ,5 mg/ml) was administered intraperitoneally. The anti-inflammatory treatment was repeated for 3 days post-surgery. Ten days after the transduction, tamoxifen (Sigma-Aldrich) diluted in corn oil at a concentration of 10mg/ml was IP injected at 5 µl/g of body weight to induce the activation of Cre and, thus, the expression of DREADDs in the neurons of the MHb. Ten days after the tamoxifen injection, Clozapine N-oxide hydrochloride (CNO) (SML2304, Sigma-Aldrich) diluted in DMSO was IP injected at a concentration of 0,3 mg/kg. The mice were left undisturbed, for 7h, to let *Egr1* expression to return to baseline, as it is induced by the stress of the injection, and then they were rapidly sacrificed.

Stress protocol

Mice were placed in pierced syringes suited for their size at each stage studied, to restrain their movements as much as possible. The restraint was used acutely (one unique 2h-restraint) or chronically (2h/day for 7 days). For the analysis related to the study of neuronal activity at the different

developmental stages, the mice were immediately sacrificed at the end of the acute stress or at the end of the last chronic stress. The control mice that did not undergo any protocol of stress were quickly sacrificed at the proper age. At the end of the behavioral analysis, mice for each condition were divided into two groups: a group of mice that underwent a last restraint stress before the collection of the brains, and a group that was immediately sacrificed.

Acute sucrose consumption

The water in the bottle of the cage was replaced by a 30% sucrose solution for the night. The sacrifice occurred the following day.

Behavioral tests

The open field test and the elevated plus maze test were used to assess anxiety level during the Behavior 1 step. The same tests were used during the Behavior 2 step to assess anxiety level. Depression level was assessed using the curiosity test and the forced swim test.

Mice were acclimated in the behavioral room 1h prior to the beginning of the tests. Videos were acquired and analyzed with the EthoVision XT software. For all the tests, the arena was cleaned with 70% ethanol and dried at the end of each trial.

Open field test

The open field test was used to measure the anxiety levels and the ambulatory behaviors of the mice. The test was recorded in an arena in which the walls and the floor are made of black PVC. The box dimension is (40 W x 40 L x 30 H cm) and was divided into the border area (50% of the total arena) and into the center area. The field was moderately illuminated at 60 lux. Mice were individually placed in a corner of the arena and the behavior was recorded for 5 min. The time spent, the latency to enter, the number of entries, the mean speed and the total distance travelled in the center, which is an anxiogenic area for the mice, were measured.

Elevated plus maze test

The Elevated Plus Maze test (EPM test) was used to assess the anxiety level. This apparatus is 50 cm elevated from the ground and composed of the open arms (50 x 5 cm) which are anxiogenic for the mice, and two closed arms (50 W x 5 L x 16 H cm) which spread from the central platform (5 x 5 cm). Mice were placed at the center of the platform, head toward a closed arm and the video was recorded for 5 min. The latency to explore the open arms and the time spent in the open arms were measured.

Curiosity test

This test allows the measurement of the level of curiosity of the mice, an aspect of depression/anxiety. An exploratory zone, containing a transparent cylinder with holes, was designed in the middle of one side of the wall of the open field. Mice were placed facing that side and the video was recorded for 5 min (Habituation phase). Following the habituation phase, an object was placed inside the cylinder and the mouse was relocated at the opposite side of the object and the video was recorded for 5 more min (Exploration of the object phase). The percentage of time spent in the exploratory zone, during the

exploration of the object phase, is calculated and the statistics were made on the values obtained. We also used these values to divide the mice into subgroups: mice that spent a percentage of time $\leq 40\%$ in the exploratory zone are classified as anxious, those that spend a percentage of time $\geq 60\%$ are classified as curious, the mice in between are classified as indifferent.

Forced swim test

The forced swim test was used to measure the depression level of mice. Mice were placed individually in a transparent cylinder (12 cm diameter; 30 cm of height) high enough to avoid escaping or touching the bottom filled at 25cm from the bottom with water (23-25°C) for 6 min. The time of immobility during the last 4 min was measured on the EthoVision software. The immobility was defined as the lack of movement, except those necessary to sustain the head outside of the water. The water was changed at each trial.

Immunohistochemistry and histological analysis

Mice used to identify the critical period of development were directly sacrificed at the end of the acute stress or at the end of the last stress. Brains were dissected and directly frozen in Tissue-Tek OCT compound at -80°C (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In order to preserve endogenous fluorescence of the reporter, mice transduced with the DREADDs were subjected to intra-cardiac perfusion using PBS, then 4% paraformaldehyde (PFA). The same treatment was done to *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2/+};Ai14/Ai14*, *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2/+};Ai14/Ai14* and *Otx2^{flox/flox} Ai14/Ai14* mice used to study the anatomical effect of *Otx2* deletion in the MHB, the neuronal activity in response to stress between P30-36 and to mice that underwent the behavioral analysis. Brains were post-fixed overnight in 4% PFA at 4°C and cryoprotected in 30% PBS sucrose before freezing in Tissue-Tek OCT compound at -80°C . Eyes were collected from dislocated mice and placed in cold PBS. A small hole was done at the level of the ora serrata. The eyes were fixed in 4% PFA for 2h at room temperature, cryoprotected in 20% PBS sucrose overnight, then frozen in OCT and stored at -80°C .

Brains were cut in $16\mu\text{m}$ coronal sections using a Microm HM550 cryostat and sections were mounted on SuperFrost + slides (Fisher Scientific). Eyes were cut in $14\mu\text{m}$ sections collected on SuperFrost + slides. The sections directly frozen were post-fixed in fresh 4% PFA. Before the blocking step, sections from perfused *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2/+};Ai14/Ai14*, *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2/+};Ai14/Ai14* and *Otx2^{flox/flox} Ai14/Ai14* mice were subjected to an unmasking step to better reveal the *Otx2* signal that is weaker in perfused brains. In this step, the slides were incubated in Citrate Buffer, pH 6, for 8 min at 95°C . A second treatment was performed with PBS-Glycine (100 mM glycine) to limit background noise. The rest of the steps were similar for all the samples. Briefly, the slides were incubated in a blocking solution (PBS with 0,2% dTriton 10% FBS) for 1h. The primary antibodies were incubated overnight at 4°C in a solution of PBS (0,1% Triton-10%FBS). The sections were incubated 10 min in DAPI ($1\mu\text{g/ml}$).

The primary antibodies used were: mouse anti-Brn3a (Merck/Millipore, 1:250), rabbit anti-Er81 (kind donation of Silvia Arber, 1:1000), goat anti-Otx (R&D Systems, 1 :500), rabbit anti Fos (SySy 1 :2000), rabbit anti-egr1 (cell signaling 1 :500), wfa biotinylated (vector laboratories, 1 :500).

The secondary antibodies used (Jackson ImmunoResearch, 1:500) were: anti-rabbit Alexa Fluor™ 488, anti-rabbit Alexa Fluor™ 647, anti-goat Cy3, anti-mouse Alexa Fluor™ 647, Conjugated streptavidine Alexa Fluor™ 488.

Microscopy

Images of the retina were acquired on a confocal microscope Zeiss 780 (Zeiss, Oberkochen, Germany). All other images were acquired on the wide-field microscope AxioObserver - Zeiss (2011) with the sCMOS ANDOR Neo camera and the stereomicroscope coupled with the digital camera (Zeiss axioplan2). Images were processed with the ImageJ software and figures were mounted on Adobe Photoshop.

Statistical analysis

To study the interaction between anxiety phenotype with genotype, rankings were made by grouping the animals with the same genotype (stressed and non-stressed mice). A rank was attributed to the mice according to the value of the variable (time spent in the open arms of the EPM), ordered increasingly. Outliers (value $1,5 > 75$ th percentile or value $1,5 < 25$ th percentile) were removed from the analysis. Statistical analyses were made using the R software. Results are presented as the mean \pm SEM. The comparison of the mean of two groups was done by using the Student t-test when the variance was equal and with a Welch correction when it was not. Anova were calculated using the ANOVA function of the package “car” and corrected for the type III error for unbalanced datasets. Comparison of three groups were made with a one-way ANOVA. The interaction effects between the chronic stress and the *Otx2* deletion were revealed by using a two-way ANOVA.

Results

1. HIPOPS circuits are interconnected and *Otx2*^{High}MHb region drives *Otx2*cIPN activity

Previous results showed that MHb *Otx2*^{High} neurons preferentially form synapses around IPN neurons that are expressing *Otx2*, located in two subnuclei of the caudal IPN, the cIPN (centro-caudal IPN) and lat-IPN (latero-caudal IPN). From these results we hypothesized that *Otx2* marks a subcircuit inside the HIPS that may be preferentially interconnected (Ruiz-Reig et al., 2018). To test this hypothesis, we asked whether chemogenetic activation of MHb *Otx2*^{High} neurons that are glutamatergic would preferentially drive the activation of their hypothesized targets in the cIPN. AAVs containing a floxed Gq-coupled hM3D DREADD fused with mCherry under the control of human synapsin promoter were injected stereotaxically into the mHb of *Otx2*^{CreERT2/+} and wild type male mice (Fig.1A-B). To monitor neuronal activation, we examined the expression of immediate-early genes that are strongly and specifically induced after neuronal activation (Zangenehpour and Chaudhuri, 2002). As expected, in wild type mice, after tamoxifen induced recombination and CNO mediated activation of the DREADDs, no sign of neuronal activation could be detected in the MHb or in the IPN (Fig.S1). Absence of activation was also noticed in *Otx2*^{CreERT2/+} when the CNO was omitted, despite the presence of DREADDs visualized by mCherry decorating MHb *Otx2*^{High} neurons (Fig.S1). In contrast, upon CNO injection in *Otx2*^{CreERT2/+} mice, a strong Fos-immunoreactivity was found in dMHb neurons expressing hM3D in the *Otx2*^{High} region (Fig.1D-F). In the IPN target, neuronal activity could be detected in neurons of the cIPN and lat-IPN (Fig.1D). Furthermore, only cells that were *Otx2*⁺ were strongly labeled (Fig.1H). Thus, forced activation of *Otx2*^{High} neurons in the MHb drives activity specifically in *Otx2*⁺ neurons in the IPN.

These results show that MHb *Otx2*^{High} neurons are able to modulate the activity of *Otx2*⁺ IPN neurons and it also confirms that these neurons form a sub-circuit inside the HIPS that can be marked by the expression of *Otx2*, that we thus called the HIPOPS.

Interestingly, in the MHb, Fos-immunoreactivity was not only found in DREADD⁺ neurons. Many neurons inside the MHb and some in the lateral habenula were also labelled despite they were not expressing DREADDs (Fig.1F; Arrows). This observation suggests that Otx2^{High} neurons can activate local habenular neurons in addition to the neurons in the cIPN that express *Otx2*.

2. HIPOPS critical period of response to stress

We then wanted to investigate the response of habenular neurons and their IPN targets upon stress-induced neuronal activation. As we wanted to test different developmental stages, we selected physical restraint, a type of stress that can be applied at any stage and whose intensity and chronicity can be controlled. Restraint has been extensively used in rodent experimentations (Chiba et al., 2012; Sun et al., 2015; Seewoo et al., 2020) and is a validated form of stress that can induce long term consequences on behavior when applied with sufficient intensity (Shoji and Miyakawa, 2020).

We tested the effect of a chronic stress (CS) on HIPS activity by repeating the same restraint stress, every day for a period of 7 days, on male mice. After the last stress, *Fos* and *Egr1* (*Krox-24*, *Zif-268*), another immediate early gene (Zangenehpour and Chaudhuri, 2002), were strongly induced in the dMHb compared to control (Fig.2). *Egr1* even appeared a more robust marker of stress-induced activity (Fig2.C-D versus Fig.2C'-D'); therefore, we use *Egr1* thereafter. *Egr1* induction was evident post-weaning into the pre-adolescence and adolescence stages (Fig.2C-D' and Fig.2G). Following the same trend, activation of the IPN was strong and more evident at these stages (Fig.3). Interestingly, the neurons that were particularly activated belonged to the HIPOPS: Otx2^{High} and Otx2⁺ neurons of the MHb and cIPN respectively, were relatively more *Egr1*-immunoreactive than other neurons in the same regions (Fig.3D-H and graph in Fig.3K). We then tested the effect of an acute stress. Such stress activated neurons in the HIPS; however, these neurons mostly lied outside of the-HIPOPS or in the lateral most part of Otx2⁺ neurons (Fig.3I and graph in Fig.3K). Those Otx2⁺ neurons displayed a different molecular identity. They expressed parvalbumin (Fig.4A) and were surrounded by a particular form of the extracellular matrix, the perineuronal nets (PNNs) (Fig.4B). We therefore called these neurons, Otx2^{PNN+} neurons. In contrast, after the chronic stress even though Otx2⁺ neurons represented the vast majority of active neurons, those located in the Lat-cIPN were *Egr1*⁻, indicating that Otx2^{PNN+} neuronal population was silent after a chronic stress (Fig.3D-H and graph in Fig.3K).

To verify that this activation was due to the stress and not to any other type of event that the animals would experience, we tested the response of the HIPOPS following an exposure to a pleasurable event such as pleasant-tasting sucrose containing water. In contrast to stress, this condition elicited very little response confirming the specificity of the IPN response towards unpleasant stressful event (Fig.3J).

Thus, the HIPS responds to stressful events and the more intense the stress, the more the HIPOPS is engaged, compared to other circuits inside the HIPS. This activation occurs particularly when facing stressful events but not pleasurable ones. Furthermore, a peak of response after weaning and before adulthood seems to exist. Finally, a particular population of IPN Otx2⁺ neurons, characterized by PV expression, surrounded by PNNs, that we called Otx2^{PNN+} neurons, is responding to acute but not chronic stress.

3. Restraint Stress during hyper-responsive period precipitates effects of adult stress

We then wanted to test if the hyper-responsive period that we identified corresponded to a period of development during which stress can induce anxiety on the long term, in other words, to a critical period for stress-induced anxiety. As mentioned above, chronic stress is known to generate long-term

consequences on behavior including on anxiety levels when applied with sufficient intensity and chronicity; independent of the life period it is experienced. In accordance with the two-hit stress model, we wanted to apply a mild stress (7 days of restraint for two hours) during the HIPOPS hyper-responsive period, that would by itself not generate detectable long-term consequences on anxiety but that would produce a susceptibility to develop anxiety. This susceptibility would then require a second hit of stress to become detectable at the behavioral level.

We first verified that 7 days of chronic stress (P30-36) would not generate behavioral abnormalities by testing general motility and anxiety levels 2 weeks after the end of the period of stress. As shown in Fig.5B-E, no differences could be noticed between controls and stressed animals. In sharp contrast, several weeks after a second period of stress during early adulthood (P60-P66), animals that had received the early stress presented higher anxiety based on distance travelled, number of entries and time spent in an anxiogenic zone (Fig.5F,H-I). These differences could not be explained by motor dysfunctions as demonstrated by a similar mean speed of the animals. In contrast to anxiety, depressive-like behavior was not significantly affected (Fig.5J), as measured by the Porsolt swim test. Interestingly, though, curiosity toward a new object was reduced (Fig.5K). However, this reduction in curiosity could be explained by a potential anxiety towards this new object. Indeed, the stressed mice were not more indifferent to the new object, they were avoiding it, compared to unstressed mice.

This shows a priming effect of the early stress on the late one that consequently reveals itself at the behavioral level. Anxiety levels are particularly affected by this early stress, while no clear difference in depressive-like behavior can be detected. This temporal window may thus represent a critical period of HIPOPS development particularly involved in setting long-term levels of anxiety.

4. Deletion of *Otx2* restricted to the HIPOPS protects from susceptibility to develop anxiety on the long-term.

To implicate directly the HIPOPS into the mechanisms leading to increased anxiety, we tested if interfering with HIPOPS normal development would change the outcome of individuals that suffered the early stress. Since *Otx2* is a master gene of HIPOPS development, we designed a strategy to delete *Otx2*, specifically in these circuits. We relied on the *Ngn1^{CreERT2}* line, which expresses an activable form of Cre driven by the *Ngn1* promoter (Koundakjian et al., 2007; Kim et al., 2011). In this line, CreERT2 expression becomes gradually restricted to a few sites as mice age. The CreERT2 colocalization with *Otx2* at P0 is almost entirely specific to the dMHb (Fig.S2 and Fig.6). Only two other sites that are unlikely to interfere with a HIPOPS phenotype could be found: some granular cells in the cerebellum and rare photoreceptors in the retina (Fig.S2).

Otx2^{fllox/fllox};Ngn1^{CreERT2} animals were compared to *Otx2^{fllox/fllox}* or to *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2}* mice. The habenula in these mice appeared normal. The projections of the neurons that had lost *Otx2* expression were normally found surrounding their lat-IPN targets (Fig.6B-e'). The size of the MHb was unchanged further supporting that the post-natal ablation of *Otx2* did not affect their survival (Fig.6F). We next assessed the behavior of these mice at the adult stage at P100. No abnormalities were detected in term of anxiety levels or motor parameters measured by the mean speed or distance travelled in the arenas of both the open field and elevated-plus maze tests (Fig.7A-D). Depression-like behavior was unaffected (Fig.7E).

Thus, deletion of *Otx2* at the post-natal stage in the dMHb and in rare cells in the retina and cerebellum does not lead to anatomical or behavioral abnormalities in standard reared conditions in mice.

The dMHb is particularly active during chronic stress and especially during the critical period of HIPOPS development. We therefore tested if the deletion of *Otx2* would affect stress-induced anxiety.

We assessed the behavior of mice that went through the two-Hit stress with or without *Otx2* deletion in the dMHb. As expected, in two different controls *Otx2^{flox/flox}* and *Otx2^{+/+};Ngn1^{CreERT2}*, the two-hit stress protocol increased anxiety levels (Fig.7M). However, this stress effect could not be observed in the *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}* mice (Fig.7M). In fact, all the parameters that we found affected in control animals, after the early + late stress compared to the adult stress alone, were unaffected in the *Otx2 cKO* (Fig.7F-J). As expected, inactive time in the FST test was unchanged in *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}* mice, as the stress-protocol did not induce depressive-like symptoms, even in the controls. The proportion of curious individuals facing a new object was markedly increased with a parallel reduction in anxious and indifferent mice. Interestingly, the effect of adult stress alone followed the same trend in controls (Fig.5K) and *Otx2 cKO* (Fig.7?) with an increase in the proportion of indifferent and anxious mice. These indicates that the response to stress is only different during the early stress between the two genotypes.

Thus, *Otx2* deletion in the dMHb leads to a relative protection against stress effects on the long-term regarding anxiety and curiosity. This effect seems to be the consequences of an altered interaction between *Otx2* and stress specifically during the juvenile period.

5. Deletion of *Otx2* restricted to the HIPOPS leads to a bimodal response to juvenile chronic stress and protects from stress-hypersensitivity of the circuit later on.

To understand the mechanisms of resilience to stress observed in *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}* animals, we analyzed the response of the HIPOPS to juvenile stress. Interestingly, in *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}*, although the dMHb was even more active than in controls at the end of the juvenile chronic stress, IPN neurons did not respond (Fig.8A-D). One possibility is that *Otx2* deletion leads to an abnormal connectivity between the dMHb and its IPN output. However, at earlier time points during the protocol of stress, *Otx2⁺* IPN neurons were readily activated and this activation correlated with a relative strong dMHb activation. In fact, even an acute stress at P30 (even three days of stress P30-P32), in *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}*, activated HIPOPS circuits, to an even higher extent than in controls (Fig.8E-H). This was particularly surprising as an acute stress is normally not strong enough to significantly activate the dMHb at any of the time points tested from P20 to adulthood.

Thus, deletion of *Otx2*, in *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}* mice, renders the HIPOPS more activable by stress. This habenular hyper-sensitivity, paradoxically, desensitize the IPN neurons after 5-7 days of stress.

We then tested if this biphasic response to the early stress would impact long-term reaction of the circuits when facing stress, again. We examined the status of the circuit, at adult stage, in controls and *Otx2 cKO*, with or without previous two-hit stress protocol. In the control stressed animals, higher activity in HIPOPS neurons, after an acute final stress before sacrifice at this late stage, could be detected (Fig.9). This activation after an acute final stress was relatively low in *Otx2^{flox/flox};Ngn1^{CreERT2}* mice with previous two-hit stress mice or in control unstressed mice (Fig.9). Actually, in the HIPOPS, only PNN⁺ neurons were significantly *Egr1⁺* in the control whereas none could be detected in the *Otx2 cKO*. In sharp contrast, many cells were strongly *Egr1*-immunoreactive in the HIPOPS after an acute final stress in the control animals with previous two-hit stress protocol. Interestingly, PNN⁺ cells were not the only *Egr1*-immunoreactive *Otx2⁺* cells despite the fact that the mice endured an acute stress. Indeed, we previously showed (See Fig.3I) that an acute stress mainly activated PNN⁺ cells at P36. Here, these cells were modestly induced compared to the other *Otx2⁺* IPN neurons. It is noteworthy that the activation was high in many other regions that are known to be involved in stress such as the VTA or the LHB (Reviewed in(Hikosaka, 2010; Bouarab et al., 2019) and Fig.9A-C). These regions were weakly induced in the control animals after an acute stress (Fig.9C-F2). The activation was also relatively low in the *Otx2 cKO* (Fig.9B-E2).

Thus, *Otx2* deletion in the dMHB changes the normal response of the HIPOPS into a biphasic response with an hyperactivation in the beginning of the stress followed by an inhibition of the IPN targets as the stress becomes more chronic. On the long term, *Otx2* ablation in the dMHB counteracts the hyper-responsiveness of HIPOPS neurons and stress-related circuits, correlated to an apparent protection to develop stress-induced anxiety. This suggests that genetic factors, such as *Otx2*, interact with environmental stress at the level of the HIPOPS, during critical period of development. This also suggests that blocking this interaction, by deletion of *Otx2* in the dMHB, leads to a form of resilience to develop anxiety in the adult. Finally, it suggests that HIPOPS neurons may drive this long-term anxiety and that the experience of stress by the HIPOPS, during juvenile period, conditions the response of stress-related circuits to later stress-experiences.

Discussion

In this study, we have shown that chronic restraint stress during the sexual maturation period specifically induces the HIPOPS among HIPS circuits and renders the animals more prone to develop high levels of anxiety. This type of stress did not seem to affect levels of depressive-like behavior, as far as can be judged from the tests carried out, that are validated ways to measure depression. However, a potential role of the HIPOPS in modulating susceptibility to depression may have gone unnoticed as the stress used could not induce these types of symptoms. While we cannot therefore conclude on a potential role of the HIPOPS in depression, this study clearly shows its implication in stress-induced anxiety.

We showed that upon acute stress, HIPOPS neurons are not very responsive, with the exception of PNN⁺ neurons. This was particularly true from P36 stage. Indeed, an acute stress at P30 did not follow the same rule. At that stage, many neurons of the HIPOPS could be activated and they were mostly not located in the PNN region (see Fig.8). Interestingly, the first PNN detection with WFA in the HIPOPS is P36 (Fjerdingstad et al.; preliminary results). Thus, maturation of PNN⁺ cells coincide with acute stress response specifically in these cells and not in other HIPOPS neurons. This could indicate that from that time point, activation of other HIPOPS neurons by an acute stress is inhibited by GABAergic cells in the region such as the PNN⁺ cells. This, of course, would require additional investigation. Whether or not the maturation of PNN⁺ cells is involved in the hyperactivity or the following hypo-responsiveness seen during a chronic stress between P30-36, is still speculative. However, maturation of PV⁺ cells have been shown to control the opening and closure of critical periods in other brain regions (Refs Cortex visuel et auditif). It is thus of particular interest that this period corresponds also to the most sensitive period of HIPOPS activation. One scenario would be that the environmental stress experienced at that period would set on the long term the final sensitivity to stress of the HIPOPS, through activation of the habenula and maturation of PNN⁺ cells. The more quickly the habenula responds the more rapid the maturation of the PV cells would occur and finally, the more resistant the HIPOPS would become to stress-induction.

The hyper-responsive habenula at the beginning of the stress period in *Otx2* cKO between P30 and P36 is somewhat difficult to reconcile with a long-term protection against anxiety. Indeed, in controls, a strong activation of the habenula correlates with increased chronicity which is a known factor of higher susceptibility to develop anxiety. It would, therefore, be expected that a strong activation of the habenula in the *Otx2* cKO would lead to higher anxiety in the adult. However, this hyper-activation in *Otx2* cKO is rapidly followed by a hypo-responsive phase. This hyporesponsive phase may thus represent the long-term status of the IPN. For instance, PNN⁺ cells are only detected from P36 on. Thus, the IPN is hyporesponsive at that moment in the cKO, and it may be that status that is locked by the appearance of PNN structures. Whether or not PNNs are involved in the process, this hyporesponsive phase may explain why individuals with certain genetic background may develop resistance instead of susceptibility to disease following a trauma. In this line of idea, a lower level of *Otx2* may be an

important factor to become resilient to stress-induced anxiety, at least at these developmental periods. This correlates well with the hypo-anxiety that has been described in *Otx2* heterozygote mice (Prochiantz et al.; unpublished observations).

To demonstrate HIPOPS sensitivity to stress, we measured activation of immediate early genes such as *Egr1* and *Fos*. Thus, we did not directly monitor neuronal activity. In fact, if we consider *Egr1*, it is regulated by a wide variety of environmental stimuli, including stress, and can regulate a large transcriptional program related to neuronal activity but also synaptic plasticity (Minatohara et al., 2015; Gallo et al., 2018). As a result, *Egr1* represents a key factor both in integrating environment's perception and in translating the appropriate response. It is therefore not surprising to find *Egr1* associated with neuropsychiatric disorders in which neuronal plasticity and activity are altered, such as stress-related anxiety and mood disorders (Gallo et al., 2018). Whether or not they were monitoring direct neuronal activity, the changes in *Egr1* levels that we found are significant and may be even more valuable than direct monitoring, as they reflect neuronal activity or plasticity to stress. A thorough electrophysiological correlate of these changes is needed to understand more clearly these responses.

This protection against stress-induced anxiety was unlikely to be explained by the rare cells recombined in the other two sites, the retina or the cerebellum. Indeed, even complete deletion of *Otx2* in the photoreceptors does not lead to differences in EPM or OF (Pensieri et al.; unpublished observation). Furthermore, we did not detect any motor abnormality that could have been the result of cerebellar dysfunction.

Animal models of stress-induced anxiety and mood disorders have largely focused on pre-weaning period or on the adult. Here we found that the sexual maturation period is particularly involving the HIPOPS in stress response. In fact, this period of development is a known vulnerability window. Indeed, anxiety, depression, schizophrenia, and drug abuse are markedly elevated during these periods (Dahl, 2004; Patton and Viner, 2007) and exposure to stress plays a significant role (Grant et al., 2004). A systematic study in rodent models has confirmed that these periods are in fact the most sensitive time-points for the development of stress-induced psychopathologies (Cymerblit-Sabba et al., 2015). It is therefore of high importance to study more deeply HIPOPS role during this period as it may hold the key to susceptibility versus resilience to stress-induced anxiety.

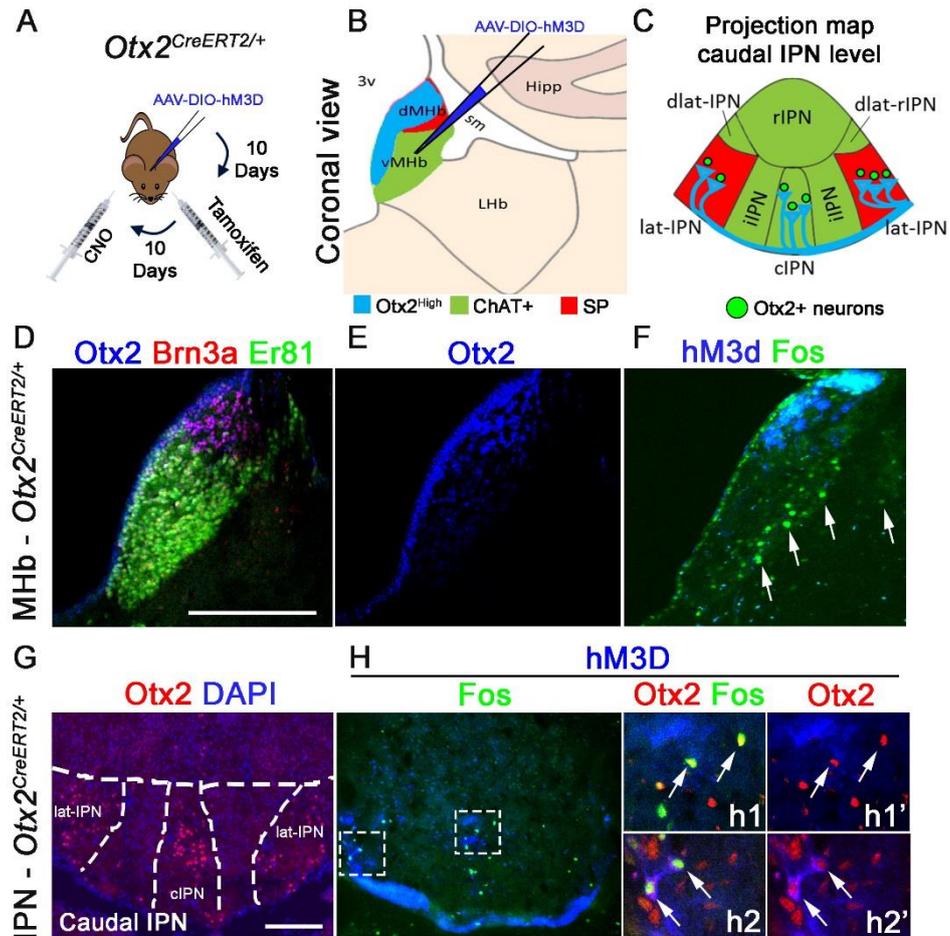


Figure 1. Effects of $Otx2^{High}$ neurons chemo-activation in the MHb. **A**, Schematic representation of the activating DREADD induction in the $Otx2^{High}$ neurons of the MHb in $Otx2^{CreERT2/+}$ mice ($n=3$). **B**, Schematic illustration of an MHb coronal section representing the localization of substance P+ (in red), ChAT+ (in green), $Otx2^{High}$ (in blue) neurons. **C**, Schematic illustration of an IPN coronal section representing the $Otx2^{High}$ substance P-ergic (in red) and cholinergic (in green) neurons projections and localization of the $Otx2+$ neurons of the IPN. **D-F**, Immunolabelling of MHb coronal sections for $Otx2$ (in blue), $Brn3a$ (in red), $Er81$ (in green) (**D-E**), and in an adjacent section hM3D (in blue), Fos (in green) (**F**). The arrows represent the Fos+ neurons outside of the $Otx2^{High}$ area of the MHb. **G-H**, Immunolabelling of IPN coronal sections for $Otx2$ (in red) and DAPI staining (in blue) (**G**), and in an adjacent section Fos (in green) and hM3D (in blue) (**H**). **h1-h2'**, Immunolabelling of hM3D (in blue), Fos (in green) on a higher magnification of the c-IPN (central subnucleus of the caudal IPN) (**h1-h1'**) and of the lat-IPN (lateral subnuclei of the caudal IPN) (**h2-h2'**). The arrows represent the overlap of hM3D, Fos and $Otx2$ labelling. Scale bar, 100 μm .

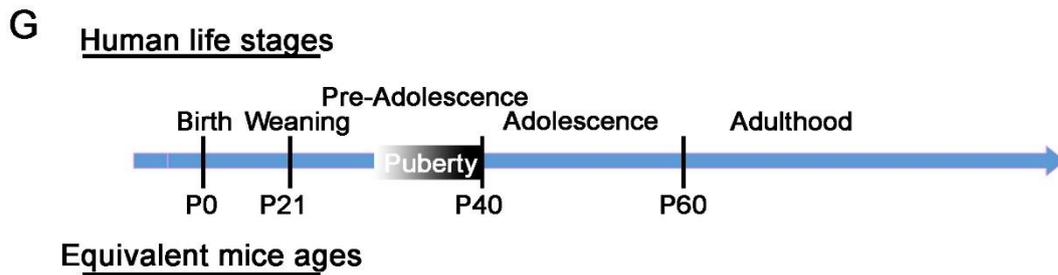
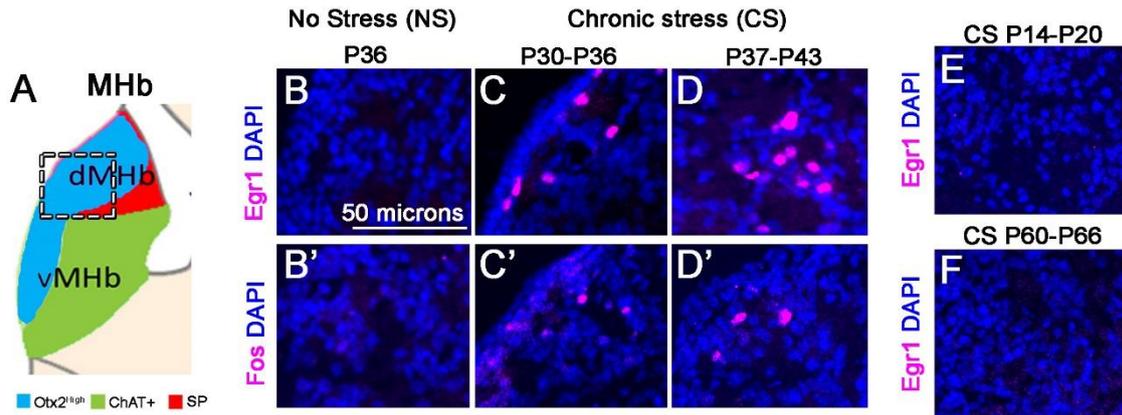


Figure 242. Neuronal activity of the MHb in response to a chronic stress endured at different postnatal periods. A, Schematic representation of an MHb coronal section representing the localization of substance P⁺ (in red), ChAT⁺ (in green), Otx2^{High} (in blue) neurons and the area of strong expression of Egr1 and Fos in response to a chronic stress (framed) represented between (B-F et B'-D'). B-F, Immunolabelling of coronal sections for Egr1 (in magenta) corresponding to the area framed in A and DAPI staining (in blue) in the absence of stress at P36 (n=3) (B), in response to a chronic stress between P30-36 (n=2) (C), between P37-43 (n=3) (D), between P14-20 (n=2) (E), between P60-66 (n=2) (F), respectively. B'-D', Immunolabelling in coronal sections showing the area framed in A for Fos (in magenta) and DAPI staining (in blue) in the absence of stress at P36 (B'), in response to a chronic stress between P30-36 (n=2) (C'), between P37-43 (n=3) (D'), respectively. Scheme comparing the different stages of a human life and the mice equivalent age (G).

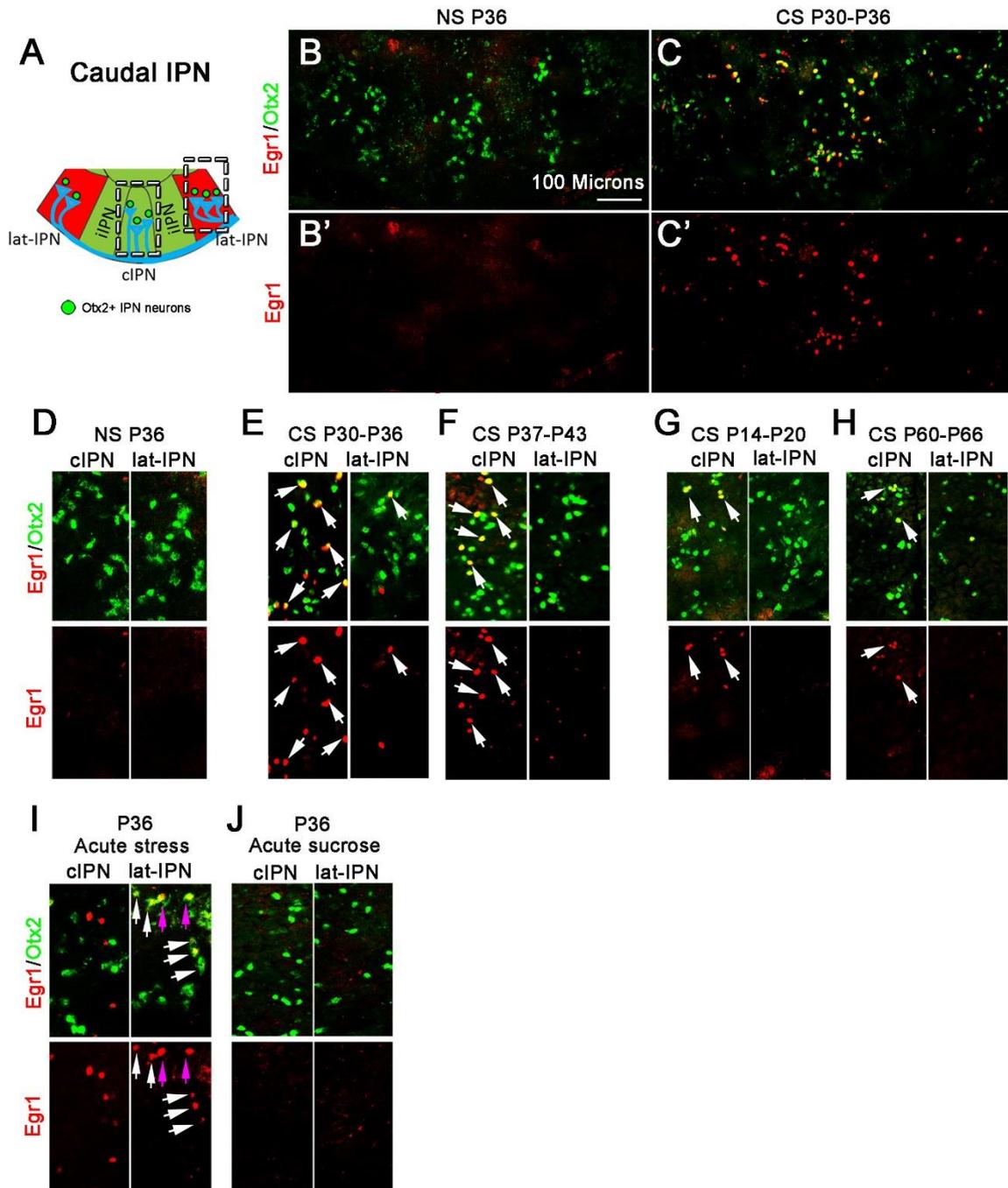


Figure 3. Neuronal activity of the IPN in response to a stress endured at different post-natal periods. A, Schematic illustration of caudal IPN coronal sections where Otx2^{High} substance P-ergic (in red) and cholinergic (in green) neurons of the MHb project and localization of the Otx2⁺ neurons of the IPN. The areas framed correspond to the central (cIPN) and lateral (lat-IPN) caudal IPN. B-C', Immunolabelling of the caudal IPN coronal sections for Egr1 (in red) and Otx2 (in green) without stress P36 (B et B') and in response to a chronic stress between P30-36 (C et C'). D-J, Immunolabelling of coronal sections representing the area framed in (A) for Egr1 (in red) and Otx2 (in green) without stress P36 (B et B') and in response to a chronic stress between P30-36, showed entirely in (C and C') (n=2) (E), in response to a chronic stress between P37-43 (n=3) (F) between P14-20 (n=2) (G) between P60-66 (n=2) (H), in response to an acute stress at P36 (n=2) (I), in response to an acute sucrose consumption at P36 (n=2) (J). The white arrows indicate an overlap of Egr1 and Otx2. The magenta arrows indicate the same neurons as in Figure 37.

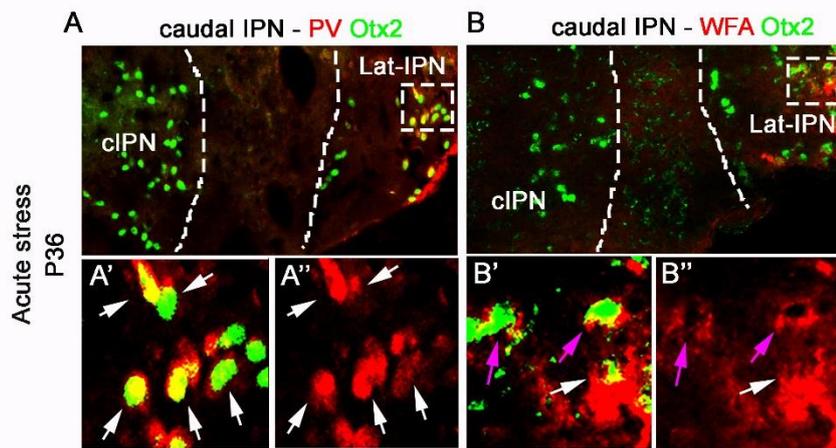


Figure 4. Molecular signature of the Otx2+ neurons in the lateral and central subnuclei of the IPN. **A**, Immunolabelling of IPN coronal sections for PV (in red) and Otx2 (in green) in an acute stress condition at P36. **A'-A''**, zoom on the area framed on (**A**). The white arrows show the superposition of the PV and Otx2 labelling. **B**, Immunolabelling of the IPN coronal sections for WFA, binding to PNNs, (in red) and Otx2 (in green) in a condition of acute stress at P36. **B'-B''**, High magnification of the area framed in **B**. The white arrows show the superposition of WFA and Otx2. The magenta arrows show the same Egr1+ neurons after the acute stress in the **figure 36**.

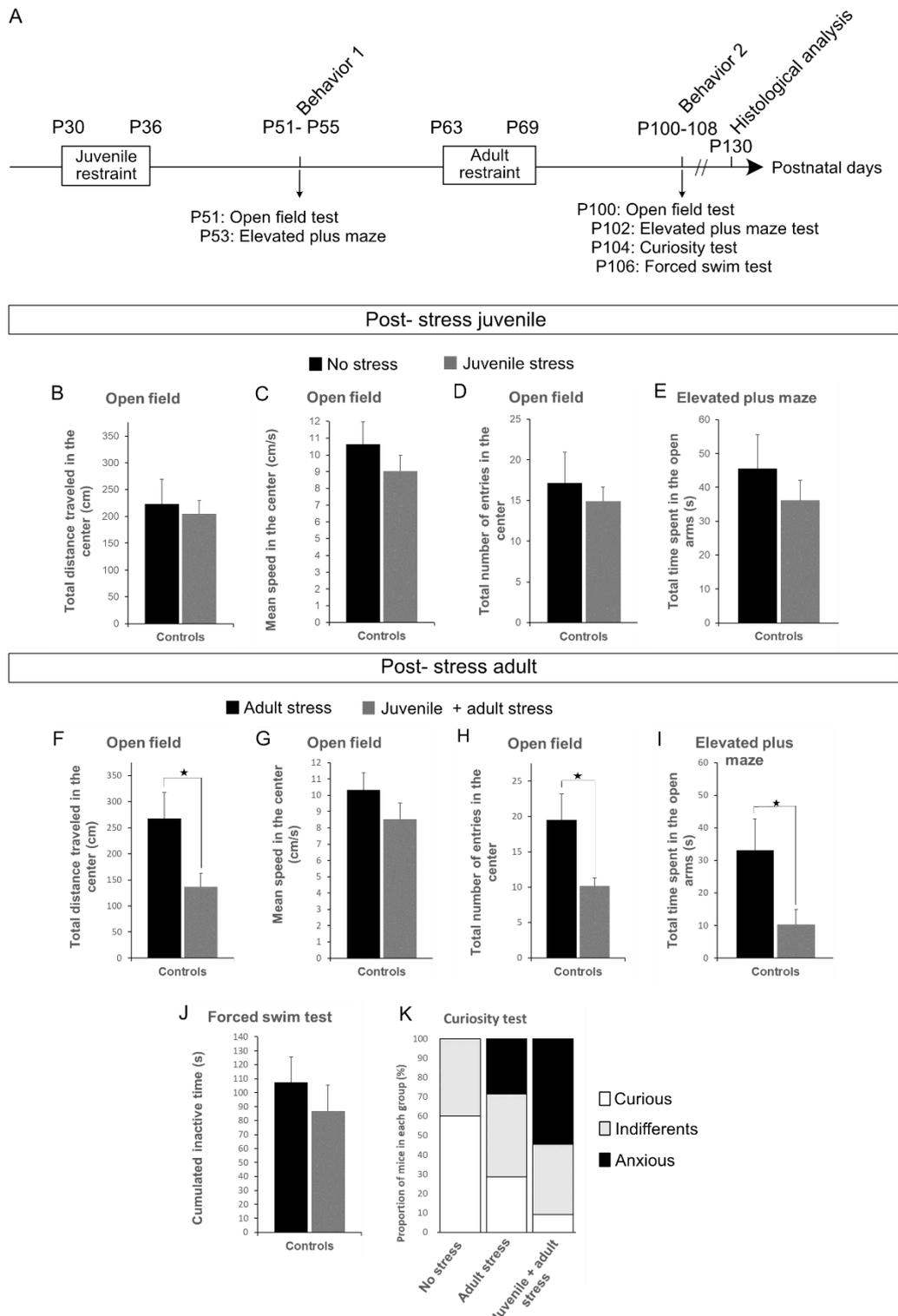


Figure 5. Effects of the adolescent stress on the level of anxiety and depression in the long-term. **A**, Illustration of the experimental protocol. **B-E**, Comparative results between no stress (n=6-7) and preadolescent stress (n=10-12) condition from de P51 comprising a measure of the total distance traveled (**B**), the mean speed (**C**) and the total number of entries (**D**) in the center of the open field test, total time spent in the open arms of the elevated plus maze (**E**). **F-K**, Comparative results of the same mice from P100 after the adult chronic stress comprising a measure of the total distance traveled (**F**), mean speed (**G**) and total number of entries (**H**) in the center of the open field test, total time spent in the open arms of the elevated plus maze (**I**), the cumulated inactive time in the forced swim test (**J**), the percentage of mice in the subgroups curious, indifferent and anxious in the curiosity test (**K**). The error bars represent the SEM. *P < 0.05, bilateral t-test

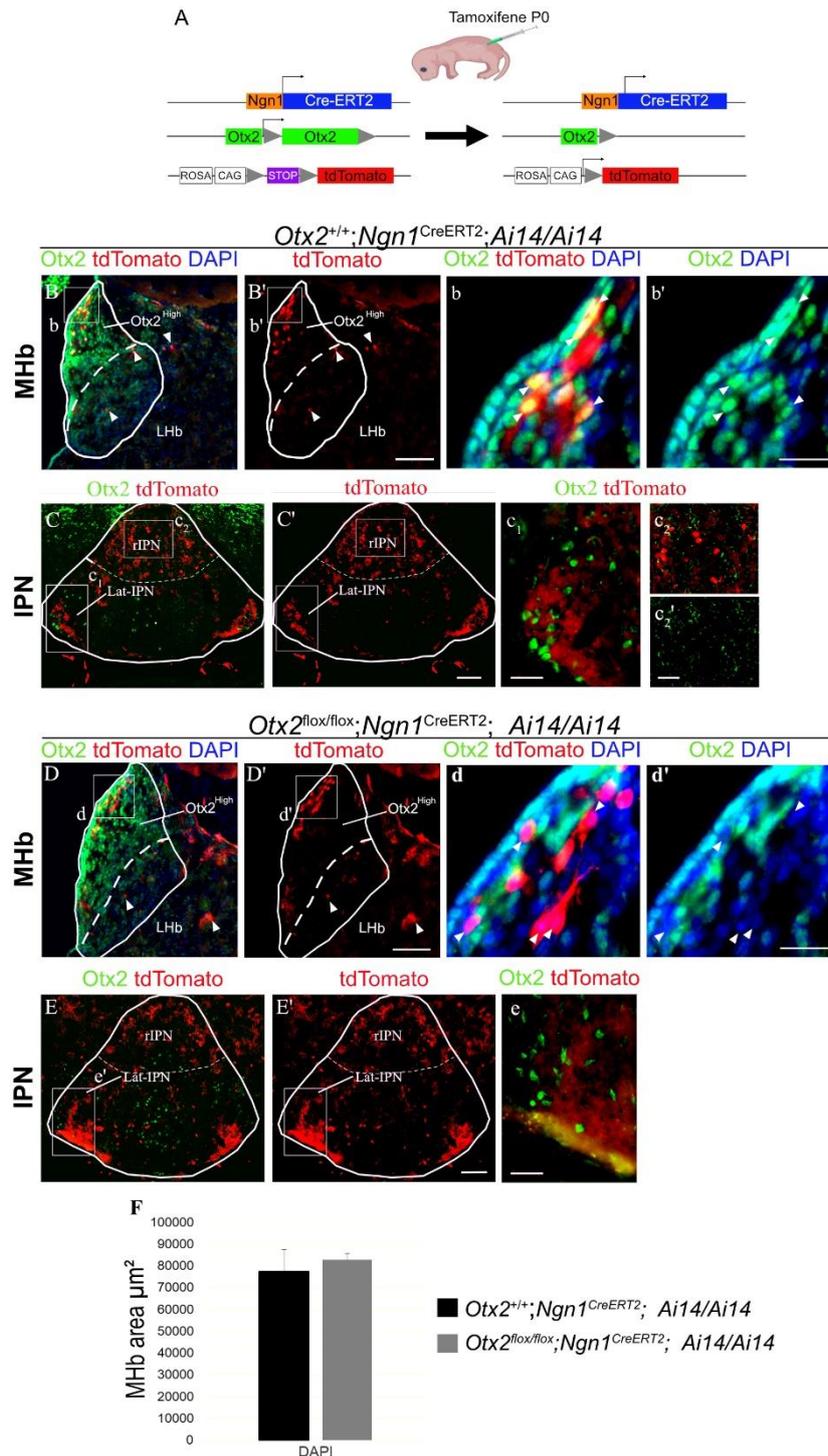
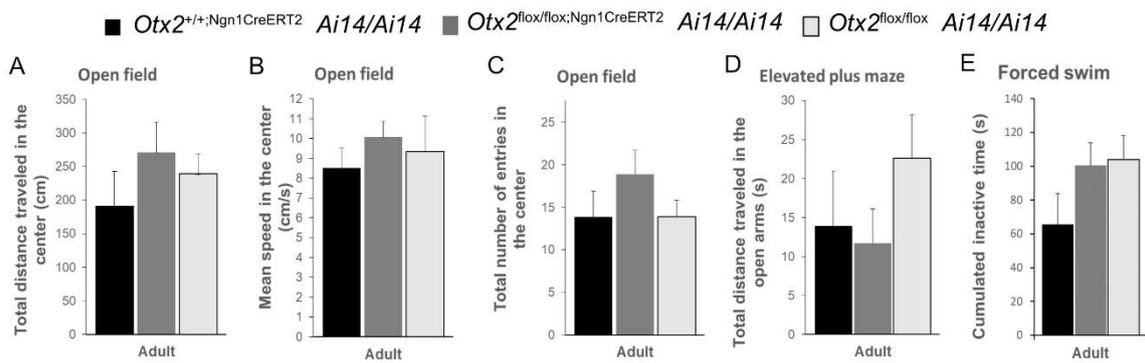


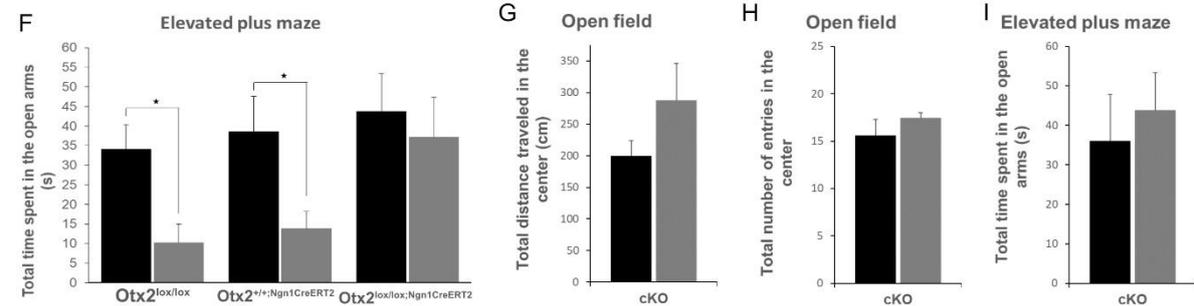
Figure 6. tdTomato expression and *Otx2* deletion effects on the HIPS. **A**, Scheme representing the genetic combination used to induce the recombination to follow the recombined *Otx2* cKO neurons. **B-C'**, Immunolabelling of coronal sections for *Otx2* (in green) tdTomato (in red), DAPI (in blue) in the MHb (**B-B'**) and in the IPN (**C-C'**) in control mice (n=3). The arrows represent the tdTomato+ glial cells. **b-b'**, Higher magnification of the area framed in **B**. The arrows represent the overlap of *Otx2* and Tomato. **c**, Higher magnification of the area framed in **C**. **c₁** et **c₂'**, Higher magnification of the area framed in **c** showing the Lat-IPN (**c₁**) and rIPN (**c₂** and **c₂'**). **D-E'**, Immunolabelling of coronal sections for *Otx2* (in green) tdTomato (in red), DAPI (in blue) in the MHb (**D-D'**) and in the IPN (**E-E'**) in *Otx2* cKO mice (n=3). The arrows represent the overlap of *Otx2* and tdTomato. **e**, Higher magnification of the area framed in **E**. **F**, Measure of the total surface of the MHb in μm² in controls (n=3) and in cKO mice (n=3). Scale bars: B', C', D', E' = 100 μm. c, e = 50 μm. b', c₁': 25 μm. The error bar represents the SEM

No stress



With stress

■ Juvenile stress ■ Juvenile + adult stress ■ No stress ■ Juvenile stress



■ Adult stress ■ Juvenile stress + adult

□ Curious □ Indifferent ■ Anxious

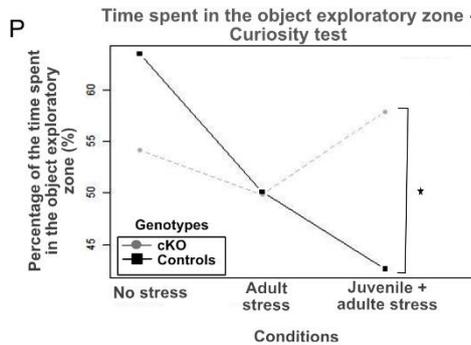
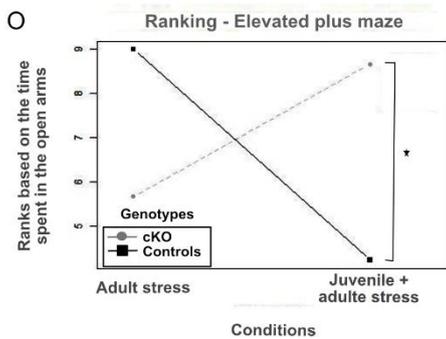
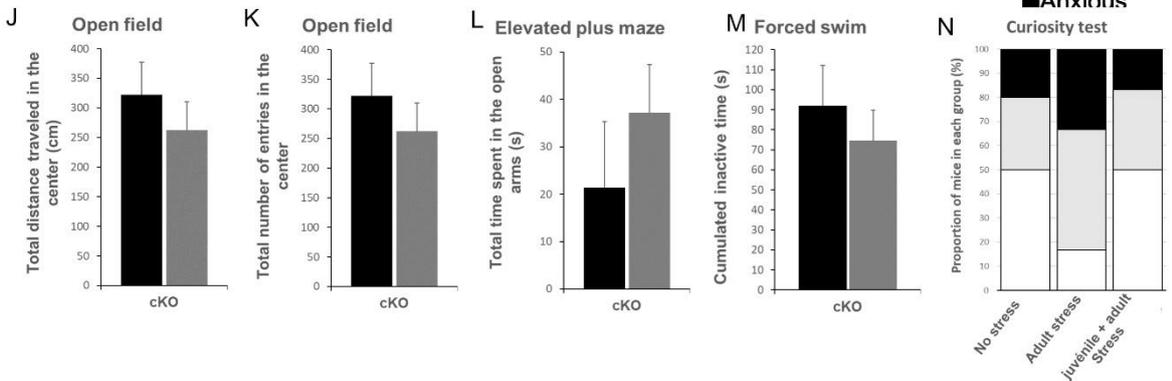


Figure 7. Effects of Otx2 deletion alone and in interaction with chronic stress. **A-E**, Comparative results between *Otx2^{lox/lox};Ai14/Ai14* (n=10), *Otx2^{+/+};Ngn1Cre^{ERT2};Ai14/Ai14* (n=7) control mice and cKO (n=8-10) condition without stress on the anxiety levels (**A-D**) and depression (**E**) comprising a measure of the total distance traveled (**A**), the mean speed (**B**) and the total number of entries (**C**) in the center of the open field test, the total time spent in the open arms of the elevated plus maze (**D**), the cumulated inactive time in the forced swim test (**E**). **F**, Comparative results between the effects of the juvenile stress and the adult stress in *Otx2^{lox/lox};Ai14/Ai14* (n=10-12) and *Otx2^{+/+};Ngn1Cre^{ERT2};Ai14/Ai14* (n=6) control mice and in cKO mice (n=12) on the anxiety level. **G-I**, Comparative results between not stressed mice (n=5-6) and the mice that underwent the preadolescent stress (n=12) from P51 comprising a measure of the distance traveled (**G**), total number of entries (**H**) in the center of the open field test, total time spent in the open arms of the elevated plus maze (**I**). **J-N**, Comparative results of the same mice from P100 after the adult chronic stress comprising a measure of the distance traveled (**J**), the total number of entries (**K**) in the center of the open field test, the total time spent in the open arms of the elevated plus maze (**L**) the cumulated inactive time in the forced swim test (**M**), the percentage of mice in the curious, indifferent and anxious subgroup (**N**). **O**, Interaction plot representing the effect of Otx2 deletion and juvenile chronic stress associated with the adult stress on the time spent in the open arms of the elevated plus maze (F(3,30)=0,1098, interaction effect p=0,0249). **P**, Interaction plot representing the effect of Otx2 deletion and adult stress or juvenile chronic stress associated with the adult stress on the time spent in the exploratory area in the presence of an object (F(1,38)= 6,7127, Interaction effect p=0, 01350). The error bars represent the SEM. *P < 0.05, one-way ANOVA for the figures **A-E**, bilateral t-test for the figures **F-M**, two-way ANOVA for the figures **O et P**

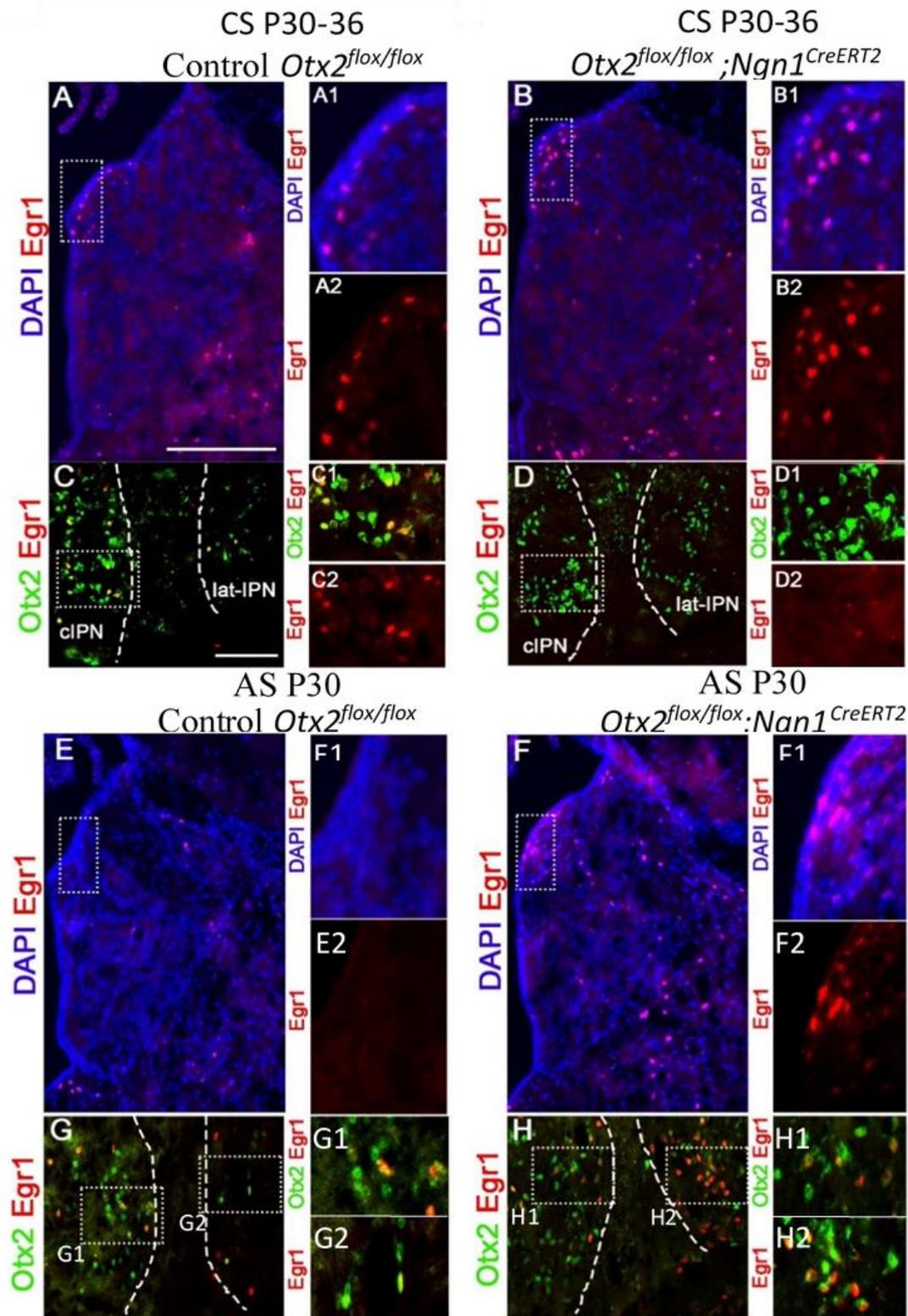


Figure 8. Effects of *Otx2* deletion in the MHB on the response to preadolescent stress. A-B and E-F, Immunolabelling of MHB coronal sections for *Egr1* (in red) and DAPI (in blue) in controls (n=3) (E) and in cKO that underwent a chronic stress between P30-36 (B) and an acute stress at P30 (n=3) (F). A1-A2, Higher magnification of the area framed in A. B1-B2, Higher magnification of the area framed in B. E1-E2, Higher magnification of the area framed in E. F1-F2, Higher magnification of the area framed in F. C-D and G-H, Immunolabelling of IPN coronal sections for *Egr1* (in red) and *Otx2* (in green) in controls that underwent a chronic stress between P30-36 (n=3) (C), an acute stress at P30 (n=3) (G) and in cKO mice that underwent a chronic stress between P30-36 (n=2) (D) and acute stress at P30 (n=3) (H). C1-C2, Higher magnification of the area framed in C. D1-D2, Higher magnification of the area framed in D. G1-G2, Higher magnification of the area framed in G. H1-H2, Higher magnification of the area framed in (H).

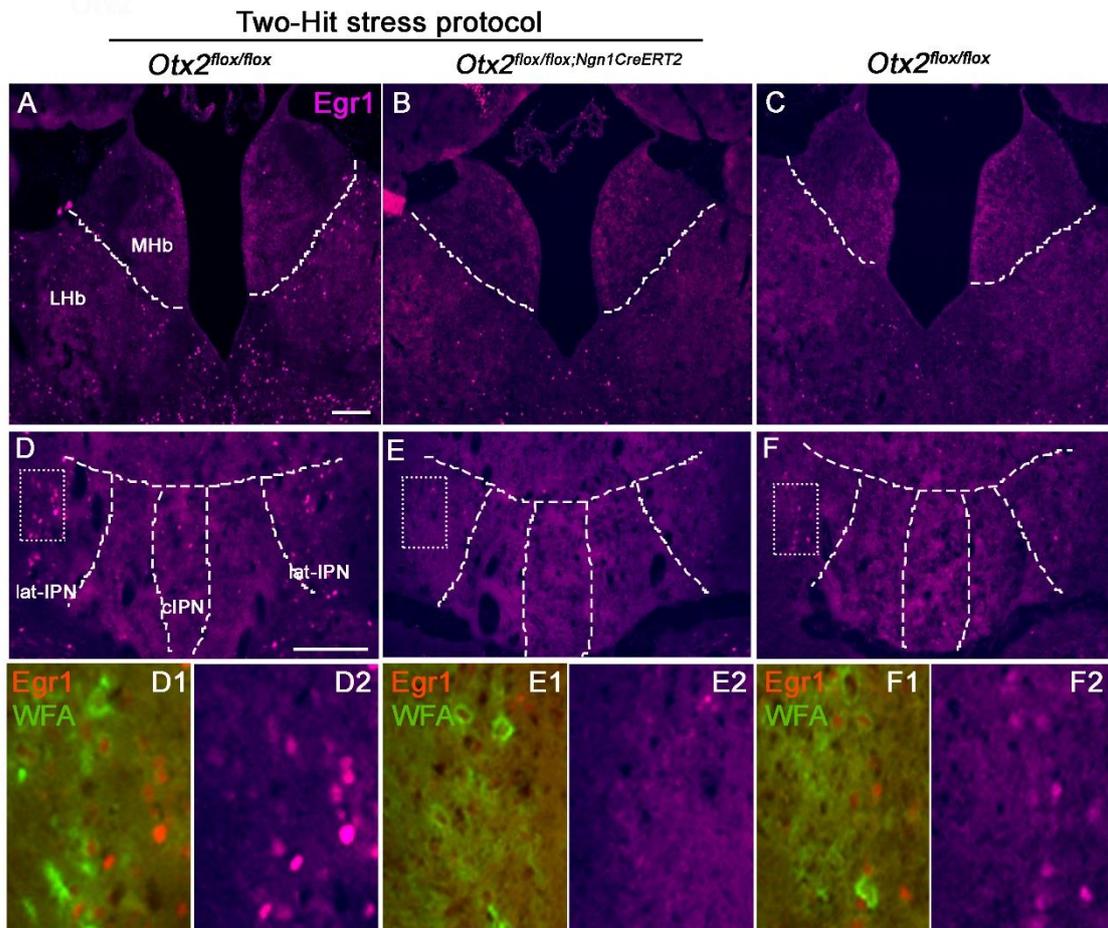


Figure 9. Effects of *Otx2* deletion in the dMHb on the neuronal activity of the HIPOPS in the long-term in response to a last acute stress. **A and D**, Immunolabelling of coronal sections for *Egr1* (in magenta) after the “2-hit stress” protocol followed by a last acute stress in controls (n=4) in the MHb (**A**) and IPN (**D**), and in cKO (n=3) in the MHb (**B**) and IPN (**E**). **C and F**, Immunolabelling of coronal sections for *Egr1* (in magenta) in controls that only endured the acute stress before the sacrifice (n=2) in the MHb (**C**) and IPN (**F**). **D1-F2**, Higher magnification of the area framed in (**D**), (**E**), (**F**) labelled with WFA (in green), *Egr1* (in red) in control (**D1 et D2**) and cKO mice that underwent the “2-hit stress” protocol followed by the last acute stress (**E1 et E2**) and in control mice that only endured the last acute stress before the sacrifice (**F1 et F2**)

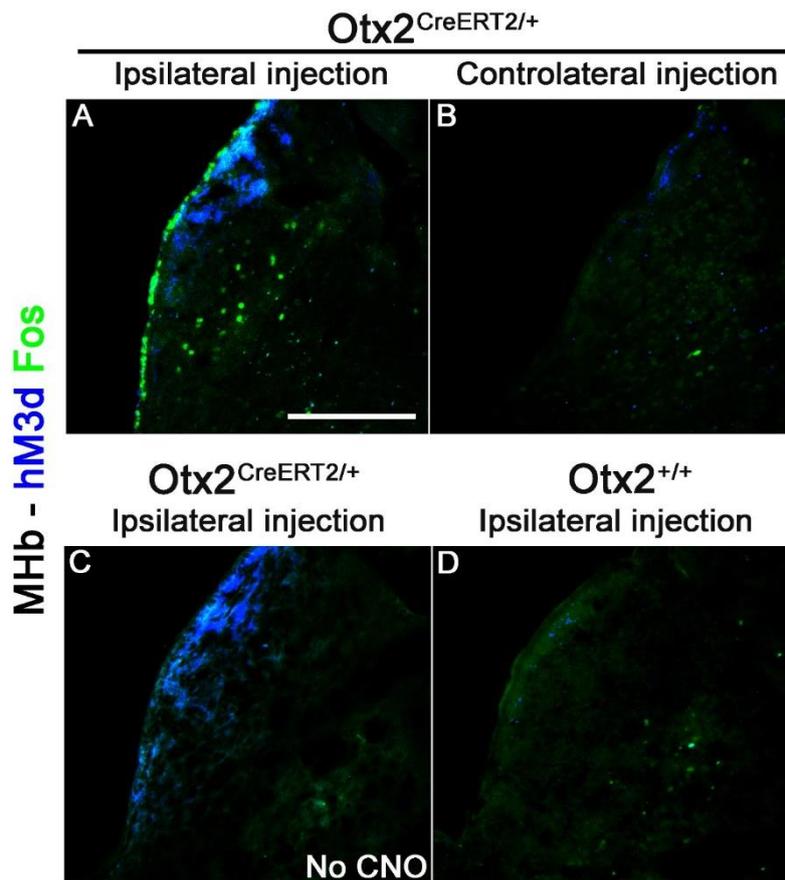


Figure S1. Controls of Otx2^{High} neurons chemoactivation in the MHb. A-C, Immunolabelling of MHb coronal sections for hM3d (in blue) and Fos (in green), in *Otx2^{CreERT2/+}* mice injected with CNO (n=3) in the ipsilateral side transfected with the activating DREADD (A), in the controlateral side not transfected (B), and in mice not injected with CNO (n=2) (C). D, Immunolabelling in *Otx2^{CreERT2/+}* mice transfected with an activating DREADD injected with CNO (n=3). Scale bar : 100 μ m

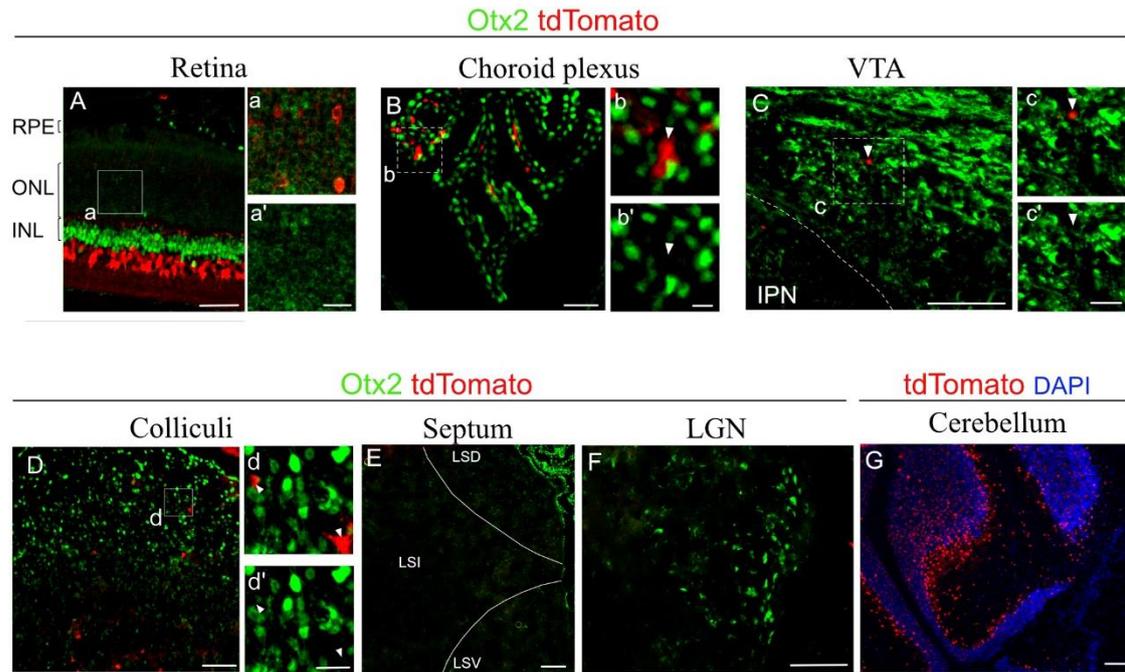


Figure S2. Regions expressing Otx2 and TdTomato. A-F, Immunolabelling for Otx2 (in green) and tdTomato (in red) of retina sections (A), and coronal section of the choroid plexus (B), VTA (C), colliculi (D), septum (E) and LGN (F). **a-a'**, Higher magnification of the area framed in A. **b-b'**, Higher magnification of the area framed in B. **c-c'**, Higher magnification of the area framed in C. **d-d'**, Higher magnification of the area framed in D. G, Immunolabelling of cerebellum coronal section for tdTomato (in red) and DAPI (in blue). RPE : retinal pigmented epithelium. ONL : outer nuclear layer containing photoreceptors. INL : inner nuclear layer containing bipolar cells. LSD : lateral septum dorsal part. LSI : lateral septum intermediate part. LSV : lateral septum ventral part. LGN : lateral geniculate nucleus. Barre d'échelle : A-G = 100 μ m. a', b', c', d' = 25 μ m

- 1 Hegde, A. & Mitra, R. Environment and early life: Decisive factors for stress-resilience and vulnerability. *Int Rev Neurobiol* **150**, 155-185, doi:10.1016/bs.irm.2019.12.002 (2020).
- 2 Horovitz, O., Tsoory, M. M., Hall, J., Jacobson-Pick, S. & Richter-Levin, G. Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. *Neuroendocrinology* **95**, 56-64, doi:10.1159/000331393 (2012).
- 3 Callaghan, B. L., Graham, B. M., Li, S. & Richardson, R. From resilience to vulnerability: mechanistic insights into the effects of stress on transitions in critical period plasticity. *Front Psychiatry* **4**, 90, doi:10.3389/fpsy.2013.00090 (2013).
- 4 Pena, C. J., Nestler, E. J. & Bagot, R. C. Environmental Programming of Susceptibility and Resilience to Stress in Adulthood in Male Mice. *Front Behav Neurosci* **13**, 40, doi:10.3389/fnbeh.2019.00040 (2019).
- 5 Seewoo, B. J. *et al.* Validation of Chronic Restraint Stress Model in Young Adult Rats for the Study of Depression Using Longitudinal Multimodal MR Imaging. *eNeuro* **7**, doi:10.1523/ENEURO.0113-20.2020 (2020).
- 6 Chiba, S. *et al.* Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **39**, 112-119, doi:10.1016/j.pnpbp.2012.05.018 (2012).
- 7 Price, J. L. & Drevets, W. C. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* **35**, 192-216, doi:10.1038/npp.2009.104 (2010).
- 8 McLaughlin, I., Dani, J. A. & De Biasi, M. The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *J Neurochem* **142 Suppl 2**, 130-143, doi:10.1111/jnc.14008 (2017).
- 9 Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T. & Nakanishi, S. Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* **78**, 537-544, doi:10.1016/j.neuron.2013.02.035 (2013).
- 10 Hsu, Y. W. *et al.* Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. *J Neurosci* **34**, 11366-11384, doi:10.1523/JNEUROSCI.1861-14.2014 (2014).
- 11 Ruiz-Reig, N. *et al.* Developmental requirement of homeoprotein Otx2 for specific habenulo-interpeduncular subcircuits. *J Neurosci*, doi:10.1523/JNEUROSCI.1818-18.2018 (2018).
- 12 Sen, S., Reichert, H. & VijayRaghavan, K. Conserved roles of *ems/Emx* and *otd/Otx* genes in olfactory and visual system development in *Drosophila* and mouse. *Open Biol* **3**, 120177, doi:10.1098/rsob.120177 (2013).
- 13 Ranade, S. S. *et al.* Analysis of the Otd-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates. *Dev Biol* **315**, 521-534, doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.017 (2008).
- 14 Pena, C. J. *et al.* Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science* **356**, 1185-1188, doi:10.1126/science.aan4491 (2017).
- 15 Lee, H. H. C. *et al.* Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol Psychiatry* **22**, 680-688, doi:10.1038/mp.2017.1 (2017).
- 16 Hensch, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**, 877-888, doi:10.1038/nrn1787 (2005).
- 17 Reh, R. K. *et al.* Critical period regulation across multiple timescales. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 23242-23251, doi:10.1073/pnas.1820836117 (2020).
- 18 Maheu, M. E. & Ressler, K. J. Developmental pathway genes and neural plasticity underlying emotional learning and stress-related disorders. *Learn Mem* **24**, 492-501, doi:10.1101/lm.044271.116 (2017).
- 19 Sabunciyan, S. *et al.* Polymorphisms in the homeobox gene OTX2 may be a risk factor for bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144B**, 1083-1086, doi:10.1002/ajmg.b.30523 (2007).
- 20 Fossat, N., ChATelain, G., Brun, G. & Lamonerie, T. Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* **7**, 824-830, doi:10.1038/sj.embor.7400751 (2006).

- 21 Koundakjian, E. J., Appler, J. L. & Goodrich, L. V. Auditory neurons make stereotyped wiring decisions before maturation of their targets. *J Neurosci* **27**, 14078-14088, doi:10.1523/JNEUROSCI.3765-07.2007 (2007).
- 22 Zangenehpour, S. & Chaudhuri, A. Differential induction and decay curves of Fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 221-225, doi:10.1016/s0169-328x(02)00556-9 (2002).
- 23 Sun, N. N., Sha, L. Z. & Xu, Q. Establishment of a chronic restraint stress model of depression with C57BL/6J mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **37**, 8-11, doi:10.3881/j.issn.1000-503X.2015.01.002 (2015).
- 24 Shoji, H. & Miyakawa, T. Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacol Rep* **40**, 73-84, doi:10.1002/npr2.12093 (2020).
- 25 Kim, E. J. *et al.* Spatiotemporal fate map of neurogenin1 (Neurog1) lineages in the mouse central nervous system. *J Comp Neurol* **519**, 1355-1370, doi:10.1002/cne.22574 (2011).
- 26 Hikosaka, O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* **11**, 503-513, doi:10.1038/nrn2866 (2010).
- 27 Bouarab, C., Thompson, B. & Polter, A. M. VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Frontiers in neural circuits* **13**, 78, doi:10.3389/fncir.2019.00078 (2019).
- 28 Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H. & Weisstaub, N. V. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on Fos, Egr1 and Arc. *Front Behav Neurosci* **12**, 79, doi:10.3389/fnbeh.2018.00079 (2018).
- 29 Minatohara, K., Akiyoshi, M. & Okuno, H. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front Mol Neurosci* **8**, 78, doi:10.3389/fnmol.2015.00078 (2015).
- 30 Patton, G. C. & Viner, R. Pubertal transitions in health. *Lancet* **369**, 1130-1139, doi:10.1016/S0140-6736(07)60366-3 (2007).
- 31 Dahl, R. E. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci* **1021**, 1-22, doi:10.1196/annals.1308.001 (2004).
- 32 Grant, K. E., Compas, B. E., Thurm, A. E., McMahon, S. D. & Gipson, P. Y. Stressors and child and adolescent psychopathology: measurement issues and prospective effects. *J Clin Child Adolesc Psychol* **33**, 412-425, doi:10.1207/s15374424jccp3302_23 (2004).
- 33 Cymerblit-Sabba, A. *et al.* Mapping the developmental trajectory of stress effects: pubescence as the risk window. *Psychoneuroendocrinology* **52**, 168-175, doi:10.1016/j.psyneuen.2014.11.012 (2015).

Bibliographie

- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121:3279-3290.
- Acampora D, Annino A, Tuorto F, Puellas E, Lucchesi W, Papalia A, Simeone A (2005) *Otx* genes in the evolution of the vertebrate brain. *Brain Res Bull* 66:410-420.
- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Barone P, Perera M, Choo D, Wu D, Corte G, Simeone A (1999) Differential transcriptional control as the major molecular event in generating *Otx1*^{-/-} and *Otx2*^{-/-} divergent phenotypes. *Development* 126:1417-1426.
- Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, Nakayama R, Takahoko M, Goto M, Sassa T, Amo R, Shiraki T, Kawakami K, Hosoya T, Higashijima S, Okamoto H (2010) The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci* 13:1354-1356.
- Aguggia JP, Suárez MM, Rivarola MA (2013) Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res* 248:25-31.
- Aizawa H, Amo R, Okamoto H (2011) Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci* 5:138.
- Aizawa H, Kobayashi M, Tanaka S, Fukai T, Okamoto H (2012) Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J Comp Neurol* 520:4051-4066.
- Aizawa H, Bianco IH, Hamaoka T, Miyashita T, Uemura O, Concha ML, Russell C, Wilson SW, Okamoto H (2005) Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. *Curr Biol* 15:238-243.
- Akers KG, Arruda-Carvalho M, Josselyn SA, Frankland PW (2012) Ontogeny of contextual fear memory formation, specificity, and persistence in mice. *Learn Mem* 19:598-604.
- Akil H (2005) Stressed and depressed. *Nat Med* 11:116-118.
- Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S (2009) The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 66:627-635.
- Andersen SL, Teicher MH (2008) Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci* 31:183-191.
- Ang SL, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J (1996) A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122:243-252.
- Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 7:8-17.
- Antonini A, Stryker MP (1993) Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science* 260:1819-1821.
- Baker KD, Den ML, Graham BM, Richardson R (2014) A window of vulnerability: impaired fear extinction in adolescence. *Neurobiol Learn Mem* 113:90-100.
- 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.
- Beby F, Lamonerie T (2013) The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp Eye Res* 111:9-16.
- Benson DL, Huntley GW (2012) Building and remodeling synapses. *Hippocampus* 22:954-968.
- Bernard C, Prochiantz A (2016) *Otx2*-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plast* 2016:7931693.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33-84.

- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9:65-73.
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee HH, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A (2012) Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci* 32:9429-9437.
- Beydoun H, Saftlas AF (2008) Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol* 22:438-466.
- Bolhuis JJ, Honey RC (1998) Imprinting, learning and development: from behaviour to brain and back. *Trends Neurosci* 21:306-311.
- Bondar NP, Lepeshko AA, Reshetnikov VV (2018) Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behav Neurol* 2018:1538931.
- Borgkvist A, Puelles E, Carta M, Acampora D, Ang SL, Wurst W, Goiny M, Fisone G, Simeone A, Usiello A (2006) Altered dopaminergic innervation and amphetamine response in adult Otx2 conditional mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 31:293-302.
- Bouarab C, Thompson B, Polter AM (2019) VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Frontiers in neural circuits* 13:78.
- Boyce WT, Ellis BJ (2005) Biological sensitivity to context: I. An evolutionary-developmental theory of the origins and functions of stress reactivity. *Dev Psychopathol* 17:271-301.
- Bromberg-Martin ES, Hikosaka O (2011) Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat Neurosci* 14:1209-1216.
- Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M, Babulas VP, Susser ES (2004) Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 61:774-780.
- Browne CA, Hammack R, Lucki I (2018) Dysregulation of the Lateral Habenula in Major Depressive Disorder. *Front Synaptic Neurosci* 10:46.
- Buynitsky T, Mostofsky DI (2009) Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1089-1098.
- Béby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T (2010) Otx2 gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration. *PLoS One* 5:e11673.
- Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, Do KQ (2013) Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9130-9135.
- Callaghan BL, Graham BM, Li S, Richardson R (2013) From resilience to vulnerability: mechanistic insights into the effects of stress on transitions in critical period plasticity. *Front Psychiatry* 4:90.
- Carlson PJ, Diazgranados N, Nugent AC, Ibrahim L, Luckenbaugh DA, Brutsche N, Herscovitch P, Manji HK, Zarate CA, Drevets WC (2013) Neural correlates of rapid antidepressant response to ketamine in treatment-resistant unipolar depression: a preliminary positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* 73:1213-1221.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.
- Chaby LE, Cavigelli SA, Hirrlinger AM, Caruso MJ, Braithwaite VA (2015) Chronic unpredictable stress during adolescence causes long-term anxiety. *Behav Brain Res* 278:492-495.

- Chatelain G, Fossat N, Brun G, Lamonerie T (2006) Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants. *J Mol Med (Berl)* 84:604-615.
- Chau KY, Chen S, Zack DJ, Ono SJ (2000) Functional domains of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor. *J Biol Chem* 275:37264-37270.
- Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39:112-119.
- Cho CH, Lee S, Kim A, Yarishkin O, Ryoo K, Lee YS, Jung HG, Yang E, Lee DY, Lee B, Kim H, Oh U, Im HI, Hwang EM, Park JY (2020) TMEM16A expression in cholinergic neurons of the medial habenula mediates anxiety-related behaviors. *EMBO Rep* 21:e48097.
- Contestabile A, Villani L, Fasolo A, Franzoni MF, Gribaudo L, Oktedalen O, Fonnum F (1987) Topography of cholinergic and substance P pathways in the habenulo-interpeduncular system of the rat. An immunocytochemical and microchemical approach. *Neuroscience* 21:253-270.
- Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS (2017) Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics* 14:687-697.
- Courtois V, Chatelain G, Han ZY, Le Novère N, Brun G, Lamonerie T (2003) New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J Neurochem* 84:840-853.
- Covington HE, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, LaPlant Q, Mouzon E, Ghose S, Tamminga CA, Neve RL, Deisseroth K, Nestler EJ (2010) Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 30:16082-16090.
- Curran B, O'Connor JJ (2001) The pro-inflammatory cytokine interleukin-18 impairs long-term potentiation and NMDA receptor-mediated transmission in the rat hippocampus in vitro. *Neuroscience* 108:83-90.
- Cymerblit-Sabba A, Zubedat S, Aga-Mizrachi S, Biady G, Nakhash B, Ganel SR, Shapira B, Grinstein D, Avital A (2015) Mapping the developmental trajectory of stress effects: pubescence as the risk window. *Psychoneuroendocrinology* 52:168-175.
- Daghfous G, Green WW, Alford ST, Zielinski BS, Dubuc R (2016) Sensory Activation of Command Cells for Locomotion and Modulatory Mechanisms: Lessons from Lampreys. *Front Neural Circuits* 10:18.
- Dahl RE (2004) Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci* 1021:1-22.
- Dao DQ, Perez EE, Teng Y, Dani JA, De Biasi M (2014) Nicotine enhances excitability of medial habenular neurons via facilitation of neurokinin signaling. *J Neurosci* 34:4273-4284.
- Darnaudéry M, Maccari S (2008) Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev* 57:571-585.
- Daviu N, Bruchas MR, Moghaddam B, Sandi C, Beyeler A (2019) Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiol Stress* 11:100191.
- de Araújo Costa Folha OA, Bahia CP, de Aguiar GPS, Herculano AM, Coelho NLG, de Sousa MBC, Shiramizu VKM, de Menezes Galvão AC, de Carvalho WA, Pereira A (2017) Effect of chronic stress during adolescence in prefrontal cortex structure and function. *Behav Brain Res* 326:44-51.

- de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC (2007) Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:168-179.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem* 281:17789-17800.
- DeGroot SR, Zhao-Shea R, Chung L, Klenowski PM, Sun F, Molas S, Gardner PD, Li Y, Tapper AR (2020) Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. *Biol Psychiatry* 88:855-866.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Di Giovannantonio LG, Di Salvio M, Omodei D, Prakash N, Wurst W, Pierani A, Acampora D, Simeone A (2014) Otx2 cell-autonomously determines dorsal mesencephalon versus cerebellum fate independently of isthmic organizing activity. *Development* 141:377-388.
- Di Salvio M, Di Giovannantonio LG, Omodei D, Acampora D, Simeone A (2010) Otx2 expression is restricted to dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in the adult brain. *Int J Dev Biol* 54:939-945.
- Doupe AJ (1997) Song- and order-selective neurons in the songbird anterior forebrain and their emergence during vocal development. *J Neurosci* 17:1147-1167.
- Duclot F, Kabbaj M (2017) The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci* 11:35.
- Durand S, Patrizi A, Quast KB, Hachigian L, Pavlyuk R, Saxena A, Carninci P, Hensch TK, Fagiolini M (2012) NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of Mecp2. *Neuron* 76:1078-1090.
- Eiland L, Romeo RD (2013) Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience* 249:162-171.
- El Nagar S, Chakroun A, Le Greneur C, Figarella-Branger D, Di Meglio T, Lamonerie T, Billon N (2018) Otx2 promotes granule cell precursor proliferation and Shh-dependent medulloblastoma maintenance in vivo. *Oncogenesis* 7:60.
- Ellison G (2002) Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:287-297.
- Facchin L, Duboué ER, Halpern ME (2015) Disruption of Epithalamic Left-Right Asymmetry Increases Anxiety in Zebrafish. *J Neurosci* 35:15847-15859.
- Fatemi SH, Folsom TD (2009) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 35:528-548.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Huang H, Oishi K, Mori S, Smee DF, Pearce DA, Winter C, Sohr R, Juckel G (2008) Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr Res* 99:56-70.
- Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A (2002) Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav* 73:233-245.

- Filipović D, Zlatković J, Gass P, Inta D (2013) The differential effects of acute vs. chronic stress and their combination on hippocampal parvalbumin and inducible heat shock protein 70 expression. *Neuroscience* 236:47-54.
- Fischer AG, Ullsperger M (2017) An Update on the Role of Serotonin and its Interplay with Dopamine for Reward. *Front Hum Neurosci* 11:484.
- Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T (2006) Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* 7:824-830.
- Fowler CD, Lu Q, Johnson PM, Marks MJ, Kenny PJ (2011) Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 471:597-601.
- Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ (2002) Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 22:7840-7843.
- Freudenmacher L, von Twickel A, Walkowiak W (2020a) The habenula as an evolutionary conserved link between basal ganglia, limbic, and sensory systems-A phylogenetic comparison based on anuran amphibians. *J Comp Neurol* 528:705-728.
- Freudenmacher L, Schauer M, Walkowiak W, von Twickel A (2020b) Refinement of the dopaminergic system of anuran amphibians based on connectivity with habenula, basal ganglia, limbic system, pallium, and spinal cord. *J Comp Neurol* 528:972-988.
- Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, Cepko CL (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice. *Nat Genet* 23:466-470.
- Galliot B, de Vargas C, Miller D (1999) Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Dev Genes Evol* 209:186-197.
- Gallo FT, Katche C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV (2018) Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on *c-Fos*, *Egr1* and *Arc*. *Front Behav Neurosci* 12:79.
- García-Guillén IM, Alonso A, Morales-Delgado N, Andrés B, Puelles L, López-Bendito G, Marín F, Aroca P (2020) *Netrin-1/DCC* Signaling Differentially Regulates the Migration of *Pax7*, *Nkx6.1*, *Irx2*, *Otp*, and *Otx2* Cell Populations in the Developing Interpeduncular Nucleus. *Front Cell Dev Biol* 8:588851.
- Germot A, Lecointre G, Plouhinec JL, Le Mentec C, Girardot F, Mazan S (2001) Structural evolution of *Otx* genes in craniates. *Mol Biol Evol* 18:1668-1678.
- Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL (2006) Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced *c-fos* expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* 138:1067-1081.
- Glick SD, Sell EM, Maisonneuve IM (2008) Brain regions mediating $\alpha 3\beta 4$ nicotinic antagonist effects of 18-MC on methamphetamine and sucrose self-administration. *Eur J Pharmacol* 599:91-95.
- Golding B, Pouchelon G, Bellone C, Murthy S, Di Nardo AA, Govindan S, Ogawa M, Shimogori T, Lüscher C, Dayer A, Jabaudon D (2014) Retinal input directs the recruitment of inhibitory interneurons into thalamic visual circuits. *Neuron* 81:1057-1069.
- Goodwill HL, Manzano-Nieves G, LaChance P, Teramoto S, Lin S, Lopez C, Stevenson RJ, Theyel BB, Moore CI, Connors BW, Bath KG (2018) Early Life Stress Drives Sex-Selective Impairment in Reversal Learning by Affecting Parvalbumin Interneurons in Orbitofrontal Cortex of Mice. *Cell Rep* 25:2299-2307.e2294.
- Grant KE, Compas BE, Thurm AE, McMahon SD, Gipson PY (2004) Stressors and child and adolescent psychopathology: measurement issues and prospective effects. *J Clin Child Adolesc Psychol* 33:412-425.

- Groenewegen HJ, Ahlenius S, Haber SN, Kowall NW, Nauta WJ (1986) Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 249:65-102.
- Gu Y, Huang S, Chang MC, Worley P, Kirkwood A, Quinlan EM (2013) Obligatory role for the immediate early gene NARP in critical period plasticity. *Neuron* 79:335-346.
- Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, Craig I, O'Gara C, Bubb VJ, Greenwood T, Kelsoe J, Asherson P, Murray RM, Castelo A, Quinn JP, Vallada H, Breen G (2006) A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4552-4557.
- Görlich A, Antolin-Fontes B, Ables JL, Frahm S, Slimak MA, Dougherty JD, Ibañez-Tallon I (2013) Reexposure to nicotine during withdrawal increases the pacemaking activity of cholinergic habenular neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17077-17082.
- Hale MW, Shekhar A, Lowry CA (2012) Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol* 32:695-708.
- Han S, Yang SH, Kim JY, Mo S, Yang E, Song KM, Ham BJ, Mechawar N, Turecki G, Lee HW, Kim H (2017) Down-regulation of cholinergic signaling in the habenula induces anhedonia-like behavior. *Sci Rep* 7:900.
- Hegde A, Mitra R (2020) Environment and early life: Decisive factors for stress-resilience and vulnerability. *Int Rev Neurobiol* 150:155-185.
- Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49:1023-1039.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-888.
- Hensch TK, Fagiolini M (2005) Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog Brain Res* 147:115-124.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282:1504-1508.
- Hettema JM, Neale MC, Kendler KS (2001) A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 158:1568-1578.
- Hettema JM, Prescott CA, Myers JM, Neale MC, Kendler KS (2005) The structure of genetic and environmental risk factors for anxiety disorders in men and women. *Arch Gen Psychiatry* 62:182-189.
- Hikosaka O (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11:503-513.
- Hill AS, Sahay A, Hen R (2015) Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology* 40:2368-2378.
- Hiroi N, Agatsuma S (2005) Genetic susceptibility to substance dependence. *Mol Psychiatry* 10:336-344.
- Holland FH, Ganguly P, Potter DN, Chartoff EH, Brenhouse HC (2014) Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neurosci Lett* 566:131-136.
- Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Henningsen K, Jayatissa MN, Wiborg O, Jensen K (2011) Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression. *Hippocampus* 21:422-433.
- Horn G (2004) Pathways of the past: the imprint of memory. *Nat Rev Neurosci* 5:108-120.

- Horovitz O, Tsoory MM, Hall J, Jacobson-Pick S, Richter-Levin G (2012) Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. *Neuroendocrinology* 95:56-64.
- Horowitz R, Kotler M, Shufman E, Aharoni S, Kremer I, Cohen H, Ebstein RP (2000) Confirmation of an excess of the high enzyme activity COMT val allele in heroin addicts in a family-based haplotype relative risk study. *Am J Med Genet* 96:599-603.
- Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S (2017) Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci Rep* 7:12646.
- Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T (2013) Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 33:9890-9904.
- Hsu YW, Wang SD, Wang S, Morton G, Zariwala HA, de la Iglesia HO, Turner EE (2014) Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. *J Neurosci* 34:11366-11384.
- Hu W, Zhang M, Czéh B, Flügge G, Zhang W (2010) Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacology* 35:1693-1707.
- Huberman AD, McAllister AK (2002) Neurotrophins and visual cortical plasticity. *Prog Brain Res* 138:39-51.
- Hwang BH, Suzuki R, Lumeng L, Li TK, McBride WJ (2004) Innate differences in neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in discrete brain regions between alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rats: a significantly low level of NPY mRNA in dentate gyrus of the hippocampus and absence of NPY mRNA in the medial habenular nucleus of P rats. *Neuropeptides* 38:359-368.
- Hünnerkopf R, Strobel A, Gutknecht L, Brocke B, Lesch KP (2007) Interaction between BDNF Val66Met and dopamine transporter gene variation influences anxiety-related traits. *Neuropsychopharmacology* 32:2552-2560.
- Íñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, Cruz B, Warren BL (2014) Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* 17:247-255.
- Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517:284-292.
- Jesuthasan SJ, Mathuru AS (2008) The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. *J Neurogenet* 22:211-228.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844-858.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486.
- Kendler KS, Karkowski-Shuman L (1997) Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment? *Psychol Med* 27:539-547.
- Kepecs A, Fishell G (2014) Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505:318-326.
- Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS (1994) Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51:8-19.

- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS, Replication NCS (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289:3095-3105.
- Kim EJ, Hori K, Wyckoff A, Dickel LK, Koundakjian EJ, Goodrich LV, Johnson JE (2011) Spatiotemporal fate map of neurogenin1 (Neurog1) lineages in the mouse central nervous system. *J Comp Neurol* 519:1355-1370.
- Kim JH, Richardson R (2010) New findings on extinction of conditioned fear early in development: theoretical and clinical implications. *Biol Psychiatry* 67:297-303.
- Kim U, Chang SY (2005) Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *J Comp Neurol* 483:236-250.
- Kim U, Chung LY (2007) Dual GABAergic synaptic response of fast excitation and slow inhibition in the medial habenula of rat epithalamus. *J Neurophysiol* 98:1323-1332.
- Kimura C, Shen MM, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I (2001) Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev Biol* 235:12-32.
- Kimura C, Yoshinaga K, Tian E, Suzuki M, Aizawa S, Matsuo I (2000) Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol* 225:304-321.
- Knudsen EI (2004) Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *J Cogn Neurosci* 16:1412-1425.
- Ko SW, Ao HS, Mendel AG, Qiu CS, Wei F, Milbrandt J, Zhuo M (2005) Transcription factor Egr-1 is required for long-term fear memory and anxiety. *Sheng Li Xue Bao* 57:421-432.
- Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, Sato S, Furukawa A, Aizawa S, Matsuo I, Suzuki N, Kondo M, Furukawa T (2007) Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol Cell Biol* 27:8318-8329.
- Konishi M (1985) Birdsong: from behavior to neuron. *Annu Rev Neurosci* 8:125-170.
- Koppensteiner P, Galvin C, Ninan I (2016) Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Mol Cell Neurosci* 77:105-112.
- Koundakjian EJ, Appler JL, Goodrich LV (2007) Auditory neurons make stereotyped wiring decisions before maturation of their targets. *J Neurosci* 27:14078-14088.
- Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E (2002) Pharmacotherapy of addictions. *Nat Rev Drug Discov* 1:710-726.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
- Kuhlman SJ, Tring E, Trachtenberg JT (2011) Fast-spiking interneurons have an initial orientation bias that is lost with vision. *Nat Neurosci* 14:1121-1123.
- Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT (2013) A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* 501:543-546.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27:19-31.
- Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M (2008) Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* 31:159-168.
- Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, Bertini M, Pacifici R (2004) Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 20:1655-1664.

- Lecca S, Meye FJ, Mameli M (2014) The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur J Neurosci* 39:1170-1178.
- Lee HHC, Bernard C, Ye Z, Acampora D, Simeone A, Prochiantz A, Di Nardo AA, Hensch TK (2017) Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol Psychiatry* 22:680-688.
- Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59:786-792.
- Leonardo ED, Hen R (2008) Anxiety as a developmental disorder. *Neuropsychopharmacology* 33:134-140.
- Leuzinger S, Hirth F, Gerlich D, Acampora D, Simeone A, Gehring WJ, Finkelstein R, Furukubo-Tokunaga K, Reichert H (1998) Equivalence of the fly orthodenticle gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125:1703-1710.
- Levine S (2002) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res* 4:557-564.
- LEVINE S, ALPERT M, LEWIS GW (1957) Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis. *Science* 126:1347.
- Lezak KR, Missig G, Carlezon WA (2017) Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci* 19:181-191.
- Lima LB, Bueno D, Leite F, Souza S, Gonçalves L, Furigo IC, Donato J, Metzger M (2017) Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. *J Comp Neurol* 525:2411-2442.
- Limosin F, Rouillon F, Payan C, Cohen JM, Strub N (2003) Prenatal exposure to influenza as a risk factor for adult schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 107:331-335.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
- Loonen AJ, Ivanova SA (2015) Circuits regulating pleasure and happiness: the evolution of reward-seeking and misery-fleeing behavioral mechanisms in vertebrates. *Front Neurosci* 9:394.
- Loonen AJM, Ivanova SA (2018) Circuits regulating pleasure and happiness: evolution and role in mental disorders. *Acta Neuropsychiatr* 30:29-42.
- Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San-Miguel R, Hidalgo-Sánchez M, Ferrán JL, Puelles L, Aroca P (2012) Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev Biol* 361:12-26.
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O (2003) Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27:119-127.
- Madras BK, Fahey MA, Bergman J, Canfield DR, Spealman RD (1989) Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. I. [³H]cocaine binding sites in caudate-putamen. *J Pharmacol Exp Ther* 251:131-141.
- Maheu ME, Ressler KJ (2017) Developmental pathway genes and neural plasticity underlying emotional learning and stress-related disorders. *Learn Mem* 24:492-501.
- Mahler SV, Aston-Jones G (2018) CNO Evil? Considerations for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 43:934-936.
- Marco EM, Macri S, Laviola G (2011) Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res* 19:286-307.

- Maron E, Nikopensius T, Kõks S, Altmäe S, Heinaste E, Vabrit K, Tammekivi V, Hallast P, Koido K, Kurg A, Metspalu A, Vasar E, Vasar V, Shlik J (2005) Association study of 90 candidate gene polymorphisms in panic disorder. *Psychiatr Genet* 15:17-24.
- Massat I, Souery D, Del-Favero J, Nothen M, Blackwood D, Muir W, Kaneva R, Serretti A, Lorenzi C, Rietschel M, Milanova V, Papadimitriou GN, Dikeos D, Van Broekhoven C, Mendlewicz J (2005) Association between COMT (Val158Met) functional polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European multicenter genetic association study. *Mol Psychiatry* 10:598-605.
- Mataga N, Mizuguchi Y, Hensch TK (2004) Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* 44:1031-1041.
- Mathuru AS, Jesuthasan S (2013) The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. *Front Neural Circuits* 7:99.
- McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR (2015) CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron* 87:605-620.
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM (2005) Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* 309:2222-2226.
- McGrath JJ, Féron FP, Burne TH, Mackay-Sim A, Eyles DW (2003) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: a review of recent developments. *Ann Med* 35:86-93.
- McLaughlin I, Dani JA, De Biasi M (2017) The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *J Neurochem* 142 Suppl 2:130-143.
- Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24:1161-1192.
- Meyer U, Yee BK, Feldon J (2007) The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 13:241-256.
- Meyer U, Feldon J, Fatemi SH (2009) In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1061-1079.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK (2006) Immunological stress at the maternal-foetal interface: a link between neurodevelopment and adult psychopathology. *Brain Behav Immun* 20:378-388.
- Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H (2015) Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front Mol Neurosci* 8:78.
- Mirrione MM, Schulz D, Lapidus KA, Zhang S, Goodman W, Henn FA (2014) Increased metabolic activity in the septum and habenula during stress is linked to subsequent expression of learned helplessness behavior. *Front Hum Neurosci* 8:29.
- Miyasaka N, Morimoto K, Tsubokawa T, Higashijima S, Okamoto H, Yoshihara Y (2009) From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J Neurosci* 29:4756-4767.
- Moreno N, González A (2006) The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Prog Neurobiol* 78:61-90.
- Morgan MA, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci* 109:681-688.

- Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK (2010) Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science* 330:1238-1240.
- Morishita H, Cabungcal JH, Chen Y, Do KQ, Hensch TK (2015) Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry* 78:396-402.
- Mugnaini M, Tessari M, Tarter G, Merlo Pich E, Chiamulera C, Bunnemann B (2002) Upregulation of [3H]methyllycaconitine binding sites following continuous infusion of nicotine, without changes of alpha7 or alpha6 subunit mRNA: an autoradiography and in situ hybridization study in rat brain. *Eur J Neurosci* 16:1633-1646.
- Munafò MR, Matheson IJ, Flint J (2007) Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol Psychiatry* 12:454-461.
- Murakami Y, Uchida K, Rijli FM, Kuratani S (2005) Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans. *Dev Biol* 280:249-259.
- Murakami Y, Ogasawara M, Sugahara F, Hirano S, Satoh N, Kuratani S (2001) Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development* 128:3521-3531.
- Muramatsu T, Higuchi S (1995) Dopamine transporter gene polymorphism and alcoholism. *Biochem Biophys Res Commun* 211:28-32.
- Mészáros J, Gajewska S, Tarchalska-Kryńska B (1985) Habenulo-interpeduncular lesions: the effects on pain sensitivity, morphine analgesia and open-field behavior in rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 37:469-477.
- Müller CP, Homberg JR (2015) The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav Brain Res* 277:146-192.
- NAUTA WJ (1958) Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain* 81:319-340.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Neugebauer NM, Einstein EB, Lopez MB, McClure-Begley TD, Mineur YS, Picciotto MR (2013) Morphine dependence and withdrawal induced changes in cholinergic signaling. *Pharmacol Biochem Behav* 109:77-83.
- Nguyen Ba-Charvet KT, von Boxberg Y, Guazzi S, Boncinelli E, Godement P (1998) A potential role for the OTX2 homeoprotein in creating early 'highways' for axon extension in the rostral brain. *Development* 125:4273-4282.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697-709.
- Nixdorf-Bergweiler BE, Wallhäusser-Franke E, DeVoogd TJ (1995) Regressive development in neuronal structure during song learning in birds. *J Neurobiol* 27:204-215.
- Oliver PL, Finelli MJ, Edwards B, Bitoun E, Butts DL, Becker EB, Cheeseman MT, Davies B, Davies KE (2011) Oxr1 is essential for protection against oxidative stress-induced neurodegeneration. *PLoS Genet* 7:e1002338.
- Olson I, Suryanarayana SM, Robertson B, Grillner S (2017) a homologue of the periaqueductal gray in the lamprey. *IBRO Rep* 2:24-30.
- Padilla E, Shumake J, Barrett DW, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F (2011) Mesolimbic effects of the antidepressant fluoxetine in Holtzman rats, a genetic strain with increased vulnerability to stress. *Brain Res* 1387:71-84.
- Patton GC, Viner R (2007) Pubertal transitions in health. *Lancet* 369:1130-1139.
- Pena CJ, Nestler EJ, Bagot RC (2019) Environmental Programming of Susceptibility and Resilience to Stress in Adulthood in Male Mice. *Front Behav Neurosci* 13:40.

- Pena CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, Issler O, Loh YE, Leong T, Kiraly DD, Goodman E, Neve RL, Shen L, Nestler EJ (2017) Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science* 356:1185-1188.
- Perez E, Quijano-Cardé N, De Biasi M (2015) Nicotinic Mechanisms Modulate Ethanol Withdrawal and Modify Time Course and Symptoms Severity of Simultaneous Withdrawal from Alcohol and Nicotine. *Neuropsychopharmacology* 40:2327-2336.
- Pervanidou P, Chrousos GP (2018) Early-Life Stress: From Neuroendocrine Mechanisms to Stress-Related Disorders. *Horm Res Paediatr* 89:372-379.
- Peña CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, Issler O, Loh YE, Leong T, Kiraly DD, Goodman E, Neve RL, Shen L, Nestler EJ (2017) Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science* 356:1185-1188.
- Price JL, Drevets WC (2010) Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35:192-216.
- Quello SB, Brady KT, Sonne SC (2005) Mood disorders and substance use disorder: a complex comorbidity. *Sci Pract Perspect* 3:13-21.
- Quina LA, Harris J, Zeng H, Turner EE (2017) Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. *J Comp Neurol* 525:2632-2656.
- Ranade SS, Yang-Zhou D, Kong SW, McDonald EC, Cook TA, Pignoni F (2008) Analysis of the Otd-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates. *Dev Biol* 315:521-534.
- Reh RK, Dias BG, Nelson CA, 3rd, Kaufer D, Werker JF, Kolb B, Levine JD, Hensch TK (2020) Critical period regulation across multiple timescales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:23242-23251.
- Rhinn M, Dierich A, Le Meur M, Ang S (1999) Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development* 126:4295-4304.
- Robertson B, Kardamakis A, Capantini L, Pérez-Fernández J, Suryanarayana SM, Wallén P, Stephenson-Jones M, Grillner S (2014) The lamprey blueprint of the mammalian nervous system. *Prog Brain Res* 212:337-349.
- Romeo RD (2013) The Teenage Brain: The Stress Response and the Adolescent Brain. *Curr Dir Psychol Sci* 22:140-145.
- Roosendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL (2008) Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 90:576-579.
- Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78:57-65.
- Ruiz-Reig N, Rakotobe M, Bethus I, le Menn G, Huditz HI, Marie H, Lamonerie T, D'Autreaux F (2018) Developmental requirement of homeoprotein Otx2 for specific habenulo-interpeduncular subcircuits. *J Neurosci*.
- Ruiz-Reig N, Rakotobe M, Bethus I, Le Menn G, Huditz HI, Marie H, Lamonerie T, D'Autreaux F (2019) Developmental Requirement of Homeoprotein Otx2 for Specific Habenulo-Interpeduncular Subcircuits. *J Neurosci* 39:1005-1019.
- Sabunciyan S, Yolken R, Ragan CM, Potash JB, Nimgaonkar VL, Dickerson F, Llenos IC, Weis S (2007) Polymorphisms in the homeobox gene OTX2 may be a risk factor for bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:1083-1086.
- Sakai A, Sugiyama S (2018) Experience-dependent transcriptional regulation in juvenile brain development. *Dev Growth Differ* 60:473-482.

- Sakai A, Nakato R, Ling Y, Hou X, Hara N, Iijima T, Yanagawa Y, Kuwano R, Okuda S, Shirahige K, Sugiyama S (2017) Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex. *Front Neurosci* 11:307.
- Salgado S, Kaplitt MG (2015) The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotact Funct Neurosurg* 93:75-93.
- Schenk S, Valadez A, Worley CM, McNamara C (1993) Blockade of the acquisition of cocaine self-administration by the NMDA antagonist MK-801 (dizocilpine). *Behav Pharmacol* 4:652-659.
- Scholpp S, Foucher I, Staudt N, Peukert D, Lumsden A, Houart C (2007) Otx11, Otx2 and Irx1b establish and position the ZLI in the diencephalon. *Development* 134:3167-3176.
- Schumacher J, Jamra RA, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB, Schulze TG, Deschner M, Schmääl C, Höfels S, Zobel A, Illig T, Propping P, Holsboer F, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S (2005) Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry* 58:307-314.
- Seewoo BJ, Hennessy LA, Feindel KW, Etherington SJ, Croarkin PE, Rodger J (2020) Validation of Chronic Restraint Stress Model in Young Adult Rats for the Study of Depression Using Longitudinal Multimodal MR Imaging. *eNeuro* 7.
- Seigneur E, Polepalli JS, Südhof TC (2018) Cbln2 and Cbln4 are expressed in distinct medial habenula-interpeduncular projections and contribute to different behavioral outputs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E10235-E10244.
- Sen S, Reichert H, VijayRaghavan K (2013) Conserved roles of *ems/Emx* and *otd/Otx* genes in olfactory and visual system development in *Drosophila* and mouse. *Open Biol* 3:120177.
- Serrano-Saiz E, Leyva-Díaz E, De La Cruz E, Hobert O (2018) BRN3-type POU Homeobox Genes Maintain the Identity of Mature Postmitotic Neurons in Nematodes and Mice. *Curr Biol* 28:2813-2823.e2812.
- Shoji H, Miyakawa T (2020) Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacol Rep* 40:73-84.
- Shumake J, Edwards E, Gonzalez-Lima F (2003) Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain Res* 963:274-281.
- Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E (1992) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687-690.
- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E (1993) A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* 12:2735-2747.
- Smith DG, Learn JE, McBride WJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM (2001) Alcohol-naïve alcohol-preferring (P) rats exhibit higher local cerebral glucose utilization than alcohol-nonpreferring (NP) and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1309-1316.
- Spatazza J, Lee HH, Di Nardo AA, Tibaldi L, Joliot A, Hensch TK, Prochiantz A (2013) Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Rep* 3:1815-1823.
- Stein DJ (2008) Depression, anhedonia, and psychomotor symptoms: the role of dopaminergic neurocircuitry. *CNS Spectr* 13:561-565.
- Stein EA (1993) Ventral tegmental self-stimulation selectively induces opioid peptide release in rat CNS. *Synapse* 13:63-73.

- Stephenson-Jones M, Floros O, Robertson B, Grillner S (2012) Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E164-173.
- Stern JM, Johnson SK (1990) Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav* 47:993-1011.
- Stöber G, Franzek E, Beckmann H, Schmidtke A (2002) Exposure to prenatal infections, genetics and the risk of systematic and periodic catatonia. *J Neural Transm (Vienna)* 109:921-929.
- Suda Y, Matsuo I, Aizawa S (1997) Cooperation between Otx1 and Otx2 genes in developmental patterning of rostral brain. *Mech Dev* 69:125-141.
- Sugama S, Cho BP, Baker H, Joh TH, Lucero J, Conti B (2002) Neurons of the superior nucleus of the medial habenula and ependymal cells express IL-18 in rat CNS. *Brain Res* 958:1-9.
- Sugiyama S, Prochiantz A, Hensch TK (2009) From brain formation to plasticity: insights on Otx2 homeoprotein. *Dev Growth Differ* 51:369-377.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK (2008) Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134:508-520.
- Sullivan PF, Kendler KS (1999) The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob Res* 1 Suppl 2:S51-57; discussion S69-70.
- Sun NN, Sha LZ, Xu Q (2015) Establishment of a chronic restraint stress model of depression with C57BL/6J mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 37:8-11.
- Sun Y, Ikrar T, Davis MF, Gong N, Zheng X, Luo ZD, Lai C, Mei L, Holmes TC, Gandhi SP, Xu X (2016) Neuregulin-1/ErbB4 Signaling Regulates Visual Cortical Plasticity. *Neuron* 92:160-173.
- Suri D, Teixeira CM, Cagliostro MK, Mahadevia D, Ansorge MS (2015) Monoamine-sensitive developmental periods impacting adult emotional and cognitive behaviors. *Neuropsychopharmacology* 40:88-112.
- Swanson LW, Cowan WM (1979) The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* 186:621-655.
- Söderlund J, Lindskog M (2018) Relevance of Rodent Models of Depression in Clinical Practice: Can We Overcome the Obstacles in Translational Neuropsychiatry? *Int J Neuropsychopharmacol* 21:668-676.
- Talge NM, Neal C, Glover V, Early Stress TaRaPSNFaNEoCaAMH (2007) Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry* 48:245-261.
- Taraschenko OD, Shulan JM, Maisonneuve IM, Glick SD (2007) 18-MC acts in the medial habenula and interpeduncular nucleus to attenuate dopamine sensitization to morphine in the nucleus accumbens. *Synapse* 61:547-560.
- THOMPSON R (1960) Interpeduncular nucleus and avoidance conditioning in the rat. *Science* 132:1551-1553.
- Torres-Berrio A, Cuesta S, Lopez-Guzman S, Nava-Mesa MO (2018) Interaction Between Stress and Addiction: Contributions From Latin-American Neuroscience. *Front Psychol* 9:2639.
- Tyssowski KM, DeStefino NR, Cho JH, Dunn CJ, Poston RG, Carty CE, Jones RD, Chang SM, Romeo P, Wurzelmann MK, Ward JM, Andermann ML, Saha RN, Dudek SM, Gray JM (2018) Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs. *Neuron* 98:530-546.e511.

- Valentino RJ, Van Bockstaele E (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 583:194-203.
- Van den Hove DL, Steinbusch HW, Scheepens A, Van de Berg WD, Kooiman LA, Boosten BJ, Prickaerts J, Blanco CE (2006) Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience* 137:145-155.
- van Loo KM, Martens GJ (2007) Genetic and environmental factors in complex neurodevelopmental disorders. *Curr Genomics* 8:429-444.
- Veerakumar A, Challis C, Gupta P, Da J, Upadhyay A, Beck SG, Berton O (2014) Antidepressant-like effects of cortical deep brain stimulation coincide with pro-neuroplastic adaptations of serotonin systems. *Biol Psychiatry* 76:203-212.
- Volkow ND, Fowler JS (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10:318-325.
- Vue TY, Aaker J, Taniguchi A, Kazemzadeh C, Skidmore JM, Martin DM, Martin JF, Treier M, Nakagawa Y (2007) Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol* 505:73-91.
- Walters H, Kosten TA (2019) Early life stress and the propensity to develop addictive behaviors. *Int J Dev Neurosci* 78:156-169.
- Warner-Schmidt JL, Schmidt EF, Marshall JJ, Rubin AJ, Arango-Lievano M, Kaplitt MG, Ibañez-Tallon I, Heintz N, Greengard P (2012) Cholinergic interneurons in the nucleus accumbens regulate depression-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:11360-11365.
- WEININGER O, McCLELLAND WJ, ARIMA RK (1954) Gentling and weight gain in the albino rat. *Can J Psychol* 8:147-151.
- Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1073-1086.
- Wiesel TN, Hubel DH (1965) Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *J Neurophysiol* 28:1060-1072.
- Willner P (2017) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress* 6:78-93.
- Wu Y, Davies KE, Oliver PL (2016) The antioxidant protein Oxrl influences aspects of mitochondrial morphology. *Free Radic Biol Med* 95:255-267.
- Xu C, Sun Y, Cai X, You T, Zhao H, Li Y (2018) Medial Habenula-Interpeduncular Nucleus Circuit Contributes to Anhedonia-Like Behavior in a Rat Model of Depression. *Front Behav Neurosci* 12:238.
- Yamada J, Ohgomori T, Jinno S (2015) Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* 41:368-378.
- Yamaguchi T, Danjo T, Pastan I, Hikida T, Nakanishi S (2013) Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* 78:537-544.
- Yazaki-Sugiyama Y, Kang S, Câteau H, Fukai T, Hensch TK (2009) Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience. *Nature* 462:218-221.
- Yu Z, Chen N, Hu D, Chen W, Yuan Y, Meng S, Zhang W, Lu L, Han Y, Shi J (2020) Decreased Density of Perineuronal Net in Prelimbic Cortex Is Linked to Depressive-Like Behavior in Young-Aged Rats. *Front Mol Neurosci* 13:4.
- Zangenehpour S, Chaudhuri A (2002) Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res Mol Brain Res* 109:221-225.
- Zhang J, Tan L, Ren Y, Liang J, Lin R, Feng Q, Zhou J, Hu F, Ren J, Wei C, Yu T, Zhuang Y, Bettler B, Wang F, Luo M (2016) Presynaptic Excitation via GABAB Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression. *Cell* 166:716-728.

- Zhao-Shea R, Liu L, Pang X, Gardner PD, Tapper AR (2013) Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. *Curr Biol* 23:2327-2335.
- Zhong M, Wang X, Xiao J, Yi J, Zhu X, Liao J, Wang W, Yao S (2011) Amygdala hyperactivation and prefrontal hypoactivation in subjects with cognitive vulnerability to depression. *Biol Psychol* 88:233-242.