

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Jadot, Sam

Promoteur(s) : Bakker, Julie

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20548>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Étude de l'activité des neurones à nNOS de l'amygdale médiale postéro-dorsale lors de tests comportementaux chez la souris

Promotrice: Julie Bakker
Encadrante: Caitlin McIntyre



Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Julie Bakker, la chef du laboratoire, dont l'ouverture d'esprit, l'écoute attentive et la présence constante ont rendu cette expérience de recherche si enrichissante. Son sens de l'humour contagieux a su créer un environnement propice à la collaboration et à l'apprentissage.

Je souhaite également remercier chaleureusement Caitlin, mon encadrante, dont le soutien, les conseils avisés et la patience m'ont été d'une aide précieuse tout au long de ce projet. Malgré les barrières linguistiques, nous avons su surmonter les difficultés avec humour, ce qui a permis d'avancer de manière efficace dans la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à Florence, avec qui j'ai partagé tant d'expériences et surmonté tant d'obstacles. Notre complicité et notre capacité à rire ensemble ont rendu cette aventure mémorable. Sa contribution à mon apprentissage, notamment en corrigeant mon orthographe et en partageant ses connaissances, est inestimable. J'espère pouvoir lui rendre la pareille en lui faisant découvrir les subtilités des courses au Carrefour en Belgique.

Enfin, je souhaite adresser mes remerciements à Chloé, avec qui j'ai entretenu une relation tantôt tumultueuse, tantôt complice. Malgré nos différences, nos échanges ont été riches en enseignements et en moments de joie.

À chacune d'entre vous, je suis reconnaissant pour les souvenirs précieux que nous avons créés ensemble et pour votre contribution à, je l'espère, la réussite de ce mémoire. Merci du fond du cœur.

ABSTRACT

English:

Sexual behavior is a crucial determinant of species survival. Recent studies on rodents have highlighted the predominant role of the posterodorsal part of the medial amygdala (AMePD) in the expression of sexual behavior in both sexes. Recently, a new population of neurons expressing neuronal nitric oxide synthase (nNOS) has been identified within this nucleus. Research has already established the significant involvement of nNOS neurons present in other nuclei in the modulation of both sexual and anxious behaviors. This project therefore focuses on the role of nNOS neurons in the AMePD during the expression of certain behaviors.

To analyze the importance of this neuronal population, we used two genetic tools: inhibitory DREADDs (hM4Di) and fiber photometry. To do this, viruses expressing hM4Di and GCaMP6S in a Cre-dependent manner were injected into the AMePD of *Nos1Cre* mice. Despite numerous animal losses that complicated the analyses, a trend emerged, highlighting the role of these neurons in the appetitive sexual behavior of males. More specifically, these nNOS neurons in the AMePD appear to have more intense calcium activity in response to female urine compared to male urine. They are also activated upon direct contact with females, and their inhibition seems to suppress their preference for the opposite sex.

These preliminary data suggest the importance of nNOS neurons in the AMePD in male sexual behavior. However, additional studies will be necessary to obtain more definitive and broader conclusions regarding consummatory sexual behavior as well as their potential role female behavior.

Français :

Le comportement sexuel est un déterminant crucial de la survie des espèces. Des études récentes sur des rongeurs ont mis en évidence le rôle prédominant de la partie postéro-dorsale de l'amygdale médiale (AMePD) dans l'expression du comportement sexuel chez les deux sexes. Récemment, une nouvelle population de neurones exprimant la nitric oxide synthase neuronale (nNOS) a été identifiée au sein de ce noyau. Des recherches ont déjà établi l'implication significative de neurones à nNOS présents dans d'autres noyaux dans la modulation des comportements sexuels mais aussi anxieux. Ce projet porte donc sur le rôle des neurones à nNOS de l'AMePD lors de l'expression de certains comportements.

Pour analyser l'importance de cette population neuronale, nous avons utilisé deux outils génétiques : les DREADDs inhibiteurs (hM4Di) et la photométrie par fibre. Pour ce faire, des virus exprimant hM4Di et GCaMP6S de façon CRE dépendante ont été injectés dans les AMePD de souris Nos1Cre. Malgré de nombreuses pertes animales qui ont compliqué les analyses, une tendance a émergé, soulignant le rôle de ces neurones dans le comportement sexuel appétitif des mâles. Plus précisément, ces neurones à nNOS de l'AMePD semblent avoir une activité calcique plus intense en réponse à l'urine de femelle comparée à l'urine de mâle. Ils s'activent également au contact direct des femelles et leur inhibition semble supprimer leur préférence pour le sexe opposé.

Ces premières données préliminaire suggèrent l'important des neurone a nNOS de l'AMePD chez le mâle dans le comportement sexuel. cependant des études complémentaires seront nécessaires pour obtenir des conclusions plus définitives et élargie tant au comportement sexuelle consommation que au femelle.

Abréviations

A

AAV : Virus adéno-associé

AAVr : Virus adéno-associé recombinant

AC : Adénylate-cyclase

Aco : Amygdale corticale antérieure

AMe : Amygdale médiale

AMeA : Amygdale médiale antérieure

AMePD : Amygdale médiale postéro-dorsale

AMePV : Amygdale médiale postéro-ventrale

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AOB : Bulbe olfactif accessoire

AOE : Épithélium olfactif accessoire

AON : Noyau olfactif antérieur

AOS : Système olfactif accessoire

AR : Récepteur aux androgènes

B

BNST : Noyau du lit de la strie terminale

BNSTpr : Noyau principal du noyau du lit de la strie terminale

C

CaM : Calmoduline

cGMP : Guanosine monophosphate cyclique

CNO : Clozapine-N-oxyde

cpGFP : Protéine fluorescente verte à permutation circulaire

CTB : Toxine B du choléra

D

DAG : Diacylglycérol

DHT : 5 α -dihydrotestostérone

DREADD : *Designer receptor exclusively activated by designer drugs*

E

Ent : Cortex entorhinal

EPM : Labyrinthe en croix surélevé (*Elevated Plus Maze*)

ER : Récepteur aux œstrogènes

EZM : Labyrinthe en rond surélevé (*Elevated Zero Maze*)

F

FMC : Fluorescence Mini Cube

FPR : Récepteurs *formyl-like*

G

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GECI : Indicateurs de calcium génétiquement codés

GIRKs : *G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels*

GTP : Guanosine triphosphate

H

HHG : Hypothalamo-hypophyso-gonadique

I

IEG : Gènes précoces immédiats

IP3 : Triphosphate d'inositol

L

LC : Coefficient de lordose

LOT : Tractus olfactif latéral

LTP : Potentialisation à long-terme

L-NAME : N(G)-nitro-L-arginine méthyl ester

M

M/T : Mitrales et touffues

MOB : Bulbe olfactif principal

MOE : Épithélium olfactif principal

MOS : Système olfactif principal

MPOA : Aire préoptique médiane

N

NAc : Noyau accumbens

NADPH : Nicotinamine adénine dinucléotide phosphate

nNOS : Forme de neuronale de la NO synthétase

NO : Monoxyde d'azote / Oxyde nitrique

O

OR : Récepteur olfactif

ORN : Récepteur olfactif bipolaire

OT : Tubercule olfactif

P

PAF : Paraformaldéhyde

PAG : Substance grise périaqueducatale

PC : Cortex piriforme

PDE : Phosphodiesterases

PETP : Graphiques temporels péri-événements

PIP2 : Phosphatidylinositol biphosphate

PKA : Protéine kinase A

PKG : Protéines kinases G dépendantes du cGMP

PLCo : Amygdale corticale postéro-latérale

PMCo : Amygdale corticale postéro-médiale

PMv : Partie ventrale du noyau prémammillaire

R

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

S

sGC : Guanylate cyclase soluble

SNC : Système nerveux central

T

TAAR : Récepteur associé aux amines traces

TCRP2 : Canal cationique à potentiel de récepteur transitoire C2

TT : *Taenia tecta*

TX : Tamoxifène

U

USV : Vocalisations ultrasoniques

V

V1R : Récepteur voméronasal de type 1

V2R : Récepteur voméronasal de type 2

VMH : Noyau ventromédian hypothalamique

VMHvl : Partie ventrolatérale du VMH

VNE : Épithélium voméronasal

VNO : Organe voméronasal

VRN : Neurone récepteur voméronasal

VTA : Zone tegmentale ventrale

W

WHV : *Woodchuck hepatitis virus*

WPRE : *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. Différences sexuelles.....	1
2. Comportement sexuel	1
3. Système olfactif	2
3.1. Système olfactif principal	3
3.2. Système olfactif accessoire.....	4
3.2.1. Les phéromones	5
3.3. Rôle du AOS et du MOS dans le comportement sexuel.....	6
4. AMePD	7
4.1. Études expérimentales sur le comportement sexuel et anxieux	9
4.2. Dimorphisme sexuel de l'AMePD.....	10
4.3. Efférences de l'AMePD	11
5. nNOS	13
5.1. Rôles des neurones à nNOS dans les comportements sexuels.....	15
5.2. Nouvelle population de neurones à nNOS dans MePD et son rôle possible dans l'expression de plusieurs types de comportement.....	15
6. Outils génétiques utilisés pour étudier la circuiterie neuronale	16
6.1. Virus.....	16
6.2. GCaMP6s	18
6.3. hM4di	19
Objectifs.....	20
Matériels et Méthodes	21
1. Animaux et hébergement.....	21
2. Chirurgie	22
2.1. Chirurgie stéréotaxique (injection d'AAV et implantation de canule à fibre pour la photométrie).....	22
2.2. Ovariectomie	23
3. Les traitements	24
3.1. CNO	24
3.2. Progestérone	24
4. Les tests comportementaux	24

4.1.	Test d'odeurs sociales et non-sociales	24
4.2.	Tests de préférence de partenaire	25
4.3.	Tests sexuels	26
4.3.1.	Tests des mâles	26
4.3.2.	Tests des femelles -tests de lordose	26
4.4.	Test d'anxiété en labyrinthe en croix surélevé.....	27
5.	Photométrie en fibre.....	27
6.	Perfusion et récolte des cerveaux.....	29
7.	Immunohistochimie	29
8.	Procédure expérimentale.....	30
9.	Analyses statistiques	31
Résultats	33	
1.	Tests comportementaux sur les femelles	33
1.1.	Effet de CNO sur la préférence de partenaire sexuel, le comportement sexuel et le comportement anxieux.....	33
2.	Tests comportementaux sur les mâles	33
2.1.	Les neurones à nNOS de l'AMePD sont activés de manière préférentielle par l'urine de femelles	33
2.2.	Effet de CNO sur la préférence de partenaire.....	34
2.3.	Activation des neurones à nNOS de l'AMePD suite à l'entrée de la femelle dans la cage	34
2.4.	Effet de CNO sur le comportement anxieux	35
Discussion	36	
1.	Embûches rencontrées lors des expériences réalisées	37
1.1.	Perte de nombreux animaux	37
1.2.	Taux de succès de l'enregistrement de l'activité neuronale par photométrie en fibre très faible (1/4)	39
2.	Discussion et perspectives.....	40

INTRODUCTION

La reproduction est l'une des principales fonctions communes à tous les organismes vivants et garantit la survie et la continuité des espèces. En l'absence de reproduction, une espèce est vouée à disparaître. Dans la classe des mammifères, où l'on retrouve les rongeurs et les humains, cette reproduction est sexuelle et les comportements associés sont sexuellement différents. Chez les rongeurs, le mâle exhibe un comportement de monte envers la femelle, qui à son tour adopte une posture de réceptivité sexuelle, appelée la lordose, qui facilite l'intromission du mâle, ce dernier pouvant ensuite éjaculer. Ces comportements sont orchestrés par une circuiterie neuronale sous l'influence des hormones sexuelles (1). Chez la femelle, ils sont synchronisés avec l'ovulation et sont influencés par les indices sociaux perçus par le système olfactif, qui les informent de l'état interne de leur congénère (2). Ces différents facteurs permettent d'optimiser les chances de fécondation.

1. Différences sexuelles

La différenciation sexuelle du cerveau, sous l'influence des stéroïdes sexuels (effet dit organisationnel des stéroïdes) pendant le développement, conduit à la création de réseaux neuronaux qui favorisent l'émergence de comportements spécifiques en cohérence avec les caractéristiques biologiques du sexe gonadique (3). Parmi ces comportements, le comportement sexuel diffère considérablement entre les individus de sexe masculin et ceux de sexe féminin.

2. Comportement sexuel

Le comportement sexuel est séparé en trois phases (4). La première phase, qualifiée d'appétitive, englobe la détection, l'approche et l'investigation du partenaire. Ceux-ci augmentent la probabilité d'accouplement et reflètent la motivation sexuelle. Ce comportement est étudié par des tests dits de préférence de partenaires sexuels. Deuxièmement, la phase consommatoire couvre l'accouplement lui-même. Ce comportement consommatoire diffère fortement entre les mâles et les femelles. Chez le mâle, il se résume à

la monte de la femelle, à l'intromission et à l'éjaculation. Chez les rongeurs femelles, il se caractérise par l'arc-boutement du dos, au relèvement de la tête et de l'arrière-train, ce qui permet l'exposition du vagin afin de faciliter l'intromission du pénis. Chez le rat, lorsque la femelle est sexuellement réceptive, la simple palpation des flancs du rongeur, mimant la monte du mâle, suffit à induire ce comportement (caractère réflexe de la lordose) (5). Ces comportements sont étudiés lors de tests dits sexuels. Enfin la dernière phase correspond à la phase réfractaire, soit à la période post-accouplement pendant laquelle la femelle et le mâle ne sont pas réceptifs et ont peu, voire pas du tout d'intérêt pour le sexe opposé. Ces comportements sont sous la dépendance des effets dits activationnels des hormones stéroïdiennes sexuelles sur la circuiterie neuronale contrôlant ces comportements sexuels (3). Chez les souris femelles, le cycle œstral, sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) et des hormones clefs de cet axe, la GnRH, la LH et la FSH, est d'une durée de 4 à 5 jours. Le cycle est séparé en quatre phases : le proestrus, l'œstrus (période de réceptivité sexuelle, phase d'ovulation), le metoestrus et le dioestrus (6). Durant le proestrus, il y a une hausse des taux circulants en estradiol qui entraîne l'ovulation, suivie d'une augmentation des taux en progestérone. La séquence de sécrétion de ces hormones stéroïdiennes est cruciale pour activer les réseaux neuronaux contrôlant les comportements sexuels. En dehors des périodes de réceptivité, les femelles repoussent les avances des mâles, préservant ainsi de l'énergie, et s'accouplent uniquement lorsqu'elles sont fertiles (7).

Le comportement sexuel masculin est également influencé par des niveaux appropriés d'hormones gonadiques circulantes, principalement la testostérone (1). Cette dernière peut également être convertie en estradiol localement par l'enzyme aromatasase présent dans les cellules cérébrales (8). La castration entraîne la suppression du comportement sexuel, mais celui-ci peut être restauré par un traitement à la testostérone (9).

3. Système olfactif

Les mammifères, y compris les rongeurs tels que les souris, émettent une gamme étendue de molécules dans leur environnement, allant des petites molécules volatiles aux grandes protéines non volatiles. Ces molécules sont libérées par différentes voies, notamment via l'urine, les fèces, ainsi que via les sécrétions de la peau, de l'appareil reproducteur ou des

glandes olfactives spécialisées (10). L'olfaction qui est, contrairement aux humains, le sens dominant chez la souris et la majorité des mammifères (11), permet de capter ces molécules dans l'environnement (12). Celles-ci sont essentielles pour la reconnaissance et les interactions sociales afin de distinguer le sexe et de s'informer sur le statut social ou reproductif de leurs congénères, qui sont des informations indispensables pour l'expression du comportement reproductif (13,14). Les comportements sociaux inter-espèces tels que la réaction au prédateur sont également fortement influencés par ces informations olfactives (15,16).

Le système olfactif, à l'origine de l'olfaction, est lui-même séparé en 2 systèmes : le système olfactif principal assure la détection des odeurs courantes de l'environnement, tandis que le système olfactif secondaire, aussi connu sous le nom de système olfactif accessoire ou voméronasal, détecte principalement, mais pas exclusivement, les signaux chimiques non volatiles des congénères, tels que les phéromones (17,18).

La reconnaissance des odeurs est le fruit de l'activation concomitante de récepteurs odorants et de la connectivité neuronale, conduisant à la création d'une représentation sensorielle dans le cortex (14).

3.1. Système olfactif principal

Le système olfactif principal (MOS) est responsable de la détection à long distance de substances présentes dans l'environnement. Les molécules odorantes de faible poids moléculaire (<300 Da), et donc volatiles, sont inhalées par les narines, traversent les cavités nasales et atteignent finalement l'épithélium olfactif principal (MOE), la plus grande structure olfactive observée chez les rongeurs. C'est à ce niveau que les composés chimiques se lient aux récepteurs olfactifs (OR), des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (19,20), situés sur les cils olfactifs, baignant dans le mucus nasal, des neurones récepteurs olfactifs bipolaires (ORN) (21). Chaque ORN exprime seulement 1 des ~1000 gènes récepteurs codant pour des OR possibles (22,23). Ces récepteurs sont couplés à l'une des deux protéines G, Golf_{alpha} (24,25) ou Gi2_{alpha} (26), qui transformeront la liaison de la molécule odorante en événements biochimiques, et plus précisément, une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) ou du trisphosphate d'inositol (IP3) intracellulaire (27,28). L'activation des canaux cationiques non spécifiques (Na⁺ et Ca²⁺) par l'AMPC et des canaux Ca²⁺ par l'IP3 provoque une entrée massive de ces ions, générant ainsi des réponses électriques (29). Si cette réponse est suffisante pour dépasser le seuil, elle induit des potentiels d'action qui sont

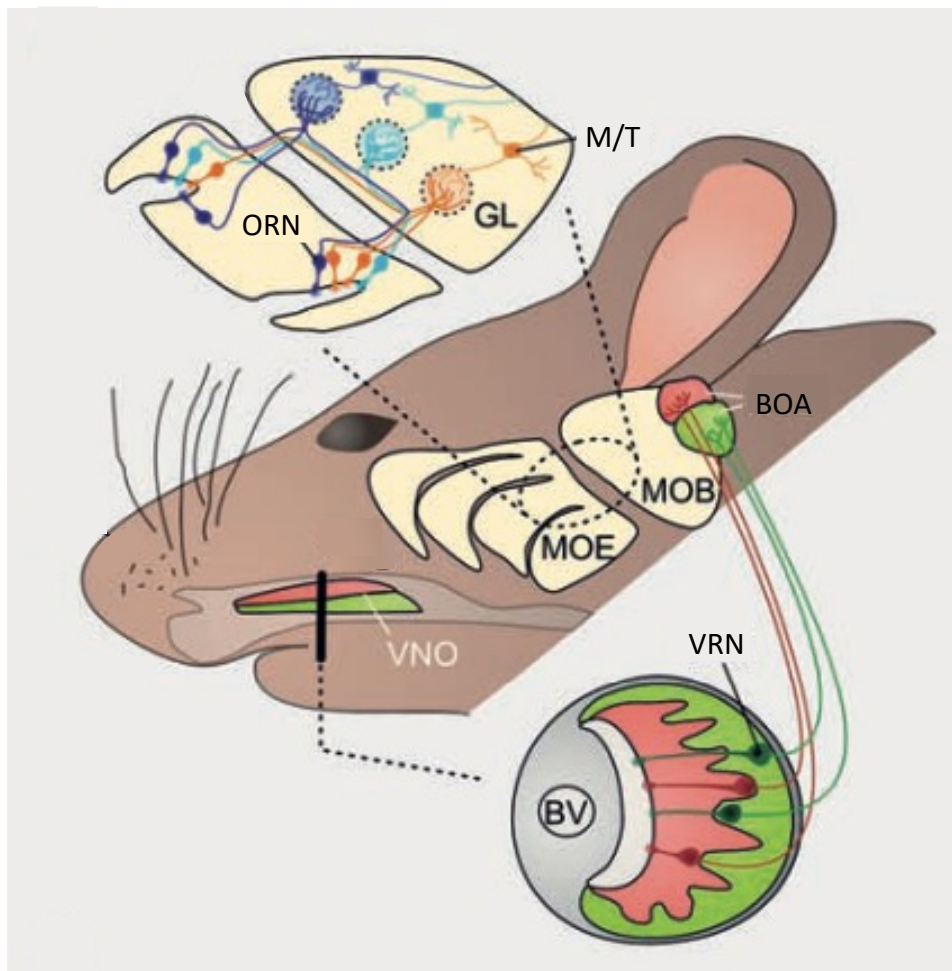


Figure 1 : **Les systèmes olfactifs principal et accessoire : des épithéliums de détection aux bulbes olfactifs.** Schéma montrant les deux principaux sous-systèmes chimiosensoriels avec comme organes récepteurs l'épithélium olfactif principal (MOE), l'organe voméronasal (VNO). Dans le MOE, les neurones récepteurs olfactifs bipolaires (ORN) étendent leurs dendrites ciliaires apicaux dans le mucus olfactif. Les axones des ORN convergent de manière dépendante du récepteur exprimé sur leur dendrites vers les dendrites des cellules mitrales et touffues (M/T) présents dans les glomérules (GL) du bulbe olfactif principal (MOB). Les M/T achemineront les informations vers les couches plus internes. Le VNO est constitué de tubes bilatéraux aveugles à la base antérieure de la cloison nasale. Les molécules stimuli odorantes sont aspirées dans la lumière du VNO grâce aux contractions vasculaires des vaisseaux sanguins latéraux (BV). Deux sous-populations de neurones récepteurs voméronasaux (VRN) résident respectivement dans la couche apicale (rouge) et basale (verte) d'un épithélium sensoriel en forme de croissant. Cette dichotomie organisationnelle est préservée jusqu'au bulbe olfactif accessoire (BOA) où on retrouve également des M/T.

Abréviations : AOB, Bulbe olfactif accessoire ; BOA, Bulbe olfactif accessoire ; BV, Vaisseaux sanguins latéraux ; GL, Glomérule ; MOB, Bulbe olfactif principal ; MOE, Epithélium olfactif principal ; M/T, Cellules mitrales et touffues ; ORN, Neurones récepteurs olfactifs bipolaires ; SO, Organe septal ; VNO, Organe voméronasal ; VRN, Neurones récepteurs voméronasaux.

Adapté de (Spehr et al. 2006).

transmis vers les dendrites des neurones de second ordre situés dans les glomérules constituant le bulbe olfactif principal (MOB) (Figure 1).

Ces neurones de second ordre sont connus sous le nom de cellules mitrales et touffues (M/T). Les ORN exprimant les mêmes gènes récepteurs se projettent spécifiquement vers les mêmes un ou deux glomérules du MOB (30,31). Ainsi, une même odeur active un ensemble spécifique de glomérules est ceci de manière reproductible (32,33). Au-delà des glomérules, les axones des cellules M/T forment un faisceau d'axones qui constituent le tractus olfactif latéral (LOT) se projetant vers de nombreuses régions cérébrales telles que le *tenia tecta* (TT), le noyau olfactif antérieur (AON), le tubercule olfactif (OT), le cortex piriforme (PC), le cortex entorhinal (Ent) et les régions de l'amygdale dite « olfactive », soit les noyaux de l'amygdale corticale antérieure (ACo) et de l'amygdale corticale postéro-latérale (PLCo) (34,35). Des études ont également montré l'existence de projections directes du MOB vers l'amygdale dite « voméronasale », constituée de l'amygdale médiale (AMe) et du noyau du lit de la strie terminale (BNST) (36,37) (Figure 2).

Le MOS a une fonction générale d'"analyseur moléculaire" pour les substances chimiques de l'environnement n'ayant pas de signification prédéterminée, il permet de scanner l'entourage olfactif (38).

3.2. Système olfactif accessoire

Le système olfactif accessoire, quant à lui, détecte les substances présentes dans l'environnement nécessitant un contact nasal direct, telles que les phéromones, qui sont des molécules odorantes non volatiles de poids moléculaire élevé (voir point 3.2.1). Elles sont détectées par la première structure sensorielle du système olfactif accessoire (AOS), l'organe voméronasal (VNO). Le VNO se trouve bilatéralement, juste au-dessus de la voûte nasale, à la base de la cavité nasale. Il possède une lumière allongée, avec les neurones récepteurs voméronasaux (VRN) situés à la surface de l'épithélium voméronasal (VNE). Les VRN sont les neurones sensoriels de premier ordre de l'AOS (39). Le mucus présent dans la cavité nasale, dans lequel sont dissoutes les substances odorantes non volatiles, est activement pompé dans le VNO grâce à des vasoconstrictions du tissu vasculaire autour du VNO faisant entrer un afflux de mucus dans sa lumière (40,41).

Le VNE est lui-même séparé en deux régions bien distinctes : la région proche de la lumière du VNO, ou couche apicale, et la région située à la base de l'organe, ou couche basale.

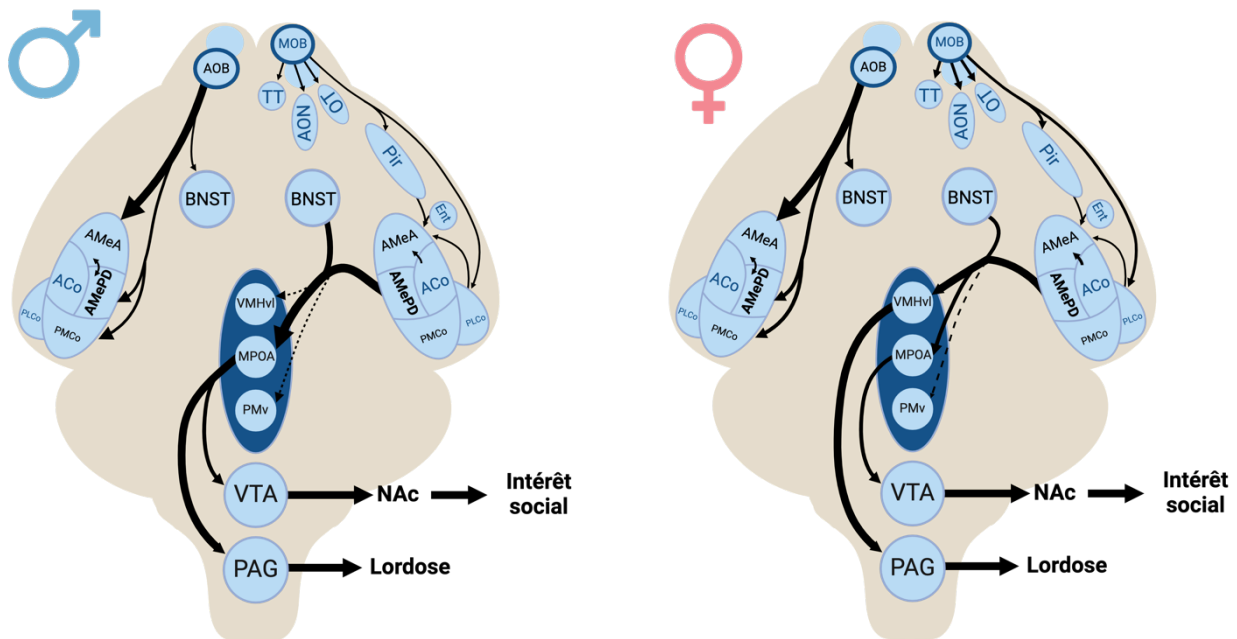


Figure 2 : **Circuits neuronaux du comportement sexuel masculin et féminin.** A partir des glomérules, les axones des cellules mitrales et touffues (M/T) projettent directement vers le *tenia tecta* (TT), le noyau olfactif antérieur (AON), le tubercule olfactif (OT), le cortex piriforme (PC), le cortex entorhinal (Ent) et les régions de l'amygdale dite « olfactive », soit les noyaux de l'amygdale corticale antérieure (ACo) et de l'amygdale corticale postéro-latérale (PLCo). Certains de ces noyaux projettent ensuite vers l'amygdale médiale (AMe), et plus spécifiquement vers la subdivision antérieure (AMeA). Le bulbe olfactif accessoire (AOB) envoie une grande partie de ses projections directes au noyau du lit de la strie terminale (BNST), ainsi qu'à l'AMeA et en proportions moindres vers le noyau cortical postéro-médial de l'amygdale (PMCo) et l'amygdale médiale postéro-dorsale (AMePD). L'AMePD et l'AMeA sont fortement interconnectées. Pour les mâles, les efférences de l'AMePD impliquées dans l'expression du comportement sexuel vont principalement vers l'aire préoptique médiane (MPOA). La MPOA projette à son tour vers la zone tegmentale ventrale (VTA) un noyau important dans l'intérêt social, et vers la substance grise périaqueducale (PAG), une région relai prémotrice du comportement sexuel qui contrôle directement les neurones moteurs de la moelle épinière.

Pour les femelles, la portion ventrolatérale de l'hypothalamus ventromédial (VMHvl) et le MPOA sont les deux principales cibles de l'AMePD nécessaires à l'expression du comportement sexuel. Leurs efférences projettent respectivement vers le PAG et le VTA.

Abréviations : ACo, Amygdale corticale antérieure ; AMe, Amygdale médiale ; AMeA, Amygdale médiale antérieure ; AMePD, Amygdale médiale postéro-dorsale ; AOB, Bulbe olfactif accessoire ; AON, Noyau olfactif antérieur ; BNST, Noyau du lit de la strie terminale ; Ent, Cortex entorhinal (Ent) ; M/T, Cellules mitrales et touffues ; MPOA, Aire préoptique médiane ; NAc, Noyau accumbens ; OT, Tubercule olfactif ; PC, Cortex piriforme ; PAG, Substance grise périaqueducale ; PLCo, Amygdale corticale postéro-latérale ; PMCo, Noyau cortical postéro-médial de l'amygdale ; PMv, Partie ventrale du noyau préammillaire ; TT, *Tenia tecta* ; VMHvl, Portion ventrolatérale de l'hypothalamus ventromédial ; VTA, Zone tegmentale ventrale.

Adapté de Jennings et De Lecea 2020

Chacune de ces régions contient les corps cellulaires de neurones qui diffèrent tant dans le type de récepteurs aux phéromones qu'ils expriment, qu'au niveau de leur morphologie et de leur site de projection. Les VRN dont les corps cellulaires sont situés dans la couche apicale du VNE coexpriment des récepteurs de la superfamille des récepteurs voméronasaux de type 1-positifs (V1R) (42) et la protéine $G\alpha i2$, et projettent vers le bulbe olfactif accessoire (AOB) antérieur. Tandis que les VRN dont les corps cellulaires sont situés dans la couche basale coexpriment des récepteurs de la superfamille des récepteurs voméronasaux de type 2-positifs (V2R) (43) et la protéine $G\alpha o$, et projettent vers le AOB postérieur (44–46) (Figure 1). Les superfamilles V1R et V2R sont les deux familles de GPCR les plus exprimées par les VRN, en plus des récepteurs *formyl-like* (FPR) (47). Les neurones exprimant V1R n'expriment à chaque fois qu'une seule des 160 formes existantes, comme dans le MOE (48). Par opposition aux V1R, plusieurs formes de V2R sur les 120 existantes peuvent être co-exprimées dans un même VRN (49). Les deux superfamilles de récepteurs, lorsqu'ils sont activés, induisent toutes deux une dépolarisation cellulaire par l'activation de la phospholipase C qui convertit le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) en IP3 et en diacylglycérol (DAG). Ensemble, ces seconds messagers déclenchent l'ouverture du TRPC2 (canal cationique 2 de la sous-famille C des TRP (*transient receptor potential*)), permettant l'afflux simultané de Na^+ et de Ca^{2+} (50,51).

Contrairement au MOS, dans le bulbe, un même glomérule reçoit des afférences de VRN exprimant des VR distincts mais apparentés (52). Les cellules M/T de ces glomérules envoient également des projections axonales via le LOT jusqu'à l'AMe, à l'amygdale corticale postéromédiale (PMCo) et aux noyaux principaux du noyau du lit de la strie terminale (BNSTpr) (53,54) (Figure 2).

3.2.1. Les phéromones

Les phéromones permettent aux animaux de communiquer socialement et sont capables d'induire des modifications physiologiques et comportementales (2). Bien que majoritairement traitées par l'AOS, certaines sont détectées par le MOS (55). Plusieurs molécules présentes dans l'urine d'individus mâles, considérées comme de possibles phéromones volatiles, sont détectées par les OR (56). En plus des récepteurs chimiosensoriels canoniques, une nouvelle classe de récepteurs, présents dans le MOE, associés aux amines

traces (TAAR) a été identifiée et semble également être associée à la détection de phéromones volatiles (57,58).

Les types et les quantités de phéromones libérées, notamment celles qui influent sur le comportement sexuel, varient tout au long de la vie en fonction du sexe, du contexte social et environnemental, ainsi que du statut hormonal (e.g. en fonction du cycle œstral et de l'achèvement ou non de la puberté). Ce sont les hormones stéroïdiennes sexuelles, sujettes à d'importantes variations temporelles, qui exercent un rôle crucial dans la régulation de la sécrétion des phéromones. En effet, certaines phéromones sont obtenues par transformation chimique des stéroïdes circulants, avant d'être diffusées à l'extérieur (59,60). Par exemple, un œstrogène sulfaté est émis par les femelles ovulantes et fonctionne ensuite comme l'un des éléments du cocktail de phéromones favorisant le comportement sexuel chez les mâles (61). Pour d'autres phéromones, le contrôle par les hormones sexuelles peut être plus indirect, par exemple via leur action sur les cellules synthétisant ces phéromones (62,63).

Les phéromones peuvent ensuite induire ou supprimer une variété de comportements sociaux, tels que le comportement sexuel, qui nous intéresse pour ce travail. Le type de réponses comportementales peut varier en fonction du sexe, de la physiologie de la reproduction et de l'expérience du congénère (7). Par exemple, les femelles peuvent avoir un comportement très différent en fonction de leur état d'ovulation. Une étude de Dey et al. 2015 (64) a montré que, pendant la phase de dioestrus, les VRN de souris femelles sont temporairement et spécifiquement rendus "aveugles" à un sous-ensemble de phéromones émis par les mâles, alors qu'il sont pleinement activés par ces mêmes ligands pendant la phase d'œstrus. Effectivement, les récepteurs aux œstrogènes présents sur ces neurones peuvent moduler rapidement leur réactivité aux odeurs (65,66). C'est pourquoi lors des tests comportementaux, les femelles sont induites en œstrus comportemental pour que la probabilité d'être sexuellement réceptives augmente. Concernant les mâles, l'expression du comportement sexuel peut être influencée par leur position dans la hiérarchie sociale (7).

3.3. Rôle du AOS et du MOS dans le comportement sexuel

Pour conclure sur le système olfactif, il convient de noter que la voie principale et la voie accessoire ne sont pas strictement séparées ; il existe un certain chevauchement à la fois dans leur anatomie et dans leur fonction. Le MOS et le AOS sont strictement séparés jusqu'au niveau du MOB/AOB. A partir de ceux-ci, certaines projections se chevauchent. Pour

démontrer ceci, Pro-Sistiaga et ses collaborateurs (67,68) ont procédé à des injections simultanées de différents dextrans-amines fluorescents, des traceurs antérogrades dans le MOB et l'AOB. Des chevauchements ont été retrouvés dans de nombreux noyaux associés aussi bien à l'AOS qu'au MOS, tels que les subdivisions antérieure et postérieure de l'AMe.

Des études d'ablation ou de lésion du VNO ou du MOE menées chez les mâles et les femelles ont démontré l'importance de ces deux types d'épithélium à la fois dans la reconnaissance du partenaire et dans l'expression de l'ensemble des comportements sexuels, qu'ils soient appétitifs ou consommatoires (36,69,71).

4. AMePD

L'AMe est une cible majeure des structures olfactives primaires, principalement l'AOB et dans une moindre mesure le MOB. Il est également ciblé par les structures olfactives secondaires telles que l'ACo, le PLCo, le PMCo, et le cortex piriforme. Il s'agit du premier site de convergence entre le MOS et l'AOS.

L'AMe constitue une composante centrale du réseau neuronal cérébral qui intègre à la fois l'état interne (hormonal) et les informations sensorielles chimiques liées aux émotions (phéromones) pour exprimer et réguler de manière adaptée des comportements tels que l'agression, la parentalité et, plus particulièrement dans le cadre de ce projet, le comportement sexuel. En effet les lésions de l'AMe perturbent l'expression des aspects appétitifs et consommatoires du comportement sexuel mâle et femelle chez de nombreuses espèces de rongeurs. Des études histologiques, neurochimiques et fonctionnelles ont divisé l'AMe en au moins 3 subdivisions : la subdivision antérieure, (AMeA), la subdivision postéro-ventrale (AMePV) et celle qui nous intéresse dans ce projet la subdivision postéro-dorsale (AMePD) (72,73).

En tant que site potentiel pour l'intégration des signaux chimio-sensoriels et hormonaux (74), des analyses approfondies des diverses subdivisions ont révélé que l'intégration de ces deux types d'informations essentielles à l'expression appropriée du comportement sexuel, est traitée par différentes sous-régions de l'AMe.

En effet, l'AMeA reçoit la majorité des entrées chimio-sensorielles affluant dans l'AMe. En réponse à l'exposition à une grande variété d'odeurs sociales (de congénères ou d'individus

provenant d'autres espèces), l'expression de gènes précoces immédiats (IEG) augmente dans les neurones de ce sous-noyau, ce qui témoigne de leur activation neuronale. L'AMePD ne reçoit quant à lui qu'un ensemble plus limité d'entrées chimio-sensorielles, provenant principalement de la partie antérieure de l'AOB (75). Il montre une activation neuronale plus faible aux odeurs sociales (76). Seulement des odeurs de congénères, et plus spécifiquement les odeurs du sexe opposé, augmentent l'expression des IEG dans les neurones de l'AMePD. Des lésions de l'AMeA et de l'AMePD ont pour conséquences respectives une investigation plus approfondie des odeurs d'individus du même sexe et une diminution de l'investigation des odeurs d'individus du sexe opposé (77). L'AMeA semble fonctionner comme un filtre chimio-sensoriel permettant de distinguer les odeurs d'individus du sexe opposé de celles d'individus du même sexe, tandis que l'AMePD est essentielle pour générer une attirance spécifique pour les odeurs d'individus du sexe opposé (78,79). De plus, une étude de l'AMe, dans son ensemble, a mis en évidence que les neurones la constituant répondent préférentiellement aux indices olfactifs émis par les individus de l'autre sexe, ce qui n'était pas présent en amont dans l'AOB (80). Cette activation neuronale sexuellement différente n'est présente que chez les animaux sexuellement expérimentés (81).

Les informations liées au statut reproductif interne (maturité sexuelle, phase du cycle oestral) sont également intégrées dans l'AMe et plus spécifiquement dans sa subdivision postéro-dorsale, l'AMePD. En effet, l'AMePD contient un grand nombre de neurones, mais également des cellules gliales avec une haute expression de récepteurs aux androgènes (AR) (82,83), de récepteurs aux œstrogènes (ER-alpha et ER-beta) (82,84), de récepteurs à la progestérone (85), ainsi que l'enzyme aromatase (86) qui catalyse la conversion de la testostérone en œstradiol. De plus, les niveaux circulants d'hormones stéroïdiennes, qui diffèrent en fonction du sexe, affectent les cellules de l'AMePD qui y sont sensibles, ce qui sera à l'origine du dimorphisme sexuel de ce noyau (voir section 4.2 : Dimorphisme sexuel).

Enfin, deux études de P. M. Maras et A. Petrulis de 2010 (78,79) ont montré que l'AMePD et l'AMeA sont fortement interconnectées. La première consiste à injecter un traceur rétrograde, la toxine B du choléra (CTB), dans l'AMeA ou l'AMePD. Après exposition à des odeurs femelles ou mâles, le marqueur d'activité neuronale c-Fos colocalise presque trois fois plus avec les cellules marquées au CTB de l'AMeA, qui projette donc vers l'AMePD, que celle marquée au CTB de l'AMePD, qui projette vers l'AMeA. On peut également noter que 57 % des cellules marquées par la CTB dans l'AMePD expriment également des AR, contre 28 % dans

l'AMeA (78). La deuxième étude mesurait l'expression de c-Fos en réponse aux odeurs femelles ou mâles après lésions électrolytiques de l'AMeA ou de l'AMePD. Sans AMeA l'expression de c-Fos provoquée par l'exposition aux odeurs est réduite dans l'AMePD, tandis que sans AMePD, l'expression de c-Fos dans l'AMeA n'est pas affectée (79). Ces résultats prouvent une interconnexion anatomique et fonctionnelle entre ces deux régions, avec une préférence directionnelle de l'AMeA vers l'AMePD.

En résumé, l'AMe peut être théoriquement divisée en un système sensoriel/contextuel (AMeA) et un système hormonal répondant aux stéroïdes (AMePD), dans lequel le filtrage des informations chimio-sensorielles et contextuelles entrantes se produit d'abord dans le AMeA et qui, à son tour, façonne une réponse plus motivationnelle et spécifique dans l'AMePD qui est modulée par les indices hormonaux de l'état reproductif interne (gonadique) (72,78).

Au sein de cette AMe, les neurotransmetteurs prédominants sont le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA), avec une différence de concentration notable entre les noyaux postéro-dorsal et antérieur. Les neurones excitateurs glutamatergiques sont plus nombreux dans l'AMeA, tandis que les neurones inhibiteurs GABAergiques prédominent dans l'AMePD. Environ 80 % des neurones de l'AMePD sont des cellules GABAergiques chez la souris (87,88).

4.1. Études expérimentales sur le comportement sexuel et anxieux

Comme mentionné précédemment, l'AMePD est essentielle dans l'attraction pour les odeurs du sexe opposé chez les individus des deux sexes. Chez le hamster (77), le rat (89) et la souris (90,91), la lésion de celui-ci élimine les préférences olfactives pour le sexe opposé et semble suggérer une motivation sexuelle diminuée. Chez les mâles, l'activation d'une population de neurones à kisspeptine située dans l'AMePD prolonge le temps d'investigation des femelles en œstrus (92).

En ce qui concerne les comportements sexuels consommatoires tels que la lordose chez la femelle et la monte, l'intromission et l'éjaculation chez le mâle, le rôle de l'AMePD diffère en fonction du sexe et du comportement exprimé. Chez la femelle, des lésions bilatérales de la partie postérieure de l'AMe (90), l'inactivation optogénétique des neurones GABAergiques de l'AMePD (93) ou l'inhibition chémogénique (91) de l'AMe ont tous réduit le quotient de lordose exprimé par les femelles en réponse à la monte. L'importance de l'AMePD

dans les trois phases du comportement sexuel mâle n'a pas encore été clairement démontré. De fait, l'activation, l'inhibition ou l'ablation des neurones exprimant l'aromatase dans l'AMePD n'ont aucun effet sur ces comportements (94). En 2014, il a tout de même été trouvé qu'une stimulation optogénique de faible intensité réalisée au niveau de l'AMePD déclenchait une augmentation de l'investigation sociale et de monte (95).

Il a également été mis en évidence que l'AMePD est fonctionnellement impliquée dans la régulation de l'expression de la peur et l'anxiété. Plusieurs types de stressseurs ont été testés tels que l'exposition à des odeurs de chats, la contention physique (96), le passage d'un test en labyrinthe en croix surélevée (97), le passage d'un test de défaite sociale (98), et à chaque fois, l'expression de c-Fos a été détecté dans l'AMePD des rats mâles. Chez les femelles, l'AMePD exerce une influence sur la régulation de l'axe HHG. Elle pourrait médier la suppression de la pulsativité de la sécrétion de la LH induite par le stress (99,100). En revanche, l'activation chémogénétique des neurones à kisspeptine dans l'AMePD de souris femelles semble réduire leur anxiété (92).

4.2. Dimorphisme sexuel de l'AMePD

Les neurones et les cellules gliales de l'AMePD sont influencés par les niveaux circulants de stéroïdes gonadiques, ce qui entraîne des différences sexuelles dans cette région. Ces différences se manifestent par le volume et le nombre de neurones et de cellules gliales, ainsi que par le volume somatique des neurones, la longueur et la densité des épines dendritiques, et la concentration des neuropeptides. Tous ces paramètres sont plus élevés dans l'AMePD des rongeurs mâles par rapport aux femelles (101). Des expériences de gonadectomies et de remplacement hormonal ont permis de mieux comprendre l'influence des hormones sexuelles sur ce dimorphisme anatomique ainsi que sur le comportement sexuel.

Chez les mâles castrés depuis quatre semaines, le volume de l'AMePD ainsi que le diamètre du soma des neurones diminuent, mais ces diminutions sont empêchées s'ils reçoivent un traitement à la testostérone après leur castration. De plus, chez les femelles ovariectomisées mais traitées quatre semaines avec de la testostérone ou avec de l'estradiol (métabolite aromatisé de la testostérone), les valeurs de ces deux paramètres augmentent pour atteindre des valeurs similaires à celles des mâles intacts (102,103).

Les hormones stéroïdes gonadiques n'impactent pas seulement l'anatomie de l'AMePD mais sont également importantes pour l'expression des comportement sexuels propres aux

deux sexes. Par exemple, chez les rats et les hamsters mâles castrés, l'implantation spécifique d'un implant/d'une capsule de testostérone (ou d'estradiol) dans l'AMePD permet de rétablir le comportement de monte ainsi que le temps passé à renifler des odeurs de femelles en œstrus, alors que l'implantation dans l'AMeA ne le permet pas (73). Cela concorde avec le constat selon lequel l'administration bilatérale d'un antagoniste des récepteurs aux androgènes spécifiquement dans l'AMePD des rats mâles entraîne une augmentation du temps consacré à renifler des odeurs de mâles, égalant ainsi celui passé à renifler des odeurs de femelles en œstrus (104). Concernant les femelles, l'administration d'implants de tamoxifène (TX), un inhibiteur des récepteurs des œstrogènes, ou de 5 α -dihydrotestostérone (DHT), un androgène non aromatisable, dans l'AMePD de rates ovariectomisées et mises en œstrus comportemental a supprimé leur préférence pour les odeurs masculines (105). Donc, chez les femelles en situation de réceptivité sexuelle, la signalisation des estrogènes au niveau de l'AMePD semble nécessaire pour qu'elles expriment une préférence envers les odeurs de potentiels partenaires reproducteurs par rapport aux odeurs d'individus du même sexe qu'elles.

4.3. Efférences de l'AMePD

L'AMePD projette principalement vers deux structures bien connues pour leur implication dans le contrôle des comportements sexuels appétitifs et consommatoires, et qui sont, comme l'AMePD, sensibles aux stéroïdes sexuels et sexuellement dimorphiques : l'aire préoptique médiane (MPOA) et la portion ventrolatérale de l'hypothalamus ventromédial (VMHvl) (72,106). Il projette également vers la portion ventrale du noyau prémammillaire (PMv) (107,108). Il est probable que ce dernier soit également impliqué dans la circuiterie neuronale liée au comportement sexuel mais les données expérimentales à ce sujet sont encore insuffisantes (Soden et al. 2016; Choi et al. 2005; Ross et al. 2018). Ces projections vers ces différentes régions de l'hypothalamus se font soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire du BNSTpr (109). Cependant cette route indirecte ne semble pas essentielle chez la femelle car la lésion de cette dernière ne supprime pas les comportements de lordose et de préférence de partenaires, mais les atténue seulement (110,111). A l'inverse, chez le mâle, le BNSTpr est essentiel pour orienter l'accouplement vers les femelles mais également pour l'ensemble des comportements sexuels consommatoires (110,112).

Pour le comportement sexuel femelle, le VMHvl est la zone régulant les comportements sexuels féminins la mieux caractérisée. D'une part, l'activation ou l'inhibition des neurones le constituant renforce ou diminue, respectivement, la préférence pour les mâles (112,113). D'autre part, une étude de 1979 a démontré pour la première fois que la stimulation électrique prolongée du VMH pouvait faciliter la réponse de lordose à la monte par des mâles (114,115). Par la suite, des études se sont focalisées sur des populations de neurones définies moléculairement dans le VMHvl, tels que les neurones VMHvl^{Cckar}. Leur activation ou l'inhibition (optogénique ou chémogénique) spécifique est capable de promouvoir ou réprimer, respectivement, la réceptivité sexuelle chez les souris femelles ovariectomisées (non réceptives sans supplémentation hormonale) (112,113).

Il a été montré que les neurones du VMHvl projettent en partie vers la substance grise périaqueducale (PAG), une région relais prémotrice du tronc cérébral communiquant avec les neurones moteurs de la moelle épinière pour induire la lordose (116,117). En ce qui concerne la MPOA, elle contribue à la motivation sexuelle chez les femelles grâce à ses projections vers la zone tegmentale ventrale (VTA), région qui projette à son tour vers le noyau accumbens (NAc) (118), soit deux régions clefs du système dopaminergique mésolimbique impliqué dans le circuit de la récompense. La participation de ce circuit favorise ainsi l'apprentissage par renforcement et donc l'intérêt social chez les souris (119,120). Cependant, le MPOA semble exercer un effet inhibiteur sur la lordose (121) principalement par le biais de projections GABAergiques vers le VMHvl (122).

Chez les mâles, le VMHvl semble moins impliqué dans les comportements sexuels que pour les femelles, tandis que la MPOA est indispensable à l'expression de ce comportement. Lors de l'investigation des femelles, l'activation des neurones du VMHvl est similaire à celle observée lors de l'investigation des mâles (123). De très faibles variations du comportement consommatoire ont été observées lors de l'inhibition, spécifique ou non, des neurones de ce noyau (123,124). Chez les mâles, le VMHvl jouerait un rôle plus important dans un autre comportement social : le comportement agressif. En ce qui concerne la MPOA, elle contrôle une grande partie des comportements sexuels mâles. Les neurones qui le composent, en particulier ceux exprimant les ER-alpha, sont activés lors de la recherche des femelles, lors de la phase consommatoire, ainsi que lors de monte accompagné d'émission des vocalisations ultrasoniques (USV) émises par le mâle lors de la monte. Ces observations ont été confirmées par des études d'ablations, d'activations et d'inhibitions de ces neurones en particulier

(122,125,126). Les efférence du MPOA projettent vers le PAG et le VTA, des régions qui, comme décrit plus haut, coordonnent respectivement l'activité motrice responsable de l'expression du comportement, et la récompense qui y est associée (127,129).

Chez les rats sexuellement inexpérimentés des deux sexes, la réponse de c-Fos induite par l'odeur du sexe opposé se limite aux régions périphériques des voies de projections olfactives, y compris l'AMe. Après que les sujets aient acquis de l'expérience sexuelle, cette plus grande activation neuronale s'étend aux régions centrales, où se trouvent les efférences de l'AMe (130,131).

5. nNOS

Le monoxyde d'azote (NO) ou oxyde nitrique, est un messager moléculaire dont la propriété gazeuse lui permet de traverser les membranes biologiques, aussi est-il parfois qualifié de neurotransmetteur atypique (133). Largement distribué dans l'organisme des mammifères, il joue un rôle actif dans plusieurs de leurs processus physiologiques. Dans le système nerveux centrale (SNC), il régule la différenciation, le développement des synapses ainsi que de médier la régulation à long terme des transmissions synaptiques (potentialisation à long terme, inhibition à long terme) (134). Le NO présent dans le SNC est principalement produit par l'isoforme neuronale de la NO synthétase (nNOS, codée par le gène *Nos1*) qui est exprimée de manière constitutive par certains neurones. Il existe également deux autres isoformes de la NO synthétase : la NO synthétase endothéliale (eNOS, codée par *Nos3*), également exprimée de façon constitutive par les cellules endothéliales, et la NO synthétase inductible (iNOS, codée par *Nos2*) (135).

Les NOS convertissent la L-arginine en citrulline et en NO dans une réaction qui nécessite de l'oxygène et grâce à l'apport d'électron permis par la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (136). Cette réaction requiert l'homodimérisation de deux NOS pour assurer un transfert d'électron efficace et la création de sites de liaison de haute affinité pour les cofacteurs et l'arginine (137,138).

Dans les neurones, la nNOS est associée au récepteur NMDA. Cette liaison se fait par l'intermédiaire de la protéine PSD95, qui se lie aux queues cytoplasmiques des sous-unités des récepteurs NMDA (139) ainsi qu'à nNOS via l'interaction de leur domaine PDZ respectif (140). L'activation des fonctions catalytiques de la nNOS est dépendante du complexe calcium-

calmoduline (141). Étant donné que la calmoduline est liée au récepteur NMDA (142), le calcium provient principalement de son afflux à travers ces récepteurs activés. L'afflux de calcium via des canaux calciques voltage-dépendants pourrait également être impliqué (143). En parallèle, la nNOS ancrée à la membrane subit également des modifications post-transcriptionnelles (telles que la phosphorylation sur le résidu sérine 1412 par Akt), ce qui module son activité catalytique en stimulant la synthèse neuronale de NO (144,145).

Les neurones exprimant la nNOS coexpriment également des récepteurs aux hormones stéroïdes gonadiques (ER alpha et AR) (146). Les œstrogènes, en particulier, semblent avoir un impact significatif sur la synthèse du NO par la nNOS. L'augmentation naturelle des œstrogènes plasmatiques avant l'ovulation ou leur injection artificielle est corrélée respectivement à une augmentation des cellules immunoréactives à la nNOS (146) et à la l-citrulline (qui est formée de manière stœchiométrique avec le NO) (147) dans la région préoptique. La formation d'un complexe NMDA-PSD95-nNOS, cruciale pour l'activation optimale de cette dernière, semble être dépendante des niveaux circulants d'œstrogènes. Plus précisément, les fluctuations endogènes des niveaux d'œstrogènes au cours du cycle œstral sont corrélées à la phosphorylation de la nNOS sur le résidu de sérine 1412, au niveau d'association de cette forme phosphorylée avec le complexe récepteur NMDA/densité post-synaptique 95 à la membrane plasmique, et donc à l'activité de cette enzyme. Tous ces événements atteignent leur apogée dans l'après-midi du proestrus, lorsque les niveaux d'œstrogènes sont les plus élevés. (148,149).

Le rayon d'action du NO est limité (environ 200 µm depuis sa source d'émission) par sa courte demi-vie (1 à 10 secondes). Du fait de sa nature gazeuse, le NO diffuse librement et préférentiellement de manière rétrograde au niveau des synapses du SNC (150). Il n'est pas stocké dans des vésicules et n'agit pas sur un récepteur classique. La guanylate cyclase soluble (sGC) a été identifiée comme étant la principale cible du NO. Une fois activée, elle convertit de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (cGMP) qui interagit avec trois groupes majeurs de protéines : les protéines kinases G dépendantes du cGMP (PKG), les phosphodiesterases (PDE) et les canaux cationiques activés par le cGMP, ce qui permet à la voie NO/cGMP d'être impliquée dans plusieurs processus physiologiques distincts (151,153) (Figure 3).

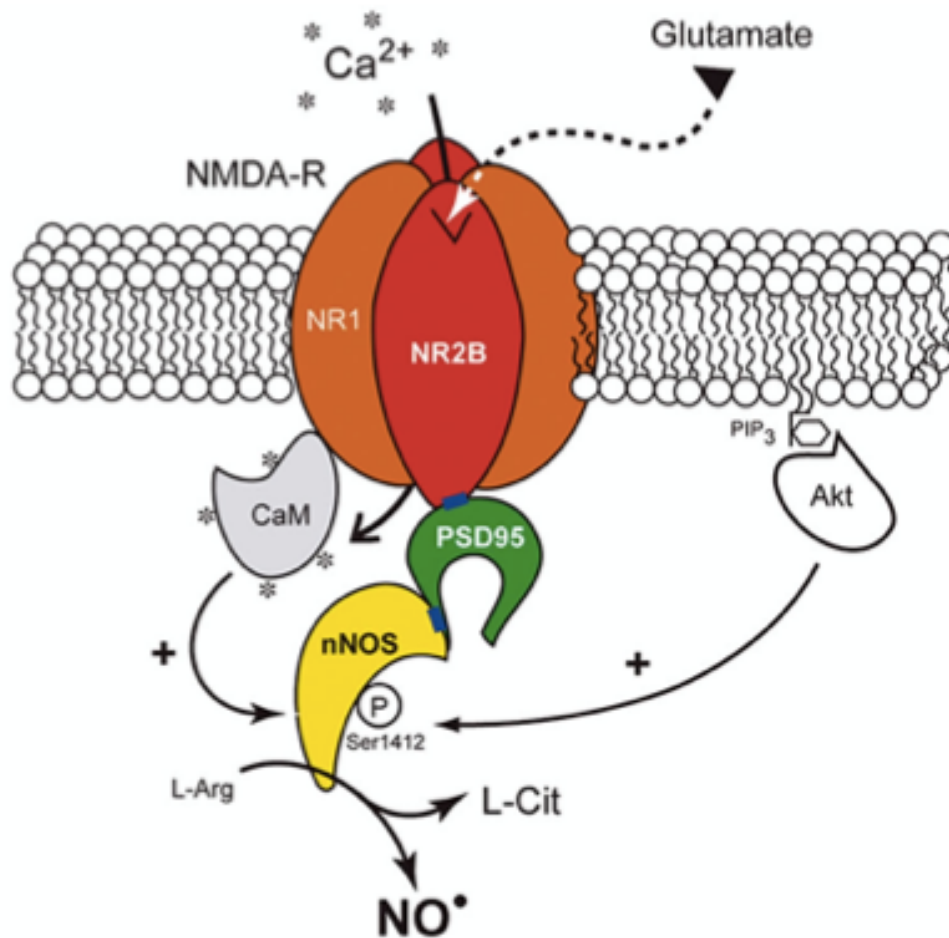


Figure 3 : **Complexe protéique permettant la synthèse de l'oxyde nitrique (NO).** La migration de la NO synthétase neuronale (nNOS) du cytosol vers la membrane et son interaction physique avec la sous-unité NR2B du récepteur NMDA (NMDA-R) via les domaines PDZ (rectangles bleus) impliquent la protéine d'échafaudage post-synaptique 95 (PSD-95) et la formation d'un complexe nNOS/PSD-95/récepteur NMDA. La stimulation du récepteur NMDA par le glutamate déclenche l'entrée de calcium dans le neurone. Le calcium se lie alors à la calmoduline (CaM), activant ainsi la nNOS et favorisant la production de NO. Ce composé est synthétisé enzymatiquement à partir de L-arginine (L-Arg) et produit de la L-citrulline (L-Cit). Parallèlement, la nNOS subit des modifications post-transcriptionnelles, telles que sa phosphorylation par Akt, ce qui facilite sa liaison au complexe nNOS/PSD-95/récepteur NMDA. L'œstradiol semble jouer un rôle crucial dans cette modification.

Abréviations : CaM, Calmoduline ; L-Arg, L-arginine ; L-Cit, L-citrulline ; NMDA-R, Récepteur NMDA ; nNOS, forme neuronale de la NO synthétase ; NO, Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote ; PSD-95, Protéine d'échafaudage post-synaptique 95.

Adapté de Chachlaki et Prevot 2020

5.1. Rôles des neurones à nNOS dans les comportements sexuels

Grace à l'étude des conséquences de la délétion homozygote de l'exon 6 du gène codant pour la nNOS chez la souris, il est établi depuis 2002 que le NO agit comme un modulateur des fonctions de reproduction chez les rongeurs. (154).

Plus récemment, des travaux menés par le laboratoire d'accueil ont permis d'indiquer que les neurones à nNOS interagissent avec les neurones à kisspeptine pour réguler le comportement sexuel chez les femelles. Tout d'abord, l'expression de la lordose est significativement diminuée chez les souris femelles dépourvues de nNOS (nNOS^{-/-}) et complètement inhibée chez les rats femelles recevant des injections intracérébroventriculaires d'inhibiteurs de nNOS, tels que le L-NAME (155,156). De manière intéressante, l'expression de la lordose est également significativement diminuée chez les souris femelles infusées bilatéralement et de manière chronique avec du L-NAME dans la portion ventrolatérale du VMH (157). Ensuite, des études impliquant des injections de Kp-10, une forme active de la kisspeptine, et de SNAP, un donneur de NO, chez des souris femelles nNOS^{-/-} et Kiss1^{-/-} respectivement, ont suggéré que le NO agit en aval de la kisspeptine dans l'expression de la lordose (155). De plus, l'utilisation de femelles de deux lignées transgéniques, Kisspeptin-IRES-Cre (KissIC) et NOS1::CRE, ainsi que du virus antérograde AAV8-flex Syn::EGFP injecté dans l'AVPV de souris KissIC et dans le VMH de souris NOS1::CRE, suggère une communication bidirectionnelle entre ces deux populations. Pour le confirmer, une expérience préliminaire d'ablation des neurones à nNOS spécifiquement dans le VMH a été entreprise. Elle a résulté en la réduction significative de la lordose, ce qui a confirmé le rôle essentiel de cette population dans le comportement sexuel femelle.

Chez les mâles, l'ablation spécifique de cette population a également résulté en une diminution des comportements de monte et d'intromission, ce qui indique qu'elle pourrait tout aussi bien jouer un rôle dans le comportement sexuel mâle.

5.2. Nouvelle population de neurones à nNOS dans MePD et son rôle possible dans l'expression de plusieurs types de comportement

Les neurones exprimant NOS sont présents dans toute l'amygdale médiane et répondent aux stéroïdes sexuels (158,159). Plus spécifiquement dans l'AMePD, des études histochimiques ciblant l'activité NADPH-diaphorase, utilisée comme marqueur de la présence

de l'isoforme nNOS dans le cerveau, montre que cette activité NADPH-diaphorase semble plus importante dans l'AMePD des mâles (160). De plus, une grande proportion des neurones exprimant la nNOS, exprime également des récepteurs aux hormones stéroïdes gonadiques et plus spécifiquement ESR1 et AR (146). Dernièrement, on a découvert que la phéromone mâle darcin stimule l'activité des neurones NOS du AMePD chez les souris femelles, ce qui suggère que ces neurones peuvent répondre aux signaux olfactifs émis par des congénères (161). Par conséquent, bien que la plupart des recherches se soient concentrées sur les effets de la signalisation NOS dans le VMH, il est possible que la signalisation NOS en amont du VMH, tel que dans l'AMePD, puisse jouer un rôle dans la modulation des comportements sexuels.

Parallèlement à cela, l'injection dans l'AMe de rat de l'inhibiteur de la nNOS, le L-NAME, a montré un impact anxiolytique sur leurs comportements (162). Il serait donc intéressant d'investiguer un possible rôle des neurones à NO de l'AMePD dans l'anxiété.

6. Outils génétiques utilisés pour étudier la circuiterie neuronale

Les virus et les différentes séquences composant le génome viral qui ont été utilisés sont expliqués en section 6.1. Cette section sera suivie de la description des différents outils apportés par ces virus en section 6.2 (GCaMP6s) et 6.3 (hM4Di).

6.1. Virus

Les 3 virus utilisés pour ce travail sont les suivants :

- AAV1 hsyn Flex GCaMP6s WPRE SV40i
- AAV1 hSyn Dio hM4D (Gi) mCherry (RC1)
- AAV2 hSyn Dio mCherry (RC2)

Le dernier des trois sert de contrôle.

La distribution de gènes par le virus adéno-associés (AAV) s'est imposée comme une méthode sûre et robuste pour l'expression à long terme de transgènes dans le SNC (163). Les AAVs sont composés d'une capside protéique icosaédrique d'environ 26 nm de diamètre et d'un génome d'ADN simple brin d'environ 4,7 kb qui peut être soit le brin plus (sens), soit le brin moins (anti-sens) (Muzyczka, N. et Berns 2001). La forme recombinante des AAV (AAVr)

encapsule des génomes dépourvus de toutes les séquences codant pour les protéines AAV sauvages qui sont remplacées par des cassettes d'expression de gènes d'intérêt (164), dans notre cas GCaMP6s, hM4Di et mCherry. Les différents sérotypes d'AAV reconnaissent des récepteurs cellulaires distincts tels que des glycoprotéines sialylées pour l'AAV1 et des protéoglycanes à base de sulfate d'héparine pour l'AAV2, tous les deux ont montré un tropisme pour les neurones du système nerveux central (165).

Concernant les génomes apportés par les AAVr, des séquences identiques entre les trois virus ont été utilisés. On y trouve le promoteur humain de la synapsine, une protéine largement distribuée dans les synapses du système nerveux central et périphérique (166). Ce promoteur confère une expression transgénique à long terme hautement spécifique des neurones et non des cellules gliales présentes dans la zone du site d'injection. Flex ou DIO sont deux noms qui désignent le même système utilisé pour que l'expression des transgènes viraux soit Cre-dépendante. La séquence des transgènes est encadrée par deux paires différentes de sites LoxP, conçus pour ne pas pouvoir recombiner entre paires. La séquence elle-même du transgène est inversé par rapport au promoteur, ce qui prévient son expression en l'état. En présence de la Cre recombinase, les sites LoxP recombinent, ce qui permet l'expression des transgènes. Ainsi, son expression n'est possible que dans les neurones exprimant la Cre. Le système Flex ou DIO utilisant la double paire de sites LoxP garantit que le transgène ne puisse plus retourner en orientation inverse grâce à une seconde recombinaison à l'origine de l'excision d'une partie du système, comme illustré en figure 4. Les sites LoxP inversés l'un par rapport à l'autre provoquent l'inversion de la séquence ADN qu'ils encadrent, tandis que s'ils sont orientés dans le même sens, leur recombinaison entraîne la délétion de cette séquence. Le gène d'intérêt est suivi, dans la région 3'UTR non traduite, de deux séquences importantes pour augmenter la stabilité et donc la traduction de l'ARNm transcrit : WPRE et SV40. Premièrement, *Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) Posttranscriptional Regulatory Element* (WPRE) renforce l'expression du transgène en augmentant l'accumulation cytoplasmique des ARN viraux *in vivo* (167). SV40 quant à lui est un signal de polyadénylation, qui induit la synthèse d'une queue poly(A) favorisant la traduction et empêchant la dégradation de l'ARNm (168).

Dans le virus AAV1 hSyn Dio hM4D (Gi) mCherry (RC1), le gène mCherry, codant pour une protéine fluorescente rouge, est utilisé comme gène rapporteur étant donné qu'il n'y a

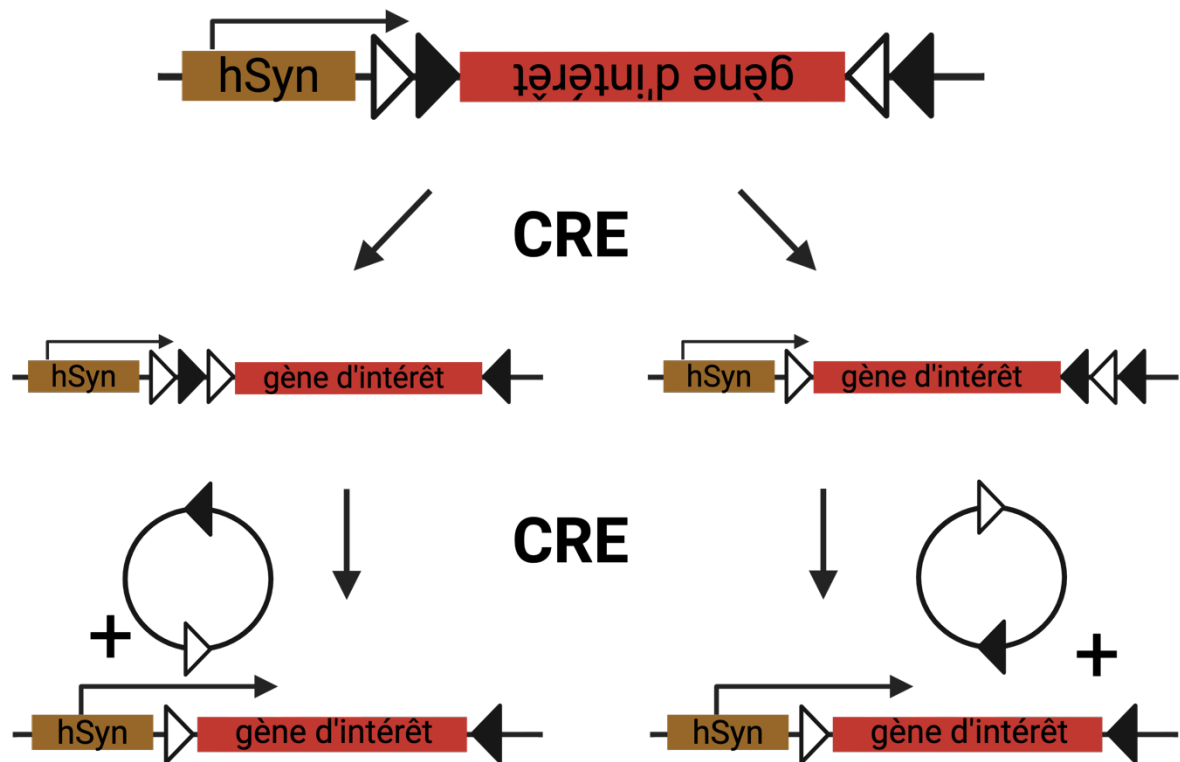


Figure 4 : **Représentation schématique du système DIO/FLEX.** Les triangles blancs et noirs représentent deux paires différentes de sites LoxP flanquant une région d'intérêt, dans notre cas, XX. Ces sites LoxP sont reconnus par la protéine recombinase Cre et, selon l'orientation de leur séquence, la Cre entraînera l'inversion ou l'excision de la région qu'ils encadrent. L'utilisation de deux paires différentes de LoxP, incapables de recombiner entre elles, permet de bloquer le système après excision de la région d'intérêt.

pas d'anticorps spécifique à hM4Di pour vérifier son expression dans les neurones en immunohistochimie.

6.2. GCaMP6s

La mesure de la fluorescence dépendante du Ca^{2+} libre intercellulaire à l'aide d'indicateurs de calcium génétiquement codés (GECI) (169,170) est une méthode standard pour suivre l'activité neuronale de neurones les exprimant chez des animaux éveillés se comportant librement (171,172). GCaMP6s fait partie de cette famille de protéines et est le résultat de la fusion entre la protéine fluorescente verte à permutation circulaire (cpGFP), de la protéine de liaison au calcium la calmoduline (CaM) et du peptide M13 (106,173,174) (Figure 5). GCaMP6s a une intensité de fluorescence faible mais suite à la liaison du calcium libre intracellulaire au domaine de la CaM, celui-ci s'enroule autour du peptide M13 ce qui a pour conséquence de changer la conformation initiale, l'environnement stérique et électrostatique du chromophore de GCaMP (cpGFP) et *in fine* d'augmenter son intensité de fluorescence (175). Plus précisément, il y a une déprotonation associée à l'état de haute intensité de fluorescence de GCaMP et une diminution de son pK_a et de l'accès du solvant au chromophore (175,176).

Plusieurs variants du senseur GCaMP6 existent : GCaMP6s, 6m, 6f avec différentes cinétiques : lente (*slow*), moyenne (*medium*) et rapide (*fast*) respectivement. Plus la cinétique est lente, plus la sensibilité augmente (177). La cinétique fait entre autres référence au temps de demi-décroissance et au temps de demi-élévation de la fluorescence qui sont plus longs pour GCaMP6s comparé à GCaMP6f. La version lente, quant à elle, émet des variations de fluorescence jusqu'à sept fois plus importante, la rendant plus sensible (177,178). Pour un petit nombre de potentiels d'action, comme c'était le cas dans les expériences où des comportements espacés dans le temps ont été étudiés, le capteur le plus sensible, GCaMP6s est un choix judicieux afin de perdre un minimum de signal et donc d'information.

En résumé, dans les neurones où il est exprimé, GCaMP6s permet de détecter l'augmentation rapide de calcium libre intracellulaire associée à l'activation neuronale et donc d'étudier le profil d'activation de ces neurones (179,180) en analysant la fluorescence émise au court du temps lors de tests comportementaux.

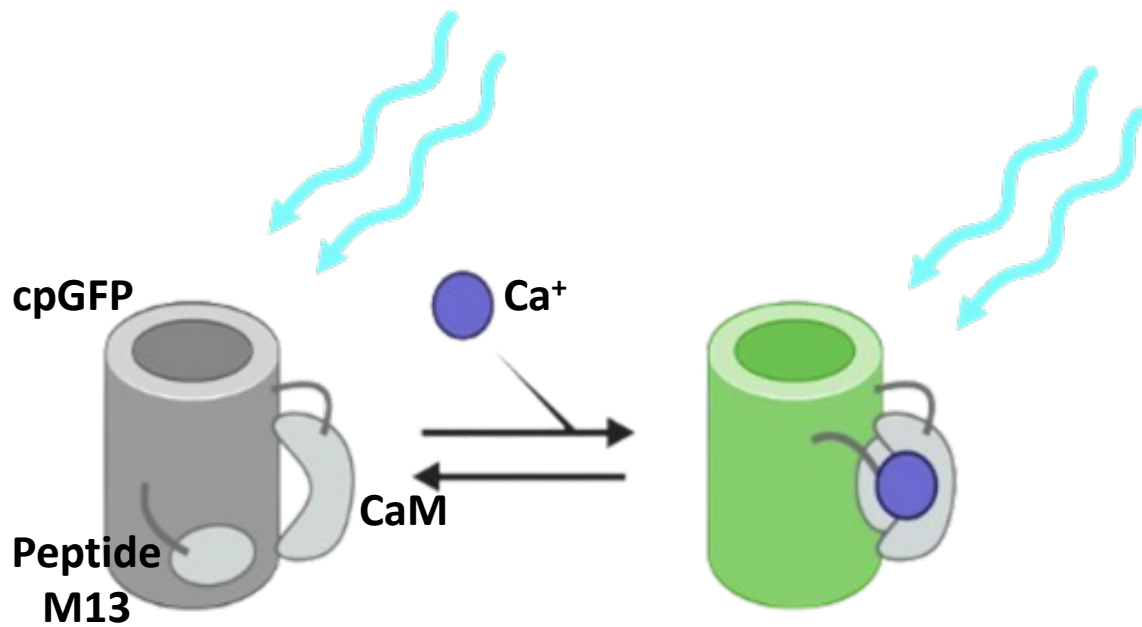


Figure 5 : **Représentation schématique de GCaMP6s.** Protéine résultant de la fusion entre la protéine fluorescente verte à permutation circulaire (cpGFP), la calmoduline (CaM), qui présente une affinité pour le calcium, et le peptide M13. Une fois liée au calcium (Ca^{2+}), la conformation de GCaMP6s change et augmente sa fluorescence.

Abréviations : CaM, Calmoduline ; Ca^{2+} , Ion calcique ; cpGFP, Protéine fluorescente verte à permutation circulaire.

Les ondes lumineuses d'excitation (465nm) et d'émission (520nm) de GCaMP6s sont captées dans la zone d'intérêt du cerveau, où est exprimé GCaMP6s, grâce à une fibre optique implantée au préalable dans cette zone.

6.3. hM4di

Pour étudier le rôle d'une population de neurones sur un comportement, il est intéressant d'analyser l'impact de l'inhibition spécifique de ces neurones sur l'expression de ce comportement. Pour ce faire, l'utilisation des DREADDs (*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*), un outil chimio-génétique, et plus spécifiquement hM4Di est une option de choix car il permet une inhibition réversible et donc non-définitive (181).

hM4Di est une version modifiée des RCPG muscariniques humain 4 (M4) qui ne répond plus à son ligand natif, l'acétylcholine mais à des composés pharmacologiques inertes tels que le clozapine-N-oxyde (CNO)(182). Étant couplé à une protéine G et plus spécifiquement G α i, hM4Di induit une inhibition neuronale lorsque qu'il est lié au CNO.

L'activation de la protéine G α i entraîne l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et, par conséquent, la diminution de la production d'AMPc, un des facteurs activateurs de la protéine kinase A (PKA) (183). D'autre part, la sous-unité β/γ se détache de la protéine G α i et active les *G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels* (GIRKs) accompagné d'une sortie massive de potassium et donc d'une hyperpolarisation cellulaire (184).

Exprimé dans des neurones spécifiques et stimulé par le CNO, hM4Di conduit donc à une hyperpolarisation et à une atténuation de l'activité neuronale, mais également une action beaucoup plus puissante de réduction au silence de la transmission synaptique (181,185).

Objectifs

L'objectif principal de ce projet est d'approfondir notre compréhension de la circuiterie neuronale régissant la préférence, la motivation et les comportements sexuels chez les deux sexes. En particulier, nous aimerions tester l'implication spécifique des neurones exprimant la nNOS dans l'AMePD. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris Nos1Cre ainsi que des outils Cre-dépendants tels que les DREADDS et la photométrie en fibre.

L'implication de l'AMePD est établie chez les deux sexes. Cependant, il est devenu évident qu'une simple analyse anatomique des liens entre les différentes régions cérébrales ne suffit plus à expliquer la fonction et la complexité de ces circuits. Une exploration approfondie de la physiologie, des neurotransmetteurs et des molécules messagères exprimés par les neurones constituant ces régions est nécessaire pour une compréhension plus complète. Par conséquent, ce mémoire vise à clarifier le rôle des neurones exprimant la nNOS dans la régulation des comportements sexuels et anxieux chez la souris mâle et femelle.

Matériels et Méthodes

1. Animaux et hébergement

Le modèle animal utilisé consiste en des souris mâles et femelles hétérozygotes de la lignée transgénique *Nos1^{Cre}* (JAX stock #017526). Cette souche de souris congénique synthétise des enzymes nNOS fonctionnelles, mais exprime également l'enzyme Cre recombinase dans les cellules exprimant *Nos1*. En effet la séquence de cette enzyme, floxée, a été insérée juste après le codon STOP du dernier exon du gène *Nos1*. La séquence IRES, permettant le démarrage de la traduction d'un ARN messager, se trouve entre ce codon STOP du dernier exon et le début de la séquence de la Cre.

L'utilisation de ce modèle nous permettra d'utiliser des outils Cre-dépendants afin d'exprimer spécifiquement dans les neurones à nNOS ciblés la sonde GCaMP6s et le récepteur DREADD hM4Di.

Les souris *Nos1Cre* sont élevées à l'Animalerie Centrale de Liège (n° d'agrément : LA1610002) et sont âgées de 12 semaines au début des expériences. Pour la réalisation des tests comportementaux, 10 souris mâles et 10 souris femelles C57BL6/J âgées de 3-4 mois ont également été acquises auprès du laboratoire Charles River afin de servir de stimuli. L'animalerie où se sont tenues les expériences et où l'ensemble des animaux ont été hébergés est une animalerie conventionnelle où la température est contrôlée ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Les souris reçoivent toutes de la nourriture et de l'eau *ad libitum* (Special Diet Services, RM3). Les protocoles utilisés pour ce projet ont été préalablement approuvés par la Commission d'Éthique Animale de l'Université de Liège (protocole n°2195). Les souris *Nos1^{Cre}* ont été hébergées en groupes de 3 à 5 individus jusqu'à ce qu'elles subissent une chirurgie stéréotaxique. Elles ont ensuite été hébergées individuellement dans des cages en plastique dépourvues de grilles afin d'éviter d'endommager la fibre optique implantée. Les mâles ont été placés en cycle lumière/obscurité inversé (12h:12h de lumière/obscurité avec extinction des lumières à 9h du matin) à la fin de leur chirurgie. Les femelles quant à elles ont été maintenues en cycle lumière/obscurité régulier jusqu'à leur ovariectomie, suite à quoi, elles ont également été placées en cycle inversé. Le placement en cycle inversé nous permet d'étudier le comportement des souris en journée, lorsqu'elles sont en phase active.

Les souris mâles stimuli sont logés individuellement une fois qu'ils ont acquis de l'expérience sexuelle, tandis que les femelles stimuli sont maintenues en groupe de 4 à 5 sujets. L'ensemble de ces animaux sont placés en cycle inversé.

2. Chirurgie

2.1. Chirurgie stéréotaxique (injection d'AAV et implantation de canule à fibre pour la photométrie)

Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane dans une chambre d'induction, puis sont placées dans un cadre stéréotaxique motorisé (Neurostar, Allemagne) où elles sont maintenues sous anesthésie gazeuse (isoflurane 2 %). Tout au long de la chirurgie, les souris sont placées sur un tapis chauffant et, avant l'incision de la peau du crâne, les souris reçoivent une injection sous-cutanée d'analgésique (Temgesic, 0,1mg/kg par souris) afin de diminuer le risque de décès et de souffrance lors des chirurgies. Après incision, les sutures du crâne sont rendues visibles par l'application d'H₂O₂ 3% et les coordonnées stéréotaxiques de 2 repères anatomiques, le bregma et le lambda, sont reportées. Les crânes sont positionnés de façon à ce que ces 2 repères soient alignés sur le plan médian et qu'il y ait une différence entre les coordonnées dorsoventrales (DV) de ces repères inférieure à 0,1 mm. Les coordonnées DV de points 2 mm à droite et 2 mm à gauche de la ligne passant par le bregma et le lambda sont également ajustées pour que la différence entre les deux soit inférieure à 0,1mm. Ceci nous permet de positionner correctement l'animal sur le cadre stéréotaxique.

Les coordonnées stéréotaxiques de la AMePD (AP : -1,6 mm ; ML : \pm 2 mm ; DV : 5mm) ont été obtenues à l'aide de l'atlas de Paxinos et Franklin (2001) (Figure 6).

Deux trous sont forés dans le crâne aux coordonnées AP et ML de la AMePD. Puis, à l'aide d'une seringue Hamilton de 1 μ l, 0,3 μ l d'un mélange de 2 virus sont injectés bilatéralement dans l'AMePD à un débit de 0,1 μ l/min. Le groupe des souris tests et celui des souris contrôles reçoivent tous deux au cours de cette injection l'AAV1 hsyn Flex GCAMP6s WPRE SV40, mais le premier groupe reçoit en plus l'AAV1 hSyn Dio hM4D (Gi) mCherry (RC1), tandis que le second reçoit l'AAV2 hSyn Dio mCherry (RC2)). Ainsi, les deux groupes exprimeront GCamp6s, mais seul le premier exprimera hM4Di et aura son activité des neurones à nNOS de la MeAPD modulable. La concentration de chaque virus dans le mélange est de 5×10^{12} GC/mL. La

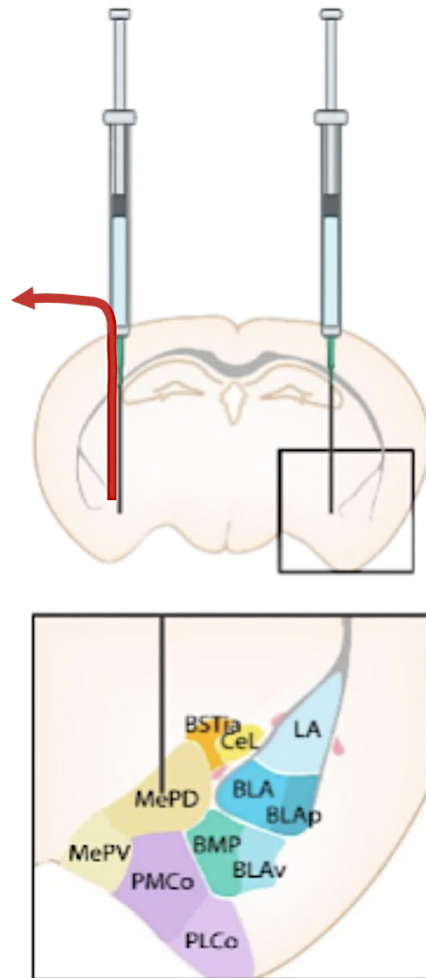


Figure 6 : **Site d'injection stéréotaxique.** Injection bilatérale des virus dans l'AMePD à ces coordonnées (AP : +1,6mm ; ML : \pm 2mm ; DV : 5mm), et pose de la fibre optique uniquement dans l'hémisphère gauche.

Abréviations : BLA, Amygdale baso-latérale ; BLAp, Amygdale baso-latérale postérieure ; BLAv, Amygdale baso-latérale ventrale ; BMP, Amygdale baso-médiale postérieure ; BNST, Noyau du lit de la strie terminale ; CeL, Amygdale centro-latérale ; LA, Amygdale latérale ; MePD, Amygdale médiane postéro-dorsale ; MePV, Amygdale médiane postéro-ventrale ; PLCo, Amygdale corticale postéro-latérale ; PMCo, Amygdale corticale postéro-médiale.

seringue a été laissée en place pendant 10 minutes puis relevée de 0,2 mm avant d'être retirée entièrement afin que le virus diffuse au mieux dans la région d'injection.

Au cours de la même intervention chirurgicale, une fibre optique implantable est placée en unilatéral à gauche, 0,2mm au-dessus du site d'injection virale (DV : 4,8). Le tout a été fixé à la surface du crâne à l'aide de ciment dentaire. Après avoir suturé la peau autour de la fibre, les souris sont laissées sur tapis chauffant jusqu'à leur réveil puis sont replacées dans leur cage d'hébergement.

Les tests comportementaux commencent 3 semaines après les chirurgies stéréotaxique afin de laisser au virus le temps d'infecter les neurones et d'exprimer leur génome, afin que l'expression de hM4Di et de GCaMP6s soit efficace et stable (165).

2.2. Ovariectomie

L'ensemble des femelles utilisées, expérimentales et stimulus ont été ovariectomisées et implantées avec un implant d'œstradiol (E2) afin d'éliminer les différences individuelles dans les niveaux endogènes d'hormones sexuelles circulantes, de prévenir les gestations et de pouvoir mimer un œstrus comportemental par l'administration de progestérone.

Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale (ip) d'un mix de kétamine (Nimatek, 80 mg/kg par souris) et de médétomidine (Domitor, Pfizer, 1 mg/kg par souris). Puis, les deux ovaires sont retirés chirurgicalement, tandis qu'un implant d'œstradiol est placé au niveau de la nuque, en sous-cutané. L'implant consiste en une capsule en silastic de 5 mm de long (diamètre extérieur 2,41 mm, diamètre intérieur 1,57 mm) remplie d'un mélange 1:1 de 17 β -œstradiol (101565, ICN Biomedicals Inc.) et de cholestérol (C8667, Sigma). À la fin de la chirurgie, toutes les souris ont reçu une injection en sous-cutané (sc) d'un analgésique à base de buprénorphine (Temgesic, 0,1mg/kg par souris) et d'atipamézole (NacroStop® ; 4 mg kg⁻¹) qui a des effets antagonistes à la médétomidine, ce qui permet d'accélérer le réveil. Les animaux sont laissés sur tapis chauffant jusqu'à leur réveil et sont ensuite ramenés dans leur cage d'hébergement.

Les mâles testés et stimuli ne sont pas gonadectomisés.

3. Les traitements

3.1. CNO

100 μ l de CNO sont injectés en ip 30 minutes avant les tests comportementaux à une concentration de 2 mg/kg (le CNO en poudre a été préalablement dissous dans de la saline à une concentration de 0,05mg/ml). De la saline a été injectée en même quantité (100 μ l) que le CNO également en ip en situation contrôle.

3.2. Progestérone

Trois heures avant chaque entraînement ou test, 50 μ l de progestérone (10 mg/ml dans de l'huile de sésame, P0130, Sigma) sont injectés en sc aux femelles. Cette injection, combinée au 17 β -estradiol libéré par l'implant, mime la condition naturelle d'œstrus dans laquelle les souris femelles sont sexuellement réceptives. On dit que les souris sont alors en œstrus comportemental.

4. Les tests comportementaux

4.1. Test d'odeurs sociales et non-sociales

4.1.1 Collecte d'urines :

L'urine a été récoltée à partir de mâles C57BL/6J expérimentés sexuellement, à partir de femelles C57BL/6J ovariectomisées et supplémentées en hormones stéroïdes gonadiques (implant d'oestradiol et injection en sc de progestérone 2 à 6 heures avant la collecte d'urine) et à partir de rats mâles et femelles de souche Wistar (urines de rats mélangées). L'urine a été recueillie en tenant la souris par la peau du cou et par la queue au-dessus d'un entonnoir, en veillant à ce qu'il n'y ait pas de contamination fécale de l'urine. Les échantillons d'urine de souris de même sexe ont été regroupés, vortexés et ensuite aliquotés dans des Eppendorf de 1ml et conservés à 80°C jusqu'à utilisation en test. L'urine de rat a été récoltée par les animaliers et stockée dans les mêmes conditions que l'urine de souris.

4.1.2 : Tests d'odeurs sous photométrie en fibre :

10 minutes avant l'enregistrement par photométrie, les canules des souris ont été connectées à la fibre photométrique et les souris ont été introduites dans une arène de test en Plexiglas (37 cm de long x 21 cm de large x 17 cm de haut) avec de la litière fraîche. Durant

l'enregistrement, des cotons-tiges imbibés soit d'urine de souris mâle, soit d'urine de souris femelle en œstrus, soit d'urine de rat (un prédateur de la souris), soit d'amyl-acétate (odeur chimique de banane, utilisée comme odeur contrôle non-sociale), soit d'eau (utilisée comme odeur contrôle neutre supplémentaire) ont été présentés aux souris tests. Chaque odeur a été présentée 3 à 4 fois, dans des ordres aléatoires, à part pour l'urine de rat qui est systématiquement présentée en dernier (odeur génératrice de stress). 20 secondes séparent les présentations des cotons-tiges lorsqu'ils sont imbibés de la même odeur, et 60 secondes séparent les présentations de cotons-tiges imbibées d'odeurs différentes.

4.2. Tests de préférence de partenaire

Pour évaluer la préférence sexuelle, nous avons utilisé une chambre à trois compartiments en Plexiglas (60 cm de long × 30 cm de large × 30 cm de haut). Le compartiment du milieu, où les souris test ont été placées était séparé des deux compartiments adjacents par des plaques en Plexiglas opaque percées de trous de 0,5 cm de diamètre, séparés les uns des autres de 2,5 cm et situés à 7,5 cm du bas de la plaque. Ces trous permettent aux odeurs de passer, tandis que l'opacité de la plaque empêche la souris test de recevoir des indices visuels sur les congénères qui seront placées dans les compartiments latéraux. Les souris ont été habituées à la chambre la veille du jour de l'expérience en étant placées dans le compartiment central 10 minutes, tandis que les compartiments latéraux étaient vides. Le jour du test, un mâle intact et une femelle en œstrus ont été placés dans les deux compartiments latéraux avec un peu de leur propre litière sale pour renforcer les signaux olfactifs. Les canules des souris tests ont été connectées à la fibre photométrique et placées dans un aquarium d'habitation avec une litière fraîche 10 minutes avant leur introduction dans le compartiment du milieu. Les comportements ont été analysés pendant 10 minutes. Le temps que les sujets ont passé à renifler les trous des plaques de chaque côté a été enregistré. Un score de préférence a été calculé comme suit :

$$\text{Score de préférence} = \frac{\text{Temps}_{\text{sexe opposé}} - \text{Temps}_{\text{même sexe}}}{\text{Temps}_{\text{sexe opposé}} + \text{Temps}_{\text{même sexe}}} \times 100$$

Où $\text{Temps}_{\text{sexe opposé}}$ et $\text{Temps}_{\text{même sexe}}$ correspondent respectivement aux temps passés à renifler les trous des parois séparant l'animal test d'un animal stimulus de sexe opposé et de même sexe. De fait, un score positif indique une préférence pour les individus du sexe opposé, tandis

qu'un score négatif indique une préférence pour le même sexe. Le compartiment du milieu est nettoyé à l'éthanol 70% entre chaque souris.

4.3. Tests sexuels

4.3.1. Tests des mâles

Le jour du test, les canules des mâles sont connectées à la fibres et placés dans une arène de test en Plexiglas (32,5 cm de long × 17,5 cm de large × 18,5 cm de haut) contenant de la litière fraîche, durant 10 minutes. L'enregistrement commence au moment de l'introduction d'une femelle expérimentée en œstrus comportemental. La latence de monte, d'intromission et d'éjaculation, ainsi que le nombre de montes et d'intromissions ont été enregistrés. Le test a pris fin, soit après éjaculation, soit après 1 heure de test. Une monte est caractérisée lorsque le mâle grimpe et attrape la femelle par derrière avec ses deux pattes. L'intromission est caractérisée par une pénétration vaginale pendant la monte accompagnée d'une poussée pelvienne, tandis que l'éjaculation est une intromission avec une poussée plus longue entraînant l'immobilisation et la chute du mâle, suivie d'une période de désintérêt pour la femelle.

4.3.2. Tests des femelles-tests de lordose

Le comportement de lordose a également été testé dans une arène de test en Plexiglas (32,5 × 17,5 × 18,5 cm) contenant de la litière fraîche. Pour chaque test de lordose, un mâle sexuellement expérimenté a été placé dans l'arène et il lui a été permis d'explorer librement pendant 10 minutes avant l'introduction d'une femelle stimulus en œstrus comportemental. A la première monte du mâle, la femelle stimulus a été retirée et remplacée par la femelle test. Les canules sont connectées à la fibre photométrique et placées dans une arène d'habituation avec de la litière propre 10 minutes avant l'introduction dans l'arène de test avec le mâle. Par la suite, le comportement a été enregistré pendant 10 minutes ou après 10 montes, ce qui se produit généralement en moins de 10 minutes. Après quelques intromissions, le mâle est doucement écarté de la femelle pour éviter l'éjaculation. Le quotient de lordose (LC) a été calculé comme un pourcentage du nombre de lordose en réponse à la monte du mâle. La lordose est une posture caractérisée par une arc-boutement du dos associé au relèvement de la tête et de l'arrière-train en réponse à une monte, ce qui facilite l'intromission du mâle.

4.4. Test d'anxiété en labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé (EPM) a été utilisé pour évaluer l'anxiété. C'est un appareil en forme de croix avec deux bras fermés (38 cm de long × 5 cm de large × 15 cm de haut), deux bras ouverts (38 cm de long × 5 cm de large × 2 cm de haut) et une plate-forme centrale de 5 × 5 cm, le tout surélevé de 80 cm par rapport au sol. Les canules des souris tests ont été connectées à la fibre et les souris ont été placées dans une arène d'habituation avec de la litière fraîche durant 10 minutes. L'enregistrement commence lorsque la souris est placée sur la plate-forme centrale, face à l'un des bras fermés du labyrinthe et dure 5 minutes. Ce test a été réalisé sous lumière normale et non sous lumière rouge dans le noir, pour stresser davantage les souris. Le score d'anxiété a été déterminé en utilisant la formule décrite par Cohen et al. (186) :

$$\text{Score d'anxiété} = 1 - \frac{\frac{\text{Temps}_{\text{bras ouverts}}}{\text{Temps}_{\text{total}}} + \frac{\text{Nombre d'entrées}_{\text{bras ouverts}}}{\text{Nombre d'entrées}_{\text{total}}}}{2}$$

Le score varie de 0 à 1, une valeur proche de 1 indiquant une anxiété accrue puisque les souris passent plus de temps dans les bras ouverts lorsqu'elles sont anxieuses. Le labyrinthe a été nettoyé à l'éthanol 70% entre chaque souris.

5. Photométrie en fibre

La sonde calcique GCaMP6s a été excitée à l'aide d'un système photométrique utilisant une fibre optique à double longueur d'onde (Tucker-Davis Technologies, RZ10x). Deux lampes LED LUX intégrées (Lx405 et Lx465) sont utilisées pour produire des longueurs d'onde d'excitation à 405 nm et 465 nm. Pour éviter les échanges croisés entre les deux canaux, chacun a été modulé à une fréquence différente (210 Hz pour le 405 nm et 330 Hz pour le 465 nm). Les lampes d'excitation ont été combinées et filtrées par un système *Fluorescence Mini Cube* (FMC) (Doric, FMC4, IE(400-410)_E(460-490)_F(500-550)_S). Les lumières d'excitation combinées ont été livrées à la fibre optique implantée via un cordon de raccordement, une monofibre optique à noyau de 400 nm, 0,57 NA, à faible auto-fluorescence (Doric, MFP_400/430/1100-0.57_FCM-MF2.5_LAF). Les réponses de fluorescence ont été recueillies à l'aide du FMC équipé d'un photodétecteur intégré sur le RZ10x (Figure 7). Les signaux ont été démodulés à 1017,25 Hz. Ce processus a permis de dissocier les signaux dépendants du

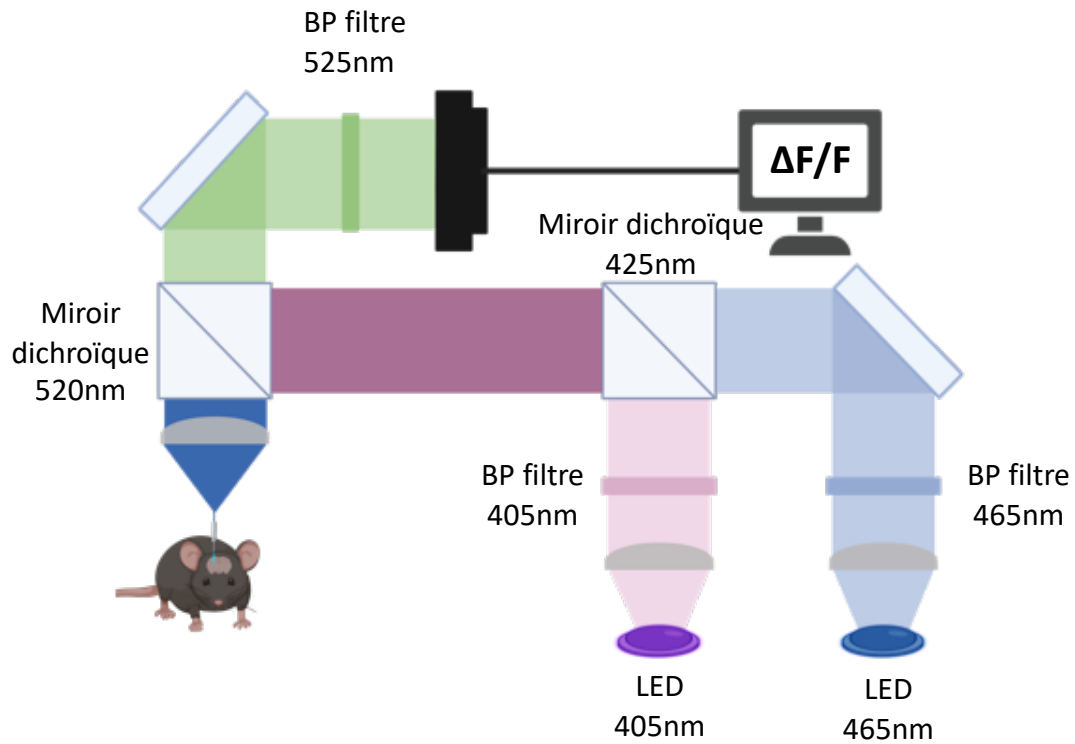


Figure 7 : **Schématisation du système de photométrie en fibre avec deux LED.** Système optique qui comprend des filtres et des miroirs dichroïques conçus pour combiner et filtrer à la fois les ondes lumineuses d'excitation émises par les LED et d'émission de GCaMP6s. Ces ondes d'émission sont détectées par un photodétecteur et traitées par un système informatique. Les données lumineuses seront ensuite présentées sous forme d'un graphique de $\Delta F/F$ en fonction du temps.

Abréviations : BP filtre , *Band-pass filter*.

calcium de GCaMP6 des variations indépendantes du calcium. Les données ont été enregistrées à l'aide du logiciel Synapse Essentials (Tucker Davis Technologies).

Deux longueurs d'ondes ont été utilisées pour exciter GCaMP6s. L'une, à 405 nm, appelé point isobestique, pour obtenir un signal isobestique indépendant du calcium et la seconde, à 465 nm, pour extraire le signal d'intérêt, dépendant du calcium. Le point isobestique est une longueur d'onde d'excitation à laquelle l'absorbance des photons par GCaMP6s, soit l'intensité totale de la fluorescence émise, ne change pas en fonction de sa liaison ou non au calcium. La soustraction du signal isobestique au signal dépendant du calcium a permis de réduire le bruit de fond, dû en partie au mouvement des animaux (artéfacts de mouvement), à l'autofluorescence des tissus et à l'effet de chaleur des LED (187,188).

Pour mesurer l'activité des neurones à nNOS de l'AMePD pendant les tests comportementaux, les souris ont été maintenues en contention le temps de les connecter au câble de raccordement optique, puis laissées libres 10 minutes, le temps de s'habituer à la configuration d'enregistrement, comme mentionné dans la section dédiée aux tests comportementaux. Après le test, les horodatages des événements d'intérêt ont été extraits manuellement lors du visionnage des vidéos prises. Pour chaque test, lesdits événements d'intérêt sont les suivants

- Test d'odeur : chaque moment de reniflement du coton-tige imbibé par la souris.
- Test de préférence de partenaires : chaque moment de reniflement des trous présents sur les plaques séparant les souris tests des souris stimuli.
- Test sexuel mâle : chaque moment moments où les mâles réalisent une monte, une intromission ou une éjaculation.
- Test sexuel femelle : chaque moment où les femelles expriment le comportement de lordose.
- Test d'anxiété : chaque entrée dans un nouveau bras ou dans la partie centrale (événement 1 : passage d'un bras ouvert vers un bras fermé, événement 2 : passage d'un bras fermé vers un bras ouvert, événement 3 : passage d'un bras fermé vers la partie centrale).

Toutes les analyses de données ont été réalisées en utilisant l'environnement de programmation Guppy (qui utilise le langage Python) ainsi que GraphPad Prism (Version 9.5.0,

GraphPad Software, Inc., 2019). Les données brutes ont été extraites, puis le canal isosbestique a été ajusté au canal GCaMP6s en utilisant une régression linéaire des moindres carrés. Le $\Delta F/F$ (DF/F) a été calculé en soustrayant le canal isosbestique ajusté du canal GCaMP6s et en le divisant par le canal témoin ajusté. Pour les histogrammes de temps péri-événement (PETH), le temps zéro a été fixé au début du comportement ou de l'événement d'intérêt. La fenêtre de temps précédant un événement comportemental ou la fluorescence moyenne qui est utilisée comme facteur de normalisation pour le calcul du changement de fluorescence par rapport à la baseline sont de -10s à 0s pour le test d'odeur et le test de préférence et de -20s à -10s pour l'EPM et le test sexuel. Le $\Delta F/F$ a été calculé dans une fenêtre de 10 secondes suivant l'expression du comportement d'intérêts.

6. Perfusion et récolte des cerveaux

Après avoir reçues une dose létale d'euthasol (400 mg/kg de poids corporel) les souris ont été perfusées par voie transcardiaque avec une solution glacée de saline tamponnée au phosphate 0,1M (PBS) durant 2 minutes puis par du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du PBS 0,1M (pH 7,4) glacé pendant 4 minutes à l'aide d'une pompe. Les cerveaux prélevés ont été conservés pendant une nuit à 4°C dans de la PFA à 4 %. Ils ont ensuite été cryoprotégés dans du saccharose à 30 % dans du PBS 0,1M à 4°C jusqu'à ce qu'ils coulent (\pm 48h). Les cerveaux ont ensuite été congelés sur de la carbo-glace et conservés à -80°C jusqu'à leur coupe au cryostat (Fisher Scientific NX70). Ces coupes ont été réalisées selon le plan coronal et collectées en 4 séries (30 μ m d'épaisseur), puis placées dans une solution d'antigel et stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour l'immunohistochimie.

7. Immunohistochimie

Immunohistochimie en fluorescence triple marquage. Le triple marquage pour nNOS/mCherry/GFP(GCaMP6s) a été réalisé selon des procédures standards. Les anticorps primaires ont été utilisés aux concentrations suivantes : anti-nNOS de lapin polyclonal (1:500; ThermoFisher, 61-700, lot : XJ358729), anti-RFP (mCherry) de rat polyclonal (1:1000; Chromotek, 5F8, lot : D0000062) et anti-GFP de poulet (1:2000; aveslabs, GFP1020, lot : GFP917979). Les sections cérébrales ont été lavées avec du PBS, incubées dans une solution de triton X-100 à 0,1 %, du sérum normal de chèvre à 5 % dans du PBS 1X pendant 1 heure à

température ambiante, puis incubées pendant 48 heures à 4°C avec un mélange d'anticorps primaires dans la solution de blocage. Après lavages au PBS, les sections cérébrales ont été incubées avec les anticorps secondaires à température ambiante pendant 1 heure et 30 minutes. Les anticorps secondaires Alexa Fluor-633 de chèvre anti-lapin (A-21071, lot : 2335723), Alexa Fluor-488 de chèvre anti-poulet (A-32931, lot : XB343360) Alexa Fluor-555 de chèvre anti-rat (A-48263, lot : XB342332) ont tous été obtenus chez ThermoFisher Scientific et utilisés à une dilution de 1:500 dans du PBS-triton Les sections ont été montées le même jour et recouvertes d'une lamelle avec de l'Aqua-polymount (Polysciences Inc., 494333). Elles ont ensuite été stockées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse au microscope confocal.

Analyse et quantification de l'imagerie. Les images ont été imagées avec le microscope confocal Zeiss LSM980. Les quantifications de la colocalisation nNOS/GCaMP6s, nNOS/mCherry ont été réalisées manuellement sur les deux hémisphères dans une section représentative par sujet entre les repères bregma -1,50 et -1,70mm pour le AMePD selon l'atlas de Paxinos et Franklin (2001).

8. Procédure expérimentale

Au jour zéro, les souris ont reçu les injections stéréotaxiques bilatérales de deux virus (souris tests: AAV1 hsyn Flex GCAMP6s WPRE SV40 + AAV1 hSyn Dio hM4D (Gi) mCherry (RC1) ; souris contrôles: AAV1 syn Flex GCAMP6s WPRE SV40 + AAV2 hSyn Dio mCherry (RC2)) dans l'AMePD.

Les femelles ont été ovariectomisées et implantées avec l'implant d'œstradiol au jour 7, les mâles quant à eux restent intacts.

Les entraînement et tests des femelles ont été séparés de 4 jours afin de mimer leur cycle œstrale qui est naturellement de 4 à 6 jours chez la souris. Pour les mâles, les tests et entraînements ne seront séparés que de 2 jours. Étant donné que les tests ont été réalisés en journée, ils sont réalisés sous lumière rouge pour respecter la phase d'obscurité du cycle des souris. Seul le test d'anxiété a été réalisé sous lumière normale, comme décrit plus haut. Les souris ont été entraînées sexuellement pour qu'elles soient sexuellement expérimentées. Pour ces entraînements, les souris tests sont placées 10 minutes dans une arène de test en présence d'une souris expérimentée du sexe opposé. Les premiers tests ont donc commencé au jour 18 soit 2,5 semaines après les injections stéréotaxique pour donner le temps aux virus d'infecter

les neurones et d'exprimer les transgènes. On commence par le test d'odeur. Ce premier test était réalisé sans injection de CNO. Les deux tests suivants, (test préférence de partenaires et test sexuel) ont été réalisés en cross-over, c'est-à-dire que chaque test a été réalisé deux fois à quelques jours d'intervalle et que si au premier test, la moitié des souris ont reçu des injections de saline, au second test, elles ont reçu du CNO, et inversement pour l'autre moitié. Les deux groupes sont identiques et comprennent chacun un même nombre de souris tests et contrôles. Pour finir, le test d'anxiété a été réalisé en dernier mais pas en cross-over. Sur la figures 8, sont présentés les calendriers expérimentaux pour les deux sexes.

Pour les femelles, l'effectif était de sept : trois souris test avec fibre, une souris test sans fibre, deux souris contrôle avec fibre et une sans fibre. Pour les mâles, l'effectif s'élevait à sept : trois souris contrôles avec fibre, deux souris tests avec fibre et pour finir deux souris tests sans fibre. Les souris sans la fibre sont manipulées de la même manière que celles avec fibre à l'exception du fait qu'elles ne sont pas connectées au câble.

Pendant les différentes chirurgies, entraînements et tests, des pertes ont été enregistrées. Le nombre total de femelles à la fin de l'expérience était de deux souris témoins et une souris de contrôle. Pour les mâles, le nombre final était de quatre souris témoins, parmi lesquelles une était équipée de fibre, et une souris de contrôle avec fibre. Les raisons sous-jacentes de ces pertes seront discutées dans la section dédiée.

Après que l'ensemble des tests ont été réalisés, les souris ont été perfusées. Après prélèvement, leurs cerveaux ont été congelés, coupés au cryostat, immuno-marqués et analysés au microscope confocal pour valider les sites d'injections et voir le pourcentage de neurones à nNOS infectés par les virus.

9. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism V9. Les données ont été évaluées pour leur normalité, et si la taille de l'échantillon (N) était suffisante pour effectuer des tests paramétriques, à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide de tests non paramétriques. Aucun test statistique n'a été réalisé sur les résultats des femelles. Pour les données des mâles, les scores de préférence et le temps d'exploration, qui sont des données appariées, ont été évalués à l'aide du test des rangs signés de Wilcoxon. En revanche, l'index d'anxiété, étant des données non appariées, a été analysé à

FEMELLE

J1	J7	J9	J13	J17	J21
Inj. stéréotaxiques	OVX + implant d'œstrogène	Entrainement 1	Entrainement 2	Entrainement 3	Test d'odeur
J25	J29	J33	J37	J41	...
Test de préf. de partenaire(1)	Test de préf. de partenaire(2)	Test sexuel(1)	Test sexuel(2)	Test d'anxiété	Perfusion

MALE

J1	J13	J15	J17		
Inj. stéréotaxiques	Entrainement 1	Entrainement 2	Entrainement 3		
J21	J23	J25	J29	J31	...
Test de préf. de partenaire(1)	Test de préf. de partenaire(2)	Test sexuel(1)	Test sexuel(2)	Test d'anxiété	Perfusion

Figure 8 : **Chronologie expérimentale utilisée pour toutes les expériences présentées.**

Abréviation : OVX, ovariectomie.

l'aide du test de Mann-Whitney U. Les pic DF/F ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis. Les données sont exprimées sous forme de moyenne et d'erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs étaient considérées comme statistiquement significatives si $p < 0,05$.

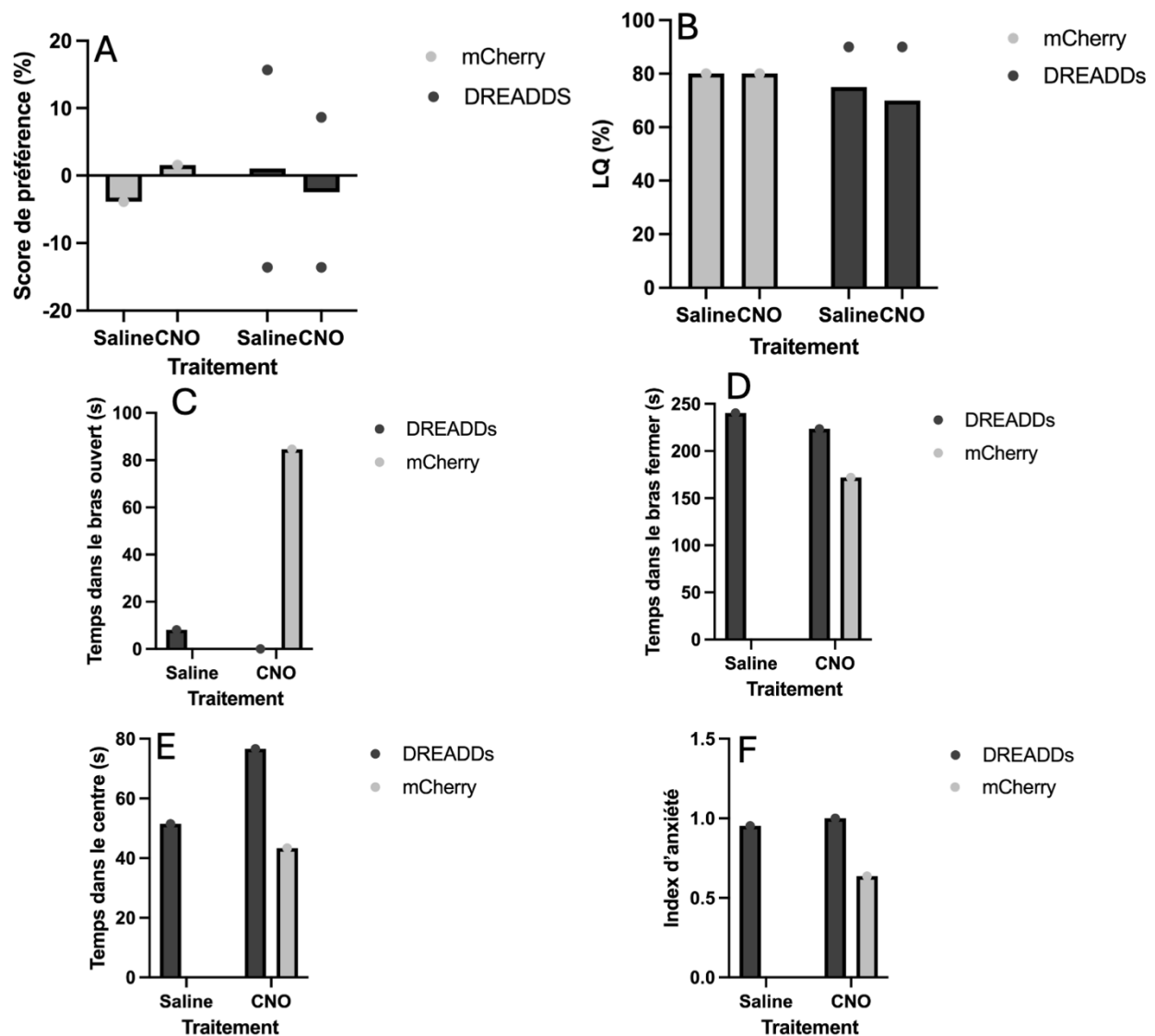


Figure 9 : Effets de l'administration périphérique de clozapine-N-oxyde (CNO) lors de différents tests comportementaux chez des souris femelle hM4Di et mCherry: (A) test de préférence des partenaires, (B) test sexuel, (C-D-E-F) test d'anxiété requérant un labyrinthe en croix surélevé. (C) Temps passé dans le bras ouvert lors du test d'anxiété. (D) Temps passé dans le bras fermer lors du test d'anxiété. (E) Temps passé dans le centre lors du test d'anxiété. (F) Index d'anxiété lors du test d'anxiété, une valeur proche de 1 indique une anxiété accrue. Chaque point représente un animal.

Résultats

1. Tests comportementaux sur les femelles

1.1. Effet de CNO sur la préférence de partenaire sexuel, le comportement sexuel et le comportement anxieux

Sur la figure 9, on peut retrouver l'ensemble des résultats des tests comportementaux réalisés sur les femelles. En raison du très faible effectif (N=3), aucune analyse statistique n'a pu être réalisée et il est impossible de pouvoir extrapoler les résultats obtenus à ce que nous aurions pu obtenir avec un effectif plus grand. Les enregistrements de photométrie en fibre réalisés sur les deux souris femelles possédant toujours leur fibre optique implantable, révèlent une absence totale de signal spécifique tout au long des différents enregistrements (figure 10). L'interprétation des causes probables de cette absence de signal peut être retrouvée en section Discussion.

2. Tests comportementaux sur les mâles

Pour les mâles, les résultats des tests comportementaux ont été obtenus à partir d'un effectif de 4 souris tests (hM4Di), tandis que les données de photométrie en fibre proviennent d'une seule souris contrôle.

2.1. Les neurones à nNOS de l'AMePD sont activés de manière préférentielle par l'urine de femelles

En utilisant la photométrie en fibre optique, nous avons examiné l'activité des neurones à nNOS de l'AMePD en réponse à des indices olfactifs urinaires. Lors de l'enregistrement effectué sur les deux souris implantées avec la fibre, un signal fonctionnel a été détecté uniquement chez l'une d'entre elles et plus précisément chez la souris contrôle. Ainsi, tous les graphiques temporels péri-événements (PETP) de la fluorescence normalisée de GCaMP6s sont issus de cette même et unique souris.

Les neurones nNOS de l'AMePD ont montré une plus grande réactivité à l'urine de femelle par rapport à celle des mâles. Le DF/F en réponse à l'urine de femelle était similaire à celle observée lors de la présentation des odeurs de contrôle (l'eau et l'amyle acétate) (Figure

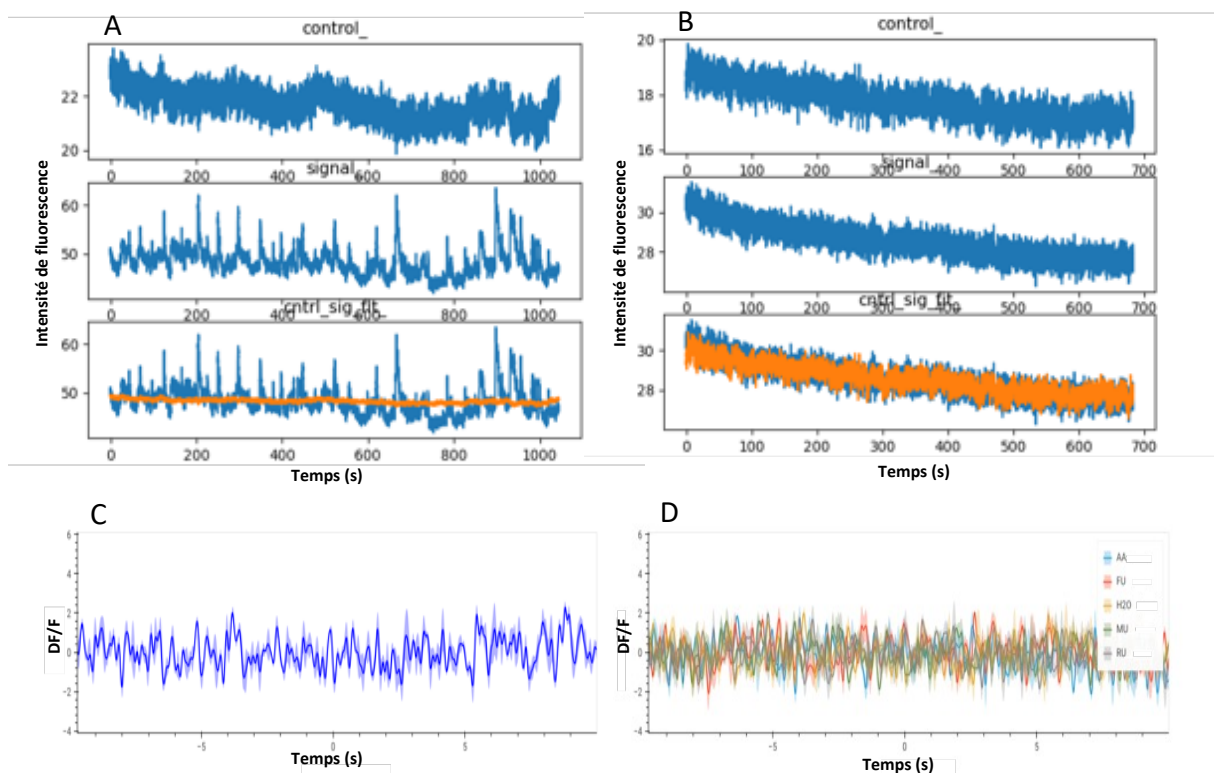


Figure 10 : (A-B) Evolution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence captée par la fibre optique, lors d'un test d'odeurs chez une souris mâle avec photométrie en fibre fonctionnelle (A) et chez une souris femelle avec photométrie en fibre non fonctionnelle (B). Pour (A) et (B), le panel supérieur correspond au signal isobestique, le panel intermédiaire, au signal d'intérêt dépendant du calcium et le panel inférieur aux deux signaux superposés.

(C) Graphique temporel péri-événementiel (PETP) de la fluorescence normalisée de GCaMP6s (DF/F) lors de la présentation de l'urine de mâle à une souris femelle avec photométrie en fibre non fonctionnelle. La ligne foncée représente le DF/D moyen et la zone ombrée représente l'Erreur Standard à la Moyenne (SEM). (D) Superposition des PETP pour chaque odeur présentée à cette même souris.

Abréviations : AA, amyl-acétate ; FU, Urine ; MU, Urine de mâle ; RU, Urine de rat.

11). En ce qui concerne le PETP en réponse à l'urine de rat, il pourrait indiquer une activation plus marquée des neurones exprimant la nNOS en présence d'une odeur de prédateur par rapport aux odeurs témoins. Bien que la différence entre les pics ne soit pas significative, les tendances décrites ci-dessus pourraient peut-être devenir significatives avec un effectif plus important.

A titre d'exemple, un événement de présentation d'odeur femelle est illustré dans la vidéo accessible à l'adresse suivante : <https://youtu.be/FI6BX1lkakI>, avec l'enregistrement photométrique associé.

2.2. Effet de CNO sur la préférence de partenaire

Lors du test de préférence de partenaire, lorsque les mâles injectés avec de la saline devaient choisir entre une femelle en œstrus comportemental et un mâle, ils montraient une préférence pour renifler le compartiment contenant la femelle en œstrus plutôt que celui avec le mâle. Cette préférence semblait s'annuler ou même s'inverser après injection de CNO. En effet, le score de préférence tendait à être plus bas avec le traitement au CNO par rapport au véhicule (p-valeur = 0,125 ; Figure 12A). Cela pourrait indiquer que l'inhibition des neurones à nNOS de l'AMePD diminue la préférence pour le partenaire du sexe opposé et donc une implication de ceux-ci dans le choix du partenaire sexuel. De plus, le temps total que les mâles ont passé à explorer les compartiments mâles et femelles n'était significativement pas différent entre les traitements mais, la p-valeur pourrait devenir significative avec une augmentation du N (p-valeur = 0,125, Figure 12B). L'inhibition de ces neurones pourrait donc peut-être impacter la sociabilité des souris mâles.

Cependant, les résultats de la photométrie en fibre n'ont pas permis de mettre en évidence un pic de fluorescence particulier lors du reniflement des différents compartiments. Cela semble plutôt dû au fait que la souris se retrouve dans un environnement dans lequel les deux odeurs, du mâle et de la femelle, se trouvent fortement mélangées. En effet, dans la littérature, aucun article n'utilise cette technique de photométrie en fibre pour analyser l'activation de neurones lors d'un test de préférence de partenaire.

2.3. Activation des neurones à nNOS de l'AMePD suite à l'entrée de la femelle dans la cage

Aucune monte de la femelle en œstrus, donc aucune intromission ni éjaculation du mâle, n'ont été enregistrées lors des deux tests sexuels réalisés en cross-over. Ce fut la même

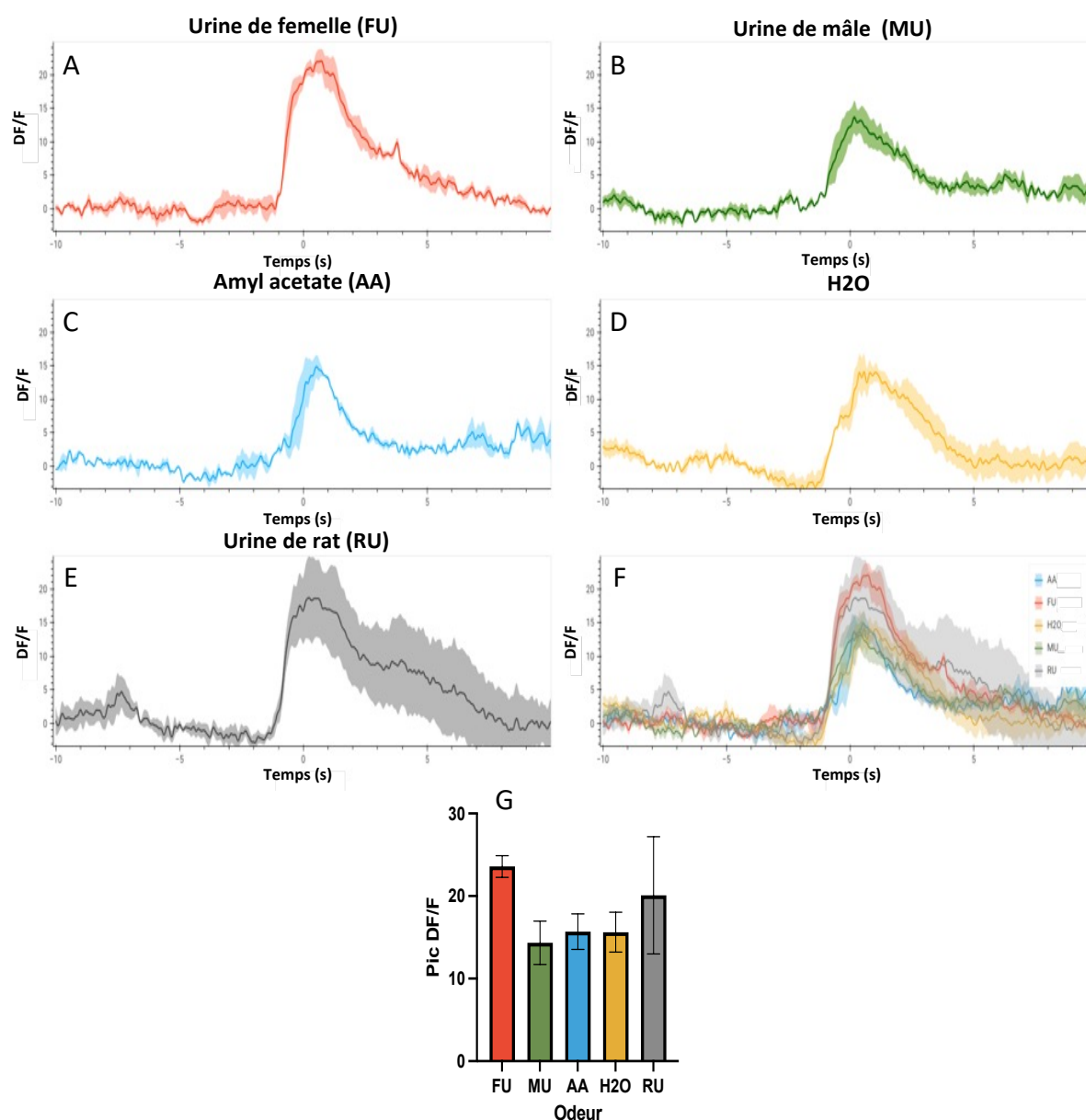


Figure 11 : (A-E) Graphiques PETP de la fluorescence normalisée de GCaMP6s (DF/F) lors d'un test d'odeurs. La ligne foncée représente la moyenne et la zone ombrée représente l'Erreur Standard à la Moyenne. Le temps zéro correspond à la présentation d'un coton-tige imbibé d'urine de femelle (A), d'urine de mâle (B), d'amyl-acétate (C), d'H₂O (D) et d'urine de rat (E) au mâle (n=1). Chaque odeur est présentée trois fois . (F) Rassemblement des différents PEPT sur un même graphique (F). Les résultats correspondent à la moyenne des trois mesures \pm SEM.

Abréviations : AA, amyl-acétate ; FU, Urine ; MU, Urine de mâle ; RU, Urine de rat.

chose lors des trois entraînements sexuels. Seul l'effet de l'entrée de la souris femelle dans la cage du mâle sur l'enregistrement photométrique des neurones à nNOS de l'AMePD a pu être analysé. Suite à une période d'habituation de 10 minutes du mâle dans la cage de test, l'arrivée d'une femelle entraîne une brusque augmentation de l'activité basale des neurones à nNOS pendant au moins les vingt secondes suivant son arrivée (Figure 12C). Ce résultat va donc dans le même sens que le test d'odeur, c'est-à-dire, l'activation de ces neurones en réponse à des stimulus olfactifs femelles.

A titre d'exemple, l'événement d'entrée d'une souris stimulus femelle est illustré dans la vidéo accessible à l'adresse suivante : <https://youtu.be/dpgxTEKhTmY>, avec l'enregistrement photométrique associé.

2.4. Effet de CNO sur le comportement anxieux

Le test de l'EPM ne peut pas être réalisé en cross-over étant donné que le but de ce test est de mettre les souris dans un environnement inconnu qui induit de l'anxiété. Par conséquent, le groupe test (hM4Di) comprenant 4 souris a été divisé en deux ; deux individus recevant de la saline et deux autres recevant du CNO (2mg/kg) par ip dans les deux cas. Les groupes ainsi formés sont trop petits, rendant les données impossibles à analyser statistiquement, même avec des tests statistiques non paramétriques.

De plus, aucune différence notable n'a été détectée entre les deux groupes (Figure 13A-B-C-D).

Par ailleurs, l'analyse des enregistrements photométriques n'a révélé aucun pic d'activation des neurones étudiés lors du passage d'un compartiment à un autre (Figure 13E).

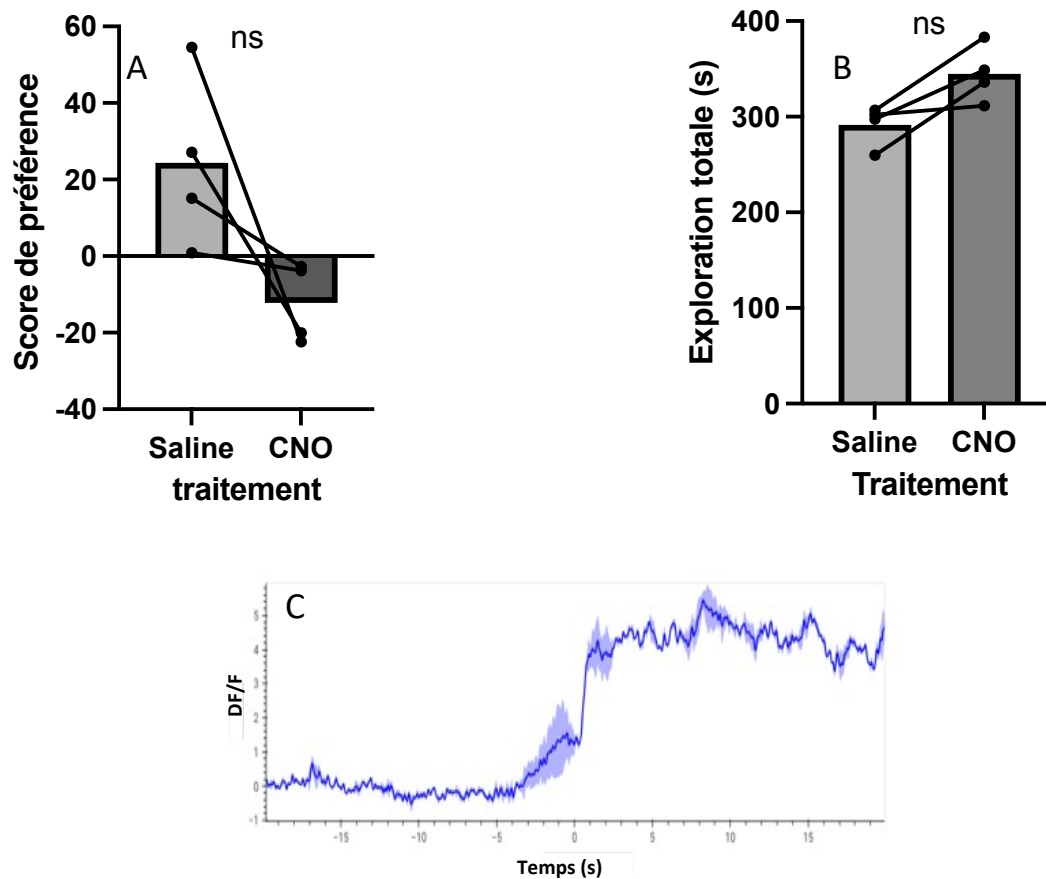


Figure 12 : Effets de l'administration périphérique de clozapine-N-oxyde (CNO) lors de différents tests comportementaux chez des souris mâles hM4Di: (A-B) test de préférence des partenaires, (C) test sexuel.

(A) Effet de l'injection intra-péritonéale de CNO (2mg/kg) sur la préférence du partenaire sexuel. Le score de préférence est calculé à partir du temps passé à renifler le compartiment d'une femelle stimulus en œstrus et du temps passé à renifler celui d'un mâle intact. Une valeur positive de ce score indique une préférence pour les femelles. (B) Somme des durées passées à renifler les deux compartiments lors du test de préférence des partenaires. (C) Graphique PETP de la fluorescence normalisée de GCaMP6s (DF/F) lors du test sexuel chez les mâles. Le temps zéro correspond à l'entrée de la femelle dans la cage.

Discussion

Le but central de ce mémoire de fin d'études était d'approfondir notre compréhension de l'implication de la population de neurones à nNOS de l'AMePD, un noyau caractérisé par un dimorphisme sexuel, dans la régulation des comportements sexuels appétitifs et consommatoires chez les femelles (tels que la lordose) et chez les mâles (comme la monte, l'intromission et l'éjaculation). Pour ce faire, une approche en deux volets a été adoptée. Premièrement, nous avons exploré l'effet de l'inhibition chimogénétique ciblée de cette population neuronale sur les divers comportements observés chez les souris lors de tests comportementaux. Deuxièmement, nous avons analysé le profil d'activation de ces neurones à l'aide de la photométrie en fibre (GCaMP6s) pendant ces mêmes tests. Cette démarche multidimensionnelle visait à fournir un éclairage approfondi sur le rôle fonctionnel des neurones à NOS dans la circuiterie neuronale contrôlant la dynamique complexe des comportements sexuels et anxieux chez les deux sexes. Cette voie de recherche représente l'une des nouvelles orientations du laboratoire de neuro-endocrinologie comportementale de Julie Bakker.

Malheureusement, ce stage n'a pas abouti à la collecte de résultats significatifs et interprétables. Cette situation découle principalement de deux facteurs majeurs. Tout d'abord, le nombre élevé de pertes enregistrées tout au long des expériences a conduit à un effectif final insuffisamment élevé pour générer des conclusions soutenues par des tests statistiques fiables. En outre, l'application de la photométrie en fibre n'a produit des résultats concluants que pour une seule des souris parmi l'ensemble des sujets testés. Ces défis rencontrés tout au long du stage, bien que malheureux, ont été instructifs, mettant en lumière l'importance cruciale de la gestion des variables expérimentales et de la planification rigoureuse. Dans un premier temps, je développerai ces embûches rencontrées. Deuxièmement, malgré l'absence de résultats significatifs, une discussion des données recueillies et des perspectives futures sera néanmoins proposée.

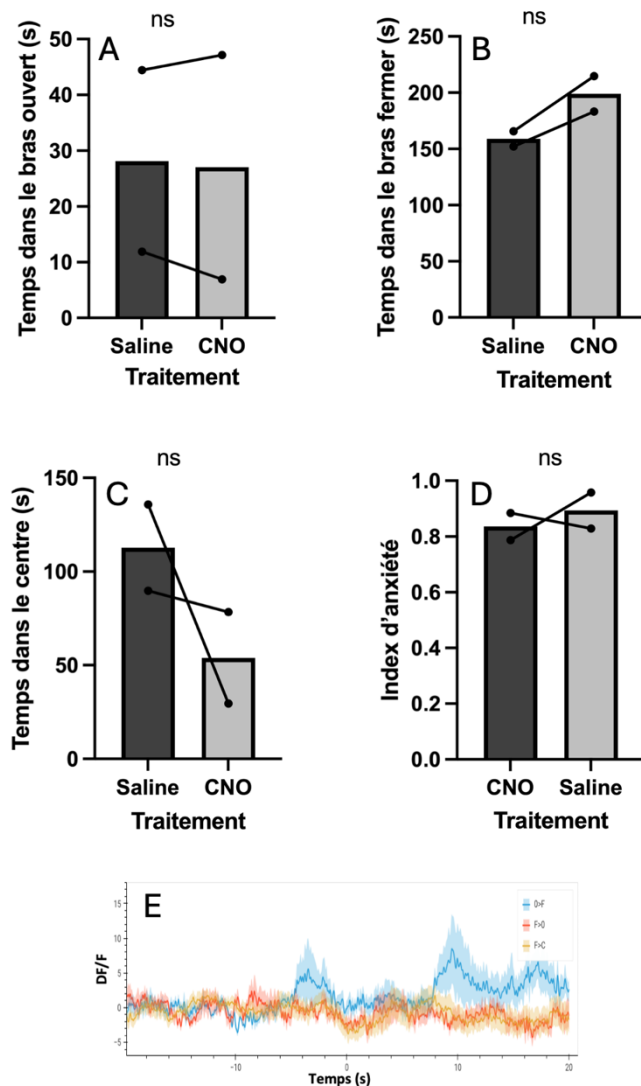


Figure 13 : Effets de l'administration périphérique de clozapine-N-oxyde (CNO) lors de test d'anxiété requérant un labyrinthe en croix surélevé chez des souris mâles hM4Di. (A) Temps passé dans le bras ouvert lors du test d'anxiété. (B) Temps passé dans le bras fermé lors du test d'anxiété. (C) Temps passé dans le centre lors du test d'anxiété. (D) Index d'anxiété lors du test d'anxiété, une valeur proche de 1 indique une anxiété accrue. (A-B-C-D) Les valeurs sont représentées comme la moyenne \pm SEM. (E) Graphique PETP du $\Delta F/F$ de GCaMP6s lors du test d'anxiété chez les mâles. Le temps zéro correspond au passage de la souris d'un bras à un autre dans un labyrinthe en croix surélevé. Pour (E), la ligne foncée représente le $\Delta F/F$ moyen et la zone ombrée représente l'Erreur Standard à la Moyenne (SEM).

1. Embûches rencontrées lors des expériences réalisées

1.1. Perte de nombreux animaux

L'enregistrement de nombreuses pertes lors des expériences a fini par donner des effectifs beaucoup trop petits pour permettre d'obtenir des résultats statistiques significatifs, si cela devait être le cas. Pour les femelles, les pertes ont été telles que la simple réalisation de tests statistiques, même non paramétriques, était impossible. Voici donc, ci-dessous, les différentes causes qui sont à l'origine de ces pertes animales.

Pour les femelles, l'effectif de départ avant la chirurgie stéréotaxique était de sept souris. Étant au début du stage et donc seulement à la phase d'apprentissage de la technique d'injection stéréotaxique et de validation du site d'injection, c'est la post-doctorante expérimentée du laboratoire qui a réalisé les chirurgies sur ces souris. Lors de ces injections, quatre souris ont été injectées avec le virus exprimant hM4Di et trois souris avec le virus de contrôle, en plus du virus codant pour GCaMP6s. Trois souris tests et deux contrôles ont été implantées avec une fibre optique. La première perte a été enregistrée le lendemain des chirurgies. Malheureusement, il est normal que, de temps en temps, lors de ces chirurgies assez lourdes pour la souris, certaines pertes soient enregistrées. Cela peut être dû à l'aiguille d'injection ou à la fibre implantable qui ont touché ou détruit des zones ou vaisseaux sanguins importants, à la durée de la chirurgie (entre 1h30 et 2h par souris avec l'implantation de la fibre), ou à une plus grande fragilité intrinsèque de la souris, le tout rendant le réveil plus compliqué.

Deux autres pertes ont été enregistrées une semaine plus tard lors des ovariectomies. Elles n'ont pas trouvé la mort lors de l'acte chirurgical en lui-même, mais à cause de l'anesthésie. En effet, au moment de l'anesthésie par injection intrapéritonéale de kétamine et de domitor, les souris titubaient mais ne s'endormaient pas. Les doses ont progressivement été augmentées jusqu'à ce qu'elles s'endorment, et que nous puissions enfin commencer la chirurgie. Cependant, les souris ont repris conscience cinq minutes après le début de l'opération. Nous avons décidé d'arrêter avec la kétamine et de faire les ovariectomies des autres souris par anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Cependant, les deux souris anesthésiées à

la kétamine n'ont pas survécu, probablement à cause de doses administrées trop élevées. Lors de ces ovariectomies, les femelles étaient déjà en cycle inversé, donc dans leur phase active, ce qui, selon nous, a rendu l'endormissement des souris impossible, étant donné que tout se passait bien lors des ovariectomies sous kétamine de souris en cycle normal.

Enfin, la dernière femelle est décédée à cause de l'arrachement de sa fibre optique implantable lors de la déconnexion du câble de raccordement optique à celle-ci.

L'ensemble de ces pertes a donc fait descendre l'effectif à trois souris, dont deux souris test (hM4Di) et une souris contrôle.

Concernant les mâles, je me suis entièrement occupé des chirurgies, qui se sont correctement déroulées, étant donné que toutes les souris opérées ont survécu. Sept souris ont été injectées, dont quatre mâles tests et trois contrôles. Seules deux souris tests et les trois souris contrôles ont été implantées avec la fibre optique. L'ensemble des pertes ont fait descendre cet effectif à cinq souris mâles, dont quatre souris tests (hM4Di) et une souris contrôle.

Le nombre total de mâles décédés s'élève à trois. Chaque fois, cela s'est produit au moment de la connexion ou de la déconnexion de la fibre optique implantée avec le câble de raccordement. À quatre reprises, la fibre s'est arrachée. À chaque connexion et déconnexion, la souris était maintenue par contention contre une surface solide pour l'immobiliser, cependant, elle parvenait parfois à bouger, causant l'arrachement de la fibre. En effet, le système de fixation entre les embouts ne me semble pas le plus optimisé pour, d'une part, faciliter la connexion et limiter l'endommagement de la fibre implantée et, d'autre part, réduire la douleur animale. Afin de limiter toute perte animale lors des dernières expériences, les souris étaient endormies à l'isoflurane à la fin des expériences pour la déconnexion de l'implant avec le câble de raccordement optique. La connexion se faisait toujours sans anesthésie pour éviter une altération du comportement et de l'activité neuronale par l'isoflurane.

Sur la figure 14A, le système utilisé pour connecter le câble de raccordement avec la fibre optique implantée est représenté, avec l'utilisation de manchons d'accouplement en céramique (zirconium). Cependant, la connexion, et surtout la déconnexion, avec ces manchons d'accouplement augmente le stress sur l'animal et les risques d'arrachement de la fibre optique. Deux autres modèles de manchons d'accouplement possibles ont été identifiés.

Le premier, nommé ADAF2 (Figure 14B), est décrit par le fabricant, THORLABS, comme permettant une connexion et une déconnexion à faible force, minimisant ainsi le stress sur l'animal. En effet, la force de déconnexion pour ce dispositif est inférieure à 4,4N, contre 25,83N pour les manchons d'accouplement en céramique utilisés par le laboratoire. Le point négatif de ce dispositif est bien évidemment son prix, 7,5 fois plus élevé.

Le second est un manchon d'accouplement imaginé et modélisé. Ce modèle 3D est illustré sur la figure 14C et a été réalisé sur TINKERCAD. Dans ce modèle, le câble de raccordement s'insérerait dans la partie supérieure non fissurée et la fibre optique implantée dans la partie inférieure portant une fissure. J'ai imaginé les deux "ailes" sur le côté permettant d'écarter légèrement les côtés adjacents à la fissure, telles une pince à linge, pour faciliter la connexion et la déconnexion du câble de raccordement avec la fibre optique implantée. Il a été imaginé entièrement conçu en céramique, notamment en zirconium, étant un matériau capable de subir de petites déformations avec une bonne résilience et résistance à la chaleur. Pour améliorer cette résilience, on pourrait ajouter un anneau (représenté en bleu sur la figure 14C) fabriqué dans un matériau très élastique et présentant une grande résilience, tel que du caoutchouc. Bien évidemment, ceci n'est qu'un prototype imaginé pour faciliter l'enregistrement photométrique.

Voici un lien vous redirigeant vers la modélisation 3D à échelle réelle de ce prototype : [Modèle de manchon d'accouplement pour photométrie en fibre.](#)

1.2. Taux de succès de l'enregistrement de l'activité neuronale par photométrie en fibre très faible (1/4)

La vérification des sites d'injection et du positionnement de la fibre optique a été validée pour toutes les souris. Pour l'instant, en raison de problèmes rencontrés avec les anticorps, la validation n'a pu être effectuée que pour mCherry (hM4Di). Cependant, étant donné que les virus ont été injectés simultanément, il est logique de supposer que le site d'injection de GCaMP6s est également valide. L'IHC pour GCaMPs est en cours de réalisation.

Il semble donc que l'absence de signal enregistré ne soit pas due à une erreur dans le site d'injection. D'autres explications possibles de ces résultats sont les suivantes.

Les fibres optiques sont réutilisées d'une expérience à l'autre. Pour les nettoyer du ciment dentaire, elles sont immergées 24 heures dans du chloroforme, puis dans un bain d'éthanol 70%. Il est possible que ces deux bains endommagent les fibres. Cependant, la post-



Figure 14 : **Les manchons d'accouplement.** (A) système utilisé par le laboratoire pour connecter la fibre optique implanté au câble de raccordement. (B) Manchon de raccordement alternatif vendu par la société THORLABS (ADAF2). (C) Prototype modélisé sur TINKERCAD d'une alternative au manchon au céramique utilisé par le laboratoire.

doctorante du laboratoire utilisait cette méthode dans son ancien laboratoire avec des fibres pour l'optogénétique sans rencontrer de problèmes.

Durant ce stage, cette même post-doctorante a également réalisé de la photométrie en fibre sur ses souris mais dans une autre région du cerveau (AVPV). De même, les résultats obtenus à l'issue de cette expérience n'ont pas été concluants.

Il y a la possibilité que ces enregistrements non-fonctionnels aient été dus à un mauvais raccordement causant une grande perte d'insertion, c'est-à-dire la quantité de lumière perdue lorsqu'un câble de raccordement est connecté à un autre composant, dans notre cas la fibre optique implantable. Il est cependant peu probable que ce raccordement soit mal fait à chaque test, sauf pour la souris avec un enregistrement fonctionnel.

2. Discussion et perspectives

Au vu des résultats, il est évident qu'une discussion classique des résultats obtenus est difficile.

Concernant les résultats obtenus chez les mâles, les neurones à nNOS de l'AMePD semblent jouer un rôle dans les comportements sexuels appétitifs, comme le montrent les tests d'odeur et de préférence de partenaire, ainsi que l'entrée de la femelle dans la cage lors des tests sexuels. D'autre part, l'un des aspects les plus regrettables de ce travail est de ne pas avoir enregistré de comportements sexuels consommatoires (montée, intromission, éjaculation) lors des tests sexuels. En effet, analyser l'effet de l'inhibition des neurones à nNOS de l'AMePD sur ces comportements consommatoires aurait pu fournir des données précieuses. De plus, la présence d'une souris mâle donnant des résultats prometteurs par photométrie en fibre aurait permis d'avoir des résultats préliminaires sur profil d'activité calcique de ces neurones et de déterminer s'ils sont activés uniquement lors de la phase appétitive ou également pendant la phase consommatoire. Si tel était le cas, il aurait été intéressant de voir le profil d'activation de ces neurones lors des différentes phases du comportement sexuel (montée, intromission, éjaculation mais également lors de la phase réfractaire). Bien évidemment, Il est probable que ces neurones ne jouent pas de rôle dans la phase active du comportement sexuel, étant donné que de nombreuses études antérieures n'ont montré que peu d'implication de l'AMePD dans les comportements de monte, d'intromission et d'éjaculation chez le mâle (94,95).

De plus, les résultats ne proviennent que des souris hM4Di. Il n'y avait pas de groupe contrôle. Par conséquent, il faut garder à l'esprit que cette diminution du score de préférence peut simplement être due à des effets secondaires du CNO et non à l'inhibition des neurones à nNOS de l'AMePD. Effectivement, des études ont attesté de ces effets indésirables du CNO. La métabolisation de celui-ci en clozapine, un antipsychotique atypique se liant puissamment à de nombreux récepteurs et transporteurs endogènes, n'est pas négligeable chez les rongeurs (189,190). En guise de solution, il convient de considérer la Deschloroclozapine, un activateur chimio-génétique plus efficace et plus sélectif que le CNO (191).

Les données des tests évaluant le rôle de l'AMePD dans les comportements anxieux présentent des contradictions. Dans le test d'odeur, l'urine de rat semble activer les neurones à nNOS de l'AMePD plus que les odeurs contrôles, alors que l'enregistrement photométrique lors du test de l'EPM n'a pas révélé d'augmentation notable de l'activité calcique lors du passage d'un compartiment à un autre. Cette disparité pourrait s'expliquer par le fait que chaque stimulus stressant induit une signature d'activation cérébrale spécifique (96,192). Il serait donc intéressant de réaliser une analyse photométrique en fibre de ces mêmes neurones en utilisant d'autres stressseurs. Par exemple, le test d'immobilisation sur planches par contention (OMI) a déjà démontré l'expression de c-fos dans l'AMePD suite à ce test. On pourrait également remplacer l'urine de rat par de l'urine de chat, un prédateur naturel de la souris, ou par un coton-tige frotté sur son pelage, bien que cela semble plutôt activer l'AMeA que l'AMePD (96). Enfin, dans une recherche de Loewke et al. 2021 étudiant par photométrie en fibre l'importance de certains circuits dans le comportement anxieux, ils ont utilisé un labyrinthe en rond surélevé (EZM) au lieu d'un EPM (193). Ceci pourrait faciliter l'analyse des vidéos étant donné que ceci supprimerait la plateforme centrale où il est difficile de dire si la souris est dans un bras ouvert ou fermé.

Concernant les perspectives de ce projet, il est évidemment important de le poursuivre en réalisant les mêmes expériences pour augmenter les effectifs. Cela permettra d'obtenir des résultats significatifs, ou non, mais avec une puissance statistique suffisante pour valider ou rejeter nos hypothèses.

Pour des perspectives autres que la poursuite des expériences déjà réalisées, elles sont multiples. Cela comprend l'approfondissement de la relation entre les neurones à nNOS de l'AMePD et les sites cibles potentiels en aval, médiateurs des comportements sexuels et de la

préférence de partenaire grâce à un traçage viral monosynaptique et la détermination du rôle de la signalisation nNOS de l'AMePD dans la dysfonction sexuelle induite par le stress.

Bien sûr, d'autres perspectives sont encore envisageables. En 2020, Demir et al. (161) ont montré que chez la femelle, les neurones à nNOS de l'AMe sensibles à la phéromone Darcin sont nécessaires pour reproduire les comportements innés et de renforcement induits par Darcin, mais pas lors du rappel de la mémoire. D'autres études ont également démontré que le NO joue un rôle dans le bulbe olfactif, influençant les fonctions cognitives de haut niveau telles que l'apprentissage et la mémoire (194,195). Les neurones à nNOS de l'AMePD jouent peut-être un rôle dans l'apprentissage et le renforcement de comportements sexuels induits par l'expérience sexuelle. Il serait donc intéressant d'analyser le rôle que jouent ces neurones dans l'expérience sexuelle. Pour ce faire, on pourrait manipuler les neurones à nNOS de l'AMePD lors des entraînements sexuels et voir l'impact sur les tests sexuels et de préférence de partenaire. Ces manipulations peuvent être multiples : soit par DREADDs inhibiteurs, soit par la mort de ces neurones grâce à la caspase-3, soit par l'injection spécifique dans l'AMePD, grâce à une canule, de l'antagoniste de l'activité de l'enzyme nNOS, le N(G)-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME). Les deux premières techniques analyseraient le rôle de cette population de neurones alors que la dernière étudierait le rôle spécifique du NO dans l'AMePD sur l'acquisition de cette expérience sexuelle.

De plus, la plasticité synaptique et plus spécifiquement la potentialisation à long terme (LTP) sont connues pour fournir un modèle cellulaire convaincant pour l'apprentissage et la mémoire (196). Des études utilisant du L-NAME ont révélé qu'en l'absence de NO, la LTP est réduite. (197–199). Par conséquent, si les expériences précédentes confirment le rôle de ces neurones dans l'apprentissage et la mémoire des comportements sexuels, des expériences d'électrophysiologie sur des coupes de cerveau seraient intéressantes. Il serait pertinent d'analyser s'il y a des phénomènes de LTP au niveau des synapses des neurones à nNOS de l'AMePD et, si c'est le cas, de voir le rôle du NO dans cette LTP.

Bibliographie

1. Jennings KJ, De Lecea L. Neural and Hormonal Control of Sexual Behavior. *Endocrinology*. 1 oct 2020;161(10):bqaa150.
2. Stowers L, Liberles SD. State-dependent responses to sex pheromones in mouse. *Current Opinion in Neurobiology*. juin 2016;38:74-9.
3. Arnold AP. The organizational–activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Hormones and Behavior*. mai 2009;55(5):570-8.
4. Wei D, Talwar V, Lin D. Neural circuits of social behaviors: Innate yet flexible. *Neuron*. mai 2021;109(10):1600-20.
5. Kow LM, Montgomery MO, Pfaff DW. Triggering of lordosis reflex in female rats with somatosensory stimulation: quantitative determination of stimulus parameters. *Journal of Neurophysiology*. 1 janv 1979;42(1):195-202.
6. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *JoVE*. 15 sept 2012;(67):4389.
7. Kaur AW, Ackels T, Kuo TH, Cichy A, Dey S, Hays C, et al. Murine Pheromone Proteins Constitute a Context-Dependent Combinatorial Code Governing Multiple Social Behaviors. *Cell*. avr 2014;157(3):676-88.
8. Hutchison JB, Wozniak A, Beyer C, Karolczak M, Hutchison RE. Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. avr 1999;69(1-6):85-96.
9. McGINNIS MY, Dreifuss RM. Evidence for a Role of Testosterone-Androgen Receptor Interactions in Mediating Masculine Sexual Behavior in Male Rats*. *Endocrinology*. févr 1989;124(2):618-26.
10. Brennan PA, Keverne EB. Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones. *Current Biology*. janv 2004;14(2):R81-9.
11. Keller M, Baum MJ, Bakker J. Olfactory Control of Sex-Recognition and Sexual Behavior in Mice. In: Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, éditeurs. *Chemical Signals in Vertebrates 11* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2008 [cité 17 mars 2024]. p. 241-50.
12. Wyatt TD. *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. 1^{re} éd. Cambridge University Press; 2003 [cité 1 févr 2024].
13. Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*. nov

2006;444(7117):308-15.

14. Brennan PA, Kendrick KM. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Phil Trans R Soc B*. 29 déc 2006;361(1476):2061-78.
15. Takahashi LK, Nakashima BR, Hong H, Watanabe K. The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29(8):1157-67.
16. Otsuka S. Predator Odor-induced Freezing Test for Mice. *BIO-PROTOCOL* [Internet]. 2017 [cité 1 févr 2024];7(17).
17. Shepherd GM. Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. *Neuron*. oct 1994;13(4):771-90.
18. Dulac C, Torello AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. juill 2003;4(7):551-62.
19. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*. avr 1991;65(1):175-87.
20. Zhang X, Rodriguez I, Mombaerts P, Firestein S. Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. *Genomics*. mai 2004;83(5):802-11.
21. Breer H, Boekhoff I, Krieger J, Raming K, Strotmann J, Tareilus E. Molecular mechanisms of olfactory signal transduction. *Soc Gen Physiol Ser*. 1992;47:93-108.
22. Young JM. Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Human Molecular Genetics*. 1 mars 2002;11(5):535-46.
23. Zhang X, Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci*. févr 2002;5(2):124-33.
24. Jones DT, Reed RR. G_{olf} : an Olfactory Neuron Specific-G Protein Involved in Odorant Signal Transduction. *Science*. 19 mai 1989;244(4906):790-5.
25. Menco BPM, Bruch RC, Dau B, Danho W. Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit $Golf\alpha$ and type III adenylyl cyclase. *Neuron*. mars 1992;8(3):441-53.
26. Wekesa KS, Anholt RRH. Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. *Brain Research*. août 1999;837(1-2):117-26.
27. Gold GH, Nakamura T. Cyclic nucleotide-gated conductances: a new class of ion channels mediates visual and olfactory transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*. août 1987;8(8):312-6.
28. Breer H, Boekhoff I, Tareilus E. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature*. 3 mai 1990;345(6270):65-8.

29. Brunet LJ, Gold GH, Ngai J. General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Neuron*. oct 1996;17(4):681-93.
30. Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nun˜ez JM, Vosshall LB, Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*. d c 1994;79(6):981-91.
31. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*. mai 1993;73(3):597-609.
32. Wachowiak M, Denk W, Friedrich RW. Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 juin 2004;101(24):9097-102.
33. Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P. Odorant Receptor Expression Defines Functional Units in the Mouse Olfactory System. *J Neurosci*. 15 avr 2002;22(8):3033-43.
34. Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory Inputs to Hypothalamic Neurons Controlling Reproduction and Fertility. *Cell*. nov 2005;123(4):669-82.
35. Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, et al. Parallel Mitral and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *Journal of Neuroscience*. 6 juin 2012;32(23):7970-85.
36. Kang N, Baum MJ, Cherry JA. A direct main olfactory bulb projection to the ‘vomeronasal’ amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur J of Neuroscience*. f vr 2009;29(3):624-34.
37. Kang N, McCarthy EA, Cherry JA, Baum MJ. A sex comparison of the anatomy and function of the main olfactory bulb–medial amygdala projection in mice. *Neuroscience*. janv 2011;172:196-204.
38. Meredith M. Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: Comparisons and contrasts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. oct 1991;39(4):601-14.
39. D ving KB, Trotier D. Structure and function of the vomeronasal organ. *Journal of Experimental Biology*. 1 nov 1998;201(21):2913-25.
40. Meredith M, O’Connell RJ. Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *The Journal of Physiology*. janv 1979;286(1):301-16.
41. Meredith M. Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiology & Behavior*. ao t 1994;56(2):345-54.
42. Dulac C, Axel R. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. oct 1995;83(2):195-206.
43. Matsunami H, Buck LB. A Multigene Family Encoding a Diverse Array of Putative Pheromone Receptors in Mammals. *Cell*. ao t 1997;90(4):775-84.

44. Dulac C. Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Current Opinion in Neurobiology*. août 2000;10(4):511-8.
45. Jia C, Halpern M. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (G_{i2} and $G_{o\alpha}$) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Research*. mai 1996;719(1-2):117-28.
46. Berghard A, Buck L. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G α_o , G α_{i2} , and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J Neurosci*. 1 févr 1996;16(3):909-18.
47. Liberles SD, Horowitz LF, Kuang D, Contos JJ, Wilson KL, Siltberg-Liberles J, et al. Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc Natl Acad Sci USA*. 16 juin 2009;106(24):9842-7.
48. Young JM, Kambere M, Trask BJ, Lane RP. Divergent V1R repertoires in five species: Amplification in rodents, decimation in primates, and a surprisingly small repertoire in dogs. *Genome Res*. févr 2005;15(2):231-40.
49. Ishii T, Hirota J, Mombaerts P. Combinatorial Coexpression of Neural and Immune Multigene Families in Mouse Vomeronasal Sensory Neurons. *Current Biology*. mars 2003;13(5):394-400.
50. Liman ER, Corey DP, Dulac C. TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11 mai 1999;96(10):5791-6.
51. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F. A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice. *Neuron*. oct 2003;40(3):551-61.
52. Wagner S, Gresser AL, Torello AT, Dulac C. A Multireceptor Genetic Approach Uncovers an Ordered Integration of VNO Sensory Inputs in the Accessory Olfactory Bulb. *Neuron*. juin 2006;50(5):697-709.
53. Davis BJ, Macrides F, Youngs WM, Schneider SP, Rosene DL. Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. *Brain Research Bulletin*. janv 1978;3(1):59-72.
54. Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J of Comparative Neurology*. mai 1975;161(1):31-55.
55. Stowers L, Kuo TH. Mammalian pheromones: emerging properties and mechanisms of detection. *Current Opinion in Neurobiology*. oct 2015;34:103-9.
56. Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*. mars 2005;434(7032):470-7.
57. Ferrero DM, Wacker D, Roque MA, Baldwin MW, Stevens RC, Liberles SD. Agonists for 13 Trace Amine-Associated Receptors Provide Insight into the Molecular Basis of Odor Selectivity. *ACS Chem Biol*. 20 juill 2012;7(7):1184-9.

58. Liberles SD, Buck LB. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*. août 2006;442(7103):645-50.
59. Fu X, Yan Y, Xu PS, Geerlof-Vidavsky I, Chong W, Gross ML, et al. A Molecular Code for Identity in the Vomeronasal System. *Cell*. oct 2015;163(2):313-23.
60. Isogai Y, Si S, Pont-Lezica L, Tan T, Kapoor V, Murthy VN, et al. Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*. oct 2011;478(7368):241-5.
61. Nodari F, Hsu FF, Fu X, Holekamp TF, Kao LF, Turk J, et al. Sulfated Steroids as Natural Ligands of Mouse Pheromone-Sensing Neurons. *Journal of Neuroscience*. 18 juin 2008;28(25):6407-18.
62. Stopka P, Janotova K, Heyrovsky D. The advertisement role of major urinary proteins in mice. *Physiology & Behavior*. août 2007;91(5):667-70.
63. Szoka PR, Paigen K. REGULATION OF MOUSE MAJOR URINARY PROTEIN PRODUCTION BY THE *MUP-A* GENE. *Genetics*. 15 nov 1978;90(3):597-612.
64. Dey S, Chamero P, Pru JK, Chien MS, Ibarra-Soria X, Spencer KR, et al. Cyclic Regulation of Sensory Perception by a Female Hormone Alters Behavior. *Cell*. juin 2015;161(6):1334-44.
65. Cherian S, Wai Lam Y, McDaniels I, Struziak M, Delay RJ. Estradiol rapidly modulates odor responses in mouse vomeronasal sensory neurons. *Neuroscience*. juin 2014;269:43-58.
66. Kanageswaran N, Nagel M, Scholz P, Mohrhardt J, Gisselmann G, Hatt H. Modulatory Effects of Sex Steroids Progesterone and Estradiol on Odorant Evoked Responses in Olfactory Receptor Neurons. Reisert J, éditeur. *PLoS ONE*. 5 août 2016;11(8):e0159640.
67. Pro-Sistiaga P, Mohedano-Moriano A, Ubeda-Bañon I, Del Mar Arroyo-Jimenez M, Marcos P, Artacho-Pérula E, et al. Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J of Comparative Neurology*. oct 2007;504(4):346-62.
68. Licht G, Meredith M. Convergence of main and accessory olfactory pathways onto single neurons in the hamster amygdala. *Exp Brain Res [Internet]*. déc 1987 [cité 7 févr 2024];69(1).
69. Martel KL, Baum MJ. Adult Testosterone Treatment But Not Surgical Disruption of Vomeronasal Function Augments Male-Typical Sexual Behavior in Female Mice. *Journal of Neuroscience*. 17 juin 2009;29(24):7658-66.
70. Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. Destruction of the Main Olfactory Epithelium Reduces Female Sexual Behavior and Olfactory Investigation in Female Mice. *Chemical Senses*. 1 mai 2006;31(4):315-23.
71. Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J of Neuroscience*. janv 2006;23(2):521-30.

72. Newman SW. The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences*. juin 1999;877(1):242-57.
73. Wood RI, Newman SW. The Medial Amygdaloid Nucleus and Medial Preoptic Area Mediate Steroidal Control of Sexual Behavior in the Male Syrian Hamster. *Hormones and Behavior*. sept 1995;29(3):338-53.
74. Wood RI. Integration of Chemosensory and Hormonal Input in the Male Syrian Hamster Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. nov 1998;855(1):362-72.
75. Cádiz-Moretti B, Otero-García M, Martínez-García F, Lanuza E. Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Struct Funct*. mars 2016;221(2):1033-65.
76. Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Úbeda-Bañón I, Crespo C, Insausti R, Martinez-Marcos A. Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur J of Neuroscience*. avr 2007;25(7):2065-80.
77. Maras PM, Petrulis A. Chemosensory and steroid-responsive regions of the medial amygdala regulate distinct aspects of opposite-sex odor preference in male Syrian hamsters. *Eur J of Neuroscience*. déc 2006;24(12):3541-52.
78. Maras PM, Petrulis A. Anatomical connections between the anterior and posterodorsal sub-regions of the medial amygdala: integration of odor and hormone signals. *Neuroscience*. oct 2010;170(2):610-22.
79. Maras PM, Petrulis A. The anterior medial amygdala transmits sexual odor information to the posterior medial amygdala and related forebrain nuclei. *Eur J of Neuroscience*. août 2010;32(3):469-82.
80. Bergan JF, Ben-Shaul Y, Dulac C. Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *eLife*. 3 juin 2014;3:e02743.
81. Li Y, Mathis A, Grewe BF, Osterhout JA, Ahanonu B, Schnitzer MJ, et al. Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice. *Cell*. nov 2017;171(5):1176-1190.e17.
82. Simerly RB, Swanson LW, Chang C, Muramatsu M. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *J of Comparative Neurology*. avr 1990;294(1):76-95.
83. Wood RI, Newman SW. Mating activates androgen receptor-containing neurons in chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain. *Brain Research*. juin 1993;614(1-2):65-77.
84. Österlund M, G.J.M. Kuiper G, Gustafsson JÅ, Hurd YL. Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. *Molecular*

Brain Research. févr 1998;54(1):175-80.

85. Gréco B, Blasberg ME, Kosinski EC, Blaustein JD. Response of ER α -IR and ER β -IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Hormones and Behavior*. avr 2003;43(4):444-53.
86. Wagner CK, Morrell JI. Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: A cellular-level analysis using in situ hybridization. *J Comp Neurol*. 17 juin 1996;370(1):71-84.
87. Choi GB, Dong H wei, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, et al. Lhx6 Delineates a Pathway Mediating Innate Reproductive Behaviors from the Amygdala to the Hypothalamus. *Neuron*. mai 2005;46(4):647-60.
88. Petrulis A. Structure and function of the medial amygdala. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience* [Internet]. Elsevier; 2020 [cité 15 févr 2024]. p. 39-61. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128151341000027>
89. Kondo Y, Sachs BD. Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiology & Behavior*. août 2002;76(4-5):443-7.
90. DiBenedictis BT, Ingraham KL, Baum MJ, Cherry JA. Disruption of urinary odor preference and lordosis behavior in female mice given lesions of the medial amygdala. *Physiology & Behavior*. janv 2012;105(2):554-9.
91. McCarthy EA, Maqsdulu A, Bass M, Georghiou S, Cherry JA, Baum MJ. DREADD -induced silencing of the medial amygdala reduces the preference for male pheromones and the expression of lordosis in estrous female mice. *Eur J of Neuroscience*. août 2017;46(4):2035-46.
92. Adekunbi DA, Li XF, Lass G, Shetty K, Adegoke OA, Yeo SH, et al. Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. *J Neuroendocrinology*. mars 2018;30(3):e12572.
93. Johnson CS, Hong W, Micevych PE. Posterodorsal Medial Amygdala Regulation of Female Social Behavior: GABA versus Glutamate Projections. *J Neurosci*. 20 oct 2021;41(42):8790-800.
94. Unger EK, Burke KJ, Yang CF, Bender KJ, Fuller PM, Shah NM. Medial Amygdalar Aromatase Neurons Regulate Aggression in Both Sexes. *Cell Reports*. févr 2015;10(4):453-62.
95. Hong W, Kim DW, Anderson DJ. Antagonistic Control of Social versus Repetitive Self-Grooming Behaviors by Separable Amygdala Neuronal Subsets. *Cell*. sept 2014;158(6):1348-61.
96. Úbeda-Contreras J, Marín-Blasco I, Nadal R, Armario A. Brain c-fos expression patterns induced by emotional stressors differing in nature and intensity. *Brain Struct Funct*. juin

2018;223(5):2213-27.

97. Silveira MCL, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*. juill 1993;56(1):115-8.
98. Fekete ÉM, Zhao Y, Li C, Sabino V, Vale WW, Zorrilla EP. Social defeat stress activates medial amygdala cells that express type 2 corticotropin-releasing factor receptor mRNA. *Neuroscience*. août 2009;162(1):5-13.
99. Pardo-Bellver C, Cádiz-Moretti B, Novejarque A, Martínez-García F, Lanuza E. Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Front Neuroanat* [Internet]. 2012 [cité 26 févr 2024];6.
100. Ivanova D, Li XF, McIntyre C, O'Byrne KT. Posterodorsal Medial Amygdala Urocortin-3, GABA, and Glutamate Mediate Suppression of LH Pulsatility in Female Mice. *Endocrinology*. 19 déc 2022;164(2):bqac196.
101. Rasia-Filho AA, Haas D, De Oliveira AP, De Castilhos J, Frey R, Stein D, et al. Morphological and Functional Features of the Sex Steroid-Responsive Posterodorsal Medial Amygdala of Adult Rats. *MRMC*. 1 sept 2012;12(11):1090-106.
102. Cooke BM. Steroid-dependent plasticity in the medial amygdala. *Neuroscience*. mars 2006;138(3):997-1005.
103. Morris JA, Jordan CL, King ZA, Northcutt KV, Breedlove SM. Sexual dimorphism and steroid responsiveness of the posterodorsal medial amygdala in adult mice. *Brain Research*. janv 2008;1190:115-21.
104. Hosokawa N, Chiba A. Androgen receptor blockade in the posterodorsal medial amygdala impairs sexual odor preference in male rats. *Hormones and Behavior*. août 2010;58(3):493-500.
105. Fujiwara M, Nitta A, Chiba A. Regulation of sexual odor preference by sex steroids in the posterodorsal medial amygdala in female rats. *Hormones and Behavior*. juin 2016;82:46-55.
106. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28 sept 1999;96(20):11241-6.
107. Pardo-Bellver C, Cádiz-Moretti B, Novejarque A, Martínez-García F, Lanuza E. Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Front Neuroanat* [Internet]. 2012 [cité 22 févr 2024];6.
108. Cavalcante JC, Bittencourt JC, Elias CF. Distribution of the neuronal inputs to the ventral premammillary nucleus of male and female rats. *Brain Research*. sept 2014;1582:77-90.
109. Spehr M, Spehr J, Ukhanov K, Kelliher KR, Leinders-Zufall T, Zufall F. Signaling in the Chemosensory Systems: Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol Life Sci*. juill 2006;63(13):1476-84.

110. Bayless DW, Yang T, Mason MM, Susanto AAT, Lobdell A, Shah NM. Limbic Neurons Shape Sex Recognition and Social Behavior in Sexually Naive Males. *Cell*. févr 2019;176(5):1190-1205.e20.
111. Martinez LA, Petrulis A. The bed nucleus of the stria terminalis is critical for sexual solicitation, but not for opposite-sex odor preference, in female Syrian hamsters. *Hormones and Behavior*. nov 2011;60(5):651-9.
112. Knoedler JR, Inoue S, Bayless DW, Yang T, Tantry A, Davis C ha, et al. A functional cellular framework for sex and estrous cycle-dependent gene expression and behavior. *Cell*. févr 2022;185(4):654-671.e22.
113. Yin L, Hashikawa K, Hashikawa Y, Osakada T, Lischinsky JE, Diaz V, et al. VMHvlCckar cells dynamically control female sexual behaviors over the reproductive cycle. *Neuron*. sept 2022;110(18):3000-3017.e8.
114. Pfaff DW, Sakuma Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology*. mars 1979;288(1):203-10.
115. Pfaff DW, Sakuma Y. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology*. mars 1979;288(1):189-202.
116. Shelley DN, Choleris E, Kavaliers M, Pfaff DW. Mechanisms underlying sexual and affiliative behaviors of mice: relation to generalized CNS arousal. *Soc Cogn Affect Neurosci*. déc 2006;1(3):260-70.
117. Lo L, Yao S, Kim DW, Cetin A, Harris J, Zeng H, et al. Connectional architecture of a mouse hypothalamic circuit node controlling social behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 9 avr 2019;116(15):7503-12.
118. McHenry JA, Otis JM, Rossi MA, Robinson JE, Kosyk O, Miller NW, et al. Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nat Neurosci*. mars 2017;20(3):449-58.
119. Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, et al. Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell*. juin 2014;157(7):1535-51.
120. Watabe-Uchida M, Eshel N, Uchida N. Neural Circuitry of Reward Prediction Error. *Annu Rev Neurosci*. 25 juill 2017;40(1):373-94.
121. Xiao K, Kondo Y, Sakuma Y. Differential Regulation of Female Rat Olfactory Preference and Copulatory Pacing by the Lateral Septum and Medial Preoptic Area. *Neuroendocrinology*. 2005;81(1):56-62.
122. Karigo T, Kennedy A, Yang B, Liu M, Tai D, Wahle IA, et al. Distinct hypothalamic control of same- and opposite-sex mounting behaviour in mice. *Nature*. 14 janv 2021;589(7841):258-63.

123. Lin D, Boyle MP, Dollar P, Lee H, Lein ES, Perona P, et al. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*. févr 2011;470(7333):221-6.
124. Lee H, Kim DW, Remedios R, Anthony TE, Chang A, Madisen L, et al. Scalable control of mounting and attack by *Esr1*⁺ neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature*. 29 mai 2014;509(7502):627-32.
125. Wei YC, Wang SR, Jiao ZL, Zhang W, Lin JK, Li XY, et al. Medial preoptic area in mice is capable of mediating sexually dimorphic behaviors regardless of gender. *Nat Commun*. 18 janv 2018;9(1):279.
126. Gao SC, Wei YC, Wang SR, Xu XH. Medial Preoptic Area Modulates Courtship Ultrasonic Vocalization in Adult Male Mice. *Neurosci Bull*. août 2019;35(4):697-708.
127. Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, et al. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*. juill 2015;162(3):622-34.
128. Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N. Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron*. juin 2012;74(5):858-73.
129. Struthers WM. Sex-induced fos in the medial preoptic area: projections to the midbrain: *Neuroreport*. oct 2001;12(14):3065-8.
130. Hosokawa N, Chiba A. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Research*. oct 2007;1175:66-75.
131. Hosokawa N, Chiba A. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats. *Brain Research*. déc 2005;1066(1-2):101-8.
132. Hosokawa N, Chiba A. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats. *Brain Research*. déc 2005;1066(1-2):101-8.
133. Garthwaite J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. *The Journal of Physiology*. janv 2016;594(1):9-18.
134. Chachlaki K, Prevot V. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. *British J Pharmacology*. déc 2020;177(24):5437-58.
135. Stuehr DJ. Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway. *The Journal of Nutrition*. oct 2004;134(10):2748S-2751S.
136. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. oct 1991;7(4):615-24.
137. Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bächinger HP, et al. Characterization of

- Heme-deficient Neuronal Nitric-oxide Synthase Reveals a Role for Heme in Subunit Dimerization and Binding of the Amino Acid Substrate and Tetrahydrobiopterin. *Journal of Biological Chemistry*. mars 1996;271(13):7336-42.
138. Dunbar AY, Kamada Y, Jenkins GJ, Lowe ER, Billecke SS, Osawa Y. Ubiquitination and Degradation of Neuronal Nitric-Oxide Synthase in Vitro: Dimer Stabilization Protects the Enzyme from Proteolysis. *Mol Pharmacol*. oct 2004;66(4):964-9.
 139. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain Interaction Between NMDA Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein PSD-95. *Science*. 22 sept 1995;269(5231):1737-40.
 140. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, et al. Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and α 1-Syntrophin Mediated by PDZ Domains. *Cell*. mars 1996;84(5):757-67.
 141. Su Z, Blazing MA, Fan D, George SE. The Calmodulin-Nitric Oxide Synthase Interaction. *Journal of Biological Chemistry*. déc 1995;270(49):29117-22.
 142. Ataman ZA, Gakhar L, Sorensen BR, Hell JW, Shea MA. The NMDA Receptor NR1 C1 Region Bound to Calmodulin: Structural Insights into Functional Differences between Homologous Domains. *Structure*. déc 2007;15(12):1603-17.
 143. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. nov 1988;336(6197):385-8.
 144. Guerra DD, Bok R, Vyas V, Orlicky DJ, Lorca RA, Hurt KJ. Akt phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase regulates gastrointestinal motility in mouse ileum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 27 août 2019;116(35):17541-6.
 145. Adak S, Santolini J, Tikunova S, Wang Q, Johnson JD, Stuehr DJ. Neuronal Nitric-oxide Synthase Mutant (Ser-1412 \rightarrow Asp) Demonstrates Surprising Connections between Heme Reduction, NO Complex Formation, and Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. janv 2001;276(2):1244-52.
 146. Scordalakes EM, Shetty SJ, Rissman EF. Roles of estrogen receptor α and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J of Comparative Neurology*. 25 nov 2002;453(4):336-44.
 147. d'Anglemont De Tassigny X, Campagne C, Dehouck B, Leroy D, Holstein GR, Beauvillain JC, et al. Coupling of Neuronal Nitric Oxide Synthase to NMDA Receptors via Postsynaptic Density-95 Depends on Estrogen and Contributes to the Central Control of Adult Female Reproduction. *Journal of Neuroscience*. 6 juin 2007;27(23):6103-14.
 148. D'Anglemont De Tassigny X, Campagne C, Steculorum S, Prevot V. Estradiol induces physical association of neuronal nitric oxide synthase with NMDA receptor and promotes nitric oxide formation via estrogen receptor activation in primary neuronal cultures. *Journal of Neurochemistry*. avr 2009;109(1):214-24.

149. Parkash J, d'Anglemont De Tassigny X, Bellefontaine N, Campagne C, Mazure D, Buée-Scherrer V, et al. Phosphorylation of *N*-Methyl- *D*-Aspartic Acid Receptor-Associated Neuronal Nitric Oxide Synthase Depends on Estrogens and Modulates Hypothalamic Nitric Oxide Production during the Ovarian Cycle. *Endocrinology*. juin 2010;151(6):2723-35.
150. Hawkins RD, Son H, Arancio O. Chapter 11 Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. In: *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 1998 [cité 28 févr 2024]. p. 155-72. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612308632069>
151. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. août 1977;74(8):3203-7.
152. Garthwaite J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem*. janv 2010;334(1-2):221-32.
153. Wood J, Garthwaite J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: Implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*. nov 1994;33(11):1235-44.
154. Gyurko R, Leupen S, Huang PL. Deletion of Exon 6 of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene in Mice Results in Hypogonadism and Infertility. *Endocrinology*. 1 juill 2002;143(7):2767-74.
155. Hellier V, Brock O, Candlish M, Desroziers E, Aoki M, Mayer C, et al. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nat Commun*. 26 janv 2018;9(1):400.
156. Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5 juill 1994;91(14):6468-72.
157. Bentefour Y, Bakker J. Kisspeptin signaling and nNOS neurons in the VMHvl modulate lordosis behavior but not mate preference in female mice. *Neuropharmacology*. oct 2021;198:108762.
158. Donato J, Cavalcante JC, Silva RJ, Teixeira AS, Bittencourt JC, Elias CF. Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. *Physiology & Behavior*. janv 2010;99(1):67-77.
159. Sato Y, Horita H, Kurohata T, Adachi H, Tsukamoto T. Effect of the nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behavior in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1 janv 1998;274(1):R243-7.
160. De Castilhos J, Rigon P, Xavier LL, Rasia-Filho A, Achaval M. Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala. *Brain Research*. déc

2009;1305:31-9.

161. Demir E, Li K, Bobrowski-Khoury N, Sanders JI, Beynon RJ, Hurst JL, et al. The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours. *Nature*. 6 févr 2020;578(7793):137-41.
162. Forestiero D, Manfrim CM, Guimarães FS, De Oliveira RMW. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology*. févr 2006;184(2):166-72.
163. Chakrabarty P, Rosario A, Cruz P, Sieminski Z, Ceballos-Diaz C, Crosby K, et al. Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain. Qiu J, éditeur. *PLoS ONE*. 25 juin 2013;8(6):e67680.
164. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. mai 2019;18(5):358-78.
165. Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S. Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. Qiu J, éditeur. *PLoS ONE*. 27 sept 2013;8(9):e76310.
166. Benfenati F, Valtorta F, Rubenstein JL, Gorelick FS, Greengard P, Czernik AJ. Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature*. oct 1992;359(6394):417-20.
167. Paterna JC, Moccetti T, Mura A, Feldon J, Büeler H. Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther*. 1 août 2000;7(15):1304-11.
168. Azzoni AR, Ribeiro SC, Monteiro GA, Prazeres DMF. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *The Journal of Gene Medicine*. mai 2007;9(5):392-402.
169. Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. févr 2001;19(2):137-41.
170. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. août 1997;388(6645):882-7.
171. Grienberger C, Konnerth A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*. mars 2012;73(5):862-85.
172. Luo L, Callaway EM, Svoboda K. Genetic Dissection of Neural Circuits: A Decade of Progress. *Neuron*. mai 2018;98(4):865.
173. Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13 mars 2001;98(6):3197-202.
174. Crivici A, Ikura M. Molecular and Structural Basis of Target Recognition by Calmodulin.

Annu Rev Biophys Biomol Struct. juin 1995;24(1):85-116.

175. Akerboom J, Rivera JDV, Guilbe MMR, Malavé ECA, Hernandez HH, Tian L, et al. Crystal Structures of the GCaMP Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design. *Journal of Biological Chemistry*. mars 2009;284(10):6455-64.
176. Wang Q, Shui B, Kotlikoff MI, Sondermann H. Structural Basis for Calcium Sensing by GCaMP2. *Structure*. déc 2008;16(12):1817-27.
177. Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 18 juill 2013;499(7458):295-300.
178. Zhang Y, Rózsa M, Liang Y, Bushey D, Wei Z, Zheng J, et al. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature*. 30 mars 2023;615(7954):884-91.
179. Baker PF, Hodgkin AL, Ridgway EB. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *The Journal of Physiology*. nov 1971;218(3):709-55.
180. Sabatini BL, Oertner TG, Svoboda K. The Life Cycle of Ca²⁺ Ions in Dendritic Spines. *Neuron*. janv 2002;33(3):439-52.
181. Stachniak TJ, Ghosh A, Sternson SM. Chemogenetic Synaptic Silencing of Neural Circuits Localizes a Hypothalamus→Midbrain Pathway for Feeding Behavior. *Neuron*. mai 2014;82(4):797-808.
182. Nawaratne V, Leach K, Suratman N, Loiacono RE, Felder CC, Armbruster BN, et al. New Insights into the Function of M₄ Muscarinic Acetylcholine Receptors Gained Using a Novel Allosteric Modulator and a DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by a Designer Drug). *Mol Pharmacol*. oct 2008;74(4):1119-31.
183. Guo ML, Mao LM, Wang JQ. Modulation of M4 muscarinic acetylcholine receptors by interacting proteins. *Neurosci Bull*. déc 2010;26(6):469-73.
184. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 mars 2007;104(12):5163-8.
185. Bock R, Shin JH, Kaplan AR, Dobi A, Markey E, Kramer PF, et al. Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat Neurosci*. mai 2013;16(5):632-8.
186. Cohen H, Matar MA, Buskila D, Kaplan Z, Zohar J. Early Post-Stressor Intervention with High-Dose Corticosterone Attenuates Posttraumatic Stress Response in an Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*. oct 2008;64(8):708-17.
187. Lu L, Gutruf P, Xia L, Bhatti DL, Wang X, Vazquez-Guardado A, et al. Wireless optoelectronic photometers for monitoring neuronal dynamics in the deep brain. *Proc*

- Natl Acad Sci USA [Internet]. 13 févr 2018 [cité 25 janv 2024];115(7).
188. Siciliano CA, Tye KM. Leveraging calcium imaging to illuminate circuit dysfunction in addiction. *Alcohol*. févr 2019;74:47-63.
 189. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*. 4 août 2017;357(6350):503-7.
 190. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*. avr 2004;3(4):353-9.
 191. Nagai Y, Miyakawa N, Takuwa H, Hori Y, Oyama K, Ji B, et al. Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci*. sept 2020;23(9):1157-67.
 192. Martin EI, Ressler KJ, Binder E, Nemeroff CB. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatric Clinics of North America*. sept 2009;32(3):549-75.
 193. Loewke AC, Minerva AR, Nelson AB, Kreitzer AC, Gunaydin LA. Frontostriatal Projections Regulate Innate Avoidance Behavior. *J Neurosci*. 23 juin 2021;41(25):5487-501.
 194. Okere CO, Kaba H, Higuchi T. Formation of an olfactory recognition memory in mice: Reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*. mars 1996;71(2):349-54.
 195. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, Zorrilla J, Hinton MR, Broad KD, Mimmack M, et al. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*. 14 août 1997;388(6643):670-4.
 196. Nicoll RA. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*. janv 2017;93(2):281-90.
 197. Hardingham N, Dachtler J, Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013 [cité 6 juin 2024];7.
 198. Lange MD, Doengi M, Lesting J, Pape HC, Jüngling K. Heterosynaptic long-term potentiation at interneuron–principal neuron synapses in the amygdala requires nitric oxide signalling. *The Journal of Physiology*. janv 2012;590(1):131-43.
 199. Phillips KG, Hardingham NR, Fox K. Postsynaptic Action Potentials Are Required for Nitric-Oxide-Dependent Long-Term Potentiation in CA1 Neurons of Adult GluR1 Knock-Out and Wild-Type Mice. *J Neurosci*. 24 déc 2008;28(52):14031-41.