



Doctoral Thesis

Functional MRI to assess genetic and environmental influences on serotonergic neurotransmission in mice

Author(s):

Razoux, Florence

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006383226> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19422

**FUNCTIONAL MRI TO ASSESS GENETIC AND ENVIRONMENTAL INFLUENCES
ON SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION IN MICE**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

FLORENCE RAZOUX

D.E.A. Molecular and Cell Biology,
University of Nice Sophia-Antipolis

Born November 12th, 1979

citizen of France

accepted on the recommendation of

Prof. Markus Rudin, examiner
Prof. Peter Boesiger, co-examiner
Dr. Christopher Pryce, co-examiner

2010

Summary

Over the last fifty years, the development of imaging techniques has permitted significant strides in characterizing neurotransmitter systems and providing tangible evidence of the neurobiological manifestations of psychiatric diseases. The availability of specific ligands for the type 1A serotonergic receptor (5-HT_{1A} receptor) has demonstrated that this receptor is associated with various psychiatric disorders and, thus, might be involved in the molecular mechanisms underlying them. However, the lack of quantitative objective measures of psychiatric diseases such as anxiety and depression, and the fact that human behavior is complex and cannot be easily tested in laboratories or reproduced in animal models complicates our understanding of these diseases. Despite progress made in determining etiology and pathophysiology of psychiatric diseases, a complete grasp on them remains elusive and determining the precise impact of the 5-HT_{1A} receptor on psychiatric disorders remains challenging. Incidentally, this residual lack of understanding has been reflected by the stagnancy of effective medication over the past decades. In loom of the growing prevalence of neuropsychiatric illnesses and their associated burden, clues on the underlying biological mechanisms of these diseases are necessary in order to allow earlier diagnoses and improve therapies. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) methods provide a powerful means to spatially and temporally resolve complex, dynamic patterns of brain activity. With their gradual implantation in small animals, and because of their non-invasive nature enabling translational research studies, they hold the place of choice among all imaging techniques and represent a precious imaging tool to investigate the foundations of psychiatric diseases by phenotyping genetically engineered animals and animal models of these disorders.

Quantitative genetic studies have provided strong evidence of the importance of both environmental and genetic factors in the regulation of behavior. Furthermore, there is growing evidence that most of the psychiatric diseases cannot be explained by the influence of a unique factor but are rather the product of multiple co-acting genetic and environmental influences. The main objective of this thesis was to develop fMRI methodology including analysis systems to assess the influence of genetic and environmental factors on the serotonergic system in mice and, ultimately, evaluate whether fMRI using a serotonergic pharmacological challenge could be used to provide a biomarker for psychiatric diseases.

To this aim, we established an fMRI protocol targeting the serotonergic system in mice. We showed that administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT prompts a dose-dependent reduction in local cerebral blood volume (CBV_{rel}) in brain areas rich in neurons expressing postsynaptic 5-HT_{1A} receptor, including the prefrontal cortex, hippocampus and amygdalar nuclei. Region-specific inhibition of the response by co-injection of 8-OH-DPAT with the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635, or in 5-HT_{1A} knock-out mice, suggests that 5-HT_{1A} receptors are the primary targets of the agonist. Overall, the data demonstrate the feasibility of mapping region-specific and dose-dependent changes of serotonergic

neurotransmission in the mouse by stimulation with the 5-HT_{1A} ligand 8-OH-DPAT using non-invasive fMRI.

Thereafter, we demonstrated the sensitivity of our fMRI protocol by detecting functional changes in the serotonergic system of mice following exposure to deleterious and beneficial environmental factors.

Early life stress (ELS) experiences, such as physical or sexual abuse, early parental loss or childhood neglect constitute an important risk factor for the appearance of psychiatric disorders in humans, such as affective disorders. Based on the fact that unreliable and poor maternal care alters behavioral responses, the group of Prof. Mansuy (Brain Institute, ETH Zürich) modeled ELS in C57Bl6 mice using unpredictable maternal separation combined with unpredictable maternal stress. Tested as adults, compared with control reared animals (CON), maternally separated animals (MSUS) exhibited depressive-like behaviors and altered response to novel and aversive environments.

Although alterations of the 5-HT_{1A} receptor densities and mRNA levels have been reported in various animal models of ELS related to parental separation, our understanding of consequences of ELS on the 5-HT_{1A} receptor system is still limited. In order to characterize the long-term effects of ELS on the serotonergic fMRI response, we applied our fMRI protocol to the ELS mouse model using MSUS. Overall, MSUS treatment induced a reduction in the serotonergic fMRI response normally observed in control animals. Thalamus, hippocampus and limbic cortical areas appeared to be the brain regions most altered by exposure to ELS. Thus, our findings seem to indicate that some brain structures may be more responsive to environmental influences and that ELS may elicit specific alterations of the functionality of the serotonergic system in the thalamus and limbic areas, which may underlie the altered behavior observed in MSUS animals in adulthood and thus provide a molecular correlate to complex traits induced by early stress.

We also observed that postnatal stress in mice can persistently affect the serotonergic transmission across generations. Indeed, alterations in serotonergic function were also seen in the offspring of the mice submitted to MSUS procedure, indicating a potential epigenetic transmission of the phenotype via the germline. This inter-generational transmission seemed to predominantly affect female mice, suggesting that our fMRI protocol may enable the detection of some interactions between genetic and environmental factors. If these neurobiological mechanisms are transposable to humans, the gender-specific transmission of the MSUS effect may reflect the higher vulnerability of women to develop stress-related disorders.

While adverse events in early life can lead to negative behaviors, positive experiences can have a beneficial effect on behavior. Among the positive environmental factors, exposure to an enriched environment (EE) has been reported to induce antidepressant-like behaviors. To further investigate the MSUS mouse model and examine whether exposure to EE may be implicated in the reversibility of observed altered behaviors by influencing the serotonergic neurotransmission, we applied our fMRI protocol to both control and MSUS mice exposed to either standard or EE housing. We then examined whether their environmental exposure influenced their respective response to the 5HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT challenge. We demonstrated that exposure to EE specifically influenced serotonergic transmission in the dorsal hippocampus. In contrast to the MSUS effect, exposure to an enriched environment

increased the serotonergic fMRI response observed in the dorsal hippocampus of control animals. As this effect counteracted the decreased response observed in MSUS animals, these findings demonstrate the potential for enhanced environmental complexity in the behavioral and functional rescue of the detrimental impact of early stress in adult animals. Yet, ambiguities in the interpretation of the results have emerged due to discrepancies between the two present studies (MSUS vs. MSEE studies), highlighting the difficulty and the fundamental importance of maintaining a stable mice physiology. Further investigations are therefore needed to confirm these conclusions.

Pharmacological fMRI can potentially reveal additional information regarding the degree of functional coupling between components of a large-scale neural system after pharmacological challenge. To improve the understanding of the interplay among brain regions following serotonergic challenge, we developed an analysis system of functional connectivity, i.e. an analysis of the relationship between signals from distinct brain regions. Thus, we characterized the 5-HT_{1A} receptor functional system neural networks by performing a cross-correlation analysis on a set of regions of interest covering brain areas expressing 5-HT_{1A} receptors and control areas. Then, to determine whether genetic and environmental influences on the 5-HT_{1A} receptor system could be detected through the investigation of its neural functional network, we examined whether we could observe changes in regional connectivity in the mouse model of ELS previously analyzed with the standard binary method, as well as in 5-HT_{1A} receptor heterozygote KO mice, proposed as the genetic mouse model of vulnerability to develop anxiety disorders. We demonstrated the feasibility of characterizing 5-HT_{1A} receptor functional networks induced by serotonergic challenge and of assessing how genetic and environmental factors influence them. At first, we showed that impairment of the 5-HT_{1A} receptor function by genetic manipulation induced alterations of functional connectivity (FC) in brain regions known to be involved in the circuitry of anxiety; namely amygdala, hippocampus, limbic cortex, hypothalamus, and various brainstem areas. Altogether, our findings confirm the validity of the 5-HT_{1A} receptor KO mice as a suitable animal model of anxiety. Furthermore, the remarkable similarities found in the anxiety brain circuitry between mice and humans hold the promise that a translation of the FC impairments observed in mice into humans is possible. If indeed transposable into humans, the FC impairment pattern we identified in heterozygote 5-HT_{1A} receptor KO mice may provide a biomarker of genetic vulnerability to the development of anxiety disorders, enabling the early and non invasive detection of patients at risk and, consequently, increase the chance of beneficial preventive or therapeutic outcomes.

When assessing the environmental influence of ELS on the 5-HT_{1A} receptor functional networks, we detected FC changes in the first and second generations of MSUS mice and MSUS treatment seemed to influence male and female animals differently. Alterations of FC induced by ELS presented coherent similarities between F1 and F2 female mice, involving structures reported to be altered by ELS such as the hippocampus, hypothalamus, thalamus and cortical areas. However, due to some ambiguous results, further analyses are required to address final conclusions.

Finally, a main limitation of fMRI methodologies is the indirect nature of the readout (neurovascular coupling), with the aim of improving the interpretation of the fMRI data in

ulterior studies, a subproject of this PhD thesis is to adapt and establish an MR-compatible EEG device for mice. In collaboration with Dr. Vyssotski (Inst. Neuroinformatics, Uni/ETH Zürich) and with the scientific contribution of Prof. Vörös (Inst. for Biomedical Engineering, ETH Zürich), we demonstrated the feasibility of establishing an electrocardiogram (EEG) setup suitable for simultaneous EEG/fMRI recordings in mice with cryoprobe at 9.4T. Electrodes consisting of thin copper wires appeared to be the optimal model among all tested, since it combined acceptable quality levels in both MR image acquisition and EEG recordings. However, the establishment of this set-up is only at the 'proof-of-concept' stage and further improvements need to be made for routine use, including application of a specially designed filtering scheme that would eliminate EEG distortions caused by the gradient switching.

In conclusion, application of our fMRI protocol and functional network analysis may provide a sensitive tool to investigate genetic and environmental influences on the serotonergic system and phenotype rodent models of stress-related diseases. However, to ensure satisfactory reliability of the readouts, considerable caution has to be taken regarding mice physiology stability and absence of environmental influences external to the scanning procedure, as these two factors may greatly interfere with the variability of the hemodynamic response observed subsequent to serotonergic challenge.

Key words: functional MRI, 5-HT_{1A} receptor, 8-OH-DPAT, WAY-100635, 5-HT_{1A} receptor KO mice, early life stress, maternal separation, enriched environment, functional connectivity, psychiatric diseases, anxiety, depression, environmental and genetic influences, neurovascular coupling, imaging techniques, MR-compatible EEG.

Résumé

Ces cinquante dernières années, le développement des techniques d'imagerie a entraîné une avancée considérable dans la caractérisation des systèmes de neurotransmission cérébrale, permettant ainsi d'apporter une preuve tangible des origines neurobiologiques de certaines maladies psychiatriques. L'existence de ligands spécifiques pour le récepteur sérotonergique de type 1A (récepteur 5-HT_{1A}) a permis de démontrer que de nombreuses pathologies psychiatriques étaient associées à des anomalies touchant ce récepteur. Cependant, la progression de notre compréhension de ces troubles est entravée par la difficulté de tester de manière quantitative et objective les troubles comportementaux humains ainsi que d'en établir la correspondance chez l'animal. Malgré le développement de nos acquis, notre compréhension des désordres psychiatriques est loin d'être complète et il reste encore très difficile d'établir précisément l'implication du récepteur 5-HT_{1A}. Ce manque de maîtrise est d'ailleurs reflété par la stagnation de l'efficacité des traitements de ces dernières décennies. Devant la prévalence des pathologies psychiatriques et de leurs lourdes conséquences, lumière doit être faite sur les mécanismes neurobiologiques qui les sous-tendent en vue de permettre un diagnostic plus précoce et d'améliorer les thérapies. Les méthodes d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) permettent de résoudre des modèles d'activité cérébrale complexes et dynamiques à d'attractives résolutions temporelles et spatiales. Avec leur implantation progressive chez les petits rongeurs, ainsi que de par leur nature non invasive, ces méthodes permettent l'établissement d'études translationnelles. Elles occupent donc une place de choix parmi les techniques d'imagerie médicale et représentent un précieux outil pour étudier l'étiologie des maladies psychiatriques via le phénotypage de modèles animaux.

Des études génétiques quantitatives ont apporté une preuve solide de l'importance des facteurs génétiques mais aussi environnementaux dans la régulation des comportements. Il apparaît d'ailleurs de manière de plus en plus évidente que l'apparition de troubles psychiatriques ne peut pas s'expliquer par l'influence d'un facteur unique mais plutôt par le produit de multiples influences, génétiques et environnementales, qui interagissent entre elles. L'objectif principal de cette thèse était donc de développer des méthodes d'IRMf, incluant des systèmes d'analyses, pour évaluer l'impact de facteurs génétiques et environnementaux sur la neurotransmission sérotonergique de la souris en vue d'une éventuelle utilisation en tant que biomarqueur de troubles psychiatriques.

Dans ce but, nous avons établi un protocole d'IRMf chez la souris ciblant le système sérotonergique. L'administration d'8-OH-DPAT, agoniste du récepteur 5-HT_{1A}, a provoqué une réduction du volume sanguin cérébral local (CBVrel) de manière dose-dépendante dans des aires cérébrales connues pour exprimer un niveau élevé de récepteurs 5-HT_{1A} (par ex. cortex préfrontal, hippocampe et noyaux amygdaliens). L'inhibition de cette réponse spécifique à certaines régions cérébrales par l'injection concomitante de WAY-100635, antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}, ou bien celle observée dans des animaux knock-out pour le récepteur 5-HT_{1A}, suggère que le récepteur 5-HT_{1A} est la cible principale de l'agoniste. Dans leur ensemble, nos

données démontrent qu'il est possible, grâce à notre protocole d'IRMf, d'établir de manière non invasive la carte des changements région-spécifiques et dose-dépendants qui touchent la transmission sérotonergique murine suite à l'administration du ligand 8-OH-DPAT, agoniste du récepteur 5-HT_{1A}.

Par la suite, nous avons démontré la sensibilité de notre protocole d'IRMf en détectant des changements fonctionnels du système sérotonergique murin induit par l'exposition à des facteurs environnementaux bénéfiques ou délétères.

Chez l'humain, les expériences de stress précoce, telles que des abus physiques ou sexuels, la perte d'un parent ou encore le traumatisme d'un abandon constituent un important facteur de risque pour l'apparition de troubles psychiatriques (par exemple, apparition de troubles affectifs) à l'âge adulte. Basée sur le fait qu'un manque de fiabilité dans les soins maternels ou la rareté de ceux-ci ont un impact négatif sur la réponse comportementale de la progéniture, l'équipe du Prof. Mansuy (Brain Institute, ETH Zürich) a modélisé le stress précoce chez des souris C57Bl6 en utilisant une séparation maternelle imprédictible associée à l'exposition de la mère, elle-aussi imprévisible, à un stress durant la phase de séparation (MSUS).

Testés à l'âge adulte et comparés au groupe d'animaux contrôles, les animaux ayant subi une séparation maternelle manifestent des comportements assimilables à certains traits de dépression humaine ainsi qu'une réponse inadaptée à la nouveauté et aux environnements aversifs. Bien que des altérations de densité en récepteurs 5-HT_{1A} et ARNm aient été reportées dans divers modèles animaux de stress précoce liés à une séparation parentale, notre compréhension de l'impact du stress précoce sur le récepteur 5-HT_{1A} est limitée. Dans le but de caractériser les effets à long-terme d'une exposition à un stress précoce sur le système sérotonergique, nous avons appliqué notre protocole d'IRMf au modèle MSUS. Dans certaines régions, le traitement MSUS semble avoir provoqué une diminution de la réponse d'IRMf sérotonergique normalement observée chez les animaux contrôles. Thalamus, hippocampe et cortex limbique apparaissent être les structures cérébrales les plus atteintes par une exposition à un stress précoce. Ainsi, nos résultats semblent indiquer que certaines régions cérébrales sont plus sensibles aux influences environnementales que d'autres et qu'une exposition à un stress précoce est susceptible d'altérer la neurotransmission sérotonergique dans le thalamus et les aires limbiques, suggérant la possibilité que ces altérations soient à la base des anomalies comportementales observées chez les animaux MSUS.

Nous avons aussi observé que chez la souris, le stress post-natal peut affecter la transmission sérotonergique d'une génération à l'autre. En effet, bien qu'elles n'aient pas expérimenté le stress précoce elles-mêmes, des altérations de la réponse sérotonergique similaires à leur ascendance ont été observées chez les souris issues de la première génération de souris, soumise quant à elle, au traitement MSUS. Ces données suggèrent l'existence d'une potentielle transmission d'un phénotype via des mécanismes épigénétiques affectant la lignée germinale. La transmission des altérations du système sérotonergique d'une génération à l'autre semble principalement concerner les souris femelles, suggérant que notre protocole soit en mesure de détecter certaines interactions se produisant entre facteurs génétiques et environnementaux. Si ces mécanismes sont transposables aux études cliniques, la spécificité de la transmission de l'effet MSUS chez les souris femelles pourrait éventuellement refléter la vulnérabilité des sujets

féminins à développer des désordres psychiatriques liés à une dysfonction du récepteur 5-HT_{1A} tels que des troubles anxieux et des états dépressifs.

Si des évènements nuisibles peuvent induire l'apparition d'anormalités comportementales, des expériences positives peuvent aussi avoir un effet bénéfique sur le comportement. Parmi les facteurs environnementaux favorables, des effets assimilables aux antidépresseurs chez l'humain ont été décrits chez l'animal suite à un enrichissement environnemental. Avec pour intention de déterminer si l'exposition à un environnement enrichi (EE) peut être impliquée dans la réversibilité des troubles comportementaux observés chez les souris MSUS via une influence de la transmission sérotonergique, nous avons appliqué notre protocole d'IRMf à deux groupes de souris, contrôles et MSUS, qui ont été hébergées soit en condition standard, soit en contact avec un EE puis nous avons examiné leurs réponses respectives suite à l'activation de leur système sérotonergique. Nos données ont montré que l'exposition à un EE influence spécifiquement la transmission sérotonergique dans l'hippocampe dorsal. Contrairement à l'effet induit par le traitement MSUS, l'exposition à un EE augmente la réponse sérotonergique observée dans l'hippocampe dorsal des animaux contrôles. Comme l'effet induit par l'EE compense la réduction de réponse obtenue chez les souris MSUS, ces résultats démontrent la potentielle implication de l'EE dans le recouvrement comportemental et fonctionnel de l'impact délétère induit par le stress précoce chez les animaux adultes. Néanmoins, des divergences entre les deux présentes études (études MSUS vs. MSEE) rendent l'interprétation de nos résultats ambiguë. Ces discordances reflètent la difficulté mais l'importance fondamentale de maintenir la physiologie des souris stable. Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour confirmer nos conclusions.

L'IRMf pharmacologique peut révéler des informations additionnelles sur le degré par lequel des composantes de systèmes neurologiques de large échelle sont fonctionnellement couplées ensemble après un challenge pharmacologique. Pour améliorer notre compréhension des interactions entre les régions cérébrales suivant administration du ligand sérotonergique, nous avons développé un système d'analyse des relations fonctionnelles présentes entre divers régions cérébrales. Ainsi, nous avons caractérisé les réseaux fonctionnels du récepteur 5-HT_{1A} en procédant à une analyse de cross-corrélation d'un ensemble de régions d'intérêt incluant des aires cérébrales exprimant le récepteur 5-HT_{1A} et des structures contrôles. Nous avons ensuite déterminé si des influences génétiques et environnementales pouvaient être détectées via une analyse des réseaux fonctionnels du récepteur 5-HT_{1A}. Nous avons donc évalué si des changements de connectivité régionale pouvaient être détectés chez les souris MSUS ainsi que chez des souris knock-out hétérozygotes pour le récepteur 5-HT_{1A}, proposées comme modèle murin de vulnérabilité à développer des troubles anxieux. Nous avons établi la faisabilité de caractériser les réseaux fonctionnels du récepteur 5-HT_{1A} en réponse à un challenge pharmacologique et d'évaluer comment les facteurs génétiques et environnementaux peuvent les influencer. Dans une première analyse, nous avons démontré que la détérioration de la fonction des récepteurs 5-HT_{1A} par manipulation génétique produit une altération de la connectivité fonctionnelle (FC) dans des régions connues pour leur contribution à la neurocircuiterie des troubles anxieux telles que l'amygdale, l'hippocampe, le cortex limbique, l'hypothalamus et le tronc cérébral. Considérés dans leur intégralité, nos résultats confirment la validité des souris KO pour le récepteur 5-HT_{1A} en tant que modèle de troubles anxieux chez la

souris. De plus, l'important degré de similarité observé dans la 'circuiterie de l'anxiété' entre la souris et l'humain promet la potentielle translation de nos données de la souris à l'humain. Dans cette affirmative, les altérations de FC que nous avons identifiées chez les souris KO pourraient potentiellement représenter un biomarqueur de vulnérabilité génétique au développement des troubles psychiatriques liés au stress et ainsi permettre, grâce à une détection plus précoce, d'améliorer les résultats thérapeutiques ou mettre en place des mesures préventives. Dans une seconde analyse, nous avons évalué l'influence du traitement MSUS sur les réseaux fonctionnels du récepteur 5-HT_{1A}. Nous avons pu observer des changements de FC dans les souris de première et seconde générations et le traitement MSUS semble avoir influencé différemment souris males et femelles. Les détériorations de FC élicitées par le stress précoce concordent avec les structures connues pour être influencées par stress précoce, telles que l'hippocampe, le thalamus and les aires corticales. Cependant, au vu de certaines ambiguïtés concernant les résultats, des analyses complémentaires sont nécessaires pour adresser des conclusions définitives.

Enfin, une limitation principale de l'IRMf réside dans la nature indirecte de la mesure de l'activité cérébrale. Pour améliorer l'interprétation des données d'IRMf dans de prochaines études, un sous-projet de cette thèse était d'établir un équipement d'électroencéphalogramme (EEG) compatible avec le scanner pour effectuer des enregistrements simultanés d'EEG/fMRI chez la souris. En collaboration avec Dr. Vyssotski (Inst. Neuroinformatics, Uni/ETH Zürich) et grâce à la contribution scientifique du Prof. Vörös (Inst. for Biomedical Engineering, ETH Zürich), nous avons démontré la faisabilité d'établir un EEG setup adapté à une cryoprobe pour exécuter des enregistrements EEG/fMRI simultanément à 9.4T. Un système constitué d'électrodes en fils de carbone (1mm de long pour un diamètre de 0.2 mm) est apparu être le modèle optimal parmi tous ceux testés et allie un niveau de qualité acceptable à la fois pour l'acquisition IRM ainsi que pour l'enregistrement EEG. Il est toutefois important de préciser que cet équipement n'est qu'à un stade de prototype et une optimisation du système est nécessaire pour un usage routinier.

Pour conclure, notre protocole d'IRMf et notre méthode d'analyse de réseaux fonctionnels représentent des outils sensibles pour examiner l'impact de facteurs génétiques et environnementaux sur la transmission sérotonergique murine et permettre ainsi de phénotyper divers modèles murins de troubles psychiatriques liés au stress. Cependant, pour assurer une fiabilité satisfaisante des mesures hémodynamiques, d'importantes précautions doivent donc être respectées pour assurer la stabilité physiologique des souris. Enfin, pour éviter une perturbation inappropriée de la transmission sérotonergique, l'exposition à tout facteur environnemental extérieur à la procédure d'imagerie doit être évitée.