

Identification d'un nouveau circuit dopaminergique du raphé dorsal impliqué dans les comportements défensifs

EMMA PERROT, FRANÇOIS GEORGES, ADRIANE GUILLAUMIN

Univ. de Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, Bordeaux, France.

Introduction

L'identification d'un circuit neuronal requiert l'utilisation d'outils variés notamment le traçage neuronal et l'électrophysiologie. Dans les années 1990, de nombreuses études anatomiques sur l'utilisation de traceurs neuronaux rétrogrades ont été réalisées. C'est notamment le cas de la sous-unité bêta de la toxine cholérique (CTb) et du Fluorogold qui sont incorporés par les terminaisons synaptiques et remontent le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire. Des études ont également été menées sur des traceurs neuronaux antérogrades tel que la leucoagglutinine (PHAL) du *Phaseolus vulgaris* qui, à l'inverse, est captée par les corps cellulaires et transportée vers les terminaisons synaptiques.

Aujourd'hui, de nombreuses équipes recourent aux vecteurs viraux Cre dépendants qui permettent d'induire l'expression de gènes dans des sous-populations neuronales spécifiques grâce à l'utilisation de souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase dans les populations neuronales d'intérêts. Les vecteurs viraux utilisés, le plus souvent des virus adéno-associés (AAV), contiennent un promoteur ciblant un type cellulaire particulier, c'est l'exemple de hSyn (human synapsin 1), des gènes rapporteurs fluorescents (mCherry, eYFP, etc...) ainsi que des séquences lox (abrégées DIO ou Flex) qui encadrent les gènes rapporteurs. Ces dernières sont reconnues par l'enzyme Cre recombinase permettant l'adressage et l'expression spécifique des gènes rapporteurs dans les neurones exprimant cette enzyme. A cette structure de base du vecteur viral peuvent s'ajouter d'autres gènes permettant d'activer ou d'inhiber les neurones, d'induire leur mort cellulaire, de surexprimer des gènes et bien d'autres possibilités (voir l'article de

Marie Barbier dans ce numéro). Nous avons utilisé l'ensemble de ces méthodes pour caractériser un nouveau circuit impliqué dans les comportements défensifs.

Les comportements défensifs sont essentiels à la survie, car ils reposent sur une évaluation fine des risques pour détecter les menaces et y répondre de manière adaptée. Le noyau du raphé dorsal (DRN), une région cérébrale impliquée notamment dans la régulation de l'éveil et du sommeil, contient des neurones dopaminergiques (DRN_{DA}) dont le rôle dans l'évaluation des menaces reste mal caractérisé. Des travaux récents ont mis en évidence un sous-ensemble de ces neurones exprimant le peptide intestinal vasoactif (VIP). Ces neurones, appelés DRN_{VIP}, projettent notamment vers l'amygdale centrale (CeA) et le noyau ovale du lit de la strie terminale (ovBNST). Ces deux régions forment l'amygdale étendue, essentielle pour les réponses adaptatives aux menaces. Le CeA et l'ovBNST partagent une origine développementale commune, une organisation de type striatal et sont majoritairement constitués de neurones inhibiteurs GABAergiques présentant des caractéristiques morphologiques et neurochimiques similaires (1). Les premiers travaux de Davis et ses collègues suggèrent que la connexion anatomique entre l'ovBNST et le CeA est à la base de leur interaction fonctionnelle (2, 3). Cette interaction fonctionnelle devient particulièrement importante à l'approche d'une menace, provoquant la transition d'un état d'hypervigilance et d'anxiété régi par le BNST à un état de peur médié par l'amygdale (4, 5). Toutefois, plutôt que de fonctionner de manière strictement séquentielle, des découvertes plus récentes suggèrent que le BNST et l'amygdale peuvent être recrutés simultanément, ce qui indique l'implication d'un

circuit neuronal capable de synchroniser l'activité de ces deux structures (6). Ces résultats nous ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle les neurones DRN_{VIP} constitueraient une population homogène occupant une position stratégique. Grâce à leurs projections vers l'ovBNST et le CeA, ils pourraient assurer la coordination de l'activité de ces régions, jouant ainsi un rôle central dans l'évaluation des risques et la mise en œuvre des comportements défensifs.

1 - Quelle est l'origine des innervations dopaminergiques de l'amygdale étendue ?

Une des premières études identifiant l'origine de l'innervation dopaminergique de l'amygdale étendue localise les sources dans le mésencéphale, principalement l'aire tegmentale ventrale (VTA), la substance grise périaqueducale (PAG) et le noyau dorsal du raphé (DRN) (7).

Pour confirmer ces observations, nous avons utilisé des traceurs neuronaux tels que le CTb et le Fluorogold, permettant d'identifier tous les neurones projetant vers la structure ciblée. Ces traceurs présentent deux avantages : une absence de tropisme pour des populations neuronales et une vitesse de transport rapide (7 à 10 jours), ce qui en font des outils de choix pour identifier les neurones afférents. Par la suite, des analyses immunohistochimiques sur coupes de cerveau ont permis d'identifier le phénotype des neurones marqués par CTb ou Fluorogold, grâce à la détection d'enzymes spécifiques telle que la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme clé de la synthèse de dopamine. Après injections de CTb dans le noyau ovale du BNST chez le rat, aucun neurone mésencéphalique ventral n'exprimait simultanément CTb et TH. En revanche, une population de neurones située dans le DRN et sous l'aqueduc de Sylvius dans le PAG coexprimait la TH, identifiant le mésencéphale dorsal (DRN/PAG) comme la source unique de dopamine pour le noyau ovale du BNST et le CeA.

2 - Quels sont ces neurones dopaminergiques se projetant dans l'amygdale étendue ?

Pendant longtemps les structures dopaminergiques du cerveau ont été perçues comme homogènes. Cependant depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont révélé une grande hétérogénéité, notamment au sein des deux structures dopaminergiques les plus connues, l'aire tegmentale ventrale et la substance noire compacte. Ces neurones dopaminergiques diffèrent par leurs projections vers diverses structures, leur activité électrophysiologique, l'expression de récepteurs variés ainsi que la co-libération d'autres neurotransmetteurs.

Toutes ces différences permettent de mettre en lumière l'existence de sous-populations dopaminergiques ayant chacune des rôles spécifiques. L'hétérogénéité des neurones dopaminergiques du DRN a été très peu explorée mais la littérature scientifique décrit plusieurs sous-populations dont l'une exprime le peptide intestinal vasoactif (VIP) (8). Cette sous-population dopaminergique semble innervier l'amygdale étendue, qui contient des fibres VIP très denses, bien qu'aucune étude n'ait ciblé spécifiquement ces neurones DA/VIP du DRN.

Dans une première expérience d'hybridation *in situ* réalisée chez des souris sauvages (C57BL/6J), nous avons identifié les neurones du DRN exprimant l'ARNm *Vip*, dont environ 85 % expriment celui de la tyrosine hydroxylase (TH), confirmant ainsi leur nature dopaminergique. Une seconde expérience menée sur des souris transgénique *Vip-Cre* a confirmé que 100% des neurones exprimant la *Cre* recombinase expriment également *Vip* et qu'environ 50% des neurones dopaminergiques du DRN expriment *Vip*. La lignée de souris *Vip-Cre* constitue donc un outil idéal pour cibler cette sous-population de neurones dopaminergique du DRN.

Grâce à cette lignée de souris *Vip-Cre*, il est possible de cibler spécifiquement les neurones VIP du DRN via des injections locales de vecteurs viraux *Cre* dépendants. Par exemple, l'injection d'un virus antérograde adéno-associé (AAV) codant pour un rapporteur fluorescent permet de marquer les corps cellulaires et les axones des neurones VIP rendant ainsi visible leur trajet depuis le DRN jusqu'aux noyaux de l'amygdale étendue (Figure 1A). Ces fibres descendent vers le mésencéphale ventral, empruntent le faisceau de fibre médian jusqu'au noyau ovale du BNST puis atteignent l'amygdale via la strie terminale.

Nous avons par la suite utilisé une stratégie virale qui consiste à injecter un AAV dans le DRN permettant l'expression d'un rapporteur fluorescent associé à la synaptophysine, une glycoprotéine localisée spécifiquement dans les vésicules synaptiques au niveau des terminaisons synaptiques. Cette méthode permet d'identifier les sites de libération synaptique et d'exclure les fibres passantes (Figure 1B).

Enfin, pour savoir si un même neurone VIP du DRN projette simultanément vers l'ovBNST et le CeA — autrement dit s'il possède des projections collatérales — nous avons utilisé un virus modifié de la rage combiné à un AAV *Cre*-dépendant. Le virus modifié de la rage est transporté efficacement dans les neurones, sautant de façon rétrograde les synapses pour atteindre les neurones pré-synaptiques. Cette méthode repose d'abord sur l'injection, dans le DRN, d'un « virus helper »

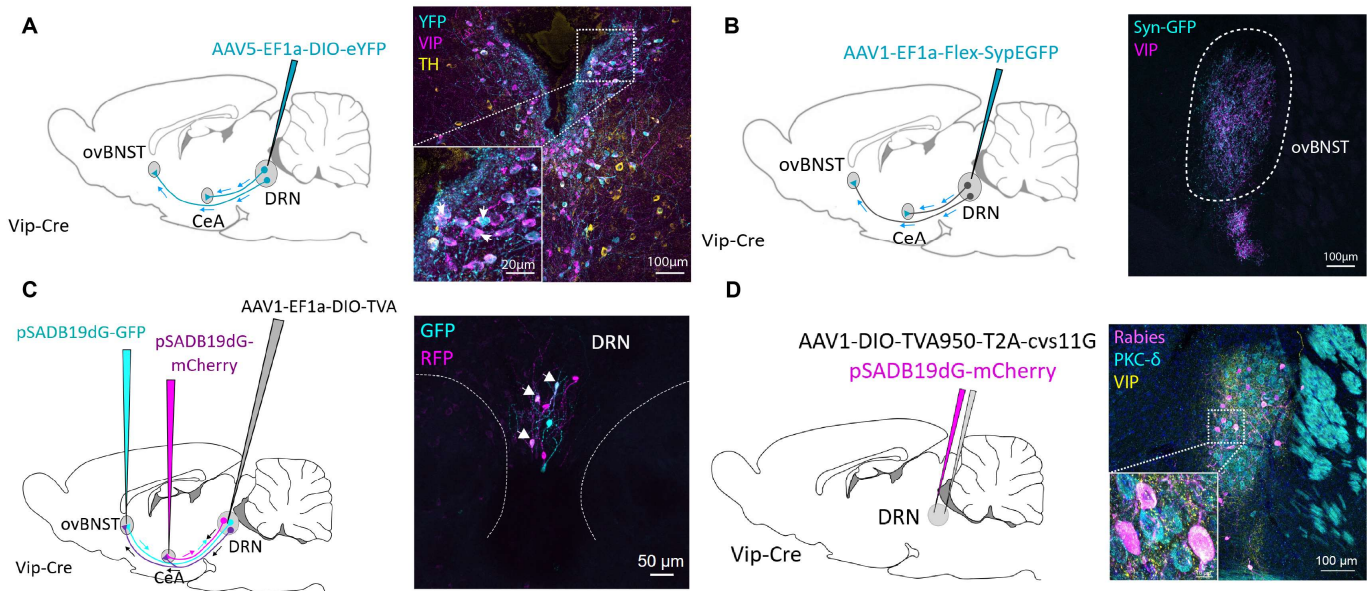


Figure 1. Approches virales et anatomiques pour cartographier le circuit dopaminergique du raphé dorsal impliqué dans les comportements défensifs.

(A–D) Schémas et images représentatives illustrant les différentes stratégies d'injection virale utilisées chez les souris Vip-Cre. (A) Injection d'un vecteur viral antérograde (AAV5-EF1a-DIO-eYFP) dans le raphé dorsal (DRN) afin de marquer les neurones Vip. À droite, image confocale montrant des neurones du DRN exprimant le marqueur fluorescent YFP (cyan) et le peptide VIP (magenta), colocalisés (flèches). (B) Injection d'un virus exprimant la synaptophysine-GFP dans le DRN pour visualiser les sites de libération synaptique. À droite, image confocale de l'ovBNST montrant les terminaisons synaptiques DRN marquées par la synaptophysine (bleu) et les fibres VIP locales (magenta). (C) Traçage rétrograde monosynaptique à l'aide du virus de la rage modifié (pSADB19dG-mCherry/GFP) injecté dans l'amygdale étendue (CeA), combiné à un virus helper (AAV1-EF1a-DIO-TVA) injecté dans le DRN. À droite, colocalisation dans le DRN entre GFP et mCherry (flèches), indiquant que certains neurones VIP du DRN projettent simultanément vers l'ovBNST et le CeA. (D) Injection combinée du virus de la rage (pSADB19dG-mCherry), du helper et de la glycoprotéine (AAV1-EF1a-DIO-TVA950-T2A-cvs11G) dans le DRN. À droite, image confocale de l'ovBNST montrant la colocalisation entre PKC-δ (bleu) et les neurones infectés par le virus de la rage (magenta), entourés de fibres VIP, suggérant que des neurones de l'ovBNST et du CeA établissent des connexions réciproques avec les neurones VIP du DRN.

contenant deux éléments clés : un récepteur appelé TVA, qui permet l'entrée d'un virus de la rage modifié dans les neurones ciblés, et une glycoprotéine (ΔG), nécessaire à sa propagation. Lorsque cette glycoprotéine est retirée du virus helper, le virus de la rage modifié ne peut plus être transporté d'un neurone à l'autre : il agit alors simplement comme un vecteur rétrograde, c'est-à-dire qu'il remonte les connexions neuronales jusqu'à leur origine. Le virus helper est injecté en premier dans le DRN, suivi de l'injection du virus modifié de la rage dans les terminaisons synaptiques (ovBNST et CeA) avec des marqueurs fluorescents distincts (Figure 1C). Cette approche a démontré l'existence de neurones VIP du DRN projetant simultanément vers l'ovBNST et le CeA, suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle clé dans la synchronisation de l'activité de ces deux structures lors de leur activation.

3 - Quelles sous-populations de l'amygdale étendue sont ciblées par les neurones DA du DRN ?

Nous avons montré qu'une sous-population de neurones dopaminergiques du DRN exprimant le VIP projette vers les deux noyaux principaux de l'amygdale étendue. L'ovBNST et le CeA sont tous deux des noyaux

GABAergiques composés de multiples sous-populations neuronales exprimant divers neuropeptides tels que la somatostatine, la neurotensine, la corticotropin-releasing hormone (CRH) ainsi que des protéines spécifiques comme la protéine kinase C delta (PKC-δ) (1).

Pour déterminer quelles sous-populations sont ciblées par les neurones VIP du DRN nous avons utilisé une lignée de souris Vip-Cre/COP4 dans laquelle les neurones VIP expriment une opsine excitatrice, un récepteur membranaire activé par la lumière induisant l'excitation neuronale. Combiné à la technique d'électrophysiologie *ex vivo*, le patch clamp, cela permet d'enregistrer l'activité électrique des neurones sur des tranches de cerveau contenant l'ovBNST ou le CeA. La stimulation lumineuse des terminaisons synaptiques des neurones VIP du DRN induit des courants électriques dans le neurone post-synaptique. Les neurones enregistrés sont marqués à la biocytine afin de déterminer leur phénotype *a posteriori*. Cette approche permet ainsi de savoir si les neurones VIP libèrent du glutamate ou du GABA via l'observation de courants post-synaptiques excitateurs ou inhibiteurs (EPSC ou IPSC). Les résultats montrent que les neurones VIP du DRN libèrent majoritairement du glutamate et projettent

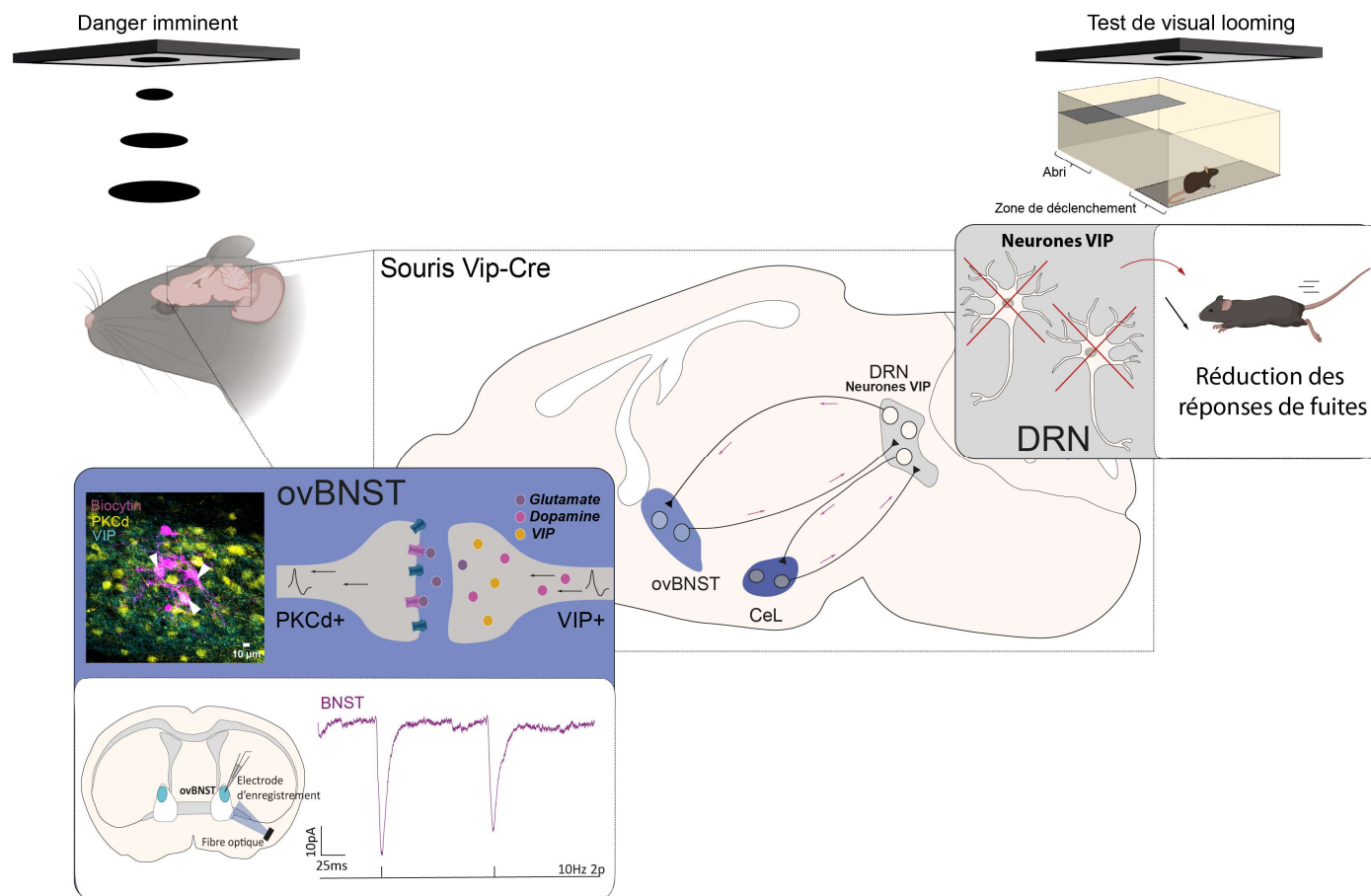


Figure 2. Schéma récapitulatif de l'étude d'un nouveau circuit dopaminergique du raphé dorsal.

Schéma synthétique du circuit proposé : les neurones DRNVip connectent l'amygdale étendue et participent à la mise en œuvre de comportements défensifs, comme démontré par des approches virales, électrophysiologiques *ex vivo* et comportementales (tâche de visual looming).

préférentiellement vers des neurones exprimant la protéine PKC- δ dans l'ovBNST et le CeA (Figure 2).

4 - Quelles sont les afférences des neurones dopaminergiques du DRN ?

Nous avons caractérisé la voie des neurones VIP du DRN innervant les neurones PKC- δ de l'ovBNST et du CeA. Cependant, aucune étude n'a montré les afférences des neurones VIP du DRN. Pinto et collègues ont montré, grâce à un virus modifié de la rage, que les neurones dopaminergiques du DRN reçoivent des projections de multiples structures cérébrales, notamment le noyau accumbens, le BNST, le pallidum ventral, l'hypothalamus latéral et la substance grise périaqueducale (9).

Nous avons donc reproduit cette expérience en utilisant des souris Vip-Cre afin de cartographier l'ensemble des afférences des neurones VIP du DRN. À l'aide d'un virus « helper » Cre-dépendant contenant la glycoprotéine facilitant le transport présynaptique, suivi de l'injection du virus modifié de la rage dans le DRN, nous avons identifié deux structures projetant massivement vers ces neurones VIP : l'ovBNST et le CeA (Figure 1D). Après un marquage immunohistochimique, nous avons caractérisé le

phénotype majoritairement PKC- δ des neurones de l'ovBNST et du CeA qui projettent aux neurones VIP du DRN. Ainsi, le circuit entre le DRN et l'amygdale étendue forme deux boucles distinctes, l'une entre le DRN et l'ovBNST et l'autre entre le DRN et le CeA. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les neurones PKC- δ recevant l'innervation du DRN et projetant vers ce dernier correspondent à la même population cellulaire.

5 - Quel est le rôle fonctionnel de la voie DRNDA/VIP vers l'amygdale étendue ?

Nous avons identifié une sous-population de neurones dopaminergiques du DRN exprimant le VIP qui innerve les neurones PKC- δ de l'amygdale étendue. Comme évoqué en introduction, l'ovBNST et le CeA jouent un rôle crucial dans l'anxiété et les réponses adaptatives aux menaces. Afin d'étudier le rôle fonctionnel de cette voie dans les comportements défensifs nous avons réalisé une ablation génétique des neurones VIP du DRN via une stratégie virale. Plus précisément, un vecteur viral codant pour la caspase 3 — une enzyme initiant l'apoptose — a été injecté dans le DRN de souris Vip-Cre. Ainsi, les neurones VIP transfectés entrent en apoptose, supprimant la source

dopaminergique vers l'amygdale étendue chez ces souris (désignées comme souris Casp3).

Le test comportemental du *visual looming* permet d'observer la réaction d'une souris face à la simulation d'un prédateur aérien qui s'approche rapidement reflétant un danger imminent. Il consiste en une arène rectangulaire divisé en trois zones : un abri, une zone intermédiaire et une zone de déclenchement. Après 3 jours d'habituation, le test consiste à déclencher un stimulus visuel (rond noir grossissant imitant l'arrivée d'un prédateur) sur un écran placé au-dessus de l'arène lorsque la souris entre dans la « trigger zone ». Le test est terminé lorsque la souris a réalisé 10 entrées dans la « trigger zone ». De nombreux comportements peuvent être mesurés dont l'un est le pourcentage de fuite, 0% si la souris ne fuit pas et 100% si la souris fuit à chaque déclenchement du stimulus visuel (Figure 2).

Les souris contrôles présentent environ 70 % de probabilité de fuite, tandis que les souris Casp3 montrent une diminution significative, à environ 40 %, indiquant un déficit dans les réponses défensives face à la menace lorsque les neurones VIP du DRN sont supprimés.

Conclusion

Les nouvelles techniques d'analyse neuroanatomiques nous ont permis d'identifier et de caractériser une sous-population de neurones dopaminergiques du noyau du raphé dorsal (DRN) exprimant le peptide intestinal vasoactif (VIP), grâce à l'utilisation combinée de souris transgéniques *Vip-Cre*, de vecteurs viraux *Cre*-dépendants et de techniques d'hybridation *in situ*. À l'aide de traçages neuronaux antérogrades et rétrogrades, nous avons montré que ces neurones projettent simultanément

vers le noyau ovale du lit de la strie terminale (ovBNST) et l'amygdale centrale (CeA) où ils ciblent majoritairement des neurones PKC- δ . L'électrophysiologie *ex vivo* a révélé que ces projections sont glutamatergiques et établissent des connexions fonctionnelles directes. En parallèle, une cartographie virale des afférences a mis en évidence des boucles réciproques entre le DRN et les deux structures de l'amygdale étendue. Enfin, l'ablation sélective des neurones DRN_{VIP} via l'expression virale de la caspase3 a induit une réduction des réponses de fuite dans le test de *visual looming*, soulignant leur rôle fonctionnel dans la mise en œuvre de comportements défensifs. Cette étude met en lumière un circuit dopaminergique distinct, capable de coordonner l'activité de l'amygdale étendue dans un contexte de menace.

emma.perrot@u-bordeaux.fr

francois.georges@u-bordeaux.fr

adriane.guillaumin@u-bordeaux.fr

Références

- (1) Beyeler, A. & Dabrowska, J. (2020) Handbook of Behavioral Neuroscience vol. 26 63–100 (Elsevier).
- (2) Davis, M. et al. (1993) Behav. Brain Res. 58, 175–198.
- (3) Davis, M. et al. (1997), Annals of the New York Academy of Sciences 821, 305–331.
- (4) Avery, S. N. et al. (2016) Neuropsychopharmacology 41, 126–141.
- (5) Shackman, A. J. & Fox, A. S. (2016) J Neurosci 36, 8050–8063.
- (6) Mobbs, D. et al. (2020) Trends in Cognitive Sciences 24, 228–241.
- (7) Hasue, R. H. & Shammah-Lagnado, S. J. (2002) J Comp. Neurol. 454, 15–33.
- (8) Poulin, J.-F. et al. (2018) Nat Neurosci 21, 1260–1271.
- (9) Cardozo Pinto, D. F. et al. (2019) Nat Commun 10, 4633.