

Des modèles génétiques pour comprendre le rôle de la sérotonine au cours du développement

Par Patricia Gaspar

INSERM Unité 106, Bâtiment Pédiatrie, Hôpital de la Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13.
Email : gaspar@infobiogen.fr

Reçu le 5 janvier 2004

RÉSUMÉ

Les approches de génétique moléculaire chez la souris ont permis des avancées majeures dans la compréhension du développement des neurones sérotoninergiques et de la signalisation sérotoninergique pendant le développement. Le phénotype sérotoninergique est défini par une séquence de facteurs de transcription dont le facteur Pet 1, sélectivement exprimé dans le raphé, et qui dirige la transcription de gènes de synthèse (TPH) et de recapture de la 5-HT (SERT). La recapture de la 5-HT peut exister indépendamment de la synthèse au cours du développement. Le transporteur de la sérotonine et le transporteur vésiculaire des amines sont exprimés au niveau de neurones thalamiques, corticaux et rétiniens. Ils permettraient d'ajuster l'homéostasie de la 5-HT au niveau des récepteurs présynaptiques de type 5-HT_{1B} exprimés transitoirement pendant le

développement de ces voies. Les souris présentant un excès ou un déficit de 5-HT pendant le développement (MAOA-KO, ou VMAT2-KO) ont surtout des anomalies tardives de la mise en place des connexions neuronales : des anomalies de l'arborisation terminale des axones, de la dendritogénèse et des modifications de la mort cellulaire au cours du développement.

Les anomalies liées à des défauts de l'homéostasie sérotoninergique concernent donc essentiellement des étapes tardives de la mise en place des connexions cérébrales. Elles ont pour l'instant été essentiellement caractérisées au niveau des cartes sensorielles somatosensorielles et visuelles mais existent aussi vraisemblablement dans de nombreuses régions du système nerveux central, pouvant être à l'origine d'anomalies comportementales chez l'adulte.

SUMMARY Genetic models to understand how serotonin acts during development

Molecular genetics in mice have allowed significant progresses to be made in our understanding of the development of serotonergic neurones and of their developmental role. The serotonergic phenotype is determined by a sequence of transcription factors. Pet-1 is selectively expressed in the raphe and controls directly the transcription of the genes, encoding the biosynthetic enzyme of 5-HT, tryptophan hydroxylase (TPH), and the serotonin plasma membrane transporter (SERT). Expression of SERT can however occur independently of TPH during development and allows subpopulations of glutamatergic neurons to take up and to store 5-HT into synaptic vesicles via the

vesicular monoamine transporter (VMAT). This could allow a tight homeostasis of 5-HT receptor activation on thalamic and retinal afferents.

Mice with an excess or a severe reduction of 5-HT during development, such as the MAOA and the VMAT2 KO mice, show abnormalities that concern late stages of development: alterations in axon branching, dendritic remodeling and developmental cell death. Each of these effects could be mediated by a different 5-HT receptor. Abnormalities have been best characterized in the somatosensory and visual system but are likely to occur throughout the central nervous system.

INTRODUCTION

Le rôle trophique de la sérotonine (5-HT) au cours du développement et de la croissance des organismes est connu depuis très longtemps. D'abord illustré par des tra-

voux chez les Invertébrés, en particulier les mollusques marins, comme l'Oursin ou l'Aplysie, il a ensuite été démontré dans le système nerveux central des Mammifères. Dans toutes les espèces étudiées à ce jour, les neurones sérotoninergiques sont parmi les premiers à se dif-

férencier, à fabriquer et à sécréter l'amine au niveau de leurs cônes de croissance et peuvent ainsi influencer la croissance ou la différenciation des neurones environnants.

Les premières études pharmacologiques ciblant les voies sérotoninergiques, en utilisant par exemple des inhibiteurs de synthèse ou de dégradation de la 5-HT ou des antagonistes de ses récepteurs, ont permis de montrer que la 5-HT influence des événements aussi divers que la division cellulaire, la migration et la croissance axonale. D'autre part, ces mêmes traitements administrés à des embryons maintenus *ex vivo* provoquent des malformations cérébrales et faciales graves (Lauder, 1993; Azmitia, 2001; Vitalis et Parnavelas, 2003).

Ce fut donc une surprise de constater l'absence d'anomalies cérébrales manifestes chez les premières souris mutantes avec une invalidation ciblée de molécules impliquées dans le métabolisme de la sérotonine. Il existe à présent près d'une quinzaine de lignées de souris mutantes soit pour l'un des quinze récepteurs de la sérotonine, soit pour une enzyme du catabolisme (MAO), de la synthèse (TPH) ou de la recapture de la sérotonine (SERT) (Gaspar *et al.*, 2003). Aucune de ces lignées ne présente de malformations cérébrales visibles, et les deux mutations qui sont léthales à la naissance le sont du fait d'anomalies de la physiologie cardiaque (voir L. Maroteaux, même numéro) ou d'anomalies de la prise alimentaire (souris VMAT2-KO) (Fon *et al.*, 1997).

Qu'en est-il donc du rôle spécifique de la 5-HT au cours du développement? Dans cette revue, nous résumerons les apports de la génétique moléculaire concernant deux points de vue, la spécification du phénotype sérotoninergique d'une part et le rôle de la sérotonine dans la construction des réseaux neuronaux d'autre part.

SPÉCIFICATION DU PHÉNOTYPE SÉROTONINERGIQUE

Les neurones sérotoninergiques forment un ensemble de neurones massés dans le tronc cérébral, principalement au niveau de la ligne médiane dans les noyaux du raphé. Plusieurs sous-groupes de neurones ont été individualisés dans cet ensemble par les chercheurs qui les ont initialement décrits (Dahlström et Fuxe, 1964), de B1 caudalement à B9 rostralement. Fonctionnellement et anatomiquement, on distingue deux sous-ensembles principaux, un groupe caudal (de B1 à B5) qui innerve la moelle épinière et contrôle les fonctions motrices et respiratoires, et un groupe rostral (de B6 à B9) qui innerve l'ensemble du télencéphale et du diencephale, et qui module les fonctions d'éveil, les réactions au stress et tout un répertoire comportemental émotionnel.

Comment ces neurones s'individualisent-ils au cours du développement? Le processus débute à un stade où le tube neural, encore très indifférencié, est un épithélium prolifératif. Différents morphogènes agissent pendant cette période pour segmenter le tube neural et en déterminer le devenir. Ces facteurs sont des molécules sécré-

tées par des centres organisateurs. Ainsi, Sonic Hedgehog est sécrété par la notocorde ventralement, Fgf8 est sécrété par la région de l'isthme (ou jonction mes-metencéphalique) rostralement, et Fgf4 est sécrété par la ligne latérale (latéro-dorsalement). La combinaison de ces trois facteurs crée, dans une région ventrale et médiane du rhombencéphale, un espace permissif pour la production de neurones sérotoninergiques (Ye *et al.*, 1998).

L'influence de ces facteurs a été montrée *in vitro* sur des co-cultures, et *in vivo* dans des modèles génétiques. Un modèle génétique a été ainsi produit récemment dans lequel la frontière isthmique a été déplacée rostralement ou caudalement, ce qui a eu pour conséquence une extension ou au contraire une réduction de l'étendue rostro-caudale des neurones sérotoninergiques. Une fois que la région compétente pour produire des neurones 5-HT a été définie, d'autres facteurs de transcription prennent le relais pour déterminer le phénotype sérotoninergique. Ainsi Pet-1 est un facteur de transcription à domaine ETS qui est exprimé très sélectivement dans les futurs neurones sérotoninergiques un jour avant leur genèse (Hendricks *et al.*, 1999). Ce facteur peut agir directement pour activer la transcription des gènes sérotoninergiques proprement dits comme ceux codant la tryptophane hydroxylase (TPH) et le transporteur de la sérotonine (SERT).

En effet, quand le gène Pet-1 est invalidé génétiquement, la plus grande partie des neurones sérotoninergiques n'est pas générée et les neurones restants ont un taux diminué de SERT et de TPH (Hendricks *et al.*, 2003).

Ce mode de spécification du phénotype sérotoninergique n'est sans doute pas univoque, car il existe d'autres cellules capables de synthétiser la 5-HT, en particulier les cellules entérochromaffines de l'intestin, qui obéissent à une détermination transcriptionnelle différente (aucun des facteurs de transcription précédemment décrits, comme Pet-1, n'est retrouvé à leur niveau). De manière intéressante, ces cellules contiennent une autre isoforme de la TPH que celle exprimée dans le système nerveux central (voir Côté *et al.* dans le même numéro). Le gène central (TPH2) et le gène périphérique (TPH1) pourraient donc obéir à des régulations transcriptionnelles différentes.

De plus, à côté des « vrais » neurones sérotoninergiques, il existe, pendant le développement, des neurones sérotoninergiques d'emprunt. Il s'agit de neurones qui captent la sérotonine mais ne la synthétisent pas. Nous avons, au cours de nos études chez les souris mutantes, découvert l'existence de tels neurones dans le thalamus sensoriel, le cortex limbique, l'hippocampe, l'hypothalamus et dans les noyaux de l'olive supérieure au niveau du tronc cérébral (Lebrand *et al.*, 1996, 1998; Cases *et al.*, 1998).

Tous ces neurones ont la particularité d'exprimer transitoirement le transporteur de la sérotonine alors qu'ils sont glutamatergiques. La plupart de ces neurones expriment de surcroît le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2), ce qui leur permet non seulement de capter la sérotonine du milieu extérieur, mais aussi de la concentrer au niveau des vésicules synaptiques, et pos-

siblement de la libérer à nouveau en réponse à une stimulation électrique.

Une telle fonction de libération du neuromédiateur internalisé n'a pas encore pu être clairement établie pour les neurones en développement, mais la présence de vésicules synaptiques aminergiques dans des boutons synaptiques de type glutamatergique (formant des contacts asymétriques) dans le cortex cérébral immature, suggère que cela puisse être le cas (Kristt, 1979). D'autre part, la capture de 5-HT est très similaire à celle démontrée au niveau des plaquettes sanguines. Les plaquettes concentrent la sérotonine du sang circulant pour la libérer en réponse à une stimulation mécanique.

Au cours du développement, certains neurones non-aminiergiques pourraient ainsi recruter ce médiateur pour des fonctions développementales particulières. Comme nous le verrons plus loin, ce processus de capture/libération pourrait constituer un mécanisme plus efficace pour contrôler le niveau d'activation de certains récepteurs sérotoninergiques.

ROLE DE LA SÉROTONINE DANS LA CONSTRUCTION DES RÉSEAUX NEURONAUX

Les modèles génétiques qui ont permis d'appréhender le plus clairement le rôle de la sérotonine pendant le développement neuronal sont ceux où la voie d'inactivation des amines est défaillante. Deux mutants ont été particulièrement utiles dans cette perspective, les souris avec une invalidation du gène de la MAOA (MAO⁻-KO) (Cases *et al.*, 1995) ou du transporteur de la sérotonine (SERT-KO) (Bengel *et al.*, 1998).

Dans ces 2 cas, la sérotonine libérée par les neurones aminergiques ne peut plus être éliminée efficacement de l'espace extracellulaire. Ainsi chez les souris MAOA-KO, la 5-HT est jusqu'à 10 fois plus élevée que la normale au cours du développement; cette augmentation s'atténue plus tard au cours de la maturation avec la mise en place d'une compensation fonctionnelle par la MAOB (Cases *et al.*, 1995). Chez les souris SERT-KO, il a été possible de montrer une augmentation significative de la 5-HT dans l'espace extracellulaire en utilisant des techniques de microdialyse (Benge *et al.*, 1998). Les anomalies du développement observées chez ces souris sont relativement subtiles et concernent des étapes tardives de la maturation neuronale. Par exemple une des anomalies que nous avons le mieux caractérisées concerne l'organisation en tonneaux du cortex somatosensoriel des rongeurs. Un tonneau correspond aux afférences sensorielles provenant d'une vibrisse (Woolsey et Van der Loos, 1970). Il est constitué par un bouquet d'afférences thalamiques entouré de neurones étoilés, dont les corps cellulaires se distribuent en périphérie et les dendrites vers le centre. Quand les taux de 5-HT sont trop élevés pendant la première semaine de vie post-natale, que ce soit du fait d'une mutation, ou à la suite d'un traitement pharmacologique, les tonneaux ne se forment pas normale-

ment : les fibres thalamiques ne forment plus d'amas caractéristiques et les cellules de la couche IV forment une couche continue (Cases, *et al.*, 1996; Vitalis *et al.*, 1998). Nous avons pu observer qu'un traitement pharmacologique abaissant les taux de 5-HT pendant la première semaine de vie suffisait à restaurer un phénotype normal, c'est à dire une organisation normale des tonneaux (Cases *et al.*, 1996).

D'autres phénotypes cellulaires du même ordre ont pu être observés dans différentes régions cérébrales. Ainsi, au niveau du système visuel, les fibres rétinienne forment une carte de projection beaucoup moins précise chez les mutants que chez les contrôles (Upton *et al.*, 1999). Dans la moelle cervicale, la maturation dendritique des motoneurons du nerf phrénique est altérée chez les souris MAOA-KO (Bou-Flors *et al.*, 1999).

Une étape a été franchie dans la compréhension des mécanismes moléculaires de ces anomalies développementales, par la démonstration d'une réversion de celles-ci chez des souris doublement KO pour la MAOA et pour le récepteur 5-HT_{1B} (Salichon *et al.*, 2001). Ces données ont montré que l'excès d'activation du récepteur 5-HT_{1B} avait un rôle crucial dans la genèse de ces malformations (Salichon *et al.*, 2001). Ce que l'on savait, et que nos études ont permis de préciser concernant ce récepteur, c'est d'une part sa position présynaptique au niveau des terminaisons axonales des neurones thalamiques (Leslie & Chiaia, 1993; Bennett-Clarke *et al.*, 2002) et d'autre part son rôle inhibiteur sur la transmission neuronale (Laurent *et al.*, 2002). Ainsi ce récepteur exerce un contrôle inhibiteur qui, s'il est poussé à l'extrême par une exposition permanente à la 5-HT, aboutit à un freinage complet des systèmes concernés. Dans les neurones thalamocorticaux ainsi que dans les cellules rétinienne, cette inhibition provoque une altération de leur développement axonal.

Les modèles génétiques de diminution de la production de la sérotonine ont été beaucoup moins étudiés jusqu'à présent. Au laboratoire, nous avons récemment caractérisé les souris déficientes en transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2). Ces souris ont une diminution radicale des 3 amines, dopamine, noradrénaline et sérotonine, et meurent au cours des premiers jours de vie postnatale à cause de troubles sévères de la prise alimentaire (Alvarez *et al.*, 2002; Fon *et al.*, 1997). De fait, elles sont hypotrophiques et ont des anomalies de la maturation corticale, avec une différenciation cellulaire anormale et une augmentation de la mort cellulaire développementale par apoptose (Stankovski, Cases, Gaspar, en préparation).

Le croisement de ces souris avec les MAOA-KO produit des doubles KO, qui ont une longévité et une croissance un peu améliorées (mort au bout de 3 semaines de vie) (Alvarez *et al.*, 2002), et surtout la mort cellulaire développementale dans leur cortex cérébral est normalisée (Stankovski, Cases, Gaspar en préparation). Le sauvetage cellulaire induit par l'augmentation (génétiquement induite) des taux de 5-HT indique le rôle probable de cette amine dans la survie des neurones. Cet effet paraît être lié au rôle de la 5-HT dans le contrôle de

l'expression de facteurs neurotrophiques et de facteurs pro-apoptotiques (Stankovski, Cases, Gaspar, en préparation). Il nous reste à présent à déterminer quels sont les récepteurs médiant cet effet trophique.

CONCLUSION

Les études génétiques ciblant les récepteurs 5-HT montrent que pour comprendre l'effet développemental de la 5-HT il est nécessaire de le décomposer en une multitude d'effets différents; chaque effet est associé préférentiellement avec un sous-type de récepteur donné. La localisation dynamique des récepteurs 5-HT au cours du développement et leur compartimentation subcellulaire, très différentes, expliquent sans doute la très grande variété des effets observés, allant de la survie cellulaire et la migration des neurones, jusqu'au remodelage de leurs dendrites et de leurs axones.

Les études génétiques s'orientent à présent vers des invalidations conditionnelles des récepteurs, en ciblant des moments clés du développement ou des régions cérébrales précises. Cette nouvelle génération de modèles permettra sans doute de déterminer, de manière plus exacte, non seulement les cibles cellulaires et sub-cellulaires de la 5-HT au cours du développement, mais aussi les conséquences fonctionnelles de ses effets pour le comportement adulte.

BIBLIOGRAPHIE

- Alvarez C., Vitalis T., Fon E. A., Hanoun N., Hamon M., Seif I., Edwards R., Gaspar P., Cases O., Effects of genetic depletion of monoamines on somatosensory cortical development. *Neuroscience*, 2002, 115, 753-764.
- Azmitia E. C., Modern view on an ancient chemical: serotonin effects on proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.*, 2001, 56, 414-424.
- Bengel D., Murphy D. L., Andrews A. M., Wichems C. H., Feltnner D., Heils A., Mossner R., Westphal H., Lesch K. P., Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4- methylendioxyamphetamine (« Ecstasy ») in serotonin transporter- deficient mice. *Mol. Pharmacol.*, 1998, 53, 649-655.
- Bou-Flores C., Lajard A. M., Monteau R., De Maeyer E., Seif I., Lanoir J., Hilaire G., Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of a serotonin excess. *J. Neurosci.*, 2000, 20, 4646-4656.
- Cases O., Seif I., Grimsby J., Gaspar P., Chen K., Pournin S., Muller U., Aguet M., Babinet C., Shih J. C., Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 1995, 268, 1763-1766.
- Cases O., Lebrand C., Giros B., Vitalis T., De Maeyer E., Caron M. G., Price D. J., Gaspar P., Seif I., Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. *J. Neurosci.*, 1998, 18, 6914-6927.
- Dahlström A., Fuxe K., Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 1964, 20, 398-399.
- Fon E. A., Pothos E. N., Sun B. C., Killeen N., Sulzer D., Edwards R. H., Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron*, 1997, 19, 1271-1283.
- Gaspar P., Cases O., Maroteaux L., The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Rev. Neurosci.*, 2003, sous presse.
- Hendricks T. J., Francis N., Fyodorov D. J., Deneris E. S., The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central 5-HT neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 10348-10356.
- Hendricks T. J., Fyodorov D. J., Wegman L. J., Lelutiu N. B., Pehek E. A., Yamamoto B., Silver J., Weeber E. J., Sweatt J. D., Deneris E. S., Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behaviour. *Neuron*, 2003, 37, 233-247.
- Krist D. A., Development of neocortical circuitry: quantitative ultrastructural analysis of putative monoaminergic synapses. *Brain Res.*, 1979, 178, 69-88.
- Lane R. D., Bennett-Clarke C. A., Chiaia N. L., Killackey H. P., Rhoades R. W., Lesion-induced reorganization in the brainstem is not completely expressed in somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 4264-4268.
- Lauder J. M., Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.*, 1993, 16, 233-239.
- Laurent A., Goillard J. M., Cases O., Lebrand C., Gaspar P., Ropert N., Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *J. Neurosci.*, 2002, 22, 886-900.
- Lebrand C., Cases O., Adelbrecht C., Doye A., Alvarez C., El Mestikawy S., Seif I., Gaspar P., Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron*, 1996, 17, 823-835.
- Lebrand C., Cases O., Wehrle R., Blakely R. D., Edwards R. H., Gaspar P., Transient developmental expression of monoamine transporters in the rodent forebrain. *J. Comp. Neurol.*, 1998, 401, 506-524.
- Salichon N., Gaspar P., Upton A. L., Picaud S., Hanoun N., Hamon M., De Maeyer E., Murphy D. L., Mossner R., Lesch K. P., Hen R., Seif I., Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knock-out mice. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 884-896.
- Upton A. L., Salichon N., Lebrand C., Ravary A., Blakely R., Seif I., Gaspar P., Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 7007-7024.
- Vitalis T., Parnavelas J. G., The role of serotonin in early cortical development. *Dev. Neurosci.*, 2003, 25, 245-256.
- Woolsey T. A., Van der Loos H., The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.*, 1970, 17, 205-242.
- Ye W., Rosenthal A., Rubenstein G., Hynes M. A., Rosenthal A., FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 1998, 93, 755-766.