



HAL
open science

Analyse de profils d'expression génique dans des modèles murins d'anxiété/dépression

Lin Xia

► **To cite this version:**

Lin Xia. Analyse de profils d'expression génique dans des modèles murins d'anxiété/dépression. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114838 . tel-00923149

HAL Id: tel-00923149

<https://theses.hal.science/tel-00923149>

Submitted on 2 Jan 2014

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

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

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOLOGIE EXPERIMENTALE ET CLINIQUE

ANNÉE 2011 – 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1176

THÈSE

Présentée

A l'Unité de Formation et de Recherche
Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry
Université Paris Sud XI

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par

Mlle Lin XIA

Titre de la thèse :

Analyse de profils d'expression génique dans des modèles murins
d'anxiété/dépression

Membres du Jury :

Mme le Dr. Cynthia **Marie-Claire** (Rapporteur)
Mme le Pr. Catherine **Belzung** (Rapporteur)
Mr le Pr. Michel **Plotkine** (Examinateur)
Mr le Pr. Alain **Gardier** (Directeur de thèse)
Mr le Dr. Jean-Philippe **Guilloux** (Examinateur)

Remerciements

Les travaux qui sont présentés dans cette thèse ont été réalisés au laboratoire de Neuropharmacologie EA3544 « Sérotonine & Dépression » de la Faculté de Pharmacie de Paris XI, sous la direction du Professeur **Alain GARDIER** et du Dr **Jean-Philippe GUILLOUX**.

Aux Rapporteurs & Membres du Jury:

Je remercie Madame le Professeur **Catherine BELZUNG**, Directrice de l'Unité INSERM U-930 FRE CNRS 2448 (Tours, France), et Madame la Docteur **Cynthia MARIE-CLAIRE**, chercheur à l'équipe INSERM U705-CNRS UMR 8206 (l'Université Paris-Descartes, Paris, France) qui ont accepté d'évaluer et de juger ce manuscrit en qualité de rapporteur et experts des travaux Neuropsychopharmacologiques réalisés chez le Rongeur.

Je remercie également, Monsieur le Professeur **Michel PLOTKINE**, Professeur à l'Université Paris-Descartes, et Directeur du Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale (EA 4475, Paris, France), qui me fait l'honneur de juger mon travail de doctorante en tant que spécialiste de la Neuropharmacologie expérimentale et clinique.

Publications

Article 1

Guilloux, J. P., D. David, **L. Xia**, H. T. Nguyen, Q. Rainer, B. Guiard, C. Reperant, T. Deltheil, M. Toth, R. Hen and A. M. Gardier (2011). Characterization of 5-HT1A/1B-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology*. 61(3):478-488.

Article 2

Xia L, Deloménie C, David I, Rainer Q, Marouard M, Delacroix H, David D, Gardier AM, Guilloux JP (2012). Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors disruption in mice. *Neurosci Lett. *Accepté pour publication**. [Epub ahead of print]

Article 3

Rainer, Q., **L. Xia**, J. P. Guilloux, C. Gabriel, E. Mocaer, R. Hen, E. Enhamre, A. M. Gardier and D. J. David (2011). Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol: *Accepté pour publication**. [Epub ahead of print]

Article 4 (en préparation)

Xia L, Chang L.C., Rainer Q., Deloménie C., Gabriel C., Mocaër E., David D.J., Gardier A.M., Sibille E., Guilloux J.P. Chronic Agomelatine reverses corticolimbic transcriptome changes induced by corticosterone in a neuroendocrine model of depression. (*En préparation*).

Communications par Affiche

1. **L Xia**, Jp Guilloux, C Delomenie, Am Gardier. Gene Expression Profile In The Ventral Hippocampus Of 5-Ht_{1a/1b} Double Knockout Mice, An Animal Model Of Anxiety. **Journée De La Recherché-Pharmacie Et Médecine-Université De Paris-Sud 11, 2009**
2. **L. Xia**, JP Guilloux, C. Delomenie, S. Leman, S. Imbeaud, H. Delacroix, D.J. David, A.M.Gardier, Gene Expression Profile In The Ventral Hippocampus Of 5-Ht_{1a/1b} Double Knockout Mice, An Animal Model Of Anxiety. **Neuroscience 2009, Sfn's 39th Annual Meeting**, Oct. 17-21, 2009 In Chicago, Illinois, Usa
3. Guiard Bp, Nguyen Th, **Lin Xia**, Quentin R, David Dj, Guilloux Jp, Gardier Am. Evidence Of The Involvement Of 5-Ht₂ Receptor On Ssri-Induced Inhibition Of Dorsal Raphe 5-Ht Neurons Firing Rate In Double 5-Ht_{1a/1b} Receptor Knockout Mice. **International College Of Neuropsychopharmacology**, June 6-10, 2010 In Hong-Kong, China
4. Rainer Q, Gabriel C, Mocaer E, **Xia L**, Hen R, Enhamre E, Guilloux Jp, Gardier Am, David Dj (2010). Beneficial Effects Of Chronic Treatment With Agomelatine On The Anxiety- And Depression-Like State Induced By Corticosterone In C57bl/6ntac Mice. **18th Annual Meeting Europ. Cong. Of Psych** 2010, Munich.
5. Rainer Q, Guiard Bp, **Xia L**, David Dj, Gardier Am, Guilloux Jp. Impact Of Serotonin 1a/1b Receptor Null Mutation On Physiology And Behavior Associated With Serotonergic Pathway Function. **10th Annual Meeting Serotonin Club** 2010, Montréal.
6. Rainer Q, Gabriel C, Mocaer E, **Xia L**, Hen R, Enhamre E, Guilloux Jp, Gardier Am, David Dj. Beneficial Effects Of Chronic Treatment With Agomelatine (S20098) On Behaviour And Adult Hippocampal Neurogenesis In A New Model Of Anxiety/Depression In Mice. **40th Annual Meeting Soc. Neurosci** 2010, San Diego.
7. J.-P. Guilloux, **L. Xia**, Q. Rainer, C. Deloménie, L.-C. Chan, C. Gabriel, E. Mocaer⁴, D. J. P. David, E. L. Sibille, A. M. Gardier¹;Chronic Agomelatine Reverses Corticolimbic Transcriptome Changes Induced By Corticosterone In A Neuroendocrine Model Of Depression. **Neuroscience 2012, Sfn's 42th Annual Meeting**, Oct. 13-17, 2010 In New Orleans, Louisiane, Usa

Résumé

Les troubles de l'humeur sont un problème de santé publique touchant 10 à 20% de la population mondiale. Mais, les mécanismes de la physiopathologie des troubles anxio-dépressifs ne sont pas encore clairement établis. Les modèles animaux sont un moyen important de simuler les symptômes humains et de bien connaître les mécanismes moléculaires du développement et de l'anatomie du cerveau, et du comportement. Actuellement, la majorité des études ayant pour but d'étudier l'efficacité (comportement) ou le mécanisme d'action (neurochimie) des traitements anxiolytiques/antidépresseurs a été réalisée chez des animaux « sains », non pathologiques. Or, chez l'Homme, on sait qu'un traitement antidépresseur chronique n'a pas d'effets chez l'individu sain.

Ces dernières années, notre équipe a créé deux modèles de souris de la pathologie anxio-dépressive par différentes méthodes : Les souris privées des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B de la sérotonine (souris « *knock-out* », KO 5-HT1A/1B) et les souris stressées ayant reçu une exposition chronique de corticostérone exogène (modèle CORT). Ces deux modèles présentent un phénotype hyper-anxieux dans plusieurs tests comportementaux. Mon projet d'études a eu pour objectifs de caractériser le phénotype moléculaire des troubles de l'humeur chez ces souris anxio-dépressives et de rechercher les effets des antidépresseurs sur le transcriptome à l'aide de la technique des puces à ADN.

Chez les souris KO 5-HT1A/1B, les changements génomiques dans l'hippocampe ventral (vHi) sont fortement associés aux fonctions et au développement du Système Nerveux Central. Ces changements impliquent surtout sur la neurogenèse adulte avec une diminution de la survie cellulaire observée dans l'hippocampe adulte.

Chez les souris du modèle CORT, on observe des dysfonctions de comportements et le déficit en neurogenèse qui sont corrigées par les traitements antidépresseurs ; les effets transcriptomiques chez les souris prétraitées à la corticostérone montrent une spécificité régionale : aucun gène n'est modifié en commun dans les 4 régions cérébrales cortico-limbiques étudiées (hippocampe ventral et dorsal,

amygdale et cortex cingulaire (CC). Ensuite, Le traitement chronique d'agomélatine, un nouvel antidépresseur, a inversé la plupart des changements génomiques induits par la corticostérone dans l'amygdale, l'hippocampe ventral et dorsal, mais sans effets dans le CC. En comparant les effets transcriptomiques de l'agomélatine entre les 4 régions cérébrales et entre les différentes souris (souris CORT et souris normales non-stressées), nous observons que le traitement d'agomélatine a aussi prévenu les effets transcriptomiques spécifiques régionaux. La comparaison de l'expression des gènes affectés par l'agomélatine chez les souris CORT par rapport aux souris non-stressées montre que les changements génomiques présente une forte identité dans le CC et de faibles liaisons d'expression génique entre les autres régions. Enfin, les traitements de l'agomélatine et de la fluoxétine ont prévenu des effets génomiques similaires chez les souris du modèle CORT.

En résumé, nos études ont montré que les états anxio-dépressifs provoquent des modifications dans plusieurs tests comportementaux et des changements transcriptomiques dans différentes régions cérébrales du circuit cortico-limbique. Les traitements antidépresseurs ont non seulement inversé ces changements de phénotype et de génotype, mais aussi induit des transcriptions génomiques régionaux spécifiques.

1	INTRODUCTION	10
1.1	LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS :	11
1.1.1	CAUSES DES TROUBLES ANXIEUX DEPRESSIFS MIXTES	13
1.1.1	LA DEPRESSION MAJEURE	16
1.1.2	LES TROUBLES ANXIEUX	28
1.2	LES REGIONS CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS	33
1.2.1	L'HIPPOCAMPE	33
1.2.2	AMYGDALÉ	39
1.2.3	CORTEX CINGULAIRE	41
1.3	LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS	43
1.3.1	LE METABOLISME DE LA SEROTONINE	44
1.3.2	LES NEURONES SEROTONINERGIQUES	47
1.3.3	LES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES	48
1.3.4	ROLES DES RECEPTEURS 5-HT _{1A/1B} DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS	54
1.4	L'AXE HPA DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS	65
1.4.1	L'AXE HPA ET LE STRESS	65
1.4.2	L'AXE HPA DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS	68
1.5	LES ANTIDEPRESSEURS	71
1.5.1	LES ISRS	71
1.5.2	L'AGOMÉLATINE	75
1.6	LES MODELES ANIMAUX	82
1.6.1	LES SOURIS KO 5-HT _{1A/1B}	83
1.6.2	LE MODELE DE SOURIS CORT	84
1.7	LA TECHNIQUE DE MICROARRAYS	87
1.7.1	BREVS RAPPELS TECHNIQUES	87
1.7.2	LES MICROARRAYS DANS L'ETUDE DES TROUBLES ANXIEUX	92
2	MATERIELS ET METHODES	97
2.1	MODELES ANIMAUX UTILISES	97
2.1.1	LES SOURIS 5-HT _{1A/1B} ^{-/-}	97
2.1.2	LES SOURIS DU MODELE CORT	99
2.2	MICROCHIRURGIE : PRELEVEMENT DE STRUCTURES CEREBRALES	101
2.2.1	LE CORTEX CINGULAIRE:	102

2.2.2	L'AMYGDALE :	103
2.2.3	SOUS-REGIONS DE L'HIPPOCAMPE:	104
2.3	PREPARATION DES ARN TOTAUX	105
2.3.1	EXTRACTION DES ARN CEREBRAUX	105
2.3.2	QUANTIFICATION ET CONTROLE QUALITE DES ARN	106
2.4	EXPERIENCES SUR PUCES A ADN	107
2.4.1	PLAN D'EXPERIENCE	107
2.4.2	LAMES	108
2.4.3	PROCEDURE EXPERIMENTALE	112
2.4.4	TRAITEMENT DES DONNEES	116
2.5	RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	121
2.5.1	TRANSCRIPTION INVERSE	122
2.5.2	CHOIX DES AMORCES DE PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	122
2.5.3	PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	123
2.5.4	TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS	125
2.6	IMMUNOHISTOCHEMIE	125
2.6.1	MARQUAGE AU BRDU POUR L'ETUDE DE LA SURVIVE NEURONAL.	126
2.6.2	ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE : MARQUAGE AU KI67	127
3	RESULTATS EXPERIMENTAUX	128
<hr/>		
ARTICLE 1		129
ARTICLE 2		148
ARTICLE 3		166
ARTICLE 4 (EN PREPARATION)		188
4	DISCUSSION GENERALE	215
<hr/>		
4.1	LES EFFETS GENOMIQUES D'UNE DELETION DES RECEPTEURS 5-HT _{1A} ET 5-HT _{1B} DANS HIPPOCAMPE VENTRAL	216
4.2	UN TRAITEMENT CHRONIQUE DE L'AGOMELATINE AFFECTE LES CHANGEMENTS DE LA TRANSCRIPTION CORTICOLIMBIQUE INDUITES PAR LA CORTICOSTERONE DANS UN MODELE DE LA DEPRESSION (SOURIS CORT) , (ARTICLE 4)	217
4.3	COMPARAISON DES CHANGEMENTS TRANSCRIPTOMIQUES ENTRE CES DEUX MODELES DES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS.	220
5	REFERENCES	224
<hr/>		

Introduction

De nos jours, le développement économique et le renforcement de la concurrence sociale qu'il entraîne, soumet l'être humain à un stress croissant dans sa vie personnelle et professionnelle. En particulier, la crise d'économie qui sévit depuis 2007 et accroît le chômage et le nombre de personnes vivant dans la pauvreté, avec les conflits régionaux et les catastrophes naturelles fréquents ces dernières années, ont augmenté le risque d'apparition de maladies mentales dans le monde (L'Organisation mondiale de la santé (OMS) en Europe, 2011). Or, il n'y a pas de santé sans santé mentale (Prince et al., 2007). Une maladie mentale ou un trouble mental est une perturbation de la réflexion, de l'humeur ou du comportemental généralement associé à une détresse subjective ou les interférences des fonctions personnelles, et qui n'est pas une partie du développement normal des croyances culturelles. La Classification Internationale des Maladies (CIM-10ème édition) établie en 1992 par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) ainsi que le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (« *Diagnostic and Statistical Manual* » dans sa version modifiée DSM IV TR) cataloguent les troubles mentaux selon les symptômes physiologiques et psychologiques, leur intensité et leur durée. Parmi eux, l'anxiété et la dépression sont les deux maladies mentales les plus fréquentes (Tableau 1).

Villes	Dépression (%)	Anxiété généralisée (%)	Dépendance alcoolique (%)	Ensemble des troubles mentaux (d'après le CIDI ^a) (%)
Ankara (Turquie)	11,6	0,9	1,0	16,4
Athènes (Grèce)	6,4	14,9	1,0	19,2
Bangalore (Inde)	9,1	8,5	1,4	22,4
Berlin (Allemagne)	6,1	9,0	5,3	18,3
Groningue (Pays-Bas)	15,9	6,4	3,4	23,9
Ibadan (Nigéria)	4,2	2,9	0,4	9,5
Mainz (Allemagne)	11,2	7,9	7,2	23,6
Manchester (Royaume-Uni)	16,9	7,1	2,2	24,8
Nagasaki (Japon)	2,6	5,0	3,7	9,4
Paris (France)	13,7	11,9	4,3	26,3
Rio de Janeiro (Brésil)	15,8	22,6	4,1	35,5
Santiago (Chili)	29,5	18,7	2,5	52,5
Seattle (Etats-Unis d'Amérique)	6,3	2,1	1,5	11,9
Shanghai (Chine)	4,0	1,9	1,1	7,3
Vérone (Italie)	4,7	3,7	0,5	9,8
Total	10,4	7,9	2,7	24,0

^a CIDI : Questionnaire composite international pour le diagnostic.

Source : Goldberg DP, Lecrubier Y (1995). Form and frequency of mental disorders across centres. Dans: Östün TB, Sartorius N, *Mental illness in general health care: an international study*. Chichester, John Wiley & Sons [pour le compte de l'OMS] : 323-334.

Tableau 1:Prévalence des troubles psychiatriques majeurs dans les structures de soins de santé primaires (OMS, 2001)

1.1 Les troubles anxio-dépressifs :

L'existence humaine est ponctuée de toutes sortes d'émotions qui peuvent la rendre momentanément plus facile ou plus difficile, et influencent l'humeur. Chacun d'entre nous est amené à éprouver des sentiments d'appréhension, d'inquiétude ou des sensations d'inconfort physique ou mental. L'homme a accès à une vaste gamme d'émotions et d'affects pour les exprimer. Si des difficultés énormes doivent être affrontées, ou en cas de stress prolongé ou de peur extrême, l'expression émotionnelle peut être déviante ou anormale. Les troubles de l'anxiété et la dépression se caractérisent par une expression anormale des émotions. Ils peuvent affecter tout individu (enfant, adolescent, adulte, vieillard, personne handicapée...) dans tout pays et toute société, quels que soient son appartenance ethnique, son métier ou son éducation. La maladie peut se faire sentir à des degrés divers, de léger à grave, durer de quelques semaines ou la vie entière, et guérir avec ou sans traitement, ou bien résister aux traitements médicamenteux. Bien que la fréquence des troubles anxieux et dépressifs retrouvée dans les consultations des médecins

généralistes soit élevée -proche de 20%- (Wong and Licinio 2001; Demertzis and Craske 2006) plusieurs études ont montré que leur détection et leur traitement sont incomplets (Pearson et al., 1999, Weisberg et al., 2007) puisque 30% à 50% des patients ne sont pas détectés (Simon et VonKorff 1995 ; Pignone et al., 2002). L'anxiété et la dépression sont deux troubles qu'il n'est pas toujours facile de différencier. En fait, l'OMS a indiqué que la dépression et l'anxiété ont été une co-occurrence courante (Sartorius et al., 1996). Puisque ces troubles se conjuguent chez la moitié environ de tous les sujets concernés (Zimmerman et al., 2000). Et la co-morbidité est une caractéristique fondamentale des troubles anxieux et de la dépression, et n'est pas confiné à certains troubles comme les troubles de l'anxiété généralisée. De plus, cette co-morbidité présente une augmentation âge-dépendante chez les patients jeunes (Wittchen et al., 2003). Cependant chez les patients déprimés avec les symptômes anxieux, leur trouble dépressif est plus graves avec plus d'épisodes, plus de risque de suicide et une réponse plus mauvaise au traitement (Brown et al., 2001). Des données récentes ont prouvé qu'il y a eu une prévalence plus forte de la complication des troubles anxieux et dépressives chez les patients âgées déprimées (Beekman et al. 2000, Lenze et al., 2000) et chez les femmes déprimées (Li et al., 2012). Les troubles n'amènent pas seulement la déperdition de la santé et sont équivalents à ceux d'autres maladies chroniques. L'anxiété et la dépression déclenchent une cascade de modifications des fonctions endocriniennes et immunitaires et accroissent la prédisposition à toute une série de maladies physiques (rapport oms, 2001). Des recherches récentes ont montré que le traitement de l'anxiété et de la dépression chez les diabétiques (Lustman et al. 1995, 2000) et les survivants du cancer (Rajandram et al., 2011) a entraîné une amélioration de leur état mental et physique et augmente la qualité de vie de patients.

La 10ème édition de la CIM-10 de l'OMS (1992) a décrit pour la première fois le diagnostic des troubles anxio-dépressives mixtes qui est défini comme une combinaison des symptômes d'anxiété et de dépression, associée avec des symptômes somatiques. Cependant, la CIM-10 ne donne pas les détails des critères diagnostiques (Means-Christensen et al., 2006). Heureusement, dans la section de « *Criteria Sets and Axes Provided for Further Study* », le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (*Diagnostic and Statistical Manual, DSM-IV*,

American Psychiatric Association, 1994) propose les critères des troubles anxio-dépressives décrits en Tableau 2 (Means-Christensen et al., 2006).

1.1.1 Causes des troubles anxieux dépressifs mixtes

Les troubles anxio-dépressifs mixtes peuvent s'expliquer par différentes causes. Tout d'abord, un facteur génétique contribuant à l'internalisation des troubles, à la fois dans la dépression majeure (MDD), les troubles de l'anxiété généralisée (GAD) et les phobies, a été identifié et peut expliquer partiellement l'anxiété et la dépression rencontrées chez des jumeaux (Kendler et al., 1996, 2003). Il est clair qu'une origine génétique commune est une explication partielle, car certains facteurs génétiques particuliers ont pu être reliés à l'anxiété seule ou à la dépression (Kendler et al., 2003). Ensuite, les facteurs environnementaux jouent aussi un rôle important dans l'apparition et le maintien de ces pathologies. En effet, il a été montré qu'un faible statut socio-économique dans l'enfance ou une période de chômage à l'âge adulte permet de séparer les patients avec MDD-GAD mixte des patients déprimés seul (Cerdá et al., 2010). De plus, une recherche clinique a montré qu'il existe des différences de caractéristiques cliniques entre les patients dépressifs en fonction des différents troubles de l'anxiété (Li et al., 2012).

Récemment, des chercheurs ont montré que des traumatismes crâniocérébraux (TCC) tels qu'un coup porté sur la tête, sont aussi une cause importante de ces deux troubles (Schönberger, 2011). Selon ces travaux, 6 mois après le traumatisme crânien, 19% et 26 % des victimes étaient atteintes respectivement de dépression et/ou d'un trouble anxieux ; parmi ces patients, 11 % présentaient des troubles anxieux-dépressifs. (Schönberger, 2011).

A Humeur dysphorique persistante ou récurrente durant au moins d'un mois.

B. Humeur dysphorique est accompagnée par au moins de 4 des symptômes suivantes durant au moins d'un mois.

(1) difficulté à se concentrer ou trous de mémoire

(2) des troubles du sommeil (Insomnie ou difficulté à rester endormi, sommeil agité ou insatisfaisant)

(3) fatigue ou une baisse de l'énergie

(4) irritabilité

(5) soucis

(6) être facilement ému aux larmes

(7) hypervigilance

(8) anticiper le pire

(9) désespoir

(10) une diminution de l'estime de soi

C. les symptômes causent une détresse clinique significativement ou dépréciation dans les domaines social, professionnel, ou les autres domaines importantes du fonctionnement.

D. les symptômes ne sont pas dus aux effets physiologiques direct d'une substance (e.g., l'abus de drogue, de médicament) ou une condition médical généralement.

E. Tous ci-dessous:

(1) critères n'ont jamais été associés à Episode Dépressif Majeur Trouble dysthymique, trouble Panique, ou Trouble de l'anxiété généralisée

(2) critères ne sont pas actuellement associés aux autres troubles de l'anxiété ou de l'humeur (y compris un trouble de l'anxiété ou de l'humeur en rémission partielle)

(3) les symptômes ne sont pas expliqués mieux par les autres troubles mentaux

Tableau 2: DSM-IV critères des Troubles Anxieux-Dépressifs. (American Psychiatric Association, 1994).

Dans le cerveau, les neurotransmetteurs jouent un rôle important dans la communication entre les cellules ou les neurones cérébraux. Les neurotransmetteurs monoaminergiques (la sérotonine, la dopamine, la noradrénaline) peuvent régir les fonctions cérébrales, par exemple, les émotions, les mouvements, les pensées, les fonctions cognitives, etc. Dans les troubles anxieux et la dépression, l'équilibre entre ces différents neurotransmetteurs serait perturbé (Delgado et al., 1990 ; Belmaker et Agam, 2008). Plus spécifiquement, la sérotonine jouerait un rôle prépondérant dans le contrôle et la régulation des troubles de l'humeur tels que l'anxiété ou la dépression (Gingrich et Hen, 2001). En clinique, on observe d'ailleurs que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) qui possèdent un effet antidépresseur et anxiolytique, sont des molécules de choix pour le traitement des épisodes dépressifs ou de l'anxiété généralisée (Ball et al., 2005, Stocchi et al., 2003).

Bien que la co-morbidité des troubles anxieux et dépressives soit assez élevée, qu'ils présentent quelques symptômes cliniques et des traitements communs, leurs étiologies sont différentes: les facteurs tels que la personnalité des sujets, les terrains génétiques et le facteur biologique sont différents, et les diagnostics cliniques également. Le traitement des troubles anxieux dépressifs est plus compliqué et difficile que le traitement de la dépression seule ou du trouble de l'anxiété seul (Brown et al., 2001). Enfin, il faut garder à l'esprit qu'une nouvelle catégorisation des troubles anxio-dépressifs mixtes est à l'étude dans les éditions futurs de DSM (Gerson et al., 2004 ; Kupfer et al., 2012).

1.1.1 La dépression majeure

Les troubles dépressifs sont un enjeu de santé publique majeur et soulèvent de nombreuses questions de société. Le rapport de l'OMS (2001) indique que la dépression majeure est aujourd'hui la première cause d'incapacité avec presque 12% du total de patients ayant une maladie mentale et figure au quatrième rang des principales causes de morbidité. L'OMS évalue qu'en l'an 2020, la dépression deviendra la deuxième cause en nombre d'années d'incapacité dans le monde, après les maladies cardio-vasculaires ischémiques, et dans les pays développés, elle viendra en tête des causes de morbidité.

1.1.1.1 Les symptômes de la dépression

Selon les critères américains du DSM-IV, la dépression se manifeste par

1. une tristesse de l'humeur,
2. une perte d'intérêt pour toute activité y compris celles qui procurent du plaisir habituellement
3. une sensation de fatigue ou une baisse de l'énergie.
4. les troubles de la concentration ou du processus de prise de décision,
5. une diminution de l'estime de soi et de la confiance en soi,
6. une culpabilité injustifiée,
7. des idées de mort et de suicide,
8. des troubles du sommeil et une perte d'appétit,
9. une prise ou une perte de 5% ou plus du poids habituel en un mois.

Les états dépressifs sont courants, surtout après une épreuve douloureuse, mais on ne diagnostique un trouble dépressif que si une personne présente au moins cinq des neuf symptômes précédents et au moins l'un des deux critères doit être présent : humeur triste ou anhédonie pour une durée d'au moins deux semaines, la plupart du temps, entraînant un changement dans le mode de fonctionnement habituel. La dépression peut aussi s'accompagner de symptômes somatiques. La dépression a différents degrés de gravité, qui vont de léger à grave (Figure 1). Le risque évolutif le plus grave de cette pathologie est le suicide. En France, en 2010, la

dépression est la première cause de suicide : près de 70 % des personnes qui décèdent par suicide souffraient d'une dépression. De ce fait, le diagnostic de la dépression demeure à l'appréciation des médecins et des psychiatres. L'utilisation des échelles de Hamilton (Hamilton, 1960) ou de Montgomery et Asberg (Guelfi, 1993; Montgomery et Asberg, 1979) permet d'affiner l'évaluation de l'intensité de la dépression majeure chez un patient. L'échelle d'Hamilton est à ce jour la plus couramment utilisée (Guelfi, 1993). Cette échelle comporte 17 ou 21 items selon les versions. Plus le score est élevé, plus la sévérité de la dépression est importante. En effet, un score compris entre 10 et 13 caractérise des symptômes dépressifs légers, alors qu'un score supérieur à 18 indique des symptômes dépressifs modérés à sévères.

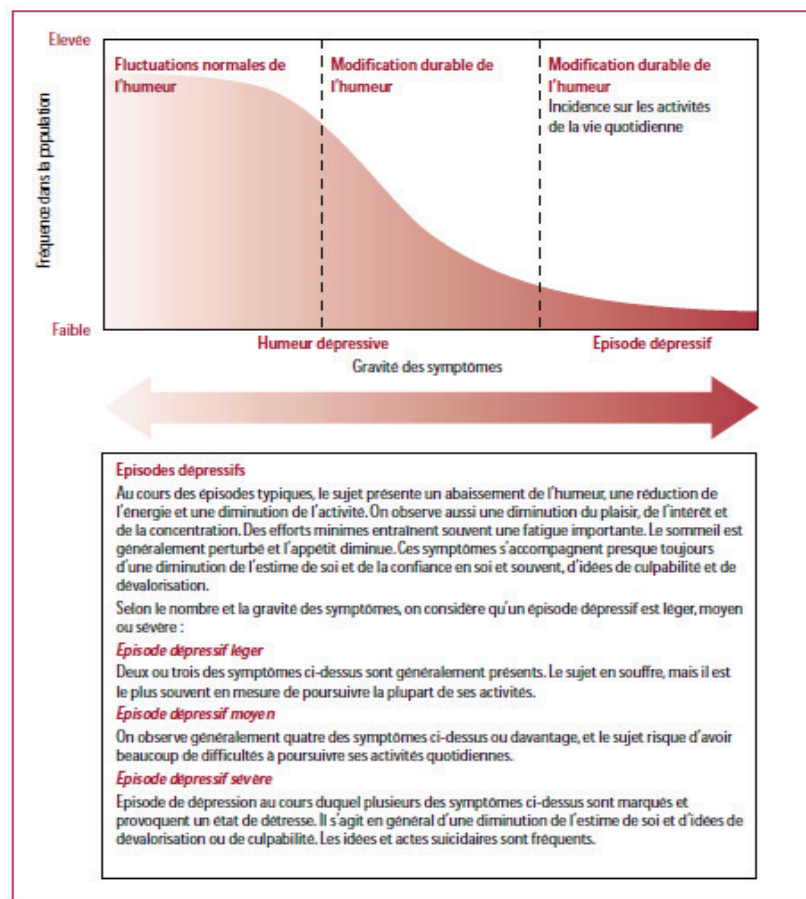


Figure 1: Continuum des symptômes dépressifs dans la population. (D'après un rapport de l'OMS, 2001)

1.1.1.2 Prévalence de la dépression

La dépression est une cause majeure de morbidité à travers le monde (Figure 3). En France, chaque année il y a 3 millions de personnes âgés de 15 à 75 ans atteintes d'une des formes de cette pathologie, c'est-à-dire que 8 % de la population est dépressive (Leroux et Morin, 2006). La dépression majeure est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes. Elle affecte entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 28% des femmes (Hamilton, 1960; Kessler, 2003; Kessler et al., 1994). Cependant, quelques données ont montré que le taux de suicide ou d'idées suicidaires chez les hommes dépressifs sont plus élevés que chez les femmes dépressives (Mackenzie et al., 2011).

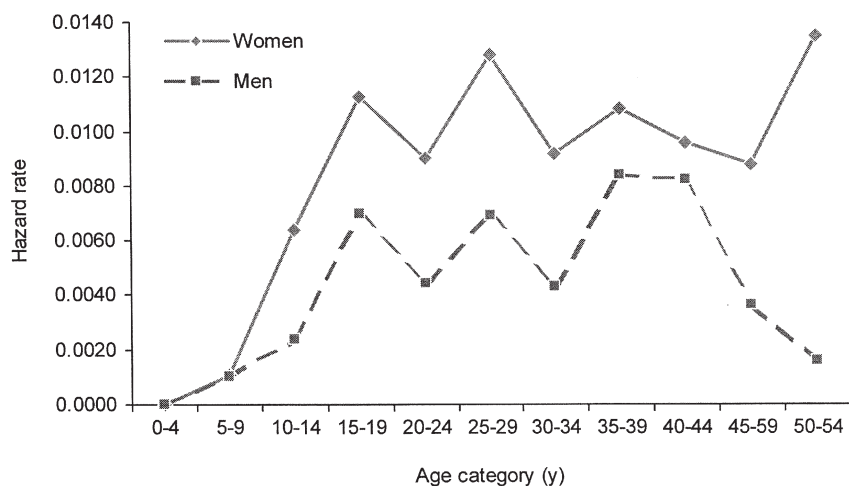


Figure 2: Risques de survenue de troubles dépressifs majeurs selon l'âge et le sexe (N° 8098) (Données de Kessler RC et al., 1993)

La dépression peut survenir à tout moment de l'existence, mais son incidence est maximum dans les classes d'âges moyens (OMS, 2001). Les individus souffriraient de leur premier épisode dépressif entre 30 et 40 ans, avec un second pic moins intense entre 50 et 60 ans (Eaton et al., 1997). Chez les personnes âgées, la dépression coexiste souvent avec les troubles physiques ou les maladies chroniques, par exemple le diabète, la maladie cardio-vasculaire ou l'arthrite (Drayer et al., 2005 ; Mueller et al., 2004). D'ailleurs, chez les personnes âgées, les taux de rechute de la dépression (Licht-Strunk et al., 2007 ; Mitchell et al., 2005) et la comorbidité avec des dysfonctions cognitives est plus élevée que chez les individus jeunes (Garcia et al., 2011). Toutefois, on prend de plus en plus conscience du problème chez les adolescents et les jeunes adultes (Lewinsohn et al., 1993). Aux

États-Unis, le nombre d'étudiants diagnostiqués avec la dépression a augmenté de 10% en 2000 à 18% en 2008 (Mackenzie et al., 2011)

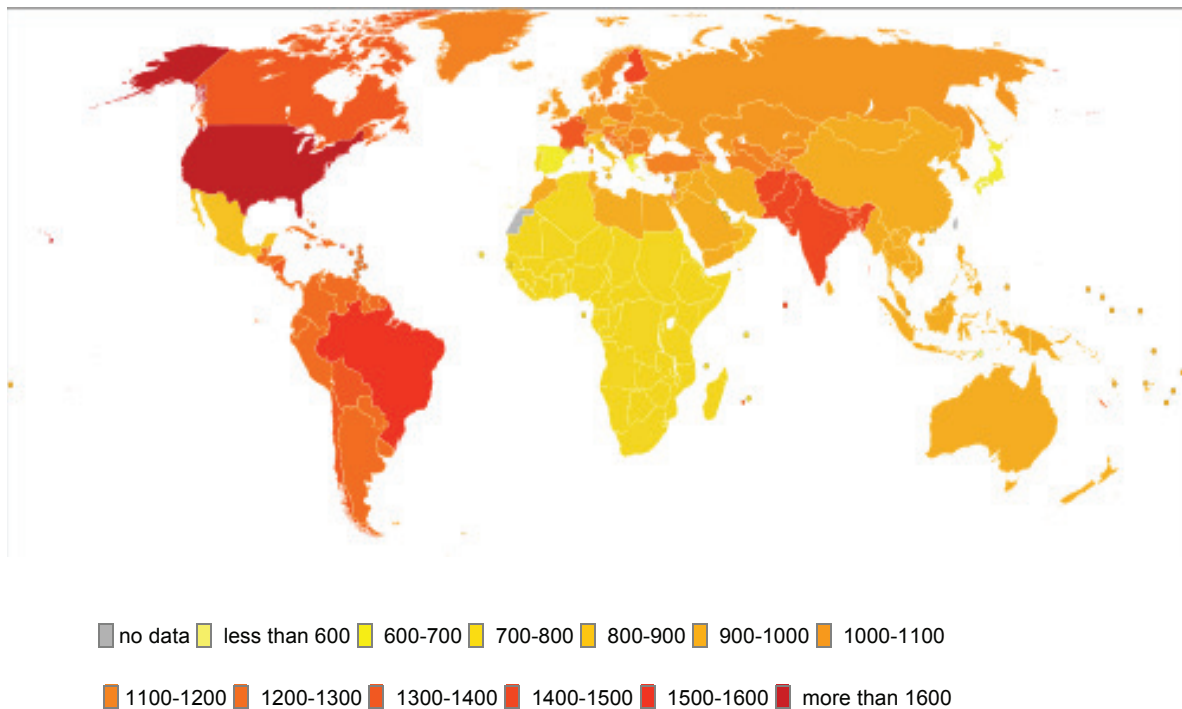


Figure 3: Espérance de vie corrigée de l'incapacité concernant les troubles dépressifs sur 100 000 habitants en 2002 (source OMS).

1.1.1.3 Hypothèse de la dépression

Plusieurs hypothèses concernant la physiopathologie de la dépression ont été proposées, dont trois majeures décrites ci-dessous qui ne sont pas exclusives. Je ne rappellerai que brièvement les principaux éléments qui constituent ces hypothèses car il existe de très nombreuses ouvrages et revues françaises ou anglo-saxonnes qui les décrivent en détails (Ex : « *Sérotonine, Aspects biologiques et cliniques* », Spreux-Varoquaux O., Médecine Sciences, Edition Lavoisier, 2012).

1.1.1.3.1 Altérations des systèmes monoaminergiques

Parmi les neurotransmetteurs monoaminergiques qui régissent les fonctions de cerveau, la sérotonine (*5-hydroxy-tryptamine* ou 5-HT) joue un double rôle d'hormone et de neuromédiateur du système nerveux central (SNC). L'hypothèse monoaminergique de la dépression (Julius Axelrod, 1970) découle d'une étude

clinique qui a montré que dans un groupe de patients déprimés en rémission mais toujours sous traitement antidépresseur, une déplétion alimentaire en tryptophane amenait à un retour des symptômes dépressifs, qui serait dû à une diminution de la synthèse de sérotonine dans le SNC (Delgado et al., 1990). Depuis lors, de faibles concentrations en 5-HT et son métabolite majeur, le 5-HIAA, ont été retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien de patients déprimés suicidés (Beskow et al., 1976; Bourne et al., 1968).

Les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation des neurotransmetteurs ont également été une des pistes explorées. En effet, la diminution de l'activité de la tryptophane hydroxylase de type 2 (TPH2) observée chez des patients dépressifs est corrélée à une diminution de la synthèse, et donc de la concentration intracellulaire, de 5-HT (Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2005). En outre, une étude par tomographie par émission de positrons utilisant un ligand de la monoamine oxydase de type A (MAO A), a révélé une augmentation de l'activité de cette enzyme chez les patients déprimés (Meyer et al., 2006). Historiquement, l'isoniazide, utilisé comme antituberculeux, a montré des propriétés antidépressives, conduisant au développement d'une classe d'antidépresseurs, les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO).

Les altérations des systèmes monoaminergiques dans la dépression majeure se répercutent également sur le système des seconds messagers, provoquant des altérations sur le phosphatidylinositol, l'AMP, l'inositol ou du facteur de transcription CREB (Blendy, 2006; Coupland et al., 2005; Shimon et al., 1997; Valdizan et al., 2003) (Figure 4).

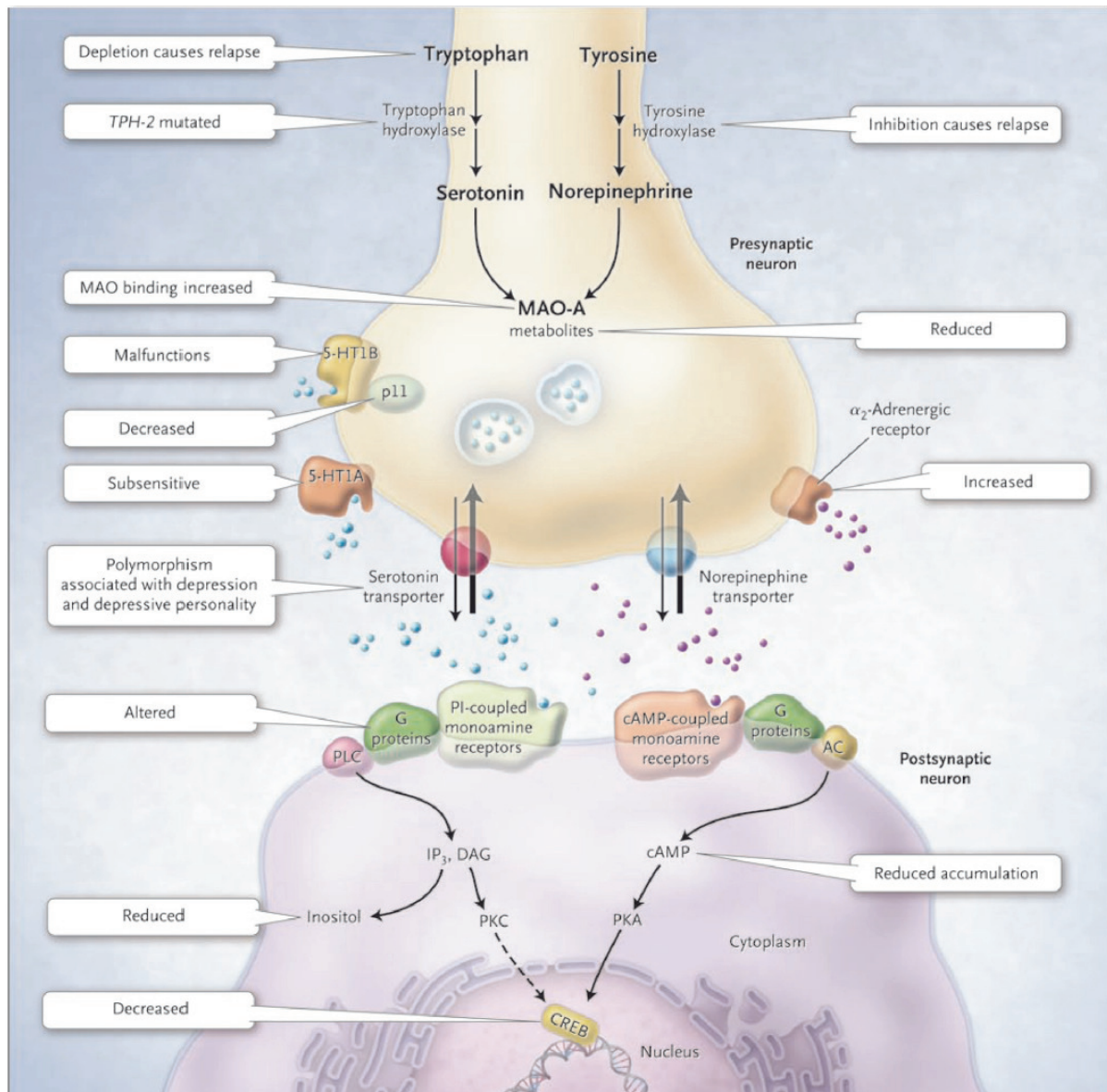


Figure 4: L'hypothèse monoaminergiques de la dépression.

Cette hypothèse postule un déficit cérébral de sérotonine et/ou de noradrénaline, provoquant des altérations de la synthèse, de la dégradation, de la fonctionnalité des récepteurs et des seconds messagers. A gauche de la synapse, les modifications du système sérotoninergique pendant un épisode dépressif. A droite, le système noradrénergique. D'après (Belmaker et Agam, 2008).

1.1.1.3.2 Dysfonctionnement de la réponse de l'axe HPA

Plus récemment, de nouvelles hypothèses permettant de rendre compte de l'étiopathologie et la pathophysiologie de la dépression ont été proposées, en particulier l'hypothèse de la dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. L'axe hypothalamo-hypophyso-adrénocorticotrope (HPA) reliant un stress à l'activation de l'hypothalamus, de l'hypophyse et des glandes corticosurrénales (Vetulani et Nalepa, 2000). Chez l'Homme, l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) est sous le contrôle stimulateur de la vasopressine et la corticolibérine (CRF : *Corticotropin-Releasing Factor*), et stimule la production de cortisol. Inversement, la production de cortisol freine grâce à un rétrocontrôle négatif, la production de CRF et d'ACTH. Chez certains patients déprimés, il existe une production accrue de cortisol (hypercortisolémie chez l'Homme, et hypercorticostéronémie chez les Rongeurs), incapable de freiner en retour la production de CRF et d'ACTH (Nemeroff, 1998 ; Sheline, 2000). Certaines études montrent d'ailleurs des concentrations élevées de CRF dans le LCR de patients déprimés, (Banki et al., 1987; Nemeroff, 1998).

1.1.1.3.3 Altérations de la plasticité neuronale

Depuis une décennie environ, une grande partie des hypothèses expliquant la physiopathologie de la dépression décrivent une diminution de la plasticité neuronale et notamment la neurogenèse dans l'hippocampe adulte chez le Rat (Duman et al., 1997; Jacobs et al., 2000), qui engendrerait des modifications morphologiques et structurales de certaines régions cérébrales (Duman et Newton, 2007; Sapolsky, 2000). En effet, des études de neuro-imagerie ont montré une atrophie de l'hippocampe ou des pertes de neurones dans le cortex préfrontal chez les patients dépressifs (Duman et Charney, 1999; Rajkowska et al., 1999; Sheline et al., 1996), travaux confirmés par d'autres équipes qui corrélaient la durée de l'épisode dépressif à la diminution du volume de l'hippocampe chez l'Homme (Bremner et al., 2000; Sheline et al., 1999).

De même, il apparaît que le stress, un symptôme qui peut être générateur de troubles dépressifs, *via* une augmentation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes, module la production de nouveaux neurones et augmente la mort

neuronale (Gould et al., 1998; Magarinos et al., 1996; Pittenger et Duman, 2008; Sapolsky, 2000; Sapolsky, 2003). Ce processus de « neurogenèse » se déroule chez l'adulte dans la zone sous-granulaire de l'hippocampe et semble stimulée par l'action des antidépresseurs sérotoninergiques (Malberg et al. 2000; Santarelli et al. 2003). Chez le Rat, il a été montré que l'administration chronique d'un ISRS augmente la concentration de l'ARNm d'un facteur de croissance, le BDNF (Nibuya et al., 1995), et active la neurogenèse (Malberg et al., 2000) de façon sélective dans l'hippocampe adulte. Ceci a été ensuite confirmé chez la souris (Santarelli et al., 2003).

Le point fort de cette hypothèse est de corrélérer le temps nécessaire aux remodelages des structures cortico-limbiques, et celui pour observer l'apparition des bénéfices comportementaux d'un traitement chronique aux antidépresseurs (2 à 3 semaines) (Santarelli et al., 2003, Rainer et al., 2011).

1.1.1.4 Implication des facteurs génétiques

Les études portant sur l'interaction gène-environnement cherchent à décrire comment les facteurs génétiques et environnementaux modulent conjointement le risque de développer une pathologie donnée. La vulnérabilité génétique peut être évaluée par l'histoire familiale ou donnée par une analyse directe de la séquence d'acide désoxyribonucléique dans une large population de patients

Des études de comparaisons entre jumeaux monozygotes et dizygotes suggèrent une prévalence de l'héritage génétique d'environ 35% (Fava et Kendler, 2000). Certains aspects associés à la dépression partagent également une part d'héritabilité (Bouchard, 1994). Suite aux études sur des familles présentant de nombreux individus dépressifs, il est admis que cette maladie n'est pas la conséquence du dysfonctionnement d'un seul gène, mais bien d'une association complexe de facteurs génétiques (Kendler et al., 1999). Il est également intéressant de noter que les dépressions précoces, sévères et récurrentes (Fava et Kendler, 2000; Gilbertson et al., 2002), mais aussi les formes mélancoliques et atypiques, ont une héritabilité plus importante que des syndromes mixtes ou moins sévères (Kendler, 1996). La part de l'héritabilité serait plus importante dans les formes sévères ou celles survenant précocement (Kendler, 1999). A ce jour, plusieurs gènes semblent avoir une pertinence plus élevée que les autres et ressortent de la

littérature, car l'observation de polymorphisme de ces gènes augmenterait le risque de survenue de la pathologie dépressive. Parmi eux, la présence d'un polymorphisme du transporteur de la sérotonine (5-HT) (Caspi et al., 2003 ; Kuzelova et al., 2010, mais ces résultats ont été contestés dans une méta-analyse de 14 études portant sur 12 500 patients :Risch et al., 2009), du récepteur 5-HT1A (Invernizzi, 2007; Le Francois et al., 2008), de la tryptophane hydroxylase 2 (TPH-2) (Invernizzi, 2007) , du « *brain derived neurotrophic factor* » (BDNF) (Chen et al., 2008), serait associée à la survenue d'une dépression relative au stress, ou d'une modulation des états dépressifs et de la réponse aux antidépresseurs.

Cependant, la plus récente méta-analyse, recoupant différentes méta-analyses réalisées sur plus de 18 000 patients (plus grande analyse réalisée à ce jour), montre une absence d'associations de polymorphisme avec le risque de développer un épisode dépressif majeur (*Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium*, 2012). Les analyses en sous-groupes (sexe, épisodes récurrents, autres sous-classifications des épisodes dépressifs, etc.) ne montrent également pas d'associations avec un/des polymorphisme(s) particulier(s), confirmant ainsi que cette pathologie est la conséquence du dysfonctionnement d'une association complexe de facteurs génétiques, probablement différents d'un patient à un autre.

1.1.1.5 Traitements de la dépression.

Voyons tout d'abord quelques généralités sur les différents traitements de la dépression proposés.

Ceux-ci incluent un traitement pharmacologique, une thérapie par électrochocs, une opération de psychochirurgie et différentes thérapies psychologiques. Classiquement, la stratégie thérapeutique s'adapte à l'intensité de la maladie :

- dans les formes légères de dépression, la psychothérapie est utilisée seule,
- dans les formes modérées de dépression, un traitement antidépresseur peut être prescrit seul.

- Enfin, la psychothérapie est associée à la thérapie médicamenteuse en milieu hospitalier lors des formes sévères de dépression.

Depuis les années 1950, on a découvert plusieurs familles d'antidépresseurs (Tableau 3 et Figure 5). D'abord, les inhibiteurs de monoamine oxydase (IMAO) sont les premiers antidépresseurs utilisés à partir de 1950 (tel que la phénelzine) qui augmente la concentration en sérotonine en inhibant les monoamines oxydases chargées de sa dégradation. Mais, les IMAO ont des effets indésirables graves comme les interactions avec d'autres médicaments. Les IMAO ont été remplacés rapidement par les antidépresseurs tricycliques (ATC) comme l'imipramine. Les ATC peuvent augmenter les concentrations de neurotransmetteurs (la sérotonine, la noradrénaline ou la dopamine) par inhibition de la recapture présynaptique de ces monoamines. Les ATC ont aussi des inconvénients : un long délai d'action (4 à 6 semaines), et une altération des rythmes cardiaques etc.. Enfin, les chercheurs ont développé d'autres antidépresseurs, moins toxiques que les TCA. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) élèvent la concentration de sérotonine dans la synapse en inhibant sélectivement sa recapture présynaptique. En clinique, les ISRS sont largement utilisés pour le traitement de la dépression et des troubles anxieux. Jusqu'à aujourd'hui, de nouveaux antidépresseurs sont apparus régulièrement sur le marché comme, par exemple, les inhibiteurs du recapture mixte de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNa), les Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline (ISRN), et l'agomélatine, antidépresseur ayant un mécanisme d'action original, puisque c'est à la fois un agoniste des récepteurs mélatoninergiques MT1 et MT2, et un antagoniste des récepteurs de la sérotonine de type 5-HT_{2C} (De Bodinat et al., 2010).

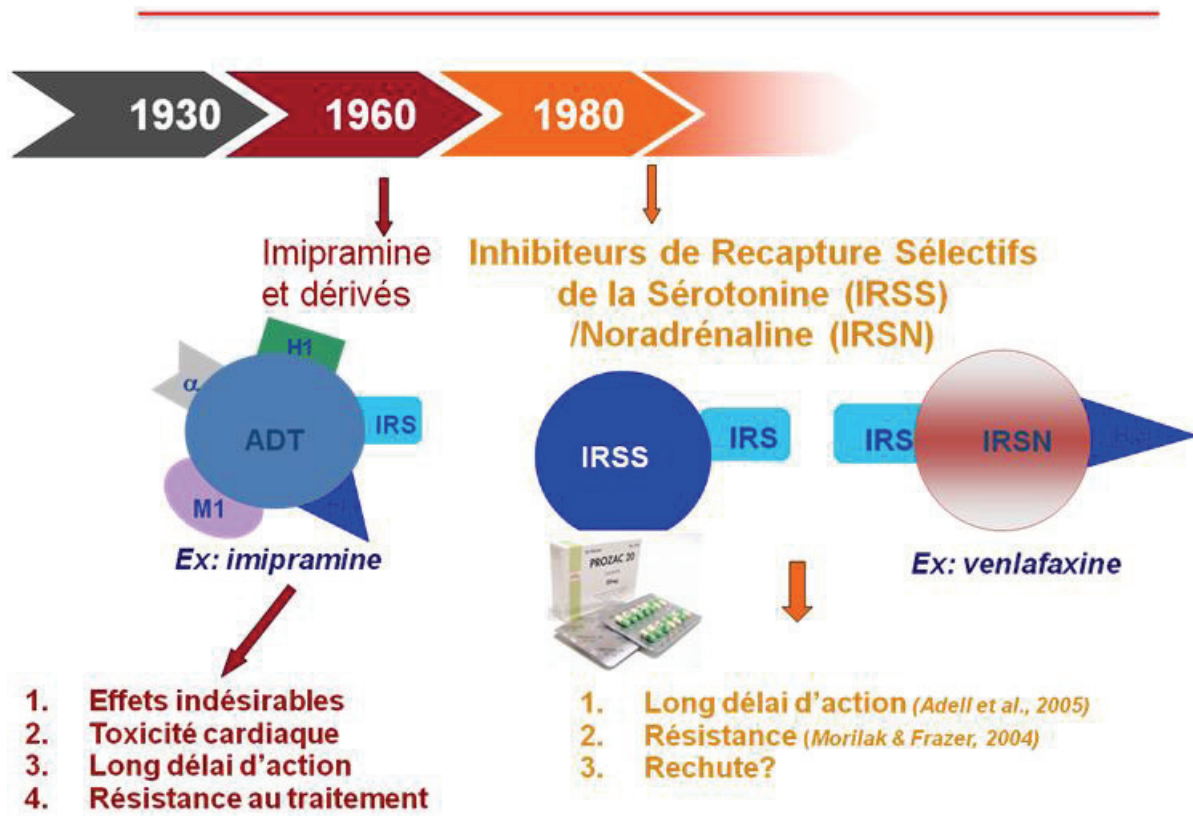


Figure 5: Chronologie de la découverte des principaux traitements antidépresseurs, leur mécanisme d'action et leurs inconvénients

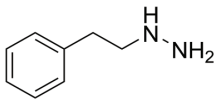
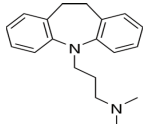
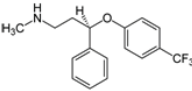
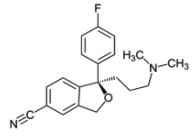
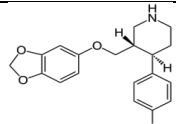
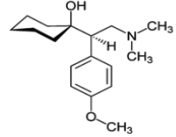
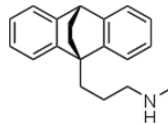
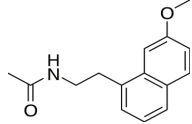
Classification	Représentant	Formule
Inhibiteurs de monoamine oxydase (IMAO)	Phenelzine	
Antidépresseurs tricycliques (ATC)	Imipramine	
Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (ISRS)	Fluoxétine	
	Citalopram	
	Paroxétine	
Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine-noradrénaline (IRSNa)	Venlafaxine	
Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline (ISRN)	Maprotiline	
L'agoniste des récepteurs mélatoninergiques et en antagoniste des récepteurs de sérotonine 2C.	Agomélatine	

Tableau 3: Exemples d'antidépresseurs avec leur formule chimique

Nous verrons ci-dessous, une fois que la présentation du système sérotoninergique (métabolisme, récepteurs, etc..) aura été effectuée, le détail des propriétés pharmacologiques des ISRS et de l'agomélatine, molécules que j'ai utilisé au cours de ma Thèse.

1.1.2 Les troubles anxieux

L'anxiété normale n'est pas un phénomène pathologique en soi, et elle s'inscrit dans le registre émotionnel humain normal. Elle est une réaction psychologique au stress et l'expérience que chacun de nous possède. On considère en général que l'anxiété est normale lorsqu'elle est tolérée et contrôlée par l'individu, et qu'il ne la perçoit pas comme une souffrance excessive, sans retentissement sur la vie quotidienne. Lorsqu'elle est ressentie comme continue et excessive, non liée à des événements de la vie ou survenant sans raison, à ce moment, l'anxiété est anormale et s'appelle les troubles anxieux. Les troubles anxieux sont les plus fréquents parmi les troubles mentaux (14 %) avant la dépression en Europe (Wittchen et al., 2011). Les troubles anxieux sont aussi l'une des maladies mentales qui se développent le plus tôt et environ 90% des troubles anxieux se produisent pour la première fois avant l'âge de 18 ans (Wittchen et al., 2011 ; Kessler et al., 2005), beaucoup plus jeune que la dépression. Mais, par rapport au grand nombre d'études dans la dépression, les troubles anxieux restent un sujet relativement négligé par la recherche, en particulier dans le domaine de soins primaire (Wittchen et al., 2003b). De plus, la forte probabilité que les troubles anxieux primaires pourraient être devenir la dépression (Wittchen et al., 2003b).

1.1.2.1 Classification des troubles anxieux

Les troubles anxieux constituent un ensemble de troubles psychologiques et neurologiques représentant plusieurs formes de peur et d'anxiété anormales ou pathologiques. Selon la classification internationale des maladies (CIM-10) publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les troubles anxieux comprennent 6 formes principales (Tableau 4) qui peuvent regrouper différents symptômes décrits dans le DSM-IV-TR (2000, Tableau 5). L'équipe de Kessler a montré que 18 % des américains étaient annuellement affectés par un ou plusieurs de ces troubles (Kessler et al., 2005). Parmi les troubles anxieux, entre 50 % et 90 % de la population atteinte des troubles d'anxiété généralisée (TAG) (Lewis-Fernández et al.,

2010) souffre également d'une autre maladie mentale, telle que le trouble de panique, la dépression ou un abus de drogue ou d'alcool (Lewis-Fernández et al., 2010). Le TAG est le trouble anxieux le plus souvent déclaré en urgence psychiatrique (Wittchen et al., 2003b).

En clinique, les questionnaires standards comme la « *Zung Self-Rating Anxiety Scale* » (SAS) créée par William Zung en 1971, sont utilisés pour quantifier l'intensité des symptômes d'anxiété (Zung et al., 1971). La SAS comporte 20 items, le score total est compris entre 20 et 80. En effet, un score compris entre 20 et 44 caractérise des anxiétés normales, tandis qu'un score supérieur à 45 indique des niveaux d'anxiété de légers ($45 < \text{score} < 59$) à extrêmes ($75 < \text{score} < 80$).

Classification	Description	Prévalence dans le monde
Anxiété généralisée	Caractérisé par une inquiétude excessive en ce qui concerne des activités ou des événements du quotidien pendant une période d'au moins six mois	3 % et 6 %
Trouble panique	Les attaques récurrentes d'anxiété sévère (panique), qui ne sont pas liés à une situation particulière ou un environnement et sont donc imprévisibles	2 % et 4 %
Trouble de stress post-traumatique	Une réponse retardée ou prolongée à un événement stressé ou à une situation d'une menace exceptionnelle ou une catastrophe naturelle	7%
Trouble obsessionnel compulsif	Comprend deux aspects : obsessionnelles pensées et compulsives actes	1,6 % à 2,5 %
Phobie sociale	C'est la peur de l'humiliation et de l'embarras lors des situations publiques.	5 % à 12 %
Phobie spécifique	La peur excessive de quelque chose en particulier. Par exemple, animal, sang etc.	4% à 13%

Tableau 4: Classification et description des troubles anxieux dans CIM-10. Prévalence de chaque forme principale notée par Lewis-Fernández et al., 2010.

A. Une anxiété et des inquiétudes ou des soucis excessifs survenant, de façon générale, tous les jours au cours d'une période d'au moins 6 mois, à propos de certaines activités, (en particulier celles qui sont reliées à l'école pour les enfants) ;

B. Une difficulté à contrôler cette anxiété et à oublier ses soucis ;

C. L'anxiété et les soucis sont associés à au moins trois des six symptômes suivants :

1. agitation ou sensation d'être survolté ou à bout ;

2. fatigabilité ;

3. difficulté de concentration ou trous de mémoire ;

4. irritabilité ;

5. tension musculaire ;

6. perturbation du sommeil et, en particulier, difficulté d'endormissement ou réveils nocturnes ; (dus à des idées noires qui agiraient inconsciemment lors du sommeil)

D. Il faut s'assurer que cette anxiété n'est pas liée à un autre trouble anxieux

E. L'anxiété, les soucis ou les symptômes physiques entraînent une souffrance significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel

F. la perturbation n'est pas due aux effets physiologiques directs d'une substance

Tableau 5: Critères de l'anxiété généralisée selon le DSM-IV.

1.1.2.2 Pathophysiologie des troubles anxieux

Très succinctement, je rappellerai que la principale hypothèse concernant l'étiologie des troubles anxieux concerne une réduction de la transmission de l'acide Gamma-Aminobutyrique (GABA) dans le Système Nerveux Central (SNC). Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central : chez les Mammifères, au moins 30% des synapses du cerveau sont de type GABAergiques. Le GABA est synthétisé à partir de l'acide glutamique par une enzyme, la GAD (*Acide Glutamique Decarboxylase*) dont il existe 2 isoformes (GAD65 et GAD67) et les molécules de GABA sont stockées dans des vésicules synaptiques, par l'intermédiaire de transporteurs VGAT (*vesicular GABA transporter*) ou catabolisés par une enzyme, la GABA transaminase (GABA-T). La fixation du GABA sur son site de liaison entraîne l'activation du récepteur, induisant l'ouverture d'un canal Cl⁻ et une entrée de ces ions dans la cellule, responsable d'une hyperpolarisation (Nutt et Malizia, 2001). Ce grand afflux d'ions Cl⁻ dans le neurone va produire une inhibition d'une nouvelle impulsion nerveuse.

Une hypothèse sous-tendant l'apparition des troubles anxieux est la diminution de l'afflux de Cl⁻ par une réduction de l'activité du complexe récepteur-canal GABA A dans le neurone postsynaptique. Chez les patients, un déficit de la quantité de récepteurs GABA A a été associée à la présence de symptômes des troubles anxieux (Hasler et al., 2008, Bremner et al., 2000). De la même façon, des souris ayant une mutation de la sous-unité gamma2 des récepteurs GABA A présentent un phénotype anxieux (Shen et al., 2010 ; Earnheart et al., 2007).

1.1.2.3 Anxiété et dépression

La dépression présente une co-morbidité élevée avec les troubles anxieux, avec 50-60% des patients déprimés qui ont présenté des troubles anxieux au cours de leur dépression. Vice-versa, de nombreux patients souffrant de troubles anxieux ont reçu, au cours de leur histoire thérapeutique, un traitement antidépresseur. Il faut noter que de nombreux antidépresseurs (comme les ISRS), sont utilisés à la fois pour leur propriétés antidépressives et/ou anxiolytiques et ciblent la neurotransmission catécholaminergique et sérotoninergique, ce qui a d'ailleurs été à l'origine de l'hypothèse monoaminergique de la dépression.

Cependant, de nombreuses études montrent l'implication du système GABAergique dans la dépression.

En effet, une réduction des taux de GABA a été observée dans le plasma (Petty et Schlessner, 1981 ; Petty et Sherman, 1984) ou dans le cortex des patients déprimés en post mortem (Gerner et Hare, 1981). De même, des variations des quantités d'ARNm codant pour les différentes sous-unités composant le récepteur GABAA ont été observées dans le cortex cérébral de patients décédés ayant été déprimés (Sequeira et al., 2007, 2009, Choudary et al., 2005). D'autres récentes études ont mis en évidence une diminution de certains marqueurs spécifiques des neurones GABAergiques, dans différentes aires limbiques telles que le cortex préfrontal, le cortex cingulaire et le complexe basolatéral de l'amygdale (Guilloux et al., 2011, Sibille et al., 2011, Tripp et al., 2011).

Ces descriptions chez l'humain sont partiellement confirmées dans un modèle de souris mutées pour la sous-unité du récepteur gamma2 du récepteur GABA-A, qui présentent un phénotype anxio-dépressif précoce, associé à des perturbations de l'axe HPA et une altération de la survie neuronale hippocampique (Shen et al., 2010, Earnheart et al., 2007).

1.1.2.4 Médicaments anxiolytiques

Les ISRS sont désormais prescrits couramment en Psychopharmacologie des troubles anxieux. Certains ISRS présentent des effets anxiolytiques lorsqu'ils sont administrés de façon chronique et leur prescription est ainsi indiquée dans le traitement de divers troubles anxieux (Bandelow et al., 2008) Ils sont considérés comme un outil pharmacologique de premier choix du traitement de l'anxiété généralisée avec la meilleure tolérance et efficacité (Reinhold et al., 2011), avec un risque de dépendance moindre que les molécules anxiolytiques de référence, les benzodiazépines (BZD) (Bandelow et al., 2008 ; Baldwin et al., 2005). Mais les mécanismes responsables de l'activité anxiolytique des ISRS ne sont pas encore déterminés. Récemment, il a été suggéré que la propriété anxiolytique des antidépresseurs reposerait sur une modification de la plasticité à long-terme du système GABAergique (Kalueff et Nutt, 2007). En effet, un traitement chronique d'ISRS semble capable d'inverser le déficit GABAergique cortical chez les patients (Hasler et al., 2007) et améliorer les comportements dépressifs chez les animaux avec une mutation hétérozygote du récepteur $\alpha 2$ -GABA_A et $\gamma 2$ - GABA_A (Shen et al., 2010 ; Vollenweider et al., 2011).

1.2 Les régions cérébrales impliquées dans les troubles anxio-dépressifs

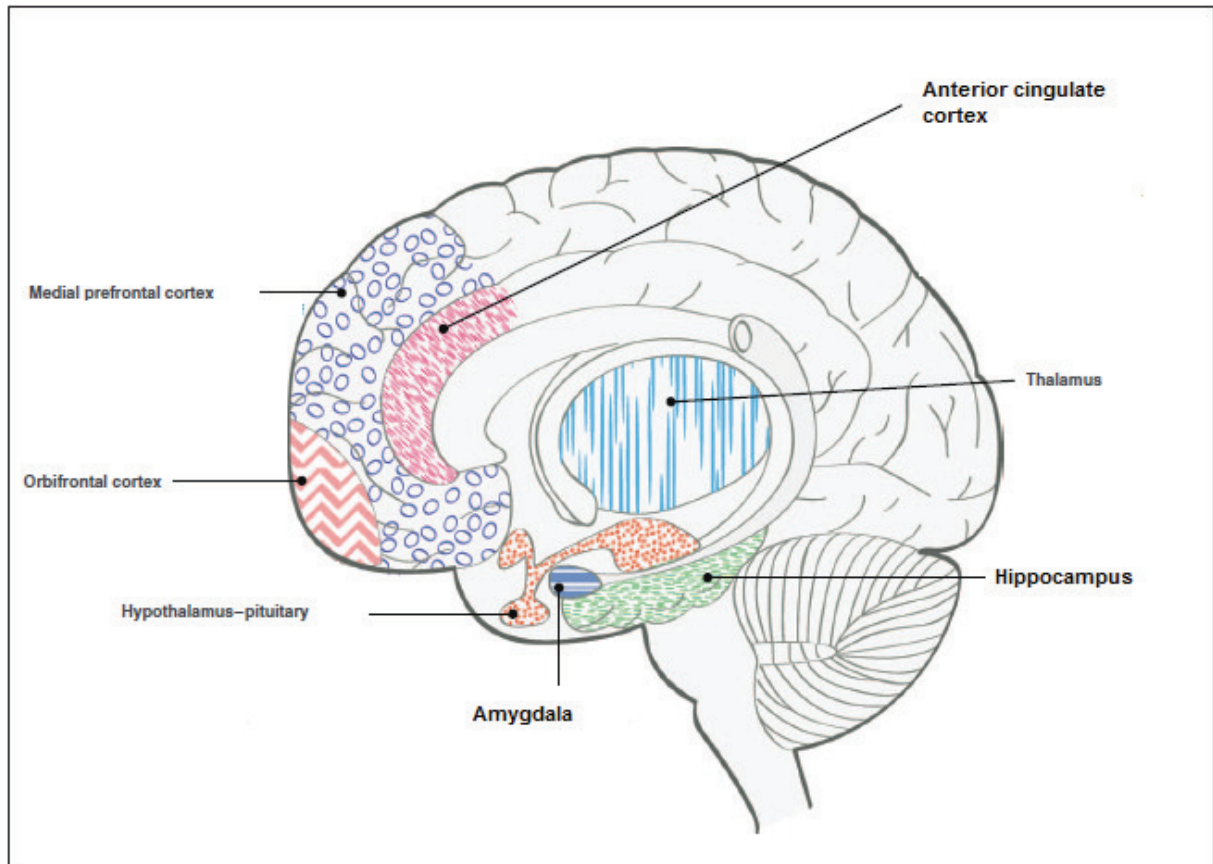


Figure 6: Circuit du système limbique-préfrontal important dans les troubles de l'humeur. Circuit reliant les régions du cerveau, y compris le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe et le système de l'axe Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien, qui jouent un rôle important dans les troubles de l'humeur et sont probablement ciblées par les médicaments stabilisateurs de l'humeur (D'après Schloesser et al., 2012)

1.2.1 L'hippocampe

L'hippocampe est une structure limbique extrêmement sensible aux hormones du stress, qui semble jouer un rôle majeur dans la physiopathologie et le traitement des troubles de l'humeur, et module la réponse antidépressive dans les modèles comportementaux de la dépression. L'hippocampe surveille et règle les fonctions de l'axe HPA. La lésion de l'hippocampe affaiblit le contrôle de la réponse hormonale au stress (Dedovic et al., 2009 ; Jacobson et Sapolsky, 1991). Inversement, une augmentation des hormones du stress peut conduire à un dysfonctionnement de l'hippocampe chez l'Homme et chez les Rongeurs (Herman et al., 2005 ; McEwen et al., 1997).

1.2.1.1 Les Projections de l'hippocampe

L'hippocampe est constitué de différentes sous régions incluant le gyrus dentelé (GD), le subiculum (SUB), la Corne d'Ammon (CA1, CA2, CA3) et le cortex entorhinal (EC) (Figure 7). Les circuits neuronaux de l'hippocampe sont trisynaptiques. Les neurones dans l'EC2 (cortex entorhinal couche 2) projettent vers le gyrus dentelé et la région CA3 (Steward, 1976). Les cellules granulaires du GD sont reliées à la zone CA3 par les fibres moussues. Les neurones de l'EC3 (cortex entorhinal couche 3) projettent vers le subiculum et la région CA1 (Li et al., 2009). Les cellules pyramidales de la région CA3 projettent vers CA1 via les collatérales de Schaeffer (Li et al., 2009). Les fibres issues de CA1 passent par le subiculum et la couche profonde du cortex entorhinal (Li et al., 2009). (Figure 7).

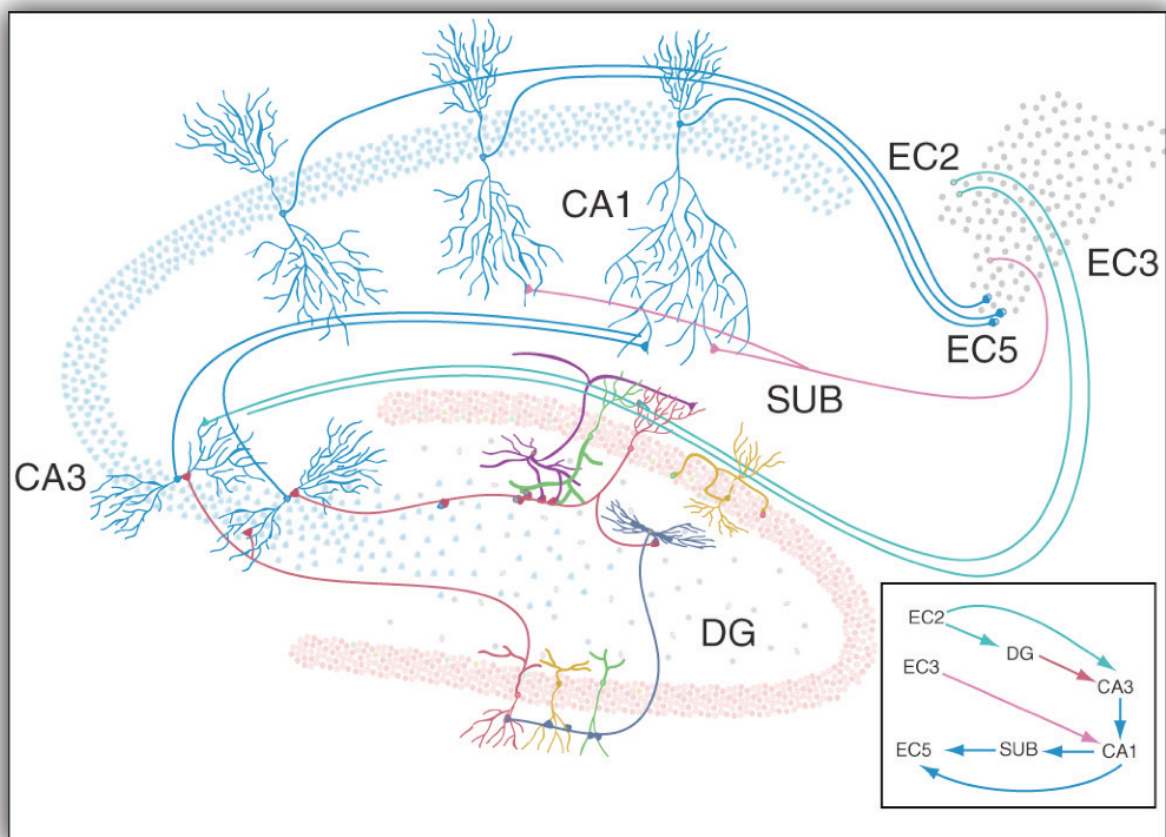


Figure 7: Réseaux neuronaux de l'hippocampe. (D'après Li et al., 2009)

1.2.1.2 *L'hippocampe ventral et dorsal*

Les études de lésions ont confirmé les différentes fonctions comportementales associées aux sous-régions ventrale et dorsale de l'hippocampe. Les rats chez lesquels on a réalisé une lésion ventrale présentent une perturbation de la réponse à la peur dans le test de « *Contextual Fear Conditioning* », une diminution de l'anxiété dans différents paradigmes (le test de la cage claire/obscur, *test d'hyponéophagie*, *open field*, Bannerman et al., 2002, 2003 ; Kjelstrup et al., 2002). Dans d'autres études, la lésion de la région ventrale a montré un effet anxiolytique (Gary and McNaughton, 2000), associé à diminution des taux plasmatiques de corticostérone suite à un stress (Kjelstrup et al., 2002). En comparaison, la lésion de la région dorsale de l'hippocampe diminue l'apprentissage spatial dans les tests de mémoire tels que l' *appetitive maze task* » en altérant aussi bien le travail spatial et la mémoire spatiale (Bannerman et al., 2002 ; Hock et al., 1998 ; Pothuizen et al., 2004). Cependant, les lésions dorsales ne semblent pas être responsable d'effets majeurs dans les tests d'anxiété (Kjelstrup et al., 2002 ; Bannerman et al., 2002)

Les autres différences entre l'hippocampe ventral et dorsal ont montré que:

1) comparé à l'hippocampe dorsal, l'hippocampe ventral a une densité plus élevée des innervations des projections sérotoninergiques (Bjarkam et al., 2003) ;

2) le stress ou un traitement à la corticostérone peuvent induire la libération de sérotonine dans l'hippocampe ventral (Rex et al., 2005) ;

3) l'hippocampe ventral régule également la transmission dopaminergique dans le cortex préfrontal (O'Donnell et al., 1995), tandis que l'hippocampe dorsal n'a pas ces effets..

Les études de la fonction de l'hippocampe se sont concentrés sur la mémoire et l'apprentissage (Squire et al., 2004 ; Brown, 1990). Cependant, il y a de nombreux éléments qui indiquent le rôle de l'hippocampe dans la régulation de l'anxiété (Gary and McNaughton, 2000). L'équipe de Moser (Moser et Moser, 1998) a proposé que l'hippocampe ne travaille pas comme une structure unitaire. En effet, les différences des profils d'expressions de gènes et des projections anatomiques suivis l'axe de dorsal-ventral suggèrent de diviser l'hippocampe en plusieurs zones indépendantes

dédiées à des fonctions distinctes (Fanselow et Dong, 2009). De plus, les études sur les expressions de gènes ont montré que certains gènes sont exprimés de façon différente dans l'hippocampe dorsal et ventral (Leonardo et al., 2006 ; Fanselow et Dong, 2009) : par exemple, les gènes *Wolframin*, *LPH*, *Epha7* sont plus riches dans l'hippocampe ventral que dorsal, tandis que les gènes *Dcn*, *Neuromatin* sont exprimés préférentiellement dans l'hippocampe ventral (Leonardo et al., 2006).

1.2.1.3 **Neurogenèse**

En effet, des études récentes ont montré une atrophie associée à une perte de neurones dans l'hippocampe chez des patients dépressifs (Gurvits et al.1996). Par ailleurs, il a montré que la durée de l'épisode dépressif était corrélée à la diminution du volume de l'hippocampe chez l'Homme (Sapolsky et al., 1996 ; Santarelli et al., 2003). Ces altérations sont corrigées par un traitement antidépresseur chronique (Czeh et al., 2001 ; David et al, 2009). De même, le stress module la production de nouveaux neurones chez l'adulte (Gould et al., 1998). Ce processus est appelé « la neurogenèse » inclue plusieurs étapes distinctes (Figure 8) : la prolifération cellulaire, la migration dans la couche granulaire, la différenciation des neurones et la survie des neurones et leur maturation. L'ensemble de ce processus est besoin de 4 semaines et se déroule dans deux zones cérébrales : la zone sous-granulaire (gyrus dentelé) de l'hippocampe, et la zone sous-ventriculaire des bulbes olfactifs. Le processus de neurogenèse est fortement régulé par divers paramètres physiologiques (Tableau 6).

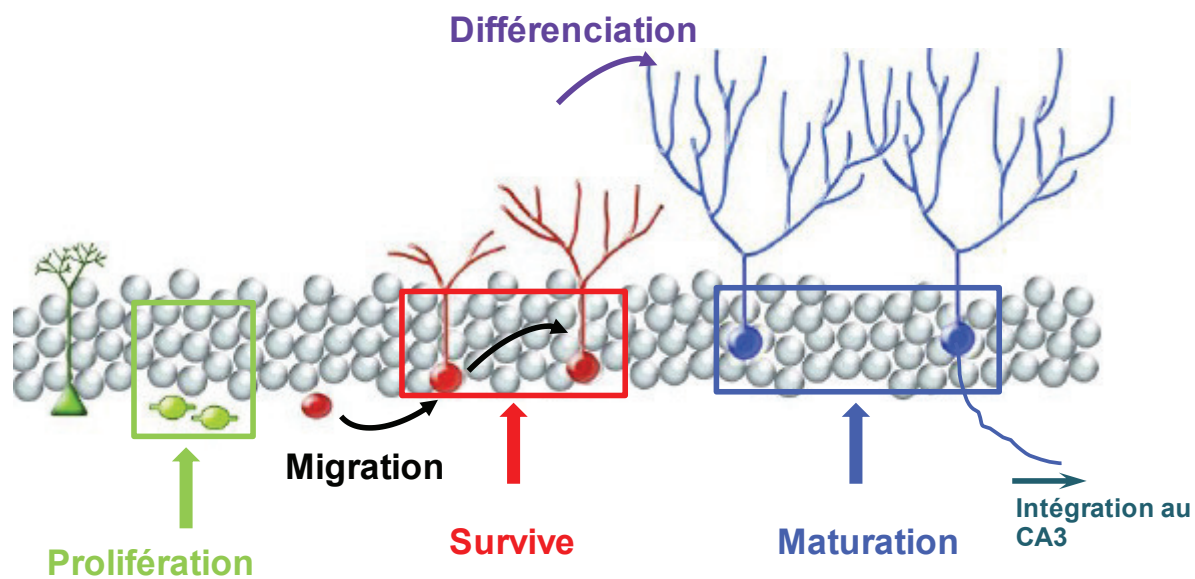


Figure 8: Neurogenèse dans le gyrus dentelé de l'hippocampe chez l'adulte.

Modèle	Effets sur la neurogenèse	Références
Bon Environnement	Survie	↗ Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999
Course	Prolifération cellulaire	↗ Van Praag et al., 1999
Stress	Prolifération cellulaire	↘ Gould et al., 1997 ;
	Survie	↘ Mineur et al., 2007
		↘ Jayatissa et al., 2006
<i>traitement antidépresseurs</i>	Prolifération cellulaire	↗ Suget et al., 2008
Corticostérone	Prolifération cellulaire	↘ David et al., 2009; Rainer et al., 2011
<i>traitement antidépresseurs</i>	Prolifération cellulaire	↗ David et al., 2009;
	Survie	↗ Rainer et al., 2011
	Maturation	↗
Water maze	Survie	↗ Gould et al., 1999; Hairstone et al., 2005
Huntington	Prolifération cellulaire	↗ Dobrossy et al., 2003
	Maturation	↘ Orveõn et al., 2011
Modifications génétiques	<i>Klf9 Knock-Out</i>	↘ Scobie et al., 2009
		↘
	<i>Vegf surexpression</i>	↗ Cao et al., 2004
	Survie	↗
	Différentiation	↗
Age	Prolifération cellulaire	↘ Jinno et al., 2011
Rayon-X	Prolifération cellulaire	↘ Santarelli et al. 2003

Tableau 6: Régulation de la neurogenèse hippocampique selon le modèle expérimental.

L'augmentation du processus de neurogenèse est stimulée par un traitement chronique avec des antidépresseurs sérotoninergiques chez le rat et la souris (Nibuya et al. 1995, 1996; Malberg et al., 2000; Santarelli et al. 2003 ; David et al., 2009 ; Rainer et al., 2011). Le long délai d'action des ISRS pourrait correspondre au temps nécessaire (3 à 4 semaines) à la mise en place de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte c'est-à-dire pour que les cellules souches se différencient en neurones. Des études récentes ont montré qu'une exposition chronique à un stress peut diminuer la neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé (Jayatissa et al., 2006 ; Gould et al., 1997). Un traitement chronique avec la corticostérone perturbe la prolifération des cellules hippocampiques (David et al., 2009 ; Rainer et al., 2011) et cet effet peut être inversé par certains antidépresseurs, par exemple, l'agomélatine (Banasr et al., 2006 ; Rainer et al., 2011) et l'escitalopram (Jayatissa et al., 2006). Le facteur de l'âge a une influence plus importante sur la neurogenèse dans l'hippocampe ventral que dans le dorsal (Jinno, 2011). Le récepteur 5-HT1A joue aussi un rôle important dans la régulation du processus de neurogenèse. Une stimulation pharmacologique de récepteurs 5-HT1A a augmenté la prolifération cellulaire, tandis que leur blocage induit des effets opposés (Klempin et al, 2010 ; Banasr et al., 2004 ; Santarelli et al. 2003). De plus, l'équipe de René Hen a montré que l'augmentation de la neurogenèse après traitement antidépresseur chronique, était liée à l'activation du récepteur 5-HT1A (Santarelli et al. 2003) chez la souris adulte de souche C57Bl/6j. Par contre, chez une autre souche de souris, BALB/cJ, la neurogenèse hippocampique n'est pas nécessaire pour obtenir les effets comportementaux de la fluoxétine (Holick et al., 2008). D'autres études effectuées chez des rongeurs génétiquement manipulés ont pourtant montré que des facteurs transcription participent à la maturation et à la différenciation des neurones du GD, deux importantes étapes de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte (Scobie et al., 2009 ; Cao et al., 2004).

1.2.2 Amygdale

L'hippocampe ventral a une forte connexion avec l'amygdale, mais ces deux régions ne peuvent pas être considérées comme réalisant une construction unitaire (Davis et Shi, 1999 ; Gary et McNaughton, 2000). L'hippocampe et l'amygdale contribuent de façon différente au mécanisme d'anxiété et de peur (Gary et McNaughton, 2000). La peur est une réponse phasique à un objet qui est explicite, terrible et conditionnel, tandis que l'objet de l'anxiété est indistinct, inconditionnel et terrible (Davis et Shi, 1999). D'autres chercheurs ont pensé que la peur est liée à un évitement actif, une réponse d'évasion et un retrait de danger. Par contre, l'anxiété causée par un stimulus indistinct et horrible est associée à un conflit et à une incertitude (Gary et McNaughton, 2000). La peur serait ainsi un précurseur logique de l'anxiété. En revanche, l'anxiété peut inhiber le système de la peur (Gary et McNaughton, 2000). La peur conditionnelle est un modèle important des troubles anxieux (Fiddick, 2011).

L'amygdale est une structure principalement connue pour son implication dans les phénomènes de peur, d'anxiété et dans l'évaluation émotionnelle (pour revue, voir (Rodrigues et al., 2009 ; Aggleton, 2000). Elle est constituée de trois groupes de noyaux : les noyaux cortico-médians (MeA), les noyaux baso-latéraux (BLA) et les noyaux centraux et antérieurs (CeA). L'amygdale reçoit des afférences des bulbes olfactifs, du tronc cérébral, de l'hypothalamus, du thalamus, de l'hippocampe ainsi que du cortex cérébral. Elle projette vers le thalamus, l'hypothalamus, le striatum, le tronc cérébral, ainsi que le cortex cérébral. On considère que l'activation de l'amygdale est une réponse à des conditions éventuellement dangereuses (Maren, 2005).

Les études de neuroimagerie ont impliqué l'amygdale lors de stimulations caractéristiques qui peuvent provoquer la peur et l'anxiété (Britton et al, 2006 ; Hariri et al., 2002), et dans des changements de renforcement de stimuli de peur (Buchel et Dolan, 2000 ; Alvarez et al., 2008). Quelques études fonctionnelles contrôlées de neuroimagerie ont trouvé que chez les patients anxieux, l'activité de l'amygdale est augmentée en réponse à la vue d'un visage menaçant (Stein et al., 2002 ; Blair et al., 2008). D'autres études de neuroimagerie chez l'homme ont aussi indiqué que

l'amygdale répond aux stimuli positifs et encourageants (Schultz, 2005 ; O'doherty et al., 2004).

L'amygdale aurait donc une action activatrice de l'axe HPA principalement en inhibant des voies inhibitrices. L'activation de l'amygdale est importante pour l'analyse émotionnelle et la récupération des informations pertinentes à tous facteurs de stress. La CRH élevée dans l'amygdale est une réponse appropriée à une émotion ou un stress (Gray et Bingaman, 1996).

Lorsqu'elle est électriquement stimulée, la concentration des glucocorticoïdes (GC) circulants est augmentée chez le rat, le singe et chez l'humain (Jankord et Herman, 2008). A l'inverse, des lésions des noyaux CeA et MeA de l'amygdale diminuent les concentrations d'ACTH et de GC. Les lésions de l'amygdale n'ont pas d'effets sur les performances dans le test de labyrinthe en croix surélevé ou « *elevated plus maze* » (EPM) (Decker et al., 1995 ; Kjelstrup et al., 2002 ; Sommer et al., 2001) et dans les tests d'interactions sociales (Bannerman et al., 2002). Dans le test d'« *Hyophagia* », les animaux avec une lésion de l'amygdale ont eu besoin de plus de temps pour commencer à se nourrir, un résultats opposé de celui de la lésion de l'hippocampe ventral (Bannerman et al., 2002). Les lésions de l'amygdale ont produit des déficits robustes et fiables dans le test de la peur (LeDoux, 1992). Une diminution de la densité gliale (Bowley et al., 2002), moins d'oligodendrocytes dans l'amygdale (Hamidi et al., 2004), ou un traitement anormale des stimuli émotionnels par l'amygdale peuvent induire une dépression majeure (Sheline et al., 2001 ; Siegle et al., 2002 ; Roberson-Nay et al., 2006). L'amygdale présente une densité élevée en sites de liaison des BZD (Niehoff et al., 1983). La perfusion directe de BZD dans l'amygdale provoque un effet anxiolytique dans plusieurs tests (Nagy et al., 1979), mais pas dans le test « *elevated plus maze* » (EPM) (Treit et al., 1993), car les lésions de l'amygdale n'ont pas bloqué les effets d'un traitement aux BZD dans ce test (Gonzalez et al., 1996 ; Pesold et al., 1994). Récemment, les variations d'allèles de deux gènes sérotoninergiques (5-HTT et Tph2) ont été associées à l'activation de l'amygdale suite à la vue de visages fâchés chez l'Homme (Furmark et al., 2009).

1.2.3 Cortex cingulaire

Le cortex cingulaire est une autre région cérébrale importante impliquée dans les conditions de peur. Le cortex cingulaire est une zone épaisse de cortex encerclant le corps calleux ou corpus callosum (Shackman et al., 2011) et est une des parties la plus grande et la plus archaïque du système limbique dans le cerveau (Fiddick 2011). Les premières recherches ont suggéré qu'il joue un rôle critique dans l'affect et la motivation (Papez, 1937). En plus de l'émotion (Kober et al., 2008), les études récentes ont montré que cette région est associée à la réaction à la douleur (Tracey et al., 2007) et au contrôle cognitif (Ridderinkhof et al., 2004 ; Cole et al., 2009).

Les données d'imagerie fonctionnelle, anatomique et électrophysiologique suggèrent que ces différentes fonctions sont séparées en sous-zones distinctes du cortex cingulaire (Devinsky et al., 1995). Le cortex cingulaire antérieur (ACC) est spécialisé dans les processus affectifs et reçoit des afférences du thalamus et de l'amygdale (Vogt et al., 1979), tandis que le cortex cingulaire postérieur gère les processus cognitifs (Devinsky et al., 1995 ; Steele et al., 2004), reçoit des afférences du thalamus, des lobes et de l'hippocampe et est relié à l'ACC (Vogt et al., 1979). Le contrôle cognitif et la douleur activent plus fréquemment le MCC - la division cognitive que l'ACC - la division affective, mais l'affect négatif montre le même effet sur les deux divisions (Shackman et al., 2011). L'affect négatif, la douleur et le contrôle cognitif activent le MCC (Mechias et al., 2010 ; Farrell et al., 2005). Les études d'imagerie impliquent le MCC dans la régulation de l'activité autonome (Medford et Critchley, 2010 ; Luu et Posner, 2003), la perception et la production d'émotion (Kober et al. 2008 ; Etkin et al., 2011). L'ACC est une structure clef qui contribue au rappel de la mémoire de peur (Frankland et al., 2004) et à la formation de la mémoire de la peur (Tang et al., 2005). De nombreux éléments indiquent que l'apprentissage de la peur et la mémoire sont modulés par des changements synaptiques dans l'ACC (Zhuo, 2008). Une stimulation électrique de l'ACC induit la mémoire de la peur (Tang et al., 2005). La formation de la mémoire de la peur s'accompagne d'un changement structural des neurones de l'ACC (Restivo et al., 2009). Chez l'homme, les neurones de l'ACC sont activés en réponse à des stimuli pernicieux (Hutchison et al., 1999) et sont nécessaires à la perception de la douleur

(Rainville et al., 1997). Dans le test de la peur, l'activité de l'ACC est diminuée par la présence d'un choc (Knight et al., 2004)

Quand des visages menaçants sont présentés à l'homme et à des animaux ou que ceux-ci sont confrontés à une situation effrayante, l'activité neuronale dans l'amygdale et le cortex cingulaire est changée (Adolphs et al., 2005 ; Jeon et al., 2010). Les neurones du cortex cingulaire projettent directement sur l'amygdale chez le rat, le chat et le singe (Aggleton et al., 1980 ; Russchen, 1982). Inversement, la projection des neurones de l'amygdale vers le cortex cingulaire a été aussi observée chez le singe par les techniques de trace anatomique (Porrino et al., 1981). Les projections entre ces deux régions sont glutamatergiques, excitatrices (Bissiere et al., 2008). D'autres études ont montré que la plasticité synaptique dans le voie de l'amygdale-cortex cingulaire est contrôlée par le GABA, un neurotransmetteur inhibiteur (Morozov et al., 2011). L'injection d'agonistes GABAergique (Kalueff et Nutt, 2007), sérotoninergique (Deakin et Graeff, 1991), cholinergique (Hasselmo, 1999) et d'agonistes du récepteur NMDA du glutamate (Tsien, 2000) chez la souris diminue le temps d'apprentissage de l'évitement d'un choc électrique faible ou « *footshock* ». En revanche, les antagonistes de ces récepteurs ont un effet opposé dans les test de la peur conditionnelle (Farr et al., 2000). L'amygdale et le cortex cingulaire peuvent être reliés indirectement par le thalamus (Vogt et al., 2006). La connexion fonctionnelle entre l'amygdale et le cortex cingulaire joue un rôle important dans la peur et le processus émotionnel, y compris dans la douleur (Malin et al., 2007). L'activité synchronisée entre l'amygdale et le cortex cingulaire est nécessaire pour la reconnaissance et l'expression de la peur sociale, chez les souris (Jeon et al., 2010). L'activité du cortex cingulaire pendant les événements émotionnelles régule l'apprentissage de la peur amygdale-dépendant (Morozow et al., 2011).

Cette région a des liens importants avec d'autres structures cérébrales impliquées dans la modulation des comportements émotionnelles, et participe dans ce réseau étendu au traitement émotionnel et à la régulation de la réponse autonome (Schloesser et al., 2011). La dépression est multi-symptomatique associant des troubles de l'humeur, de la cognition, des comportements et de la fonction végétative. La perturbation de la fonction du cortex cingulaire peut influencer sur les structures impliquées dans la pathophysiologie de la dépression (Hamani, 2011).

Hamani a suggéré que les projections du cortex cingulaire vers le cortex préfrontal peuvent interférer avec les processus exécutifs et cognitifs tandis que les projections vers l'hypothalamus peuvent perturber la fonction végétative conduisant à des troubles du sommeil (Saper et al., 2005), de l'appétit et à des anomalies de la réponse au stress et du métabolisme du cortisol. Les projections du cortex cingulaire vers l'hippocampe et le cortex entorhinal peuvent influencer les fonctions cognitives.

Chez les patients dépressifs et anxieux, les études d'imagerie ont montré une augmentation de l'activité du cortex cingulaire (Meyberg et al., 2005 ; Drevets et al., 1997 ; Konarski et al., 2009), tandis qu'une diminution de l'activité a été observé après un traitement avec un ISRS ou avec une thérapie électro-convulsive (Meyberg et al., 2005 , 2003 ; Nobler et al., 2001). Certaines études ont aussi montré que le volume du cortex cingulaire est diminué chez les patients avec une dépression familiale, une dépression psychotique ou chez les patients ayant un trouble bipolaire (Coryell et al., 2005 ; Price et Drevets, 2010). Cependant, d'autres équipes n'ont pas observé ce phénomène (Brambilla et al., 2002). Par ailleurs, une diminution de la densité gliale et un réduction de la taille neuronale sont observées chez les patients déprimés (Cotter et al., 2001). Bearden (2007) ont trouvé une augmentation du volume du cortex cingulaire après un traitement au lithium chez les patients ayant un trouble bipolaire.

1.3 Le système sérotoninergique dans les troubles anxio-dépressifs

Les symptômes anxio-dépressifs répondent souvent à la thérapie médicamenteuse (ISRS) indiquant une possible dysfonction neuronale commune dans tous les deux pathologies psychiatriques (Hanns Möhler, 2012). De nombreuses études ont montré l'importance du système sérotoninergique central dans le contrôle et la régulation des troubles de l'humeur tels que l'anxiété ou la dépression. Le système sérotoninergique peut contrôler le sommeil, moduler les comportements, réguler la température corporelle (Gingrich et Hen, 2001). Une meilleure connaissance de ce système permettrait d'améliorer la compréhension de l'étiologie des troubles anxio-dépressifs et de développer les médicaments encore plus efficaces.

1.3.1 Le métabolisme de la sérotonine

La sérotonine (*5-hydroxy-tryptamine* ou 5-HT) a d'abord été identifiée dans les cellules entérochromaffines du tube digestif par V. Erspamer (Vialli et Erspamer, 1933), et nommée entéramine. En 1947, une substance vasoconstrictrice a été isolée et apparaissait au moment de la coagulation du sang (Rapport et al., 1947) qui la dénomma sérotonine. Enfin, les équipes de B. M. Twarog et I. H. Page ont découvert la sérotonine dans le système nerveux central en 1953.

La biosynthèse de la sérotonine s'effectue dans les cellules entérochromaffines de l'intestin (à plus de 80%) ou dans les neurones (quelques % seulement). La sérotonine est synthétisée à partir de son précurseur, le L-tryptophane (L-Trp), un acide aminé « *indispensable* », apporté par l'alimentation, et est ensuite transporté par la circulation sanguine vers le SNC par un transporteur membranaire non sélectif dit transporteur des acides aminés aromatiques (Fernstrom et Wurtman, 1972; Kuhn et al., 1986). Dans le cerveau, les neurones transforment le L-tryptophane en un composé intermédiaire fugace, le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) grâce à l'enzyme de l'étape limitante de la synthèse, la tryptophane hydroxylase (TPH). Deux isoformes TPH1 et TPH2 de cette enzyme assurent la synthèse de 5-HT et régulent ainsi sa concentration intracellulaire (Zhang et al., 2005). Chez les rongeurs, la TPH1 est exprimée à la périphérie (Walther et al., 2003) et peut-être également dans le SNC (Gundlah et al., 2005), tandis que la TPH2 ne présente qu'une expression dans le SNC (Walther et al., 2003). Chez l'homme, l'expression des isoformes de la TPH serait différente pendant le développement du cerveau (Guknecht et al., 2006). Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en 5-HT par une autre enzyme non spécifique du système sérotoninergique, la 5-hydroxytryptophane décarboxylase (*L-amino acid decarboxylase*, AADC). La sérotonine synthétisée dans le cytoplasme est ensuite stockée dans des vésicules présynaptiques (sensibles à la réserpine) grâce à des transporteurs vésiculaires de la famille VMAT (« *Vesicular MonoAmine Transporters* »). La libération de la sérotonine dans la fente synaptique est effectuée par deux modes, l'un physiologique calcium (Ca^{2+})-dépendant (exocytose) et l'autre pharmacologique Ca^{2+} -indépendant. Le premier mode de libération implique l'exocytose dit tétradotoxine-sensible grâce à l'arrivée d'une dépolarisation

membranaire, potentiel d'action du flux de Ca^{2+} à la terminaison synaptique (Sharp et al., 1990). Le deuxième mode possible de libération est insensible au flux de Ca^{2+} et tétradotoxine-insensible et n'a été mis en évidence que sous l'action pharmacologique de diverses molécules (tels que la p-Chloroamphétamine, l'amphétamine et ses dérivés, ou la dexfenfluramine) induisant un fonctionnement inverse du transporteur sélectif de la sérotonine (5-HTT ou SERT) qui transfèrent la 5-HT du milieu intraneuronal vers le milieu extraneuronal (Rudnick et Wall, 1992),

La sérotonine dans la fente synaptique peut avoir plusieurs devenir : soit agir sur des récepteurs sérotoninergiques postsynaptiques et assurer la transduction du signal neuronal ; soit être recaptée par le transporteur SERT ; soit être dégradée par la monoamine oxydase MAO de type A principalement, en son principal métabolite, le 5-HIAA, qui sera excrété dans le LCR , le sang, puis les urines.

Différentes anomalies de l'activité du système sérotoninergique comme une diminution de la disponibilité du L-tryptophane, la quantité de 5-hydroxytryptophane (5-HTP), une dysfonction de la synthèse, de la libération, de la recapture et du métabolisme de la sérotonine ont été proposées comme étiologie ou facteur de risque de développement d'un épisode dépressif majeur (Maes et Meltzer, 2000). Certaines études ont proposé que la disponibilité du L- tryptophane jouerait un rôle important dans la physiopathologie de la dépression et la réponse de l'antidépresseur. En effet, une réduction du L-tryptophane dans la nourriture quotidienne peut induire des symptômes dépressifs dans certaines circonstances (Delgado et al., 1990).

La sérotonine cérébrale est impliquée dans de nombreux processus physiologiques variés (thermorégulation, contrôle cardiovasculaire, respiration, mémoire, appétition, etc.) et les comportements (agressivité, stress, sommeil, nage dans le test de Porsolt, etc.). Ceci est probablement en rapport avec la grande variété de récepteurs sérotoninergiques identifiée à ce jour : une quinzaine de types et sous-types différents. Il est donc nécessaire d'examiner l'activité des neurones sérotoninergiques.

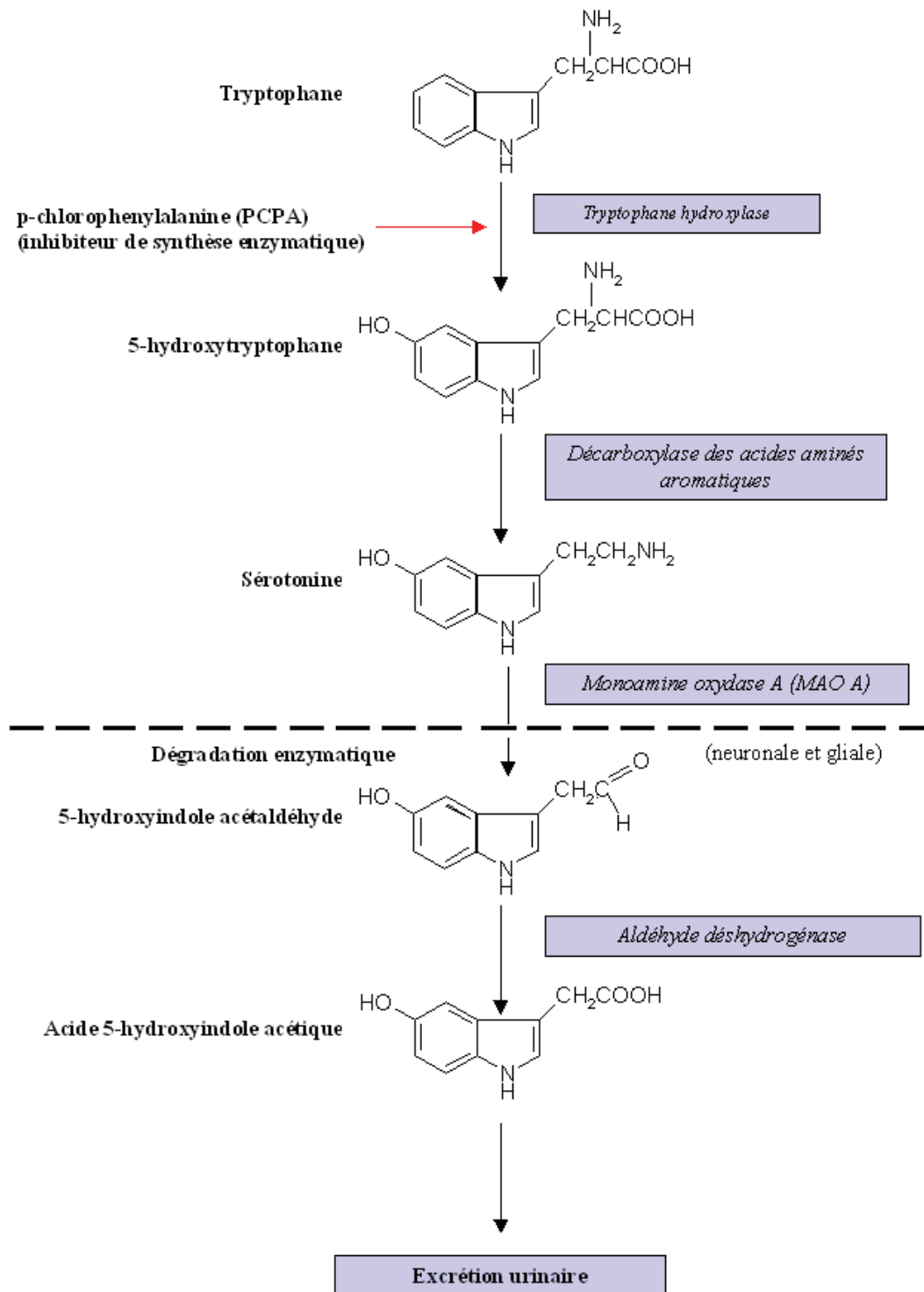


Figure 9: Métabolisme de la sérotonine.

A partir de l'isomère L du tryptophane, l'étape limitante dans la voie de biosynthèse de la sérotonine est catalysée par la tryptophane hydroxylase. Dans le système nerveux, cette enzyme est exclusivement localisée dans les neurones sérotoninergiques. D'après Hamon, 1995

1.3.2 Les neurones sérotoninergiques

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques identifiés par histochimie de fluorescence (Dahlstrom et Fuxe, 1964) et immunohistochimie (Jansson et al., 1998), situés principalement dans le tronc cérébral, constituent l'ensemble des noyaux du raphé (Dahlstrom et Fuxe, 1964). Environ 30% des neurones des noyaux du raphé sont sérotoninergiques. L'innervation sérotoninergique est diffuse et on peut détecter des terminaisons sérotoninergiques dans tout le SNC (Fuxe 1965). On en retrouve aussi dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus.

Les noyaux du raphé dorsal et médian sont composés de corps cellulaires, dont la majorité de fibres se terminent dans de nombreuses régions antérieures du cerveau et en particulier dans les structures limbiques comme le cortex préfrontal, le striatum, le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et les noyaux de l'amygdale (Vertes, 1991 ; Baumgarten et Grozdanovic, 1996; Petrov et al., 1994), impliquées dans le contrôle des émotions. Les noyaux du raphé magnus, pallidus et obscurus se projettent principalement du cerveau vers la moelle épinière par des voies descendantes.

De plus, les noyaux du raphé reçoivent des afférences de multiples origines : du septum, du cortex préfrontal et cingulaire, de la substance noire, de l'hypothalamus, de l'amygdale (Baumgarten et Grozdanovic, 1997; Jacobs et Azmitia, 1992; Peyron et al., 1998) et aussi des noyaux du raphé eux-mêmes, le noyau du raphé médian envoyant, par exemple, des projections qui se terminent dans le noyau du raphé dorsal (Adell et al., 2002; Tischler et Morin, 2003).

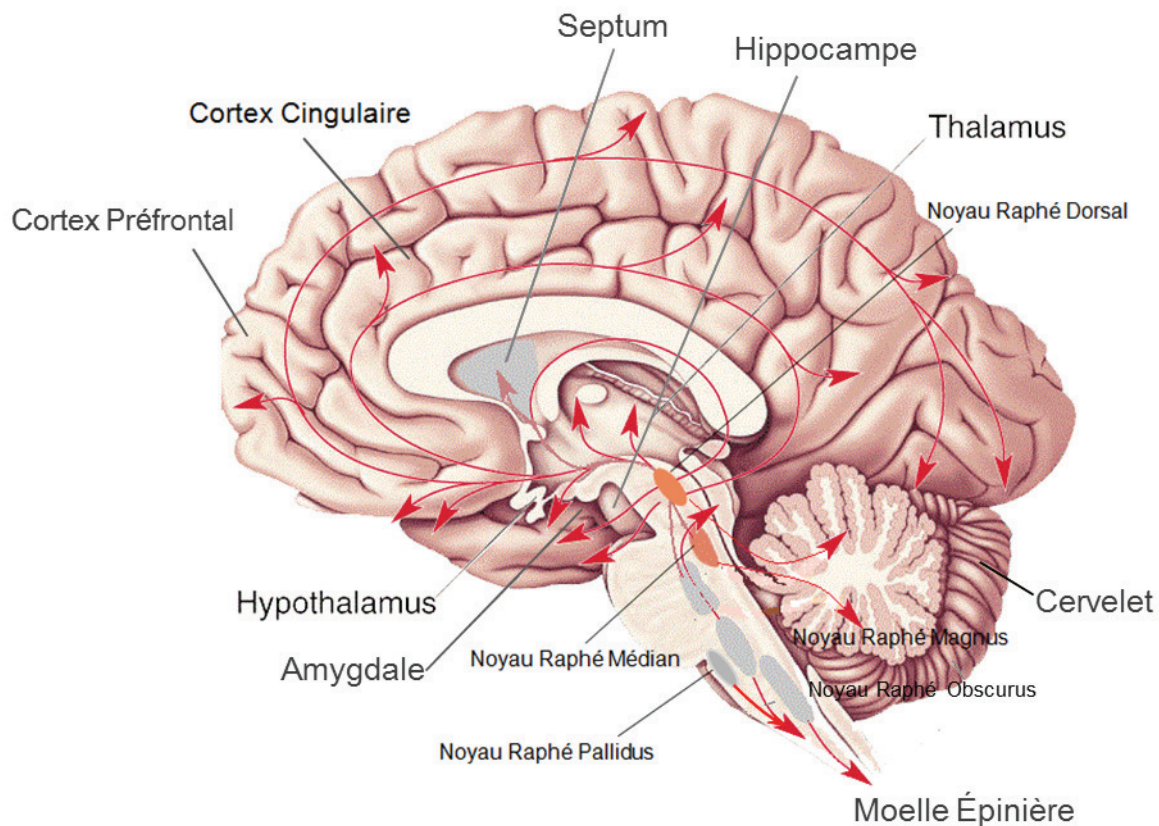


Figure 10: Représentation schématique de l'innervation sérotoninergique du Système Nerveux Central chez l'homme. (D'après Bear et al.,1999)

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont regroupés essentiellement en noyaux localisés dans la région sagittale du tronc cérébral, constituent l'ensemble des noyaux du raphé (dorsal, médian, magnus, pallidus et obscurus). Les fibres des noyaux du raphé dorsal et médian se terminent dans le cortex préfrontal, le striatum, le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et les noyaux de l'amygdale. Les noyaux du raphé magnus, pallidus et obscurus se projettent principalement du cerveau vers la moelle épinière.

1.3.3 Les récepteurs sérotoninergiques

Le système sérotoninergique comprend une quinzaine de types et sous-types de récepteurs de la sérotonine (Pytliak et al., 2011) classés en 7 familles (Tableau 7) : 5-HT₁ (1A, 1B/1D, 1E, 1F) ; 5-HT₂ (2A, 2B, 2C) ; 5-HT₃ (3A, 3B, 3C), 5-HT₄ (4A-4H), 5-HT₅ (5A, 5B), 5-HT₆ et 5-HT₇ (Tableau 8). Parmi ces récepteurs, le récepteur

de 5-HT_{5B} est exprimé spécifiquement chez les rongeurs, pas chez l'homme. Ces récepteurs appartiennent à la super-famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Tableau 7), sauf le récepteur de 5-HT₃ qui est un canal ionique (Figure 11). Les RCPG ont comme effecteur final soit un canal ionique, soit une enzyme membranaire (Figure 8).

Family	Potential	Type	Mechanism of action
5-HT ₁	Inhibitory	G _i /G _o -protein coupled	Decreasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₂	Excitatory	G _{q11} -protein coupled	Increasing intracellular concentration of IP3 and DAG
5-HT ₃	Excitatory	Ligand-gated Na ⁺ /K ⁺ channel	Depolarization of cell plasma membrane
5-HT ₄	Excitatory	G _s -protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₅	Inhibitory	G _i /G _o -protein coupled	Decreasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₆	Excitatory	G _s -protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₇	Excitatory	G _s -protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP

Tableau 7: Les différents types de récepteurs de la sérotonine (5-HT). (D'après Pytliak et al., 2011)

IP3: inositol trisphosphate; DAG: diacylglycerol; cAMP: cyclic adenosine monophosphate. Sources: Hannon et Hoyer 2002, Berger et al. 2009

Receptor	Effects and functions	Agonists	Antagonists
<i>5-HT_{1A}</i>	CNS: Aggression, Anxiety, Addiction, Appetite, Emesis, Impulsivity, Memory, Mood, Nausea, Nociception, Respiration, Sleep, Sociability, Thermoregulation, Sexual behavior Cardiovascular system: Blood pressure, Heart rate, Cardiovascular function, Vasoconstriction, Penile erection Other: Pupil dilation	buspiron, dihydroergotamine, eltoprazine, ergotamine, flesinoxan, flibanserin, gepirone, ipsapirone, methysergide, quetiapine, tandospirone, urapidil, yohimbine, ziprasidone	spiperone, alprenolol, asenapine, cyanopindolol, iodocyanopindolol, lecozotan, methiothepin, oxprenolol, pindolol, propranolol
<i>5-HT_{1B}</i>	CNS: Aggression, Anxiety, Learning, Addiction, Locomotion, Memory, Mood, Sexual behavior Vessels: Pulmonary vasoconstriction, Penile erection	dihydroergotamine, eletriptan, eltoprazine, ergotamine, methysergide, sumatriptan, zolmitriptan	yohimbine, alprenolol, asenapine, cyanopindolol, iodocyanopindolol, isamoltane, metergoline, methiothepin, oxprenolol, pindolol, propranolol
<i>5-HT_{1D}</i>	CNS: Locomotion, Anxiety Vessels: Cerebral vasoconstriction	sumatriptan, almotriptan, dihydroergotamine, eletriptan, ergotamine, frovatriptan, methysergide, naratriptan, rizatriptan, yohimbine, zolmitriptan	ketanserin, metergoline, methiothepin, rRauwolscine, ritanserin
<i>5-HT_{1E}</i>	CNS: Memory	eletriptan, methysergide, tryptamine	methiothepin
<i>5-HT_{1F}</i>	Blood Vessels: Vasoconstriction CNS: Locomotion? Anxiety?	eletriptan, naratriptan, sumatriptan	methiothepin
<i>5-HT_{2A}</i>	CNS: Anxiety, Appetite, Addiction, Cognition, Imagination, Learning, Memory, Mood, Perception, Sexual behaviour, Sleep, Thermoregulation Smooth muscles: Contraction Vessels: Vasoconstriction, Vasodilation Platelets: Aggregation	bufotenin, ergonovine, lisuride, LSD (in CNS), mescaline, myristicin, psilocin, psilocybin, yohimbine	aripiprazole, clozapine, cyproheptadine, eplivanserin, etoperidone, iloperidone, ketanserin, methysergide, mirtazapine, nefazodone, olanzapine, quetiapine, risperidone, ritanserin, trazodone, ziprasidone
<i>5-HT_{2B}</i>	CNS: Anxiety, Appetite, Sleep Gastrointestinal tract: GI motility Vessels: Vasoconstriction Cardiovascular system: Cardiovascular function	α -metyl-5-HT, fenfluramine, LSD (in CNS), norfenfluramine	agomelatine, asenapine, ketanserin, LSD (PNS), methysergide, ritanserin, tegaserod, yohimbine
<i>5-HT_{2C}</i>	CNS: Anxiety, Appetite, Addiction, Locomotion, Mood, Sexual behaviour, Sleep, Thermoregulation Gastrointestinal tract: GI motility Vessels: Vasoconstriction, Penile erection	α -metyl-5-HT, aripiprazole, ergonovine, lorcaserin, LSD (in CNS)	agomelatine, asenapine, clozapine, cyproheptadine, eltoprazine, etoperidone, fluoxetine, ketanserin, lisuride, LSD (in PNS), methysergide, mianserin, mirtazapine, nefazodone, olanzapine, risperidone, ritanserin, trazodone, ziprasidone

<i>5-HT₃</i> (<i>5-HT_{3A}</i> , <i>5-HT_{3B}</i>)	CNS, PNS: Anxiety, Addiction, Anxiety, Nausea, Emesis, Learning, Memory, Neuronal excitation Gastrointestinal tract: GI motility, Nausea, Emesis	α -metyl-5-HT, quipazine	aloseptron, clozapine, dolasetron, granisetron, memantine, metoclopramide, mianserin, mirtazapine, olanzapine, ondansetron, quetiapine, tropisetron
<i>5-HT₄</i> (<i>5-HT_{4A-B}</i>)	CNS: Anxiety, Appetite, Learning, Memory, Mood, Respiration Gastrointestinal tract: GI motility	cisapride, metoclopramide, mosapride, prucalopride, renzapride, tegaserod, zacopride	L-lysine, piboserod
<i>5-HT₅</i> (only <i>5-HT_{5A}</i> receptor in humans)	CNS: Locomotion, Sleep	ergotamine, valerenic acid	asenapine, dimebolin, methiothepin, ritanserin
<i>5-HT₆</i>	CNS: Anxiety, Cognition, Learning, Memory, Mood	EMD-386.088, EMDT	aripiprazole, asenapine, clozapine, dimebolin, iloperidone, olanzapine
<i>5-HT₇</i>	CNS: Anxiety, Memory, Mood, Respiration, Sleep, Thermoregulation Vessels: Vasoconstriction	5-carboxytryptamin, LSD	aripiprazole, asenapine, clozapine, iloperidone, ketanserin, metiotepin, olanzapine, ritanserin

Tableau 8: Les différents sous-types de récepteurs de la sérotonine (5-HT), les principaux effets liés à leur activation, les agonistes et antagonistes sélectifs de ces récepteurs (D'après Pytliak et al., 2011)

CNS: central nervous system; PNS: peripheral nervous system; LSD: lysergic acid diethylamide (lysergide); EMDT: 2-ethyl-5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine; GI: gastrointestinal.

Tous les sous-types de récepteurs peuvent se trouver sur les neurones postsynaptiques (Pytliak et al., 2011). Par ailleurs, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont localisés aussi sur les corps cellulaires des neurones présynaptiques et dendritiques (Hamon et al., 1995). Une stimulation des récepteurs présynaptiques peut inhiber l'activité électrique des neurones (ou firing), la synthèse et la libération de la sérotonine car ces autorécepteurs sont couplés à une protéine Gi/o et mobilisent une conductance potassique quand ils sont activés (effecteur, un canal K⁺) (Hamon et al., 1984 ; Gothert, 1990).

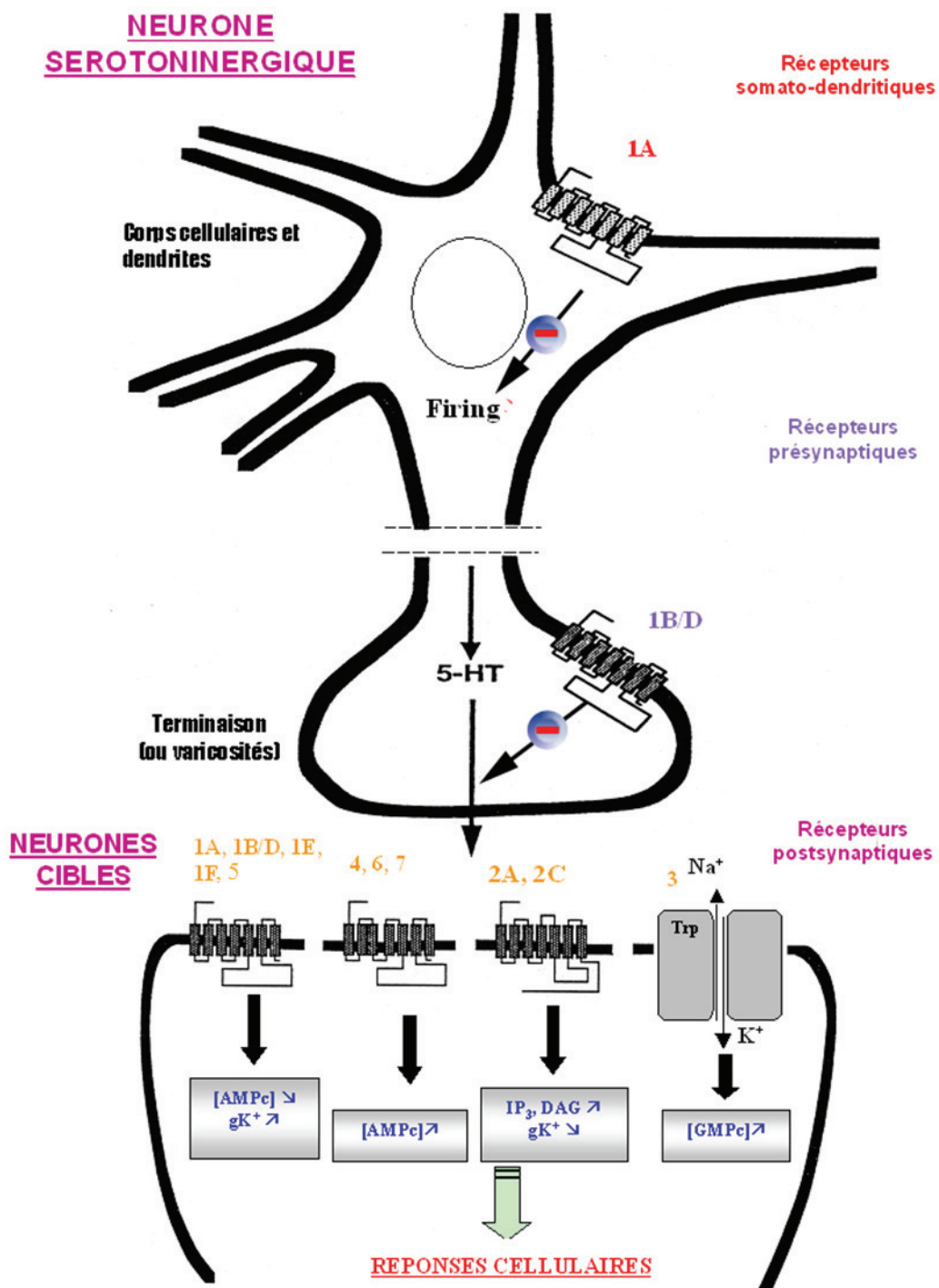


Figure 11: Représentation schématique de la localisation pré- et postsynaptiques des différents types de récepteurs de la sérotonine. D'après Hamon, 1995.

Je limiterai la présentation des récepteurs de la sérotonine à certains sous-types davantage en accord avec la thématique de ce travail : les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}.

L'activité d'un neurone sérotoninergique est en partie régulée par deux types d'autorécepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} et par le transporteur de la sérotonine (5-HTT) (Piñeyro et Blier, 1999). Pendant l'activité électrique, la sérotonine est libérée par les terminaisons neuronales et active les récepteurs 5-HT disponibles. Pour réguler l'activité électrique et la libération de la sérotonine, trois mécanismes de rétrocontrôle ont été identifiés permettant de moduler l'activité de ces neurones. Premièrement, le transporteur 5-HTT membranaire situé sur la terminaison synaptique et les dendrites des neurones sérotoninergique : il sert à la recapture de la sérotonine et assure son retour dans le neurone qui l'a libérée. Ce transporteur est la cible des principaux antidépresseurs actuels, les ISRS qui le bloquent de façon dose-dépendante. La conséquence de ce blocage est le maintien de concentrations élevées de 5-HT dans la synapse, et donc une activation de la neurotransmission sérotoninergique centrale.

Ensuite, l'activation des autorécepteurs 5-HT_{1B} au niveau de la terminaison synaptique inhibe directement la libération de la sérotonine.

Enfin, l'autorécepteur 5-HT_{1A} somatodendritique dont l'activation diminue indirectement la libération de la sérotonine grâce à l'inhibition de l'activité électrique des cellules (Olivier et Oorschot, 2005).

1.3.4 Rôles des récepteurs 5-HT1A/1B dans les troubles anxio-dépressifs

1.3.4.1 Le récepteur 5-HT1A

1.1.2.4.1 La distribution, l'expression d'ARNm et la fonction des récepteurs 5-HT1A

Le récepteur 5-HT1A a été décrit pour la première fois en 1981 (Pedigo et al., 1981) et a été le premier récepteur sérotoninergique entièrement séquencé (Kobilka et al., 1987). Parmi les récepteurs de la sérotonine, le récepteur 5-HT1A est le plus largement distribué dans les régions cérébrales, et est probablement le mieux étudié.

Les gènes, HTR1A (codant pour le récepteur 5-HT1A humain) et htr1a (codant pour celui de Rat), ont été isolés par criblage de banques génomiques avec des séquences d'ADN homologues aux adrénorécepteurs, puis identifiés chez l'Homme et le Rat (Albert et al., 1990). Le récepteur 5-HT1A humain présente 89% d'homologie avec celui du Rat.

Les différents modulateurs tels que Deaf1, Freud-1, Freud-2, REST, et HES (Figure 12) contrôlent l'expression du gène du récepteur 5-HT1A. Parmi ces modulateurs, Deaf 1 semble jouer un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression pré- et postsynaptique du récepteur 5-HT1A notamment en raison d'un polymorphisme chez l'homme qui modifie sa capacité à se fixer sur la région promotrice du gène.

Au niveau présynaptique, Deaf-1 réprime l'expression du récepteur 5-HT1A. En effet, lorsqu'il se lie sur une cytosine située en position « 1019 », il diminue l'expression de l'autorécepteur 5-HT1A. Au contraire, la présence d'une guanine empêche la fixation de Deaf-1, ce qui favorise cette expression. Chez la souris Deaf^{-/-} l'expression de l'ARNm et de la protéine du récepteur 5-HT1A et le nombre de cellules 5-HT1A-positives sont augmentés dans le raphé dorsal, mais le taux de sérotonine est diminué. Il n'y a pas d'effets sur les autres marqueurs sérotoninergiques tel que le taux de l'ARNm de TPH2, les cellules TPH-positives (Czesak et al., 2012)

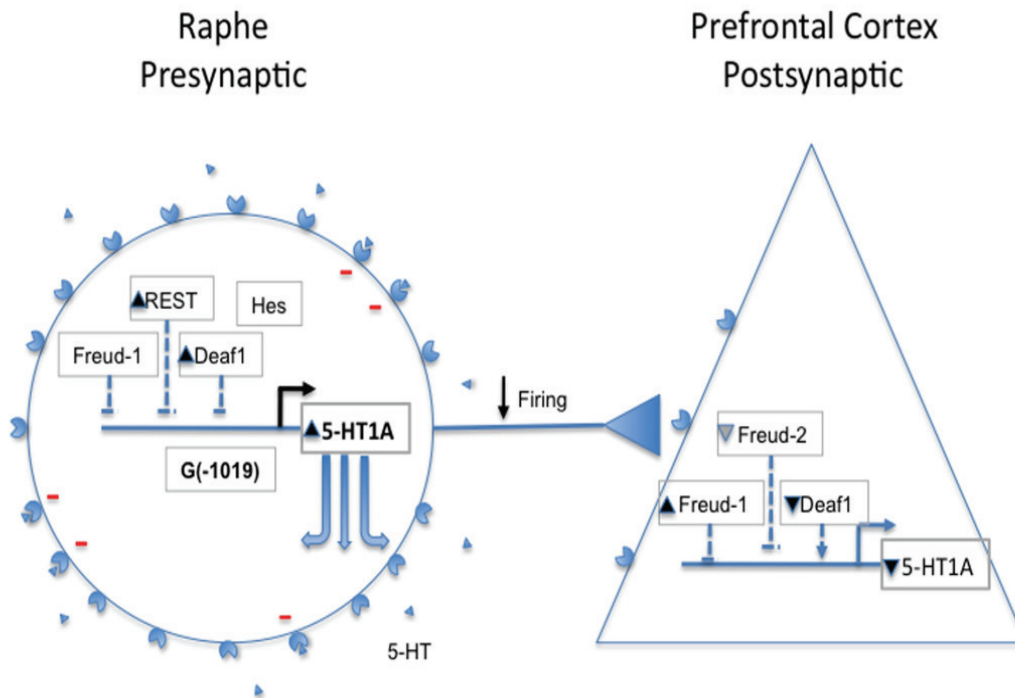


Figure 12: Régulation de l'expression du récepteur 5-HT1A (D'après Albert et François, 2010)

Au niveau postsynaptique, Deaf-1 joue un rôle complètement différent puisqu'il semble exercer une activité similaire à celle d'un « *enhancer* » de telle sorte que la présence de la cytosine augmente l'expression de l'hétérorécepteur tandis que celle de la guanine réduit cette expression (Albert et François, 2010; Albert et Lemonde, 2004). La souris *Deaf^{-/-}* présente une diminution de l'ARNm du récepteur 5-HT1A et du nombre de cellules 5-HT-positives dans le cortex frontal, mais pas dans l'hippocampe (Czesak et al., 2012).

D'autres facteurs de transcription mentionnés ci-dessus interviennent également dans la régulation de l'expression du récepteur 5-HT1A. Les protéines Hes sont présentes uniquement dans les précurseurs neuronaux et les neurones immatures. Chez les souris KO *Hes1*, l'expression de l'ARN du récepteur 5-HT1A est augmentée dans le cerveau des embryons (Jacobsen et al., 2008) suggérant que l'allèle G(-1019) peut entraîner une altération des taux de récepteurs 5-HT1A pendant la période embryonnaire.

Dans le système nerveux central, les études par autoradiographie et immunohistochimie de la distribution des récepteurs 5-HT1A montrent leur présence

dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le septum, l'amygdale, et une forte densité dans les noyaux du raphé chez l'Homme comme chez le Rat. On le retrouve également dans les noyaux gris centraux et le thalamus en faibles quantités (Vergé et al., 1986 ; Riad et al. 2000). De plus, ces études immunohistochimiques ont démontré directement la présence des récepteurs 5-HT_{1A} sur les corps cellulaires et les dendrites des neurones sérotoninergiques dans les noyaux dorsal et médian du raphé. Les études récentes par immunohistochimie (protéines) ou hybridation *in situ* (ARNm) ont montré que dans le cortex préfrontal, environ 60% de cellules glutamatergiques et environ 25% de cellules GABAergiques expriment l'ARNm du récepteur 5-HT_{1A} chez le rat (Santana, et al., 2004), et dans des proportions similaires chez le primate (De Almeida et Mengod, 2008).

Les récepteurs 5-HT_{1A} dans le noyau du raphé ont une localisation généralement présynaptiques, tandis que les récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe, le septum et le cortex sont largement postsynaptiques (Barnes et Sharp, 1999; Hoyer et al., 2002 ; Vergé et al., 1986) (Figure 11). Sur les sites postsynaptiques, la liaison de la 5-HT sur le récepteur 5-HT_{1A} active ce récepteur et induit l'hyperpolarisation de la membrane par stimulation de l'ouverture des canaux K⁺ (Sanders-Bush et Canton, 2000). L'activité des neurones sérotoninergiques présynaptiques dans le noyau du raphé dorsal (NRD) peut être inhibée par leur propre neurotransmetteur, la sérotonine, le récepteur 5-HT_{1A} exerçant alors un effet de rétrocontrôle négatif (Aghajanian 2000, Pineyro et Blier, 1999), responsable d'une hyperpolarisation de la membrane stimulée par l'augmentation de la conductance de K⁺ : cette boucle de régulation permet une diminution de la synthèse et de la libération de la 5-HT (Blier et de Montigny, 1983; Sprouse et Aghajanian, 1987).

Des différences de régulation entre les récepteurs 5-HT_{1A} pré- (i.e. les autorécepteurs) et post-synaptiques ont été observées. Ceci serait lié à la nature de la protéine Gi/o couplée au récepteur : Galpha(i3) exclusivement dans les noyaux du raphé, Galpha(o) et Galpha(i3) dans le cortex ou Galpha(o) surtout dans l'hippocampe (Mannoury la Cour et al., 2006). Dans certaines conditions pharmacologiques (Le Poul et al., 2000 ; Schechter et al., 1990), les capacités d'adaptations fonctionnelles des autorécepteurs somatodendritiques du NRD et des hétérorécepteurs postsynaptiques dans les structures limbiques (hippocampe en

particulier) présentent des différences notables. L'administration chronique d'ISRS (Le Poul et al., 2000) induit une désensibilisation fonctionnelle des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD, sans effet sur la fonction des récepteurs postsynaptiques dans l'hippocampe. A l'inverse, il a été montré, grâce aux techniques d'électrophysiologie, qu'après 2 à 3 semaines de traitement avec un antidépresseur tricyclique, ou d'électrochocs, la sensibilité des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques de l'hippocampe pouvait être augmentée (Haddjeri et al., 1998 ; Shen et Meller, 2002).

1.3.4.1.1 Les récepteurs 5-HT_{1A} et les troubles anxio/dépressifs

Evidences chez l'Homme

Etant donné le rôle central du récepteur 5-HT_{1A} dans la régulation du système sérotoninergique, de nombreuses études ont examiné le rôle de ce récepteur dans l'étiologie de l'anxiété/dépression. Le Tableau 9 indique le niveau d'expression des récepteurs 5-HT_{1A} dans différentes structures cérébrales chez les sujets dépressifs. Utilisant différentes méthodes (liaison, PET, ARNm), la plupart de ces études sont en faveur d'une baisse ou d'une absence de modification de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}. Ainsi, une tendance à une diminution de leur expression apparaît comme un bon indicateur d'un état dépressif. Le niveau d'expression des récepteurs 5-HT_{1A} est diminué chez les patients dépressifs par rapport à des sujets sains : ces effets correspondent à des réponses à l'agoniste du récepteur 5-HT_{1A} in vivo et à la liaison de ce récepteur à des fragments de tissu cérébral (Drevets et al., 2007).

Tableau 9 souligne la variabilité de ces résultats, probablement en raison des variations de l'intensité de l'état dépressif des patients, de la nature de leur traitement antidépresseur, des approches méthodologies et/ou, des régions cérébrales étudiées. Par exemple, des études *post mortem* menées chez des patients suicidés soulignent l'importante augmentation de la densité des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD (Stockmeier et al., 1998; Boldrini et al., 2008). D'autres études de tomographie par émission de positrons (PET) chez des patients dépressifs vivants, ont révélé une diminution de la capacité de liaison de ces récepteurs (Meltzer et al., 2004; Drevets et al., 2007). Cependant, chez ces patients, de nombreux éléments peuvent expliquer cette diminution d'expression du récepteur,

notamment la diminution du nombre de neurones sérotoninergiques, un traitement antidépresseur ou une élévation chronique des concentrations de cortisol plasmatique.

Région cérébrale	Méthode	Variation	Références
Raphé	Liaison	Augmentation	Stockmeier et al., 1998
Raphé	Liaison	Diminution	Arango et al., 2001
Raphé	PET	Diminution	Drevets et al., 2000 ; Meltzer et al., 2004
Hippocampe	ARNm	Diminution	Lopez-Figueroa et al., 2004 ;
Cortex frontal	PET	Diminution	Bhagwagar et al., 2004 ; Sargent et al., 2000 ; Drevets et al., 2000.
Cortex frontal	ARNm	Diminution	Lopez-Figueroa et al., 2004 ;
Raphé	PET	Inchangé	Bhagwagar et al., 2004
Hippocampe	Liaison	Inchangé	Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997
Cortex frontal	Liaison	Inchangé	Arranz et al., 1994; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997
Cortex frontal	PET	Inchangé	Meltzer et al., 2004

Tableau 9: Résumé de l'expression des récepteurs 5-HT1A chez des patients dépressifs d'après la littérature.

En outre chez les individus dépressifs suicidés. une diminution du nombre de neurones sérotoninergiques exprimant le transporteur de la sérotonine dans le noyau du raphé dorsal (Arango et al., 2001) est accompagnée d'une diminution du nombre de projections sérotoninergiques vers le cortex (Austin et al., 2002). Du côté post-synaptique, une diminution de l'expression d'ARNm de ce récepteur a été observée dans l'hippocampe des patients (Lopez-Figueroa et al., 2004). La diminution des récepteurs 5-HT1A a également été mesurée par PET dans le cortex préfrontal chez

des patients souffrant d'épisodes dépressifs (Sargent et al., 2000; Drevets et al., 2007; Hasler et al., 2007; Moses-Kolko et al., 2008).

On sait que le récepteur 5-HT1A est impliqué dans le traitement de la dépression et de l'anxiété. En effet, en clinique, différents types d'agents pharmacologiques ciblant le récepteur 5-HT1A sont utilisés dans le traitement de différents troubles anxio-dépressifs :

- l'agoniste des récepteurs 5-HT1A, la buspirone pour ses propriétés anxiolytiques modérées chez l'homme (Feighner et Boyer, 1989), mais plus convaincantes dans des modèles animaux (Costall et al., 1988).
- Un beta bloquant, le pindolol, utilisé pour ses propriétés antagoniste des récepteurs 5-HT1A a été proposé afin de diminuer le long délai d'action des ISRS (Blier et Bergeron, 1995 ; Artigas et al., 1996) et augmenter leur efficacité clinique chez les patients résistants à un traitement antidépresseur classique (Arborelius et al., 1996). Cette co-administration dès le début du traitement permet une inactivation plus rapide des autorécepteurs 5-HT1A que celle obtenu lors de la désensibilisation progressive de ces autorécepteurs après traitement chronique avec un ISRS (Stockmeier et al., 1992).

Evidences dans des modèles animaux

Afin de mieux comprendre le mécanisme de l'activation des récepteurs 5-HT1A et les conséquences comportementales dans les troubles anxio-dépressifs, les chercheurs ont créé différentes souris mutées pour le récepteur 5-HT1A, dites «knockout» constitutives, obtenues par recombinaison homologue (KO 5-HT1A) issues de trois fonds génétiques différents, [fond 129/Sv (Ramboz et al., 1998), C57Bl/6J (Heisler et al., 1998) et Swiss Webster (Parks et al., 1998)]. Ces différents modèles ont permis de confirmer que le récepteur 5-HT1A module les comportements de type anxieux. Toutes les souris KO 5-HT1A de trois fonds génétiques différents présentent un phénotype hyper-anxieux dans plusieurs tests comme le labyrinthe en croix surélevé, le test de la double enceinte éclairée et le test du champ ouvert ou « *Open Field* » (Heisler et al. 1998; Parks et al. 1998; Ramboz et al. 1998; Zhuang et al. 1999).

D'autres modèles, issus d'une construction génétique plus complexe, ont permis de mettre en évidence que l'activation de l'hétérorécepteur postsynaptique 5-HT_{1A} au cours du développement normalise le comportement émotionnel chez la souris (Gross et al., 2002). Il semble que l'expression du récepteur 5-HT_{1A} dans l'hippocampe et le cortex soit essentielle pour établir un phénotype comportemental « normal » (Gross et al., 2002; Alexandre et al., 2006; Deng et al., 2007). Des études très récentes ont également montré que la suppression génétique des autorécepteurs tout au long de la vie de l'animal est nécessaire et suffisant pour induire un phénotype anxieux chez l'animal (Richardson-Jopnes et al., 2011).

Il faut noter que les animaux surexprimant le récepteur 5-HT_{1A} pendant la période postnatale, présentent, à l'inverse, des comportements anxieux réduits (Kusserow et al., 2004).

Enfin de façon, intéressante, il a été rapportée que l'augmentation de la neurogenèse par les ISRS est bloquée chez les souris KO 5-HT_{1A} (Santarelli et al., 2003). Or, ce processus semble être un des éléments nécessaires (mais pas suffisant) pour obtenir la réponse antidépressive d'un ISRS. En effet, dans les modèles animaux d'anxiété/dépression, par exemple le stress modéré chronique ou « *chronic mild stress* » (CMS) (Bessa et al., 2009), comme dans le modèle CORT développé par le Dr Denis DAVID chez le Pr René HEN (Columbia University, New York, USA) et conjointement au laboratoire (David et al., 2009), un traitement chronique aux ISRS induit une amélioration comportementale chez la souris, qui est corrélée à une augmentation de la neurogenèse hippocampique adulte. Ceci avait été montré au préalable chez le rat naïf, non déprimé (Malberg et al., 2000). En effet, un traitement chronique de fluoxétine induit la prolifération des cellules progénitrices du gyrus dentelé de l'hippocampe, et accélère la maturation des nouveaux neurones qui vont intégrer le circuit neuronal (Encinas et al., 2006; Wang et al., 2008).

1.3.4.2 **Le récepteur 5-HT_{1B}**

1.3.4.2.1 La distribution, l'expression d'ARNm et la fonction des récepteurs 5-HT_{1B}

Le récepteur 5-HT_{1B} a été identifié en 1981 à l'aide de la spiperone qui présente une faible affinité pour ce récepteur par rapport au récepteur 5-HT_{1A}

(Pedigo et al., 1981). On a d'abord pensé que, dans le cerveau des Rongeurs, la distribution et les seconds messagers couplés au récepteur 5-HT1B sont similaires à ceux du récepteur 5-HT1D chez les Mammifères, conduisant à la conclusion que les récepteurs 5-HT1B et 5-HT1D sont les variants d'un même récepteur chez différentes espèces (Zifa et Fillion, 1992).

L'actuelle classification des récepteurs sérotoninergiques distingue le récepteur 5-HT1B de Rat du récepteur humain, anciennement 5-HT1D β , par les préfixes « r » pour Rat et « h » pour Homme (pour revue voir Hoyer et al. (2002)). Ce récepteur a été isolé chez le Rat (Voigt et al., 1991) à partir d'une banque d'ADNc de cerveau antérieur et cloné chez la souris à partir d'une banque génomique (Maroteaux et al., 1992). Le récepteur 5-HT1B humain est caractérisé par une homologie de 96% avec le récepteur 5-HT1B de Rat (Jin et al., 1992). Les différences pharmacologiques entre ces deux homologues résident dans la mutation d'un seul acide aminé, l'acide aspartique (Asp123) en arginine (Arg123). Chez le Rat, ces récepteurs ont pu être distingués des sites 5-HT1D par leur affinité élevée pour certains antagonistes des récepteurs β -adrénergiques (pindolol, cyanopindolol) ou encore pour un agoniste, le CP 93129 (Barnes et Sharp, 1999).

Les études d'autoradiographie, utilisant des molécules marquées telle que la [3H]-5-HT en présence de 8-OH-DPAT, ou le [125I]-cyanopindolol en présence d'isoprénaline, démontrent que le sous-type de récepteur sérotoninergique 5-HT1B est retrouvé, chez le Rat, dans les ganglions de la base et particulièrement dans la substance noire, le globus pallidus, le pallidum ventral et les noyaux entopédunculaires (Bruinvels et al., 1993; Pazos et Palacios, 1985; Verge et al., 1986). Les études *d'hybridation in situ* ont permis de localiser l'ARNm codant pour les récepteurs 5-HT1B dans le raphé médian et dorsal (Boschert et al., 1994; Doucet et al., 1995). Cette quantité d'ARNm est largement réduite par la lésion des fibres 5-HT par une neurotoxine, la 5,7-DHT (Doucet et al., 1995). Récemment, chez l'Homme, une étude sur des cerveaux en *post-mortem* utilisant la technique *d'hybridation in situ* a permis de retrouver de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT1B dans le noyau du raphé dorsal (Bidmon et al., 2001). Certaines aires du cerveau antérieur de Rat, comme le striatum, contiennent une grande quantité de sites de liaison expriment aussi l'ARNm du récepteur. Cependant, la distribution

régionale du récepteur 5-HT1B chez le Rat ne semble pas correspondre à celle de son ARNm suggérant que les récepteurs 5-HT1B sont exprimés à distance de leur lieu de synthèse. Des aires cérébrales comme la substance noire, le globus pallidus ou le noyau entopédonculaire qui présentent elles aussi une densité importante de récepteurs, ont de faibles quantités d'ARNm. Dans l'hippocampe, l'ARNm du récepteur 5-HT1B est localisé dans les corps cellulaires des cellules pyramidales de la région CA1, tandis que la protéine est présente dans la zone de projection des neurones CA1 pyramidaux (Boschert et al., 1994). La même étude montre que l'ARNm est exprimé dans les cellules de Purkinje, dans lesquelles aucun site de liaison 5-HT1B n'est retrouvé. Les données anatomiques indiquent donc que le récepteur 5-HT1B est largement exprimé dans le cerveau de Rat aussi bien en tant qu'autorécepteur, contrôlant la libération de sérotonine, mais aussi en tant qu'hétérorécepteur contrôlant la libération d'autres neurotransmetteurs comme la dopamine (Sarhan et al., 2000), le glutamate (Bobker et Williams, 1989), l'acétylcholine (Cassel et al., 1995) ou le GABA (Feuerstein et al., 1996).

Ainsi, la fonction du récepteur 5-HT1B dépend de sa location. Dans le cortex frontal, il agit comme un récepteur terminal inhibant par exemple la libération de dopamine (Pytliak et al., 2011), dans les neurones présynaptiques où il joue un rôle d'autorécepteur, il contrôle la libération de la sérotonine par les terminaisons neuronales sérotoninergiques (Doucet et al., 1995). Le rôle d'autorécepteur (inhibiteur) du type 5-HT1B, a été confirmée en comparant *in vitro* (Pineyro et al., 1995) et *in vivo* (Trillat et al., 1997) les effets d'un antagoniste, le CP 93129 sur la libération de 5-HT chez des souris contrôles dites sauvages ou « *wild-type* » (WT) exprimant le récepteur à des souris « *knock-out* » (KO) privées du récepteur 5-HT1B dans l'hippocampe et le cortex frontal. Les concentrations extracellulaires basales de 5-HT des différentes régions riches en terminaisons neuronales sérotoninergiques sont normales chez ces souris KO 5-HT1B, c'est-à-dire sont comparables à celles des souris WT non mutées (Trillat et al., 1997; Pineyro et al., 1995). De même, pour l'activité électrique ou « *firing* » des neurones du raphé dorsal (étude d'électrophysiologie de Evrard et al., 1999). Ces résultats suggèrent que, en conditions basales, l'autorécepteur 5-HT1B n'exerce pas de contrôle tonique sur la libération de 5-HT par les terminaisons neuronales chez la souris.

1.3.4.2.2 Les récepteurs 5-HT_{1B} et les troubles anxio/dépressifs

Certain chercheurs ont mesuré une réduction de la liaison du récepteur 5-HT_{1B} dans le striatum ventral chez les patients dépressifs (Murrough et Neumeister, 2011). Cependant, son implication précise dans les troubles anxio-dépressifs reste à définir.

Les souris KO 5-HT_{1B} présentent une augmentation de leur comportement agressif, du comportement exploratoire et de l'impulsivité motrice par rapport au souris normales (Saudou et al., 1994, Ramboz et al., 1995; Brunner et Hen, 1997; Zhuang et al., 1999 ; Bouwknecht et al., 2001). Les souris KO 5-HT_{1B} ont aussi une réponse autonome et locomotrice exagérée à un stress aigu (Bouwknrecht et al., 2001). L'administration de 3,4-methylenedioxymethamphetamine provoque chez ces animaux une diminution du phénotype anxieux (Malleret et al., 1999).

Dans les tests comportementaux de peur non conditionnée, les souris KO 5-HT_{1B} ne présentent pas de différences par rapport à leurs congénères sauvages (Tableau 10).

Test	Paramètre observé	Effet de la mutation	Référence
Labyrinthe en Croix surélevée	Entrées dans les bras ouverts Temps passé dans les bras ouverts	Aucun effet	(Brunner, Buhot et al. 1999; Crabbe, Wahlsten et al. 1999; Malleret, Hen et al. 1999; Lopez-Rubalcava, Hen et al. 2000)
	Entrées dans les bras fermés Temps passé dans les bras fermés		
Champ Ouvert	Entrées dans le centre de l'Open Field Temps passé dans le centre de l'Open Field	Aucun effet	(Saudou, Amara et al. 1994; Crabbe, Wahlsten et al. 1999; Scearce-Levie, Viswanathan et al. 1999; Zhuang, Gross et al. 1999)
	Activité Locomotrice	↗	(Malleret, Hen et al. 1999)
Test de la cage claire/obscur	Temps passé dans le compartiment clair	Aucun effet	(Ramboz, Saudou et al. 1996)

Tableau 10 - Résumé du phénotype comportemental des souris KO 5-HT1B dans différents tests d'anxiété.

Dans le test de la nage forcée, les souris KO 5-HT1B, contrairement aux souris KO 5-HT1A, ne présentent pas de modifications du temps de nage à l'état basal (Gardier et al. 2001). De plus, les ISRS ne diminuent pas le temps d'immobilité des souris KO 5-HT1B suggérant que ces récepteurs sont nécessaires pour observer l'activité antidépressive des ISRS dans ce test.

Le récepteur 5-HT1B est important pour la modulation du comportement agressif et la fonction de la sérotonine dans les comportements. Ce récepteur joue un rôle important dans la pathophysiologie des pathologies psychiatriques telles que la dépression, l'anxiété et l'agressivité (Murrough et Neumeister, 2011 ; Ruf et Bhagwagar, 2009). Certaines études ont montré que les agonistes sélectifs du récepteur 5-HT1B (CP94253 ; CP93129 ; RU24969) diminuent les concentrations de 5-HT (Chenu et al., 2008; Filip et Bader, 2009; Sari, 2004), et réduisent le comportement agressif chez la souris (Fish et al., 1999; Miczek et De Almeida,

2001), tandis que les antagonistes (SB224289 ; GR127935) l'augmentent (Filip et Bader, 2009) ou potentialisent la libération de 5-HT (Fink et Gothert, 2007; Ruf et Bhagwagar, 2009).

1.4 L'axe HPA dans les troubles anxio-dépressifs

1.4.1 L'axe HPA et le stress

L'axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien, abrégé sous l'acronyme HPA (pour « *Hypothalamo-pituitary axis* ») est la voie finale commune à tous les circuits centraux activés lors d'un stress. L'hypothalamus est la structure cérébrale qui effectue le lien entre le système nerveux et le système endocrinien grâce à ces projections vers l'hypophyse. L'hypothalamus va recevoir des connexions directes et indirectes de l'ensemble du Système Nerveux Central. Cette position privilégiée lui permet d'intégrer une multitude d'informations de sources variées et lui donne une place idéale pour remplir un rôle d'« *homéostat* », un thermostat de l'homéostasie, de régulateur et d'horloge biologique.

En condition basale, les neurones parvo-cellulaires du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) libèrent deux neuropeptides : la « *corticotropin-releasing hormone* » (CRH), et « *l'arginine- vasopressine* » (AVP), au niveau de l'éminence médiane dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Ixart et al., 1991). Ils agissent sur les cellules corticotropes de l'antéhypophyse et induisent la libération d'« *adrenocorticotropic hormone* » (ACTH). L'ACTH est libérée dans la circulation sanguine pour agir sur le cortex surrénalien stimulant alors la sécrétion et la libération de glucocorticoïdes (GC) (Figure 13).

Les glucocorticoïdes (GC) (le cortisol chez l'humain ou la corticostérone chez le rongeur) sont les hormones effectrices de l'axe HPA, qui outre leur activité anti-inflammatoire et immunosuppressive, stimulent la synthèse du glucose et augmentent la mobilisation des acides gras et des protéines pour répondre à la demande métabolique plus élevée engendrée par un stress. La réponse de cortisol est un indicateur de l'activité de l'axe HPA qui est le système basal de la réponse au stress chez les primates (Herman et al., 2005). Les glucocorticoïdes jouent un rôle

extrêmement important dans les réactions de peur, d'anxiété et dans les états dépressifs. Ils exercent souvent leurs effets sur le comportement en augmentant ou diminuant l'efficacité de certaines voies neuronales.

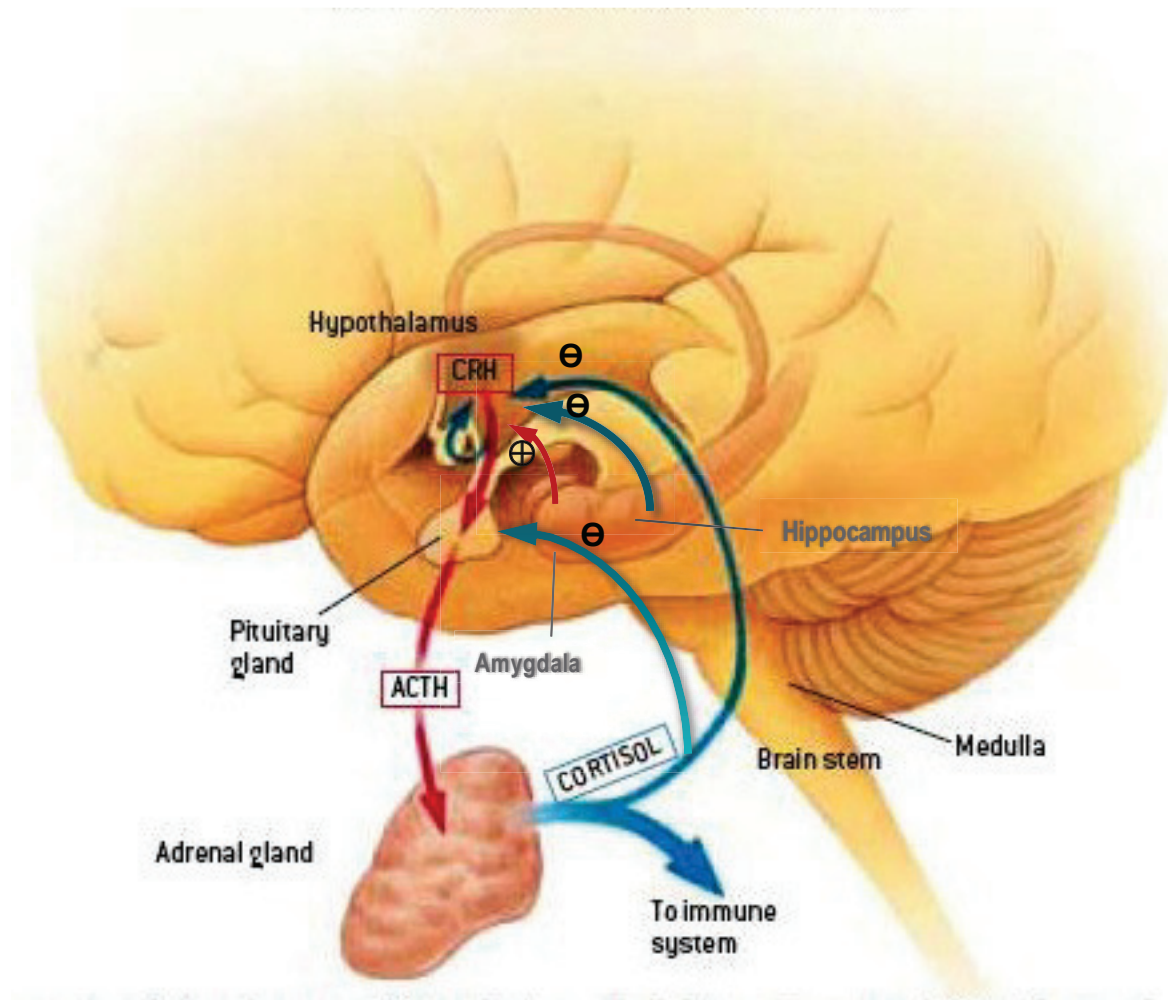


Figure 13: Activation et rétrocontrôle de l'axe Hypothalamo-hypophysio-surrénalien dans le cerveau humain. (D'après Eisen 2011)

Les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) intègrent l'information liée au stress. Les entrées neuronales incluent des afférences excitatrices (\oplus) de l'amygdale et inhibitrices (\ominus) de l'hippocampe. D'autres entrées importantes proviennent de la voie monoaminergique ascendante (non indiqué). Le CRH est libéré par ces neurones dans le système porte hypophysaire et agit sur ses récepteurs de l'hypophyse antérieure ; leur activation entraîne la libération d'adrénocorticotrophine (ACTH). Celle-ci atteint la glande surrénale par voie sanguine, où elle stimule la libération de glucocorticoïdes. Parmi ses nombreuses fonctions, les glucocorticoïdes répriment la synthèse et la libération de CRH et d'ACTH directement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse mais aussi au niveau corticolimbique (hippocampe, cortex préfrontal, amygdale). De cette façon, les

glucocorticoïdes peuvent inhiber leur propre synthèse. À des niveaux supérieurs, ils peuvent aussi affaiblir, et même endommager en cas d'excès, ses régulateurs ce qui pourrait maintenir les états hypercortisolémiques retrouvés fréquemment dans la dépression. D'après (Nestler et al., 2002).

Les stress provoquent la libération de catécholamines (adrénaline, et noradrénaline) par le système nerveux sympathique, et de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. La libération des catécholamines est considérée comme la première vague de la réponse au stress. En effet, les catécholamines ont des effets de l'ordre de la seconde sur les cellules cibles, tandis que la libération des GC se fait avec une latence de quelques minutes, certains de ces effets pouvant quand même être détectés plusieurs heures après l'application du stress (McEwen et Sapolsky, 1995).

Au cours du stress, l'axe HPA est activé par les systèmes sympathiques, parasympathiques, limbiques ainsi que par le lobe préfrontal au niveau de l'hypothalamus. Les neurones parvocellulaires libéreront rapidement de la CRH et de l'AVP (Berkenbosch et al., 1989; Kovacs et Sawchenko, 1996; Plotsky, 1988). La CRH permet alors d'augmenter la libération d'ACTH et l'AVP potentialise l'effet de la CRH. Cette libération soutenue d'ACTH agit sur les surrénales et induit l'augmentation de la sécrétion de glucocorticoïdes dans la circulation sanguine. Il est à noter que le système nerveux sympathique induit une augmentation de la sensibilité des glandes surrénales à l'ACTH (Buijs et Kalsbeek, 2001). Cette activation de l'axe HPA augmente certaines fonctions en permettant la production d'énergie par les tissus de stockage ou la transformation des protéines en métabolites énergétiques. Ce supplément énergétique permet de lutter contre l'agent stressant en augmentant le rythme cardiaque et la disponibilité en énergie pour les muscles et le cerveau (Dallman, 1993; Mormede et al., 2007).

Les glucocorticoïdes inhibent les fonctions qui ne sont pas nécessaires pour la lutte contre un stimulus stressant. Afin d'éviter un emballement de l'axe HPA, il existe un système de rétrocontrôle négatif *via* les glucocorticoïdes (Figure 13), au niveau du NPV, de l'antéhypophyse de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex frontal, permettant une diminution des taux de glucocorticoïdes (Bao et al., 2008; McEwen, 2007). Le rétrocontrôle négatif est régulé par les récepteurs des glucocorticoïdes

(GRs) et des minéralocorticoïdes (MRs). L'analyse de l'expression de l'ARNm de ces récepteurs a montré que les GR et MR sont fortement exprimés dans l'hippocampe humain, et que leur distribution sous-régionale est différente selon les espèces (Seckl et al. 1991). Les GRs sont présents dans toutes les régions cérébrales et sont les plus abondants dans l'hypothalamus où ils peuvent réprimer l'activité du gène du CRH et de la vasopressine (Holsboer 2000), tandis que la plupart des MRs sont localisés dans l'hippocampe (Sanchez et al., 2000) où ils peuvent être co-exprimés avec les GRs dans beaucoup de neurones (Holsboer 2000). De plus, les glucocorticoïdes se lient aux MRs avec une affinité 10 fois plus élevée que celle pour les GRs (Holsboer 2000). Les MRs sont activés par une faible concentration de corticostérone et inhibe l'activité de l'axe HPA. Les GRs ne sont activés que par une forte concentration de corticostérone induit par un stress et inhibe l'excitabilité neuronale (Joëls et de Kloet, 1992). L'interaction entre les MRs et les GRs jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'axe HPA chez le Rat. Les effets inhibiteurs des MRs sur l'axe HPA peuvent être inversés par l'activation des GRs hippocampiques (Holsboer 2000). Les antagonistes des MRs entraînent une activité exagérée au stress (Oitzl et al., 1994 ; Reul et al., 1997), tandis qu'un antagoniste de GRs injecté directement dans l'hippocampe diminue la sécrétion d'ACTH et de corticostérone (Van Haarst et al., 1996).

1.4.2 L'axe HPA dans les troubles anxio-dépressifs

Au cours de 20 dernières années, plusieurs équipes de chercheurs ont proposé une hypothèse de la dépression associée à l'hyperactivité de l'axe HPA responsable d'une dérégulation de la synthèse/libération d'ACTH et de la sécrétion du cortisol chez les patients dépressifs (Holsboer, 2000). Les observations cliniques ont montré que les troubles sont liés à :

- 1) une augmentation de la concentration de la CRH centrale (Nemeroff et al., 1984) et des concentrations d'ACTH (Holsboer, 2000)
- 2) une augmentation du nombre de neurones sécrétant la CRH dans les régions cérébrales limbiques (Raadsheer et al., 1994)

- 3) une hypo-sensibilité du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes suite à leur administration chronique à forte dose (cf *Infra*, Maes et Meltzer, 2000). De plus, le lien causal entre ce dysfonctionnement et l'apparition de troubles dépressifs est renforcé par la forte occurrence d'épisodes dépressifs chez les sujets présentant un syndrome de Cushing (hypertrophie des glandes surrénales qui est à l'origine d'une hypersécrétion chronique des corticostéroïdes) (Carroll et al., 2007).

En effet, l'activité de rétrocontrôle négatif de l'axe HPA peut être détectée par un test de suppression à la dexaméthasone (DST). La dexaméthasone est un corticostéroïde exogène qui induit une diminution des glucocorticoïdes endogènes grâce à l'activation du rétrocontrôle négatif dans les heures après l'injection. L'avantage de ce test est qu'il peut être réalisé aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. On peut ainsi valoriser le modèle animal si on obtient des résultats comparables dans ce test à ceux obtenus chez l'Homme. Ainsi, le prétraitement de la dexaméthasone améliore la libération d'ACTH, suite à celle de CRH, chez les patients dépressifs (Holsboer, 2000). Chez le rat, l'administration de dexaméthasone diminue la disponibilité du L-tryptophane pour le cerveau et induit une augmentation significative de l'activité de la pyrrolase hépatique (Morgan et Badawy, 1989). Chez les patients dépressifs, la dexaméthasone réduit également la concentration plasmatique de L-tryptophane (Meas et al., 1990). Ces observations ont proposé un lien entre le système sérotoninergique et l'axe HPA. Ensuite, certaines études ont montré que les glucocorticoïdes accélèrent la synthèse et le renouvellement de la sérotonine dans le cerveau chez le rat (Chaouloff, 1993 ; Singh et al., 1991). L'hypersécrétion de glucocorticoïdes diminuerait la sensibilité du récepteur 5-HT_{1A} postsynaptique ou de la transduction du signal chez les sujets dépressifs (Deakin et al., 1990 ; Lesch et al., 1990) et augmenterait la densité du récepteur 5-HT₂ dans le cortex préfrontal (Kuroda et al., 1992). De plus, chez les rongeurs, un traitement chronique avec des glucocorticoïdes change les fonctions (Morgan et al., 1989) et les comportements contrôlés par le récepteur 5-HT_{1A} (Morgan et al., 1989 ; David et al., 2009). Par contre, le système sérotoninergique peut modifier l'effet du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes sur la fonction de l'axe HPA. Certains travaux de recherche ont montré que l'épuisement de la sérotonine dans les

structures hippocampiques (Seckl et Fink, 1991) ou la diminution de la neurotransmission centrale de sérotonine dans la dépression majeure (Maes et Meltzer, 2000) peut atténuer le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur l'axe HPA par une diminution de l'expression des GRs et MRs, et induire ainsi une sécrétion immodérée de corticostéroïdes endogènes (Maes et al., 1991). Enfin, un traitement avec la fluoxétine ou l'imipramine augmente l'expression de l'ARNm du MR et l'efficacité du rétrocontrôle négatif sur l'expression de l'ARNm de la CRH dans l'hypothalamus (Brady et al., 1992).

Par ailleurs, des perturbations à plusieurs niveaux de l'axe HPA peuvent soit augmenter, soit diminuer les niveaux de l'anxiété (Koob et Heinrichs, 1999). Les effets de la CRH sont contrôlés par deux récepteurs spécifiques : CRH-R1 et CRH-R2 (Chalmers et al., 1995). La diminution de l'expression du taux de CRH-R1 produit un effet anxiolytique chez les rats stressés (Liebsch et al., 1999). Les souris homozygotes mutées pour le récepteur CRH-R1 présentent une atrophie de la glande surrénale, une diminution de la libération d'ACTH et de corticostérone induite par le stress, et présentent un phénotype moins anxieux (Timpl et al., 1998 ; Smith et al., 1998). De plus, un antagoniste du récepteur CRH-R1 réduit significativement les scores de dépression et d'anxiété chez les patients (Holsboer, 2000). En revanche, certaines études ont trouvé qu'une déficience du récepteur CRH-R2 augmente le comportement d'anxiété (Bale et al., 2000 ; Kishimoto et al., 2000). Quand la CRH a été injecté dans le cerveau des rongeurs, cette surexpression de la CRH a augmenté l'anxiété chez les souris (Stenzel-Poore et al., 1994). Par ailleurs, un traitement de métyrapone, un inhibiteur de la synthèse de cortisol et de corticostérone, produit un effet antidépresseur dans les tests comportementaux chez le rat (Healy et al., 1999). De plus, après le traitement antidépresseur, une réponse émoussée d'ACTH à la CRH ou une forte concentration anormale et durable de la CRH augmente la risque de rechute et l'apparition d'une résistance au traitement chez les patients dépressifs (Heuser et al., 1996 ; Zobel et al., 1999).

1.5 Les antidépresseurs

Classiquement, la thérapie médicamenteuse constitue le principal traitement antidépresseur, complété par une approche de psychothérapie. Depuis les années 1950, les chercheurs ont découvert plusieurs classes d'antidépresseurs présentant notamment une toxicité moindre que celle rencontrée avec les TCA (voir pages 19 à 21, ci-dessus).

1.5.1 Les ISRS

Depuis les années 1980, le développement des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) a permis une avancée majeure dans le traitement de la dépression. Les ISRS augmentent les concentrations intrasynaptiques de sérotonine par blocage immédiat du transporteur sérotoninergique (SERT) qui assure la recapture de la sérotonine par le neurone. Cette augmentation se traduit par une plus grande intensité et durée de stimulation des récepteurs post-synaptiques (Lesch, 2001).

Des études *in vitro* montrent que les différents ISRS bloquent le transporteur SERT avec une affinité de 10 à 3000 fois supérieure à celle du transporteur de la noradrénaline (NAT).

Les études de microdialyse intracérébrale et d'électrophysiologie menées chez le rat ou la souris montrent que l'administration d'une dose unique d'ISRS provoque une plus forte augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT ([5-HT]_{ext}) autour des corps cellulaires situés dans les noyaux du raphé (Guilloux et al., 2006 ; Malagie et al., 1995) que dans les régions cérébrales riches en terminaisons sérotoninergiques (Guilloux et al., 2006 ; Malagie et al., 1995 ; Nakayama, 2002).

Cependant, suite au blocage de SERT par les ISRS, les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et terminaux 5-HT_{1B} sont activés par la 5-HT endogène qui s'accumule dans le milieu intra-synaptique. Un rétrocontrôle négatif s'exerce alors sur la libération de sérotonine. En microdialyse intracérébrale, après traitement chronique avec un ISRS, on observe une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} (Popa et al., 2010 ; Le Poul et al., 2000), c'est-à-dire objectivé par l'absence

de réponse d'un ligand sélectif de ces récepteurs : un agoniste, le 8-OH-DPAT (Dawson et al., 2002; Newman et al., 2004) ou un antagoniste, le WAY 100635 (Dawson et al., 2002; Hervas et al., 2001), sur la neurotransmission 5-HT chez le Rat. Les études observant les effets d'un traitement ISRS chronique sur l'activité des autorécepteurs terminaux 5-HT_{1B} amènent à des conclusions contradictoires. Si certaines révèlent des modifications de l'activité inhibitrice des autorécepteurs 5-HT_{1B} (Newman et al., 2004; Sayer et al., 1999), d'autres n'ont pas réussi à identifier de telles altérations chez le rat (Auerbach et Hjorth, 1995 ; Cremers et al., 2000) ou chez la souris (Gardier et al., 2003). Deux exemples :

- chez le Rat, l'administration chronique d'un ISRS, la fluoxétine, désensibilise les autorécepteurs 5-HT_{1B} dans le cortex frontal (Lifschytz et al., 2004).

- chez la souris, le blocage soutenu du transporteur de la sérotonine par la paroxétine (1 mg/kg/j pendant 14 jours), ne potentialise pas les effets d'une dose challenge de paroxétine sur les [5-HT]_{ext} dans l'hippocampe (Gardier et al., 2003).

Il est probable que des différences de conditions expérimentales (espèce animale, rythme d'administration, durée du traitement) expliquent les divergences constatées entre ces travaux.

Les effets thérapeutiques des antidépresseurs sérotoninergiques et autres sont observés seulement après un délai d'action de 3 à 4 semaines de traitement (Wang et al., 2001 ; Blier et De Montigny, 1994). Cependant, environ 30% des patients déprimés sont résistants au traitement. Ce long délai d'action serait associé à un profil temporel de désensibilisation des récepteurs spécifiques de la sérotonine (Gardier et al., 1996 ; Blier et al., 1998) et aussi aux changements structurels du circuit neuronal et l'implication de la neurogenèse hippocampique adulte (Duman et Charney, 1999 ; Sahay et Hen, 2007). Dans les modèles animaux d'anxiété/dépression, un traitement chronique aux ISRS induit une amélioration comportementale, qui est corrélée à une augmentation de la neurogenèse hippocampique (Malberg et al., 2000). Brièvement, l'ablation de la genèse de nouveaux neurones dans l'hippocampe par irradiation aux rayons X supprime à la fois la prolifération des cellules progénitrices du gyrus dentelé de l'hippocampe, la maturation des nouveaux neurones et certains effets comportementaux d'un

traitement chronique ISRS (Santarelli et al., 2003). De plus, l'augmentation de la neurogenèse hippocampique par les ISRS est bloquée chez les souris KO 5-HT1A de souche C57Bl/6j (Santarelli et al., 2003 ; Holick et al., 2008).

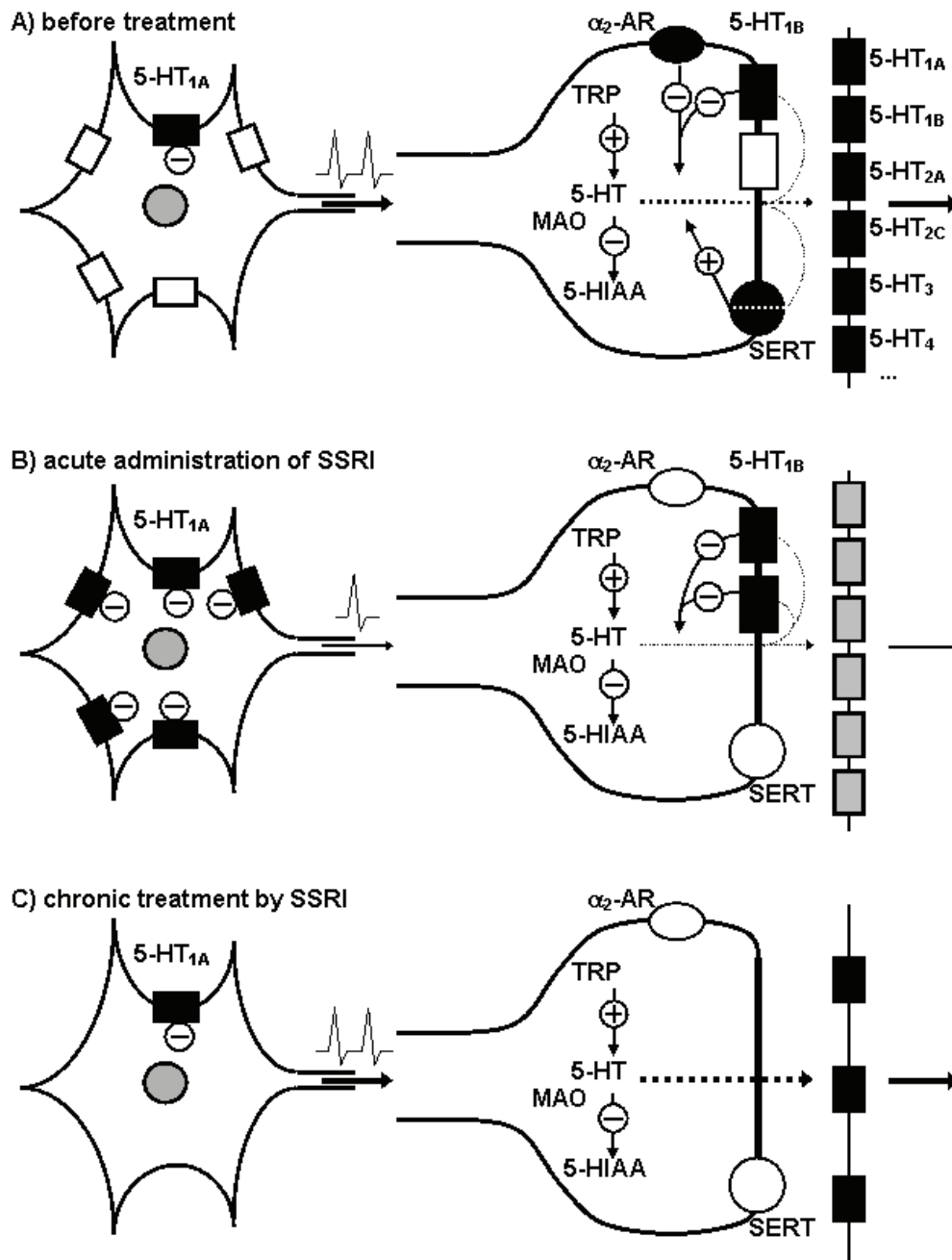


Figure 14 : Mécanisme d'action pré-synaptique des ISRS (d'après <http://psych.lf1.cuni.cz/bpen/psychopharmacology.htm>)

Avant le traitement (Figure 14A): Il y a un déficit relatif de 5-HT dans les neurones sérotoninergiques chez un patient dépressif. De nombreux types de récepteurs de la sérotonine sont surexprimés dont les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et terminaux 5-HT_{1B} présynaptiques ainsi que les récepteurs post-synaptiques. La libération

de la sérotonine dans la fente synaptique peut être affectée: 1. positivement par l'activité de transporteur de la sérotonine ou par la disponibilité du L-tryptophane (TRP, *précurseur de la sérotonine*); 2. négativement par l'activation des récepteurs présynaptiques 5-HT_{1B} et les récepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la libération de 5-HT.

Après l'administration aiguë des ISRS (Figure 14B): Le transporteur de la sérotonine est bloquée *par l'ISRS* ce qui a pour conséquence pour la sérotonine de rester plus longtemps dans l'espace extracellulaire. Cela provoque principalement une augmentation de la sérotonine dans la zone somatodendritique. Le rétrocontrôle négatif exercé par *les* récepteurs inhibiteurs présynaptiques et somatodendritiques est augmenté, les fréquences de la décharge des potentiels d'action et le montant de la sérotonine libérée au niveau présynaptique sont diminués.

Après un traitement chronique par ISRS (Figure 14C): L'augmentation de la 5-HT *extracellulaire* active de façon prolongée les autorécepteurs inhibiteurs somatodendritiques ce qui les désensibilise progressivement. Ce phénomène expliquerait pourquoi l'action thérapeutique des antidépresseurs n'est pas immédiate.

Les résultats sont plus convaincants concernant les autorécepteurs 5-HT_{1A}. un consensus existe chez les Rongeurs pour affirmer que l'administration chronique d'un ISRS désensibilise les autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodendritiques. L'effet thérapeutique des ISRS pourrait donc être potentialisé par le blocage des récepteurs 5-HT_{1A} par un antagoniste sélectif, empêchant ainsi l'inhibition de la libération de 5-HT par l'activation de ces autorécepteurs. Un traitement chronique avec la fluoxétine (Anthony et al., 2000; Neumaier et al., 1996) ou la paroxétine (Anthony et al., 2000) diminue l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT_{1A} dans les noyaux du raphé, mais pas dans l'hippocampe chez le rat. De plus, ces effets semblent être spécifiques des autorécepteurs puisqu'aucun changement n'a été observé sur les hétérorécepteurs des neurones non sérotoninergiques (Neumaier et al., 1996). Contrairement aux récepteurs 5-HT_{1A}, les arguments en faveur de la désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1B} après une administration d'un ISRS sont plus faibles (Jongsma et al., 2005).

La co-administration de molécules a été développée pour potentialiser l'efficacité des antidépresseurs en bloquant l'activité inhibitrice des autorécepteurs 5-HT_{1A}. Le (±)-pindolol présente, par exemple, une forte affinité pour les récepteurs β ₁ et β ₂ chez l'Homme, mais exerce aussi une action antagoniste de ces récepteurs. Il possède également une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} chez l'Homme et chez le Rat (Castro et al., 2000; Raurich et al., 1999). L'étude de la co-administration d'un ISRS (paroxétine ou fluoxétine) avec le (±)-pindolol chez l'Homme a montré que plus de 50% des patients non traités et des patients résistants au traitement présentaient une rémission de leur état dépressif (Artigas et al., 1994; Blier et Bergeron, 1995), une diminution du délai d'action de l'ISRS ainsi qu'une amélioration de l'efficacité antidépressive (Artigas et al., 1994; Blier et Bergeron, 1995; Blier et al., 1997; Sokolski et al., 2004; Maes, 1999). Les ISRS en co-administration doivent être utilisés aux mêmes posologies que celles connues pour être efficaces dans les états dépressifs majeurs.

Chez les souris contrôles WT 5-HT_{1A} +/+, le (±)-pindolol (1-10 mg/kg, s.c.) potentialise de façon dose dépendante l'augmentation des [5-HT]_{ext} corticales induite par la paroxétine, mais pas chez les souris KO 5-HT_{1A} (Guilloux et al., 2006). De plus, la perfusion locale intra-raphé de (±)-pindolol (100 μ M) potentialise les effets de la paroxétine (4 mg/kg, i.p.) dans le noyau du raphé dorsal. Dans les tests comportementaux, la co-administration de (±)-pindolol et de paroxétine bloque les effets de la paroxétine sur le temps d'immobilité chez les deux souches de souris WT contrôles et KO 5-HT_{1A}, mais ne modifie pas l'activité locomotrice de ces souris.

1.5.2 L'agomélatine

Dans l'optique d'améliorer le traitement de la dépression majeure, de nouvelles stratégies ont été mises en place. Le développement de molécules capables d'agir sur plusieurs systèmes à la fois semble une piste intéressante (Millan, 2009). En effet, par exemple, il a été montré que la co-administration d'un ISRS avec du lithium améliore les bénéfices thérapeutiques (McIntyre et Moral, 2006; Millan, 2006; Wong et al., 2008).

L'agomélatine (Valdoxan, S20098) développée par les laboratoires Servier, a été mise sur marche dans plus de 72 pays depuis 2009 dans le monde (Carney et Shelton, 2011). Cette molécule propose un mécanisme d'action original en agissant sur les systèmes mélatoninergique et sérotoninergique. Il s'avère que le rythme circadien et le sommeil régulés par la mélatonine est perturbé pendant un épisode dépressif (Arendt, 1998; Duncan, 1996; Germain et Kupfer, 2008; Morgan et al., 1994; Benca et Peterson, 2008; Papp et al., 2003), l'efficacité de soulager les troubles du sommeil est aussi un critère thérapeutique de meilleurs antidépresseurs dans le traitement des troubles dépressifs (Lam, 2006; Kupfer, 2006).

L'agomélatine est un analogue synthétique de la mélatonine (Cardinali et al., 2011) possédant des propriétés agonistes des récepteurs de la mélatonine 1 et 2 (Audinot et al., 2003), associées à des propriétés antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C} (Figure 1, Millan et al., 2003a). Par l'activation des récepteurs mélatoninergiques, l'agomélatine corrige la désynchronisation des rythmes circadiens dans plusieurs modèles chez l'animal (Redman et al., 1995, Martinet et al., 1996). Grâce à un blocage sur l'activité du récepteur 5-HT_{2C}, l'agomélatine produit un effet anxiolytique (Millan et al., 2003a, 2005) et augmente la transmission de la noradrénaline et la dopamine (Stahl et al., 2010 ; Millan et al., 2003). Ces propriétés sont des points majeurs bénéfiques dans le contrôle des troubles de l'humeur, de la réponse au stress et de l'activité antidépressive d'un composé (Giorgetti et Tecott, 2004; Millan et al., 2005 ; De Bodinat et al., 2010 ;). Par contre, l'agomélatine n'a pas d'effet sur la capture des monoamines et pas d'affinité significative sur les récepteurs adrénergiques, dopaminergiques ou GABAergiques (Carney et Shelton, 2011), confirmant ainsi l'originalité de son mécanisme d'action.

En préclinique, les résultats montrent que l'agomélatine possède des propriétés antidépressives et anxiolytiques dans plusieurs paradigmes comportementaux incluant :- le test de la nage forcée (Bourin et al., 2004 ; Rainer et al., 2011 ; Morley-Fletcher et al., 2011), le test de résignance acquise (« *the learned helplessness test* », Bertaina-Anglade et al., 2006), le test de suspension caudale (« *tail suspension test* », Yacoubi et al., 2011), le test de labyrinthe en croix surélevée (Morley-Fletcher et al., 2011 ; Rainer et al., 2011 ; Koresh et al., 2012), le

test de champ ouvert et le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Rainer et al., 2011) et ceci dans différents modèles animaux d'anxiété-dépression (Barden et al., 2005; Millan et al., 2005; Papp et al., 2003; Papp et al., 2006; Tuma et al., 2005 ; Rainer et al., 2011 ; Koresh et al., 2012 ; Yacoubi et al., 2011 ; Morley-Fletcher et al., 2011). De plus, l'administration chronique d'agomélatine améliore le rythme circadien ou rétablit les altérations induites par le stress sur le ratio d'activité jour/nuit chez les rongeurs (Rainer et al., 2011 ; Tuma et al., 2001 ; Redman et Francis, 1998;). Enfin, l'administration d'agomélatine réduit l'augmentation de la libération de la glutamate induite par le stress aigu dans le cortex préfrontal (Tardito et al., 2010, Musazzi et al., 2010).

Plusieurs études ont montré l'importance d'une synergie entre les propriétés antagonistes 5-HT_{2C} et agonistes MT₁ et MT₂ dans les effets comportementaux, neurochimique et cellulaires de l'agomélatine (Molteni et al., 2010 ; Norman et al., 2012a, Papp et al., 2003), qui sont récapitulées dans la figure XX.

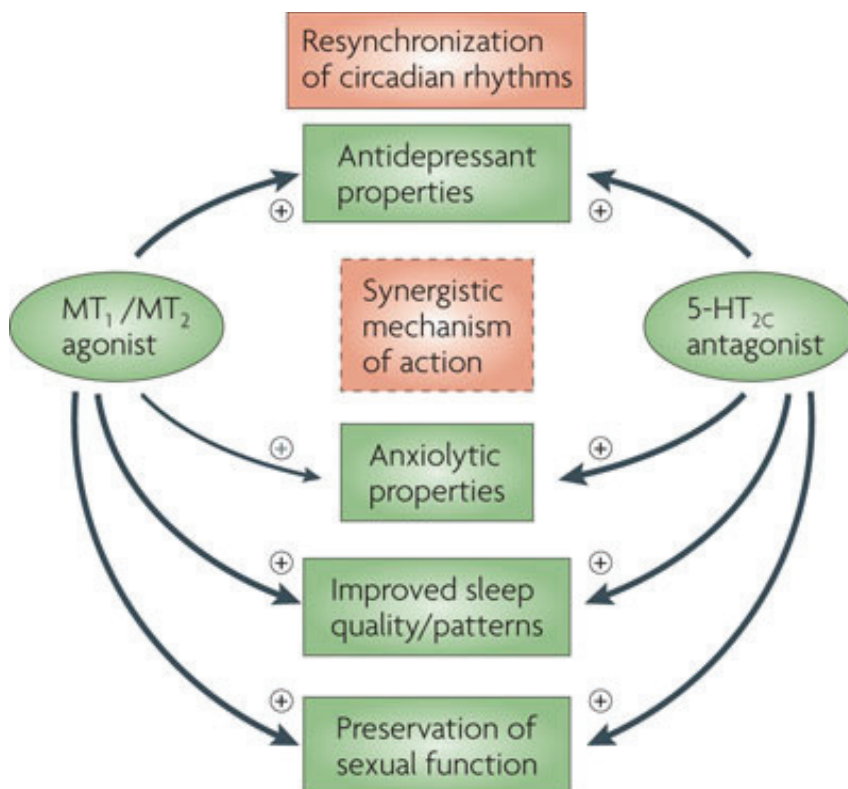


Figure 15: Représentation schématique du mécanisme d'action de l'agomélatine.

Les propriétés pharmacologiques de l'agomélatine agissent en synergie afin d'améliorer les états dépressifs, en resynchronisant les rythmes circadiens, en augmentant les connexions dopaminergiques et adrénergiques vers le cortex frontal, en améliorant la neurogenèse hippocampe et enfin sur les comportements anxieux, sexuels et de sommeil. D'après (de Bodinat et al., 2010).

Au niveau cellulaire, l'agomélatine semble jouer un rôle similaire aux ISRS et tricycliques, en augmentant la prolifération cellulaire dans le gyrus dentelé de l'hippocampe chez des rats adultes non stressés mais également dans des modèles de stress chroniques ou neuroendocriniens (Tableau 11).

Espèce/Modèle	Dose (mg/kg)	Durée (jours)	Prolifération	Différenciation	Survie	Maturation	Référence
Rat / Naïf	40	1	=	∅	∅	∅	Basnar et al., 2006
Rat / Naïf	40	7	=	∅	∅	∅	Basnar et al., 2006
Rat / Naïf	40	21	↗	∅	∅	↘	Basnar et al., 2006
Rat / Naïf	40	21	↗	↗	↗	↗	Soumier et al., 2009
Rat / Naïf	40	21	=	∅	=	↘	Dagyté et al., 2010, 2011
Rat / Naïf	40	21	=	=	=	∅	Morley-Fletcher, 2011
Rat / Exposition chronique à la corticostérone	40	14	↗	∅	∅	∅	AlAhmed et Herbert, 2010
Rat / Stress Chronique	40	21	=	∅	↗	↗	Dagyté et al., 2010, 2011
Rat / Stress prénatal	40	21	=	∅	↗	↗	Morley-Fletcher, 2011
Souris / Naïve	50	1	=	∅	∅	∅	Paizanis et al., 2010
Souris / Naïve	50	21	↗	=	=	=	Paizanis et al., 2010
Modèle Souris GR-i / Naïve	50	1	=	∅	∅	∅	Paizanis et al., 2010
Modèle Souris GR-i / Naïve	50	21	↗	↗	↗	∅	Paizanis et al., 2010

Tableau 11: Résumé des études des effets de l'agomélatine sur la neurogénèse hippocampique dans différents modèles animaux. Légende : ↗ augmentation du paramètre mesuré, = sans effets, ∅ non testé dans l'étude

Dans certaines études, un effet majeur a été décrit principalement dans la région ventrale de l'hippocampe (Banasr et al., 2004, Païzanis et al., 2010,). Enfin, l'agomélatine a également montré des effets bénéfique contre la diminution de neurogenèse chez des souris n'exprimant pas le récepteur aux glucocorticoïdes (Païzanis et al., 2010) ou dans différents modèles de stress (Dagyté et al., 2011, Morley-Fletcher et al., 2011, Rainer et al., 2011). Cette spécificité d'action sur la neurogenèse dans l'hippocampe ventral est particulièrement intéressante puisque cette structure, par sa localisation anatomique, est liée au cortex préfrontal et à l'amygdale, l'impliquant dans les circuits émotionnels et les états anxio/dépressifs (Bannerman et al., 2004; Engin et Treit, 2007; Fanselow et Dong, 2010; Moser et Moser, 1998).

Un traitement chronique d'agomélatine a également montré qu'il pouvait augmenter l'expression dans l'hippocampe de différents facteurs trophiques tels que le BDNF, Fgf2 (*fibroblast growth factor 2*) et de gènes de réponse immédiates, marqueur d'une activité neuronale accrue, tel que Arc (*activity regulated cytoskeletal-associated protein*) (Soumier et al., 2009, Calabrese et al., 2011), effet participant probablement à la réponse neurogénique mentionné précédemment (Soumier et al., 2009 ; Dagyté et al., 2010, 2011). Dans le modèle de souris GR-i, qui présentent une diminution de l'expression de GR responsable d'un déficit du rétrocontrôle de l'axe HPA, associé à un comportement axio-dépressif, un traitement chronique d'agomélatine augmente l'expression de BDNF et induit une normalisation de l'expression de GR (Païzanis et al., 2010) De même, dans un modèle de stress prénatal, un traitement chronique d'agomélatine reverse la diminution induite par le stress de l'expression de pCREB, ainsi que l'expression/l'activité des récepteurs glutamatergiques mGlu2/3 et mGlu5 (Morey-Fletcher, 2011). Dans d'autres modèles de stress post-traumatique chez le Rat, l'agomélatine après administration aigue reverse les effets induits par le stress sur l'expression et l'activité des gènes Per1 et Per2 (*period homolog 1 et 2*) dans plusieurs régions cérébrales limbiques (CA3 et DG de l'hippocampe) et dans le noyau suprachiasmatique, dans un modèle animal de stress aigu (Koresh et al., 2012).

Chez l'Homme, les études cliniques ont démontré une efficacité de l'agomélatine chez des patients dépressifs (Carney et al., 2011 ; Kennedy et Emsley, 2006; Kennedy et Rizvi, 2010; Loo et al., 2002; Olie et Kasper, 2007 ; Goodwin et al.,

2009). Chez les patients anxieux/dépressifs, l'agomélatine semble présenter un meilleur taux de réponse au traitement et la rémission des symptômes anxio-dépressifs (Loo et al., 2002 ; Olie et al., 2007 ; Stahl et al., 2010 ; Zajecka et al., 2010, Kasper et al., 2010 ; Stein et al., 2008). De plus, un traitement chronique par l'agomélatine (25-50mg/jour) améliore de façon significative l'altération du sommeil (qualité et durée) ainsi que les troubles du rythme circadien chez les patients dépressifs. (Kasper et al., 2010 ; Stein et al., 2008, Leproult et al., 2005 ; Quera Salva et al., 2007 ; Zupancic et al., 2006). Enfin, l'agomélatine semble présenter moins d'effets indésirables souvent reportés par les patients traités par ISRS ou tricycliques, notamment concernant la dysfonction sexuelle, l'absence de syndrome de discontinuation et de prise de poids (Montejo et al., 2011, 2010 ; Kenney et al., 2008).

1.6 Les modèles animaux

Dans le cadre de la compréhension des pathologies du SNC, tels que les troubles de l'humeur chez l'Homme, et du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, des modèles animaux mimant certains des symptômes présents chez l'homme sont développés depuis de nombreuses années (McKinney et Bunney 1969). Selon Willner (1984), un modèle animal reflétant un syndrome ou l'un des symptômes pathologiques chez l'Homme doit remplir trois critères de validité bien précis :

- une validité prédictive (« *predictive validity* »): un traitement (ici 'antidépresseur') connu pour être efficace chez l'Homme doit induire des effets comparables dans le modèle animal. De plus, le modèle doit être sélectif en distinguant les molécules psychoactives des faux positifs.
- une validité descriptive ou créative (« *face validity* »): les symptômes observés chez l'Homme doivent être comparables à ceux mesurés chez l'animal
- une validité de construction ou théorique (« *construct validity* »): le rationnel scientifique et les caractéristiques neurochimiques doivent être similaire entre l'Homme et le modèle.

Il est difficile pour un modèle animal de remplir ces 3 critères de validité, notamment dans les troubles anxieux et dépressifs qui regroupent notamment plusieurs formes pathologiques (selon le DSM-IV): par exemple l'anxiété généralisée, les troubles obsessionnels compulsifs, les troubles paniques, l'agoraphobie, la phobie sociale. De plus, certaines caractéristiques de ces pathologies chez l'Homme ne peuvent être établies que grâce à la relation orale que le patient entretient avec son médecin, ce qui n'est évidemment pas modélisable chez l'animal. D'autres aspects, comme la réponse à un stimulus aversif ou des données physiologiques permettent d'augmenter la pertinence du modèle animal à développer. D'une manière générale, on peut considérer qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle d'anxiété généralisée, mais au moins. Deux critères

indispensables, la reproductibilité et la robustesse, doivent être retrouvés dans la mise au point ou lors du choix d'un modèle animal (Willner 1984).

1.6.1 Les souris KO 5-HT1A/1B

Afin d'étudier l'implication des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B dans la physiopathologie et le traitement des troubles de l'humeur, nous avons créé au laboratoire un nouveau modèle de souris doublement mutées (double KO) pour ces deux sous-types de récepteurs de la sérotonine, les souris KO 5-HT1A/1B (Guilloux et al., 2011)

L'invention consiste à créer (le terme est mal approprié dans la mesure où des souris de ce type ont déjà été réalisées) une lignée de souris mutantes viables par croisement de lignées de souris pré-existantes et mutées pour le récepteur 5-HT1A (Parks et al., 1998) avec des souris mutées pour le récepteur 5-HT1B (Saudou et al., 1994). La caractérisation phénotypique de cette nouvelle lignée a été réalisée dans des tests comportementaux validés d'anxiété et de réponse aux traitements antidépresseurs.

Des souris mutées pour le récepteur 5-HT1A (KO 5-HT1A) et de souche C57Bl/6 ont été croisées avec des souris mutées pour le récepteur 5-HT1B (5-HT1B) et de souche 129Sv. Le croisement de souris de souches différentes permet une meilleure stabilité de la lignée et une meilleure survie des animaux. Dans la publication de Bonaventure et al. (2002), les auteurs ont également réalisé ce type de croisement, mais le fond génétique de la lignée était différent (fond 129S6/SvEvTac et 129S2/SvPas). De plus, la lignée n'existe plus dans cette équipe. Les animaux générés par ce croisement, sont des hétérozygotes mutés pour ces 2 récepteurs (5-HT1A/1B +/-) et ont ensuite été croisées afin d'obtenir des souris mutées pour les 2 récepteurs (KO 5-HT1A/1B) ainsi que leurs contrôles non mutés (WT 5-HT1A/1B +/+) de fond génétique mixte.

Ce modèle de souris double KO est un outil très intéressant pour étudier les comportements liés à l'anxiété/dépression. Le phénotype des souris KO 5-HT1A/1B inclut une diminution de l'activité exploratoire, une augmentation de la peur des environnements aversifs, ainsi qu'une diminution du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée (Guilloux et al., 2011). Ces souris présentent également des

concentrations extracellulaires basales de 5-HT (5-HT_{ext}) augmentées dans le cortex frontal et le noyau du raphé dorsal. Après une administration aiguë de paroxétine, elles montrent une augmentation de 7 fois des 5-HT_{ext} dans le cortex frontal et le noyau du raphé dorsal (Guilloux et al., 2011). Dernièrement, il a été montré que les souris KO 5-HT1A/1B répondent toujours à l'administration d'une dose unique de diazépam dans le test comportemental « *Elevated Plus Maze* » (EPM), mais pas à la paroxétine dans le test de la nage forcée. On observe qu'après le traitement chronique avec un ISRS, les souris KO 5-HT1A/1B présentent une diminution de leur phénotype anxieux dans le test « *Open Field* » et le test de « *Novelty Suppressed Feeding* ». La souris double KO 5-HT1A/1B est donc un modèle animal unique car il associe une hyper-anxiété sensible à un traitement anxiolytique aigu et à un traitement ISRS chronique, et une hyper-sérotoninergie notamment corticale.

1.6.2 Le modèle de souris CORT

Les stress sociaux ou le stress chronique induisent des perturbations de l'axe HPA chez le Rongeur. Cela se matérialise par une augmentation des concentrations plasmatiques en glucocorticoïdes (corticostérone). Ainsi, le modèle développé à partir de l'augmentation des concentrations en glucocorticoïdes par l'apport de corticostérone exogène (CORT) soit par injection sous-cutanée, pompe osmotique ou plus simplement par l'intermédiaire de l'eau de boisson ou dans la nourriture, permet d'étudier directement l'influence des glucocorticoïdes sur le développement d'un trouble anxieux.

La littérature indique un grand nombre d'études sur les effets de l'administration de CORT dans de nombreux paradigmes comportementaux associés à la dépression.

En outre, l'administration répétée de CORT semble inhiber le comportement sexuel (Gorzalka et al., 2001), une diminution de la prise de saccharose (Gorzalka et al., 2003; Gourley et al., 2009), mais également une diminution de la réponse à un renforcement alimentaire (Gourley et al., 2008) ainsi que le toilettage chez la souris (David et al., 2009), tous ces paramètres étant indicateurs d'une anhédonie. En plus de l'anhédonie apparente, ces animaux développent un phénotype anxio-dépressif à

travers l'évaluation comportementale dans le labyrinthe en croix surélevé (Pego et al., 2008), le « *light/dark* » (Murray et al., 2008), le test d'odeur de prédateur (Kalynchuk et al., 2004), les tests de comportements échappatoires, ou encore dans le paradigme de la nouveauté supprimant la faim, et le test du champ ouvert (David et al., 2009; Gregus et al., 2005; Skorzewska et al., 2006). L'apparition de la dépression sans phénotype anxieux est rarement référencer chez les patients (Mineka et al., 1998), ce qui renforce l'intérêt des résultats obtenus dans ce modèle. D'autres paramètres physiologiques indicateurs de la dépression sont également altérés dans ce modèle CORT, notamment la dérégulation des fonctions l'axe HPA ainsi que l'atrophie des glandes surrénales (Bush et al., 2003; Murray et al., 2008). En outre, la majorité des comportements induits dans ce modèle est corrigée par l'administration chronique d'un antidépresseur (Ago et al., 2008; David et al., 2009), supportant la validité prédictive de modèle préclinique de la dépression humaine.

Au delà des modifications comportementales induites par l'administration chronique de CORT, ce modèle présente également des modifications structurales liées à la plasticité. Ces changements sont accompagnés de déficit d'apprentissage et de mémoire (McEwen, 2000; McEwen, 2007; Southwick et al., 2005). Plusieurs études ont mis en évidence des atteintes de la plasticité localisées dans les régions cérébrales clefs impliquées dans la dépression. En effet, un remodelage dendritique induit par la CORT a été observé dans l'hippocampe (Magarinos et al., 1999; Magarinos et al., 1998; Southwick et al., 2005; Watanabe et al., 1992), l'amygdale (Mittra et Sapolsky, 2008), et le cortex préfrontal (Seib et Wellman, 2003). Ces résultats sont également présents dans des études *post-mortem* de patients souffrant de dépression (Konarski et al., 2008). En particulier, il est connu que l'exposition prolongée à la CORT induit une atrophie dendritiques des cellules pyramidales de l'hippocampe, une perte de volume des dendrites apicaux des régions CA3 et CA1 (Magarinos et al., 1999; Magarinos et al., 1998; Sousa et al., 2000). Bien que ces effets soient souvent réversibles après l'arrêt du stress (McEwen, 1999; McEwen et Olie, 2005; Pittenger et Duman, 2008; Sousa et al., 2000), une dose suffisamment élevée ou une durée d'administration de CORT suffisamment longue peuvent conduire à la mort cellulaire. De la même façon, l'atrophie relevée dans le cortex préfrontal qui apparaît dans ce modèle, implique une réorganisation de l'arborisation des neurones des couches corticales II-III (Wellman,

2001), et une diminution de la prolifération des cellules gliales et endothéliales (Alonso, 2000). En opposition aux observations cellulaires de l'hippocampe et du cortex préfrontal, une hypertrophie dendritique est constatée dans l'amygdale (Mitra et Sapolsky, 2008).

Une autre forme d'altération structurale de la plasticité associée à la dépression concerne la diminution de la prolifération cellulaire du processus de neurogenèse dans l'hippocampe adulte (David et al., 2009; Malberg et al., 2000). En plus de l'administration chronique de CORT, plusieurs modèles fondés sur le stress provoquent une diminution de la prolifération et de la survie cellulaire dans le cerveau de rongeurs adultes (David et al., 2009; Sapolsky, 2004; Wong et Herbert, 2005; Wong et Herbert, 2006). Ces observations sur la plasticité neuronale s'intègrent dans l'une des plus courantes hypothèses de l'étiologie de la dépression, stipulant qu'une altération de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte résulte de l'apparition d'un épisode dépressif (Duman et al., 2000; Jacobs et al., 2000).

L'administration de CORT chez l'Animal et chez l'Homme est associée à une réduction du facteur de transcription de l'élément de réponse liant l'AMPC (CREB; (Gourley et al., 2008; Pittenger et Duman, 2008)). Fait intéressant, l'activation de CREB induit la neurogenèse tandis que son inhibition la réduit (Nakagawa et al., 2002), faisant de CREB un acteur important de la stabilité neuronale associée au stress et à la dépression. Entre autres, CREB contrôle des gènes effecteurs, eux aussi impliqués dans la stabilité de la plasticité synaptique. L'un de ces gènes est celui codant pour le « *Brain-Derived Neurotrophic Factor* » (BDNF), qui joue un rôle critique sur la plasticité dans le développement, la survie et la fonction des neurones (Pittenger et Duman, 2008). Chez l'animal, l'exposition aux glucocorticoïdes altère aussi bien CREB que le BDNF dans les régions limbiques (Gourley et al., 2008; Jacobsen et Mork, 2006). Ceci a également été observé chez les patients atteints de dépression (Dowlatshahi et al., 1998; Dwivedi et al., 2003; Karege et al., 2002; Sen et al., 2008; Shimizu et al., 2003). Il faut bien sûr garder à l'esprit que toute modélisation animale d'une pathologie psychiatrique humaine possède ses limites.

En effet, le modèle animal fondé sur l'administration chronique de corticostérone n'est pas une simulation « réaliste » de la pathologie humaine. Toutefois, il permet de reproduire certaines altérations comportementales et

neurobiologiques semblables à celles observées dans la pathologie humaine. En outre, ce parallèle se poursuit dans la réponse aux traitements antidépresseurs. Par contre, dans ce modèle animal, des différences émotionnelles observées entre les mâles et les femelles sont analogues à l'Homme : les souris mâles présentent une augmentation du score d'émotion plus importante que les femelles dans les tests comportementaux d'anxiété (Guilloux et al., 2011).

1.7 La technique de microarrays

Les technologies génomiques, comme les puces à ADN, ont été utilisées pour étudier des processus biologiques des états normaux et pathologiques. Les puces à ADN peuvent aider à élucider ce que les gènes font, quand, où et comment ils s'expriment en tant qu'éléments d'un système orchestré dans le cadre des effets pharmacologiques, des perturbations (Imbeaud et al., 2005). L'expression du gène par les puces à ADN a été largement utilisée pour résoudre des questions complexes de biologie et a produit un nombre très important de données.

1.7.1 Brefs rappels techniques

Sur les *microarrays* ou puces sont fixées un grand nombre de sondes oligonucléotiques ou de molécules d'ADN complémentaires amplifiées de manière ordonnée, et placées sur la surface du support (verre, du silicium ou du plastique) à une très haute densité. Ensuite, les sondes sont hybridées avec les échantillons marqués par de la fluorescence, de la radioactivité ou de la chimioluminescence. Les chercheurs peuvent obtenir les informations sur des séquences ou sur les quantités de molécules par la détection de l'intensité de signal sur chaque sonde hybridée.

Le processus de *microarrays* inclut 4 étapes principales (Figure 16) :

1. La fabrication de la puce. La surface de verre ou du silicium est traitée afin de permettre l'implantation des fragments d'ADN sur la matrice. Typiquement, il y a deux formats basiques de puce à ADN (Gregg, 2002) : (1) les *arrays* d'oligonucléotides qui sont créés par la fixation de milliers d'oligonucléotides courts (15-25 paires de bases ou « mer »)

sur des supports solides, soit par la synthèse direct des oligonucléotides sur la surface, soit par la fixation chimique des oligonucléotides synthétiques ; (2) les « *spotted arrays* » qui contiennent des fragments d'ADN plus grands générés par les réactions de PCR ou par des clones génomiques (plus de 100 mer), ou des oligonucléotides longs (50-75 mer).

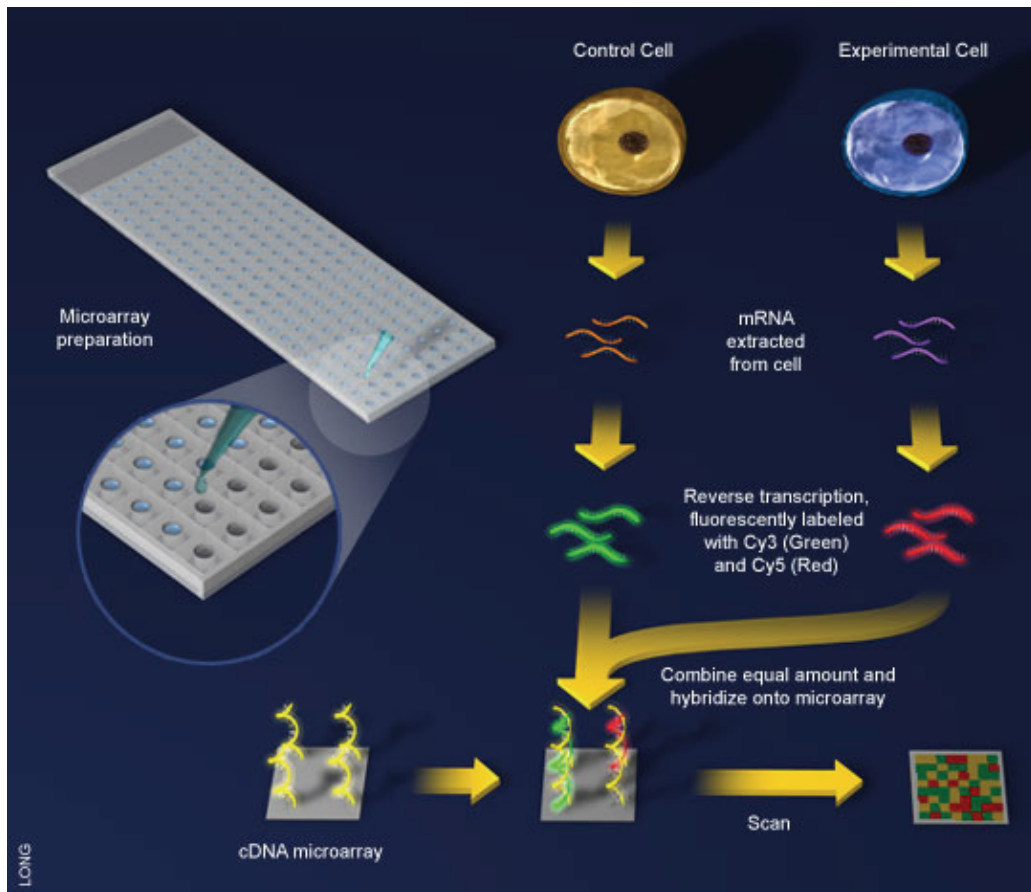


Figure 16: Processus de fabrication des microarrays

Les compagnies Affymetrix et Agilent qui sont 2 des 3 plus grosses compagnies productrices d'arrays les produisent de la première façon, mais la longueur d'oligonucléotides est différente, les sondes plus longues d'Agilent (60 mer) étant plus spécifiques des gènes cibles individuels, les sondes plus courtes d'Affymetrix (25 mer) pouvant être présentes à une densité plus élevée dans l'ensemble de puces et sont moins chers à fabriquer. Les sondes peuvent être changées, étendues

ou modifiées selon les nouveaux gènes découverts (Lockhart et Barlow, 2001). Il y a actuellement de nombreux types des microarrays commerciaux sur le marché.

2. La préparation d'échantillons. Cette étape inclut l'extraction d'ARN et le marquage des cibles. Les échantillons peuvent provenir de sources variées telles que les cultures cellulaires, les tissus animaux, les cheveux humains, le sang ou les plantes. Un échantillon biologique est souvent un mélange complexe de molécules biologiques. Les échantillons sont souvent disponibles en quantité très faible, et ils ne peuvent généralement pas être hybridés directement sur la puce. C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser des étapes d'extraction, purification et amplification pour obtenir l'ADNc et l'ARNc, qui sont ensuite marqués par des fluorophores de type cyanine afin d'améliorer la sensibilité de détection. Les échantillons biologiques sont facilement dégradables, et des variations dans le traitement expérimental des cellules et des tissus peuvent fortement influencer les résultats des mesures sur microarrays.

Le cerveau est un tissu complexe, hétérogène car il est constitué de diverses structures cérébrales, certaines d'entre elles étant elles-mêmes composées de plusieurs sous-zones, telles que l'hippocampe (GD, CA1, CA3), le raphé (NRD, NRM), le cortex (cingulé, préfrontal) et l'amygdale. Les profils de l'expression génique dans le cerveau semblent très spécifiques dans ces régions cérébrales. Ils sont dynamiques et sujet au changement dans la réponse et les changements de l'expression biologique peuvent être très subtils. La dissection de la région cérébrale reste très délicate: une microdissection « laser » de la région complexe pourrait augmenter la spécificité du résultat (Forster et al., 2003).

Donc, le traitement des animaux, l'anatomie des régions cérébrales, l'extraction d'échantillons doivent être précis et reproductible, et la haute qualité de l'ARN et d'efficacité de marquages doivent être parfaitement contrôlées. Enfin, les études réussies de microarrays

dépendent de l'extraction répétée d'un ARN de haute qualité (Forster et al., 2003).

3. L'hybridation des cibles marquées. Une comparaison entre le nombre d'échantillons et les puces nécessite de posséder un nombre comparable de paires d'échantillons pour les méthodes d'hybridation en mono-couleur et double-couleurs (Barlow et Lockhart, 2002).

La méthode mono-couleur possède une bonne reproductibilité, et les données filtrées de façon adéquate sur les puces du même type utilisé peuvent être comparées à celle de toutes autres puces du même type (Barlow et Lockhart, 2002).

Pour détecter de manière fiable les changements faibles de l'expression de gènes avec les puces d'hybridation en mode deux-couleurs, il est généralement nécessaire de co-hybridiser chaque paire d'échantillons (ADNc) marqués sur la même puce physique (Middleton et al., 2002). Les colorants fluorescents utilisés pour le marquage d'ADNc comprennent le Cy3, qui a une longueur d'onde d'émission de fluorescence de 570 nm (correspondant à la partie verte du spectre de la lumière), et Cy5 avec une longueur d'onde d'émission de fluorescence de 670 nm (correspondant à la partie rouge de la lumière spectre (Shalon et al., 1996). Cette méthode est cependant peu avantageuse lorsqu'il y a grand nombre de paires comparaisons nécessaires ou lorsque l'on veut rajouter des échantillons a posteriori dans l'analyse.

Pour cela, on utilise un échantillon dit « de référence » commun à toutes mesures de co-hybridation. Dans cette méthode, les expériences sont désignées en étoiles, chaque échantillon est comparé à la « référence » qui est soit une référence universelle proposée par le fabricant, soit une référence composée par un mélange des échantillons. Le plan d'expérience en étoile avec une référence commune s'est révélé être le mieux approprié aux questions posées et aux quantités d'échantillons disponibles dans le cadre de mon travail

Dans notre projet, nous avons travaillé en mode « deux couleurs » afin (1) de pouvoir étudier de grands groupes d'animaux et ainsi réduire le poids de la variabilité biologique interindividuelle et (2) de pouvoir par la suite prolonger l'étude avec de nouveaux groupes d'animaux.

4. La détection des signaux et l'analyse des résultats. Après l'hybridation, sur la puce, la position et l'intensité fluorescente de chaque sonde sont scannées et analysé par un logiciel spécifique (*Feature extraction*). Les fluorescences sont converties en données qui peuvent être associées à des informations biologiques. Les données sont extraites, identifiées, normalisées, filtrés et analysé par d'autres logiciels, proposés par le fournisseur ou libre d'accès (*Feature extraction, Mango, Genespring etc.*). Ces logiciels permettent la réalisation de l'analyse statistique et fournissent les informations sur la qualité d'hybridation ainsi que sur le comportement de gènes. Ces analyses permettent de mettre en évidence les gènes potentiellement exprimés différemment dans les différentes conditions testées. Cependant, du fait du très grand nombre de comparaisons réalisées, l'analyse peut produire un nombre non négligeable de faux-positifs et/ou faux-négatifs dans toutes les expériences (Evans et al., 2009). Pour cela, les résultats de microarrays doivent être confirmés par les autres techniques indépendantes, par exemple, la RT-qPCR (Lee et al., 2000) et les techniques d'hybridation *in situ* (Mirnics et al., 2000).

D'ailleurs, le design de l'expérience entier joue un rôle important pour les manipulations de *microarrays*. Le design expérimental doit tenir compte de la question biologique à l'étude, et devrait inclure les définitions statistiques afin d'obtenir des différences statistiquement significatives (Churchill, 2002 ; Glonek et Solomon, 2002 ; Yee et Speed, 2002). A cet égard, toutes les manipulations doivent être bien contrôlées et répétées, et il est essentiel que la constance soit assurée dans la logistique de l'expérience, son calendrier, l'échantillonnage et le marquage des produits biologiques, afin de réduire la source de variation non désirée (Forster et al., 2003).

Bien que la technique de microarrays ait atteint un développement considérable depuis 20 ans, il subsiste de nombreuses problèmes : ces technologies restent coûteuses, complexes, nécessitent des compétences biologiques et statistique de haut niveau. Enfin, la reproductibilité et les grandes variances entre les résultats de plateformes différentes suggère que ces techniques nécessitent toujours une expertise et un travail de routine que seuls les grandes plateformes comme les consortiums de microarray au NIH permettent afin d'éviter tout biais dans les manipulations (MAQC, 2006).

Enfin, pour valoriser les résultats, trouver des marqueurs des fonctions biologiques anormales chez l'homme ou comprendre le rôle des gènes dans les fonctions cérébrales et biologiques complexes, les chercheurs comparent et analysent leurs propres résultats aux autres bases de données bioinformatiques connues, par exemple, « *Ingenuity Pathway Analysis* » (IPA) ou « *Gene Set Enrichment Analysis* » (GSEA). Cela permet de proposer des hypothèses sur les voies de signalisation et les réseaux de gènes associés aux données obtenues par l'étude de microarrays (Gaiteri et al., 2011, Guilloux et al., 2010, 2011).

1.7.2 **Les microarrays dans l'étude des troubles anxieux**

Depuis leur première introduction par Schena en 1995, la technique de microarrays est maintenant largement utilisée dans les variés domaines : l'annotation expérimentale du génome humain (Schat et al., 2004), le diagnostic génétique de maladies (Clarke et al., 2004), la recherche et le développement du médicament (Clarke et al., 2004 ; Sausville et al., 2004), l'analyse des maladies complexes (Grant et al., 2004 ; Greenberg et al., 2001), la découverte de la fonction de gènes (Joshi et al., 2004), l'identification de bio-marqueurs (Hu et al., 2005) et les études de la toxicité de composés (Searfoss et al., 2005).

1.7.2.1 **Approche clinique**

Dans le domaine des neurosciences, la technique de microarrays peut être utilisée pour aider à élucider le fonctionnement du cerveau au niveau moléculaire (Lockhart et al. 2001). Certaines études de neurosciences ont focalisé leur analyse sur les grandes différences de l'expression en incluant les comparaisons entre les différentes structures du cerveau (Sandberg et al., 2000), ou sur les changements de

l'expression des gènes à cause de lésions massives, par exemple, des traumatismes cérébraux (Matzilevich DA et al., 2002). Quelques rapports récents ont démontré que les méthodes génomiques pouvaient identifier de petites différences entre les tissus cérébraux que ce soient les différences entre les sous-zones de l'hippocampe (Zhao et al., 2001 ; Léonardo et al., 2006) et de l'amygdale (Dent et al., 2001 ; Zirlinger et al., 2001).

Pour mieux comprendre et traiter les troubles psychiatriques, il est nécessaire de comprendre les fonctions et la régulation des gènes impliqués (Smolen et al., 2003). De nombreux chercheurs ont proposé d'étudier des troubles de l'humeur dans le système nerveux central au niveau moléculaire et cellulaire chez l'homme et dans des modèles animaux de la pathologie (Barlow et al. 2002 ; Sibille et Hen, 2001, Yamada et Higuchi, 2002), afin d'identifier les mécanismes moléculaires relatifs à la dysfonction des régions cérébrales dans les pathologies anxio-dépressives (Hoyle et al., 2010; Sibille et al., 2009 ; Guilloux et al., 2011). Cependant, si dans des pathologies psychiatriques graves, à fort impact héréditaire, on retrouve de nombreux gènes à travers les études cliniques (Mirnics et al., 2000 ; Sequeira et Turecki, 2006), ces signatures moléculaires sont plus difficiles à mettre en évidence chez les patients dépressifs ou la population présente un tableau clinique beaucoup plus hétérogène et où l'influence de l'hérédité sur l'apparition de la maladie est beaucoup plus faible, restreignant ainsi un peu plus l'impact génétique que peut avoir la maladie.

Cependant, les approches translationnelles mêlant études chez l'humain et dans des modèles animaux de la pathologie permettent de mettre en évidence des terrains génétiques communs ou des facteurs de risque à l'apparition des troubles dépressifs (Sibille et al., 2009, Guilloux et al., 2011, Edgar et al., 2011, Joeyen-Waldorf et al., 2011). Ces études présentent l'avantage de ne pas être basées uniquement sur une étude clinique, dont la cohorte de patients est parfois limitée et mal maîtrisée dans l'hétérogénéité de sa population.

1.7.2.2 ***Approche pré-clinique***

Les études pré-cliniques utilisant la technique de microarray afin de découvrir les gènes impliqués dans les pathologies anxio-dépressives sont peu nombreuses

ou se sont majoritairement intéressés aux effets de mutations sur l'expression de gènes dans des régions d'intérêt (ce qui est le cas de notre étude chez les souris 5-HT1A/1B -/-), ou à des comparaisons de lignées sélectivement croisées. Les limites de cette approche seront présentées dans la discussion.

A titre d'exemple, dans un modèle d'animaux croisés et sélectionnés pour leur réponse anxieuse (souris HAB *high anxiety-related behavior* par rapport aux souris LAB *low anxiety-related behavior*), les chercheurs ont observé que le gène *Ctsb* (Cathepsin B) était surexprimé grâce à la technique microarrays. De plus, 90 polymorphismes du *Ctsb* ont été observés sur ce gène dont plus d'une dizaine différaient entre les 2 groupes de souris (Czibere et al., 2011). Cependant, les chercheurs ont créé les souris avec une mutation du gène *Ctsb* et montré l'absence d'effet de cette mutation sur les comportements anxieux et dépressifs de ces animaux, ne montrant aucune différence entre les souris WT et KO pour ce gène. Cette étude résume ainsi la difficulté de l'association d'un gène à un comportement anxio-dépressif, notamment lorsque l'étude est basée sur des modèles animaux de « trait », basés sur une sélection par croisement.

Dans des modèles animaux où l'état anxieux/dépressif est induit, seules 9 publications à ce jour ont été réalisées, utilisant le chronic mild stress chez le rat (Babenko et al., 2012, Bergstrom et al., 2007, Jungke et al., 2011, Orssetti et al., 2008, 2009) ou la souris (Surget et al., 2009, Tordera et al., 2011) afin d'étudier les gènes modifiés dans différentes régions cérébrales impliquées dans la régulation des émotions. Cependant, aucun gène ne ressort de façon commune à toutes ses études, confirmant ainsi l'hétérogénéité que l'on peut retrouver chez l'Homme, en fonction des cohortes étudiées, des protocoles de stress réalisés et enfin, les régions analysées. Une seule étude à ce jour a étudié les effets d'un stress chronique chez la souris, sur l'expression de gènes dans différentes régions cérébrales (le cortex cingulaire, l'amygdale et le gyrus dentelé de l'hippocampe, Surget et al., 2009) et souligne que les effets du stress sur l'expression des gènes est spécifique à chaque région et que très peu de gènes semblent modulés de la même façon à travers ces régions suite à un stress, ce qui explique l'hétérogénéité régionale de résultats discuté précédemment.

De la même façon, seulement 4 études se sont intéressés aux effets des ISRS dans des modèles de stress (Bergstrom et al., 2007, Jungke et al., 2011, Orssetti et al., 2008, 2009, Surget et al., 2009). Dans l'étude la plus complète, Surget et al., 2009, les auteurs montrent qu'un traitement chronique par un ISRS ou un antagoniste des récepteurs au CRF reverse le profil d'expression induit par le stress, et ceci de façon plus importante dans l'amygdale en comparaison au gyrus dentelé et au cortex cingulaire. Dans cette même étude, les auteurs montrent que les effets des antidépresseurs diffèrent en fonction de l'état stressé/non stressé de l'animal, notamment dans le cortex cingulaire. Une analyse ultérieure a permis de démontrer que pour chaque région, certains gènes ou groupes de gènes participent à la réponse antidépressive uniquement, tandis que certains semblent à la fois impliqué dans l'apparition du syndrome anxio-dépressif chez la souris, mais également à la réponse antidépressive. Ce type d'analyse permettrait ainsi de prédire un effet antidépresseur possible d'une molécule en se basant sur le profil d'expression que cette molécule peut induire.

Matériels & Méthodes

2.1 Modèles animaux utilisés

Différentes souches de souris ont été utilisées lors de mes expériences. Cependant, les conditions d'hébergement des animaux étaient identiques. Pour ces expériences, j'ai utilisé des animaux mâles, adultes, âgés de 8 à 10 semaines, hébergés par groupes de 3-5 dans des cages d'élevage standard. L'alimentation et l'eau ont été proposés *ad libitum*. Le cycle jour nuit était de 12/12, non inversé et avec allumage des lumières non progressif dès 7:00.

2.1.1 Les souris 5-HT_{1A/1B}^{-/-}

Ces souris ont été obtenues par croisement des souris comportant la délétion homozygote 5-HT_{1A}^{-/-} de souche C57Bl/6j (Parks et al., 1998) avec des souris 5-HT_{1B}^{-/-} de souche 129Sv (Saudou et al., 1994). Par ce croisement, nous avons obtenu des souris hétérozygotes mutées pour ces 2 récepteurs (F1 5-HT_{1A}^{+/-}/1B^{+/-}) de fond génétique hybride (C57Bl/6/129Sv). Puis, suite au croisement de ces animaux, nous avons obtenu des souris mutées pour les 2 récepteurs de la sérotonine (5-HT_{1A/1B}^{-/-}) ainsi que leurs contrôles non mutés (5-HT_{1A/1B}^{+/+}) (Guilloux et al., 2011).

Pour les expériences de puces à ADN, nous avons utilisé des souris doublement mutées 5-HT_{1A/1B}^{-/-} et leurs contrôles non mutés 5-HT_{1A/1B}^{+/+}. Pour les expériences de RT-qPCR, nous avons utilisé des souris doublement mutées 5-HT_{1A/1B}^{-/-}, non mutés 5-HT_{1A/1B}^{+/+}.

2.1.1.1 Génotypages des souris mutées

Grâce à la technique de « Polymerase Chain Reaction » (PCR), Le génotypage des souris mutantes (5-HT_{1A}^{-/-}, 5-HT_{1B}^{-/-}, 5-HT_{1A/1B}^{-/-}, 5-HT_{1A/1B}^{+/+}) a été réalisé à partir de fragments de queues prélevés lors du sevrage et du marquage des animaux.

Les queues sont digérées dans une Solution Direct PCR Lysis Reagent (Viagen Biotech, USA) contenant de la protéinase K (0.5 mg/ml) pendant 5 à 6 heures à 55°C. Ensuite, les digestats sont incubés au bain marie à 85°C pendant 45

min et puis centrifugés pendant 10 seconds à 5000 tours/min. L'ADN est dans la phase supérieure et se conserve ainsi 1 semaine à +4°C ou 1 an à -20°C.

La PCR s'effectue à partir de 1 µl d'ADN dans un tube de puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (illustra™, GE Healthcare, UK) avec les amorces spécifiques du gène recherché 0,5 µM (Eurofins MWG Operon, Allemagne) (Tableau 12).

La réaction débute par une étape de dénaturation de l'ADN de 2 min à 92°C et se poursuit par 35 cycles d'amplification dont les caractéristiques sont les suivantes : 30 secondes à 94°, 45 secondes à 58°C puis 30 secondes à 72°C.

Les couples d'amorces PCR permettent de déterminer le caractère sauvage (couples 1-2 et 3-4) ou muté (couples 1-5 et 3-5) pour les récepteurs 5-HT_{1A} et/ou 5-HT_{1B} (Figure 17 et Figure 18)

N°	Nom	Séquence (5'-3')	Taille	PM (g/mol)	Tm (°C)
1	1AJPEGDA	AACGTGACCTTCAGCTACC	19	5810	57
2	1AJPEGFA	GTCCTTGCTGATGGTGACAC	19	5732	59
3	1BJPEGDA	CCCATCAGCACCATGTACAC	20	5990	59
4	1BJPEGFA	GACTTGGTTCACGTACACAGG	21	6446	60
5	HenNEO	CTTCTATCGCCTTCTTGACG	20	6009	58

Tableau 12: Descriptif des amorces utilisées en PCR pour le génotypage des souris mutées.

Les produits de PCR obtenus sont séparés par migration électrophorétique en gel d'agarose à 2%, dans un tampon Tris-Borate. 18 µl de produits PCR + 2 µl de tampon de charge sont déposés dans chaque puits du gel. Sous l'effet du champ électrique (90V, 110mA), les différents fragments amplifiés d'ADN chargés négativement migrent vers l'anode et sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. Leur coloration par le bromure d'éthidium (BET) permet de visualiser chaque fragment amplifié sur une table à UV.



Figure 17: Identification des souris mutées pour le récepteur 5-HT1A : Amorces 1, 2 et 5

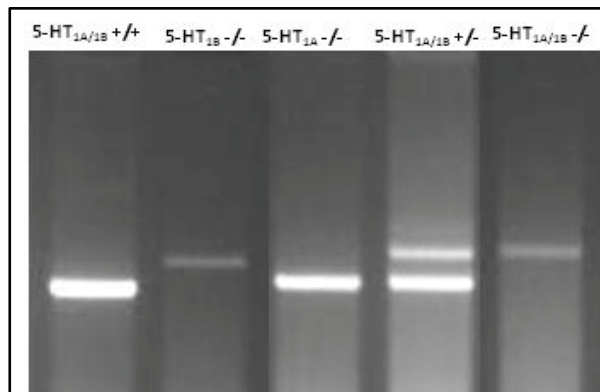


Figure 18: Identification des souris mutées pour le récepteur 5-HT1B : Amorces 3, 4 et 5

2.1.2 Les souris du modèle CORT

Nous avons récemment développé un nouveau modèle d'anxiété/dépression chez la souris, par administration prolongée de corticostérone dans l'eau de boisson.

Dans ce modèle, un traitement chronique à la fluoxétine permet de contrer les dysfonctions comportementales et l'inhibition de la neurogenèse hippocampique (David et al., 2009).

L'agomélatine (S20098) est un nouvel antidépresseur, possédant des propriétés innovantes puisqu'il est un agoniste des récepteurs mélatoninergiques et un antagoniste des récepteurs 5-HT2C. Ses effets antidépresseurs/anxiolytiques sur les troubles comportementaux et sur la neurogenèse hippocampique ont été évaluée dans notre modèle de souris CORT (Rainer et al., 2011).

Dans l'ensemble de mes travaux, 45 souris C57Bl/6 ont été séparées en 6 groupes selon le traitement reçu (Tableau 13):

groupe	produits 1	dose	produits 2	dose
1	véhicule (β -cyclodextrine, β -CD)	0.45%	véhicule (hydroxyethylcellulose (HEC))	1%
2	véhicule (β -cyclodextrine, β -CD)	0.45%	agomélatine	10mg/kg
3	corticostérone	35 μ g/ml	véhicule (hydroxyethylcellulose (HEC))	1%
4	corticostérone	35 μ g/ml	fluoxétine	18mg/kg
5	corticostérone	35 μ g/ml	agomélatine	10mg/kg
6	corticostérone	35 μ g/ml	agomélatine	40mg/kg

Tableau 13 : les traitements de 6 groupes de souris pour le projet CORT

Le traitement chronique avec la corticostérone (35 μ g/ml) ou le véhicule par voie orale a duré au total 8 semaines (Figure 19). A partir de la quatrième semaine, les souris des groupes N°2, 4, 5, 6 ont reçu un traitement chronique par antidépresseur (i.p.) pendant 4 semaines. Les cerveaux de souris ont été prélevés à la fin de la 8^{ème} semaine et congelés à -80°C dans une solution de *RNALater* (Ambion®, USA) qui empêche la dégradation de l'ARN.

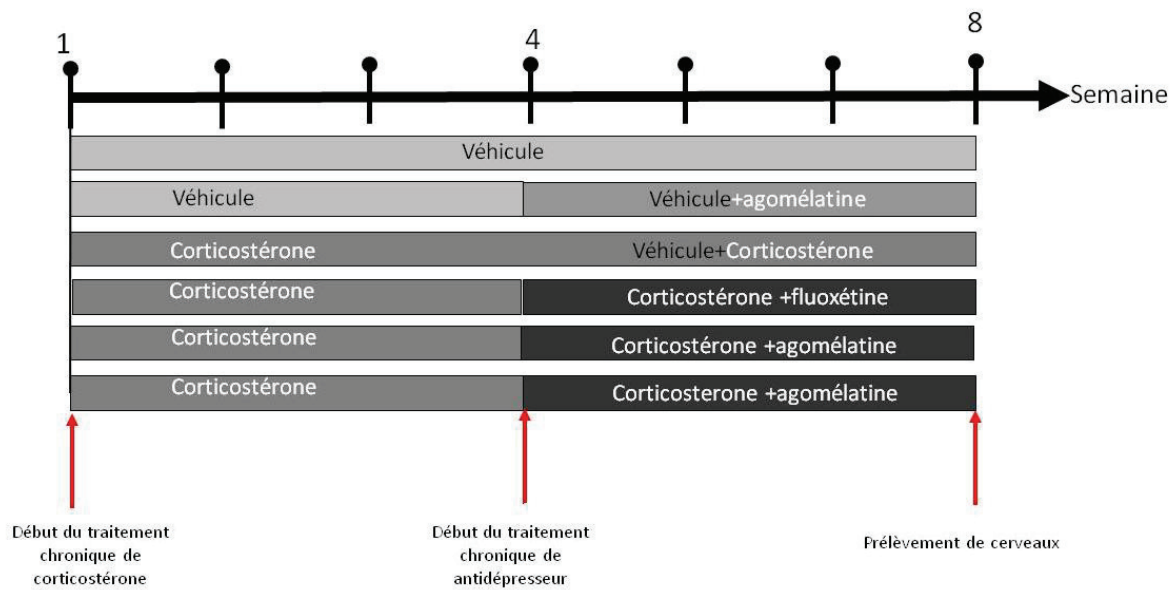


Figure 19: la procédure de traitement chronique

2.2 Microchirurgie : prélèvement de structures cérébrales

Le prélèvement des structures cérébrales a été réalisé grâce à une méthode précise de microdissection (Surget et al., 2008). Avant les manipulations pour éviter toute contamination par des RNAses, le matériel de dissection, la matrice qui permet le maintien du cerveau et la surface de la boîte de Pétri ont été décontaminés par des inhibiteurs de RNase et les solutions utilisées ont été autoclavées et les lames ont été nettoyées à l'alcool. La matrice permettant le maintien du cerveau a été refroidie sur la glace.

Après euthanasie des animaux, le cerveau a été prélevé et placé dans une solution NaCl à 0,9% glacée pendant 1 min afin de raffermir la structure. Le cerveau a été ensuite placé dans la matrice qui permet la réalisation de coupes de cerveau de 1 mm d'épaisseur (Figure 20). Il faut prêter attention à l'orientation rostro-caudale du cerveau et à l'alignement sagittal dans la matrice. Une lame a été placée dans la deuxième fente au niveau anatomique pour isoler le cortex frontal. Ensuite, une autre lame a été abaissée en arrière du cervelet pour stabiliser le cerveau dans la matrice.

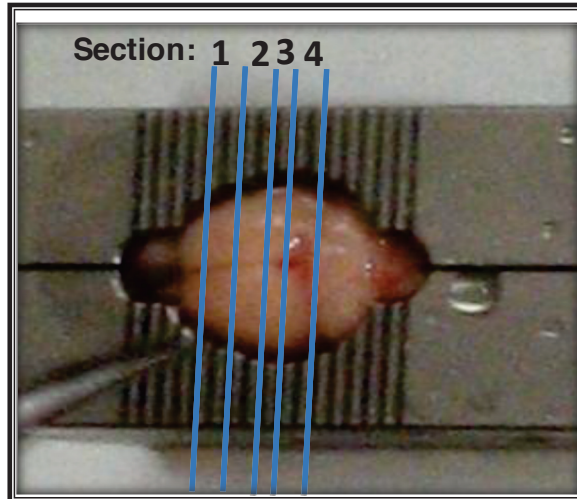


Figure 20: Découpe du cerveau de souris dans une matrice

Les différentes lames de rasoir ont été disposées dans les fentes de la matrice afin d'obtenir différentes sections transversales du cerveau contenant les régions d'intérêt. Les coupes ont été transférées dans une solution de RNALater (Ambion[®], USA). A l'aide d'une loupe binoculaire, on a ensuite réalisé la dissection et le prélèvement des différentes structures cérébrales dans l'ordre suivant.

2.2.1 **Le cortex cingulaire:**

Le cortex cingulaire est dans la première section (Section N°1 ; Fente N° 5-7, Bregma : +0.50 à 0.82 mm, Figure 21). Tout d'abord, une première incision partant de la pointe du corps calleux jusqu'à la scissure inter-hémisphérique est réalisée. On coupe ensuite horizontalement jusqu'au mur médian. Enfin, afin de ne pas prélever de cortex moteur, une seconde coupe en triangle plus petite que la première est réalisée.

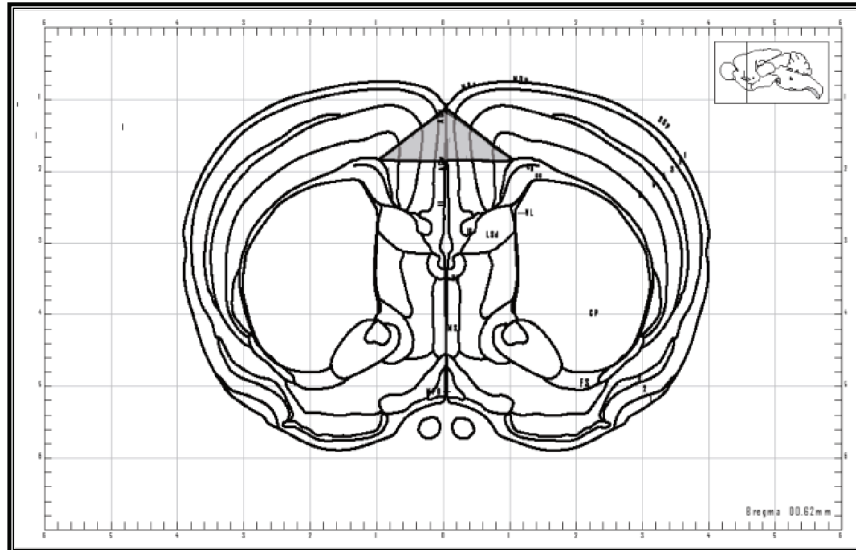
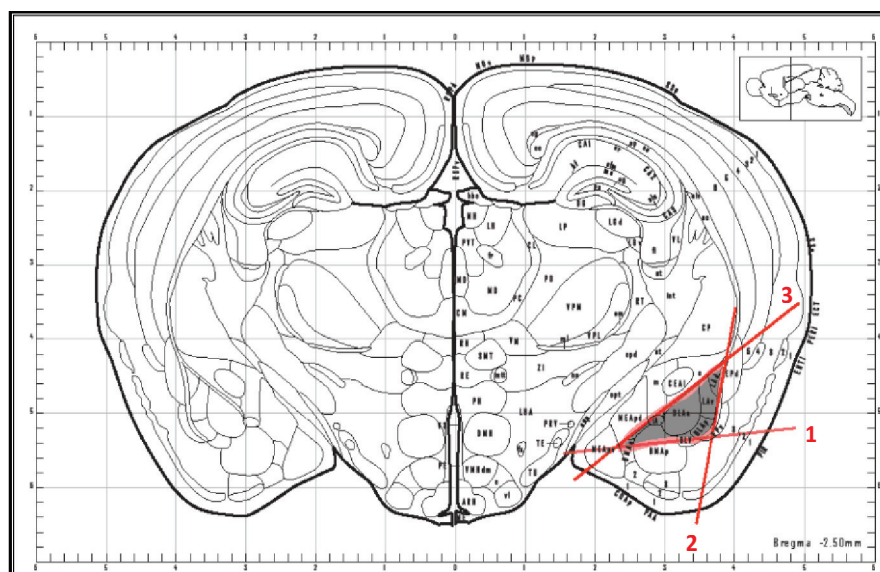


Figure 21: Cortex cingulaire (Atlas figure 27. Bregma +0.62 mm (zone grise triangulaire))

2.2.2 L'amygdale :

L'amygdale se trouve dans la deuxième section (Section N°2 ; Fente N° 7-9, Bregma : -0.50 à 2.50 mm, Figure 22). La première coupe est horizontale et enlève le cortex au-dessous de l'amygdale. La seconde coupe est verticale et enlève le cortex latéral à l'amygdale. On vérifie l'exactitude de l'angle de coupe du côté caudal. Il permet de mieux identifier et de localiser l'amygdale pour la dernière coupe. Troisième coupe à 45-60 degré diagonal pour séparer l'amygdale.



**Figure 22: Amygdale (Atlas figure 43. Bregma -2.50 mm (zone grise en trapèze)).
Chiffre en rouge indiquent l'ordre des coupes**

2.2.3 Sous-régions de l'hippocampe:

L'hippocampe dorsal (Section N°2 ; Fente N° 7-9, Bregma : -0.50 à -2.50 mm, Figure 23) et ventral sont distribués dans la deuxième et quatrième section (Section N°4 ; Fente N°10-12, Bregma : -2.80 à -4.6 mm, Figure 24). Le cortex est enlevé jusqu'à l'amygdale si possible. La première coupe est verticale. Le cortex au-dessus de l'hippocampe est retiré, puis ensuite le cortex latéral à l'hippocampe.

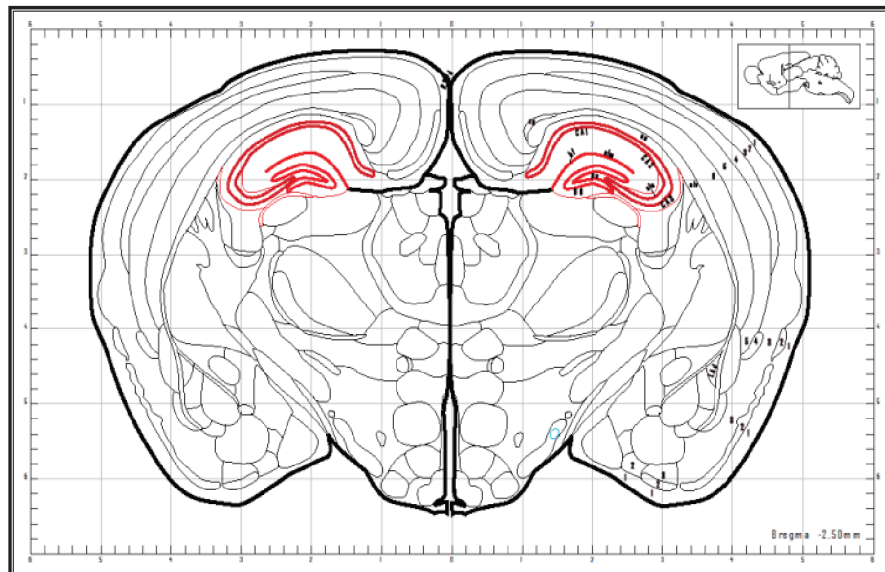


Figure 23: Hippocampe dorsal en rouge (Atlas figure 43. Bregma -2.50 mm).

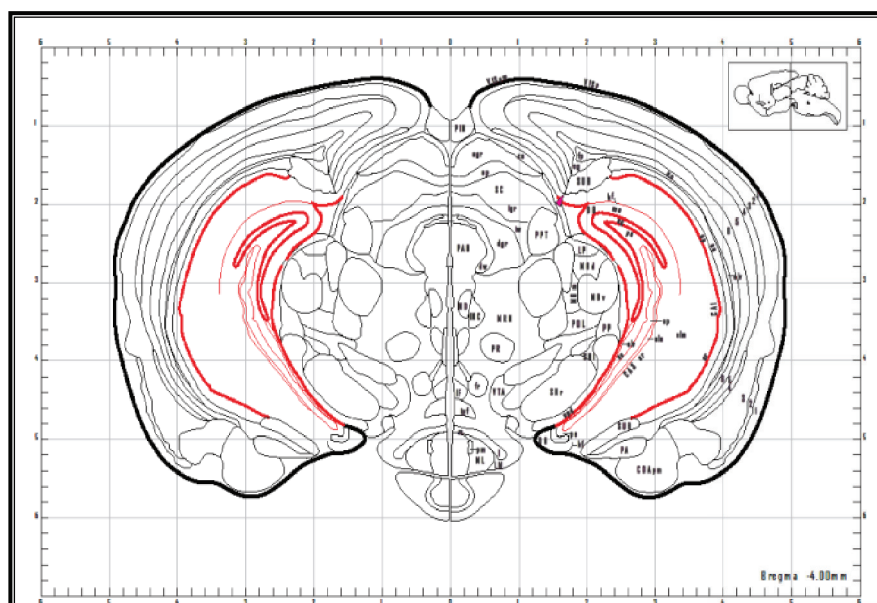


Figure 24: Hippocampe Ventral en rouge (Atlas figure 53. Bregma -4.00 mm).

L'hippocampe médian est obtenu par la section comprise entre les fentes N°9-10 afin de bien séparer le dorsal et le ventral. La confirmation d'une bonne séparation des hippocampes ventraux et dorsaux a été réalisée par RT-PCR. En effet, il a été décrit, chez la souris, une expression préférentielle, région-sélective, des transcrits 2 gènes : la Décorine (Dcn) et la Lactase-Phlorizin Hydrolase (Lct). Ces 2 gènes sont sur-exprimés respectivement dans l'hippocampe ventral et dans l'hippocampe dorsal (Leonardo et al., 2006, Tableau 14)

Gène	Signal Brut		Facteur d'expression	
	<i>Hippocampe Dorsal (CA1)</i>	<i>Hippocampe Ventral (CA1)</i>	<i>Dorsal/Ventral</i>	<i>Hippocampus/Cortex</i>
Lactose-Phlorizin Hydrolase	521±43	36±3	14,45	16,98
Décorine	129±18	1446±136	0,09	7,17

Tableau 14: Variation de l'expression des gènes Décorine et Lct en fonction de la région de l'hippocampe prélevée chez la souris (D'après Leonardo et al., 2006)

Les échantillons sont pesés et congelés dans des tubes RNase-free à -80°C et les restes du cerveau sont congelés dans des tubes avec 100-200µl de RNALater à -80°C. Le temps de procédure totale est environ 30 minutes à partir de l'euthanasie des souris.

2.3 Préparation des ARN totaux

2.3.1 Extraction des ARN cérébraux

2.3.1.1 Méthode au TRIzol®

Chaque prélèvement de tissu cérébral a été décongelé dans 1 ml de réactif phénolique TRIzol® (Invitrogen, France). Les tissus ont été broyés en présence de billes de céramique de 1.4 mm à l'aide d'un broyeur Precellys®24 (Bertin) (6500 rpm, 2x8 sec). Après agitation en présence de 200 µl de chloroforme, incubation à température ambiante pendant 3 min, une centrifugation (10000g, +4°C, 15 min) a permis de séparer la phase organique de la phase aqueuse, qui contient les ARN. L'ARN a ensuite été précipité par l'ajout d'isopropanol (500 µl) et par le froid pendant

une nuit à -20 °C, puis par une centrifugation (10000g, +4°C, 15 min). Un culot blanc d'ARN est apparu au fond du tube. Après élimination de l'isopropanol par retournement du tube au dessus d'un bécher, le culot a été lavé 2 fois avec 200µl d'éthanol 75%. Les tubes ont été installés en position retournée sur un papier absorbant, appuyés contre un portoir, puis les ARN ont été séchés partiellement à l'air pendant 15 min à température ambiante. Enfin, l'ARN a été solubilisé dans 30 µl d'eau *RNase-free* (Invitrogen) pendant 1 heure et congelé à -80 °C.

2.3.2 Quantification et contrôle qualité des ARN

2.3.2.1 Analyse photométrique

La densité optique (DO) de l'ARN a été lue sur deux dilutions séparées de chaque ARN au 1/100^{ème} dans l'eau, à 230, 260, 280 et 320 nm, à l'aide d'un *Biophotomètre*® (Eppendorf). La concentration des ARN a été calculée selon la relation : $[ARN]_{ng/\mu l} = DO_{260nm} \times 40 \times dilution$. Les ratios DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} ont été calculés comme indicateurs de la contamination en protéines, et en sels ou éthanol, respectivement. Ces rapports doivent être compris entre 1.6 et 2.0 si une pureté correcte a été obtenue.

2.3.2.2 Analyse fluorimétrique

Les ARN ont été analysés par électrophorèse sur puces avec le kit « *LabChip*® *RNA 6000 Nano* » sur un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), afin de contrôler leur intégrité, leur contamination en ADN génomique et leur concentration.

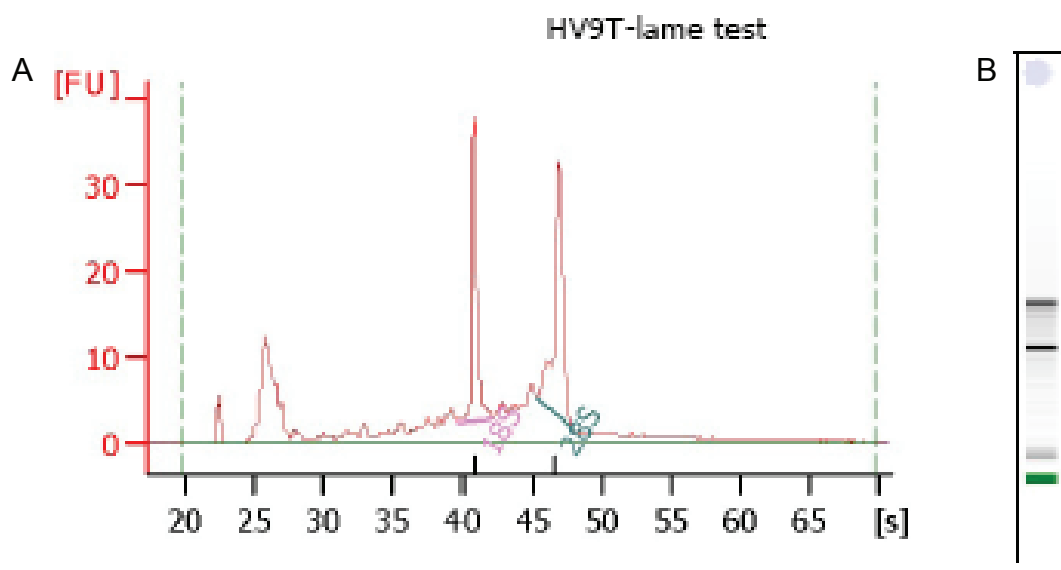


Figure 25: Profil d'analyse d'un ARN total obtenu sur LabChip® ARN

Un gel d'acrylamide a été mélangé avec un intercalant se liant spécifiquement à l'ARN, puis injecté dans les microcanaux de la *LabChip*® (Figure 25-B). On a déposé dans chaque puits 5 µl d'oligonucléotide marqueur de migration et 1 µl d'ARN. Les molécules ont migré dans un champ électrique, où elles ont été séparées selon leur taille, puis détectées par la fluorescence de l'intercalant, ce qui a produit un électrophorégramme (Figure 25-A). La concentration des ARN a été calculée selon la relation : $[ARN]_{ng/\mu l} = (\text{aire ARN échantillon} \times 150 \times \text{dilution}) / \text{aire ARN contrôle ladder}$. L'algorithme du logiciel *2100 Expert* a calculé à partir de chaque tracé le score d'intégrité de l'ARN, ou « *RNA integrity number* » (RIN), reflet de sa qualité et de son utilisation possible pour les expériences de micorarray/qPCR. On estime que les ARN sont de bonne qualité lorsque les valeurs de RIN sont homogènes et comprises entre 7 et 10.

2.4 Expériences sur puces à ADN

2.4.1 Plan d'expérience

L'expérience a été conçue en un protocole de deux-couleur, sans réplicat technique et avec 8 animaux par groupe (Figure 26). Dans ce type d'expérience, les animaux ne sont pas comparés directement entre eux. On réalise une comparaison de chaque animal par rapport à un pool d'ARN de référence (REF). Ceci permet ensuite de pouvoir ajouter de nouveaux groupes a posteriori car les valeurs d'expression seront calculées à partir d'une comparaison à la REF.

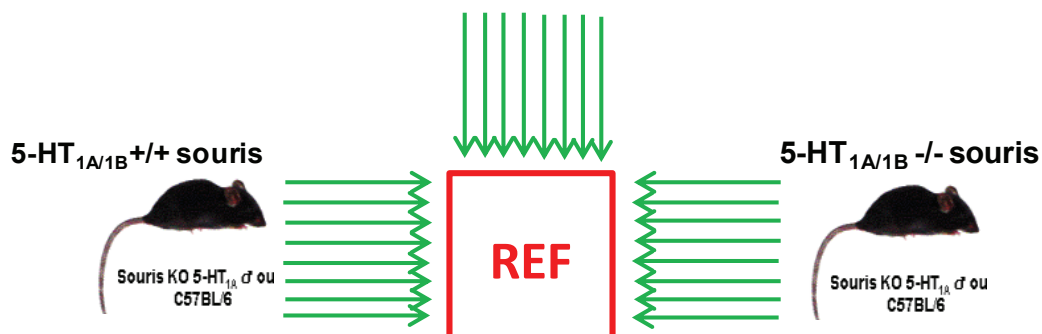


Figure 26: Plan d'expérience. Une flèche correspond à un animal

2.4.2 Lames

Nous avons utilisé les lames commerciales pan-génomiques de souris « *Whole Mouse Genome Oligo Microarray 4x44k* » (G4122F, Agilent technologies) comportant chacune 4 puces ou *arrays* constituées de 45220 spots distribués avec une séquence des oligonucléotides de 60 nt sur 532 lignes × 85 colonnes, dont 43377 spots correspondent à des gènes (Figure 27). Ces lames de haute densité présentent plusieurs avantages (MAQC Consortium, 2006, Tableau 15): deux protocoles d'hybridation (mono-couleur ou deux-couleur), sondes oligonucléotidiques plus longues (60 nt), une bonne sensibilité avec un taux plus haut de détection = 90%, environ 10000 gènes, (Figure 28, Figure 30), une reproductibilité optimisées avec une bonne concordance (> 80%) des gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre les différents sites (Figure 29), les variabilités des valeurs de signal de l'expression à l'intérieur de chaque site sont assez bon ($\approx 9\%$)(Figure 30) et une bonne corrélation ($R=0.91$) entre les résultats de microarrays et de qPCR (Figure 31).

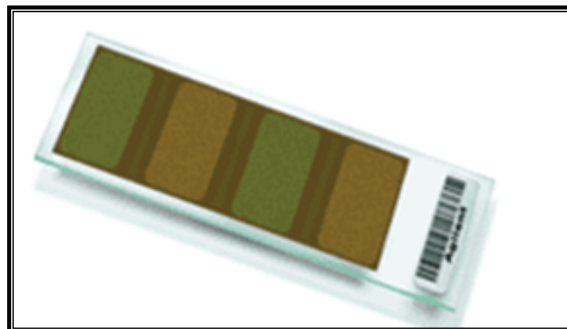


Figure 27: Architecture de la lame 4x44k.

Fournisseur	Code	Protocole	Nombre de probes	longeur de Oligos (-nt)
Applied Biosystems	ABI	One-color microarray	32,878	24
Affymetrix	AFX	One-color microarray	54,675	25
Agilent	AGL	Two-color microarray	43,931	60
	AG1	One-color microarray	43,931	60
Eppendorf	EPP	One-color microarray	294	50
GE Healthcare	GEH	One-color microarray	54,359	30
Illumina	ILM	One-color microarray	47,293	50

Tableau 15: Des plateformes de l'expression du gène utilisée dans les études de MAQC.

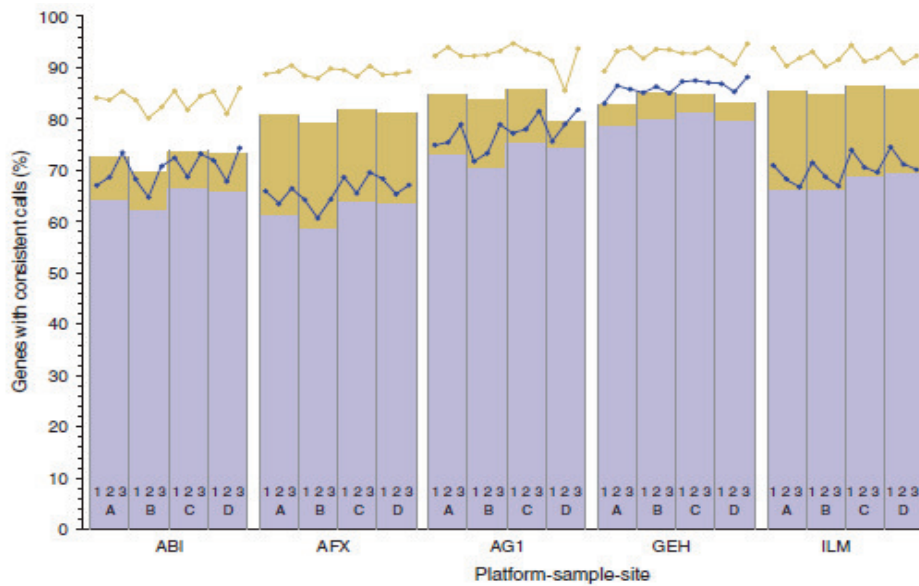


Figure 28: Concordance de signal détecté à l'intérieur et entre les sites d'essai.

Pour les 12,091 gènes communs, le signal pour la détection au sein de chaque plate-forme ont été classées en «détecté» ou «non détecté ». Les points bleus sont un pourcentage de gènes avec un signal détecté à l'intérieur d'un site d'essai, les barres bleues sont un pourcentage de gènes avec un signal détecté entre les sites. Les points jaunes sont un pourcentage total de gènes avec un signal détecté et non-détecté à l'intérieur d'un site d'essai, les barres jaunes sont un pourcentage total de gènes avec un signal détecté ou non-détecté entre les sites

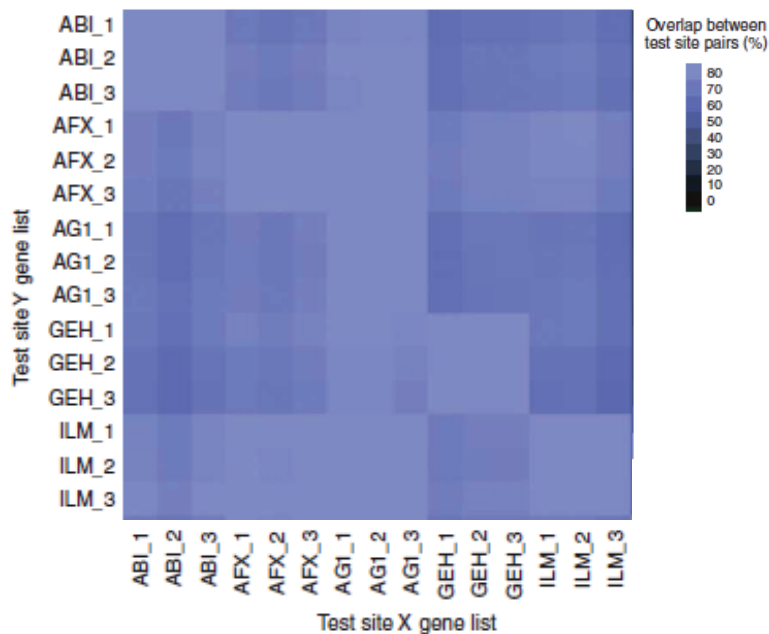


Figure 29: Ce graphique indique la concordance des gènes identifiés comme différentiellement exprimés pour des paires de sites d'essai, marqués comme L'axe X et Y.

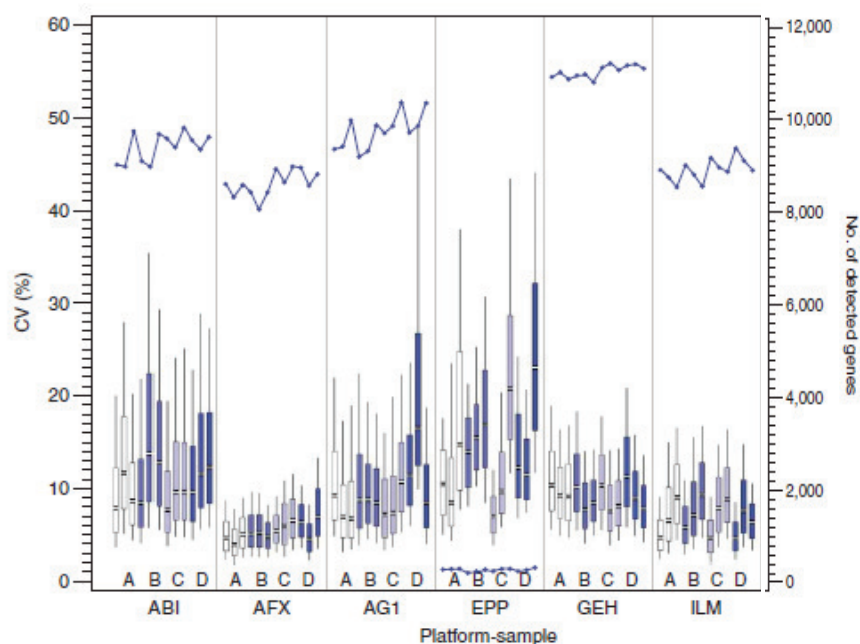


Figure 30: La variabilité de signal d'expression au sein des sites d'essai.

Pour les plates-formes en protocole de mono-couleur, le CV des valeurs de signaux d'expression a été calculée pour tous les gènes généralement détectés dans 4 mêmes échantillons (A, B, C, D) de 3 sites différents d'essai pour chaque plate-forme. Les nombres du gène détectés parmi les 12091gènes varient selon la plate-forme/échantillon/site d'essai et est noté en ligne plots avec l'axe secondaire.

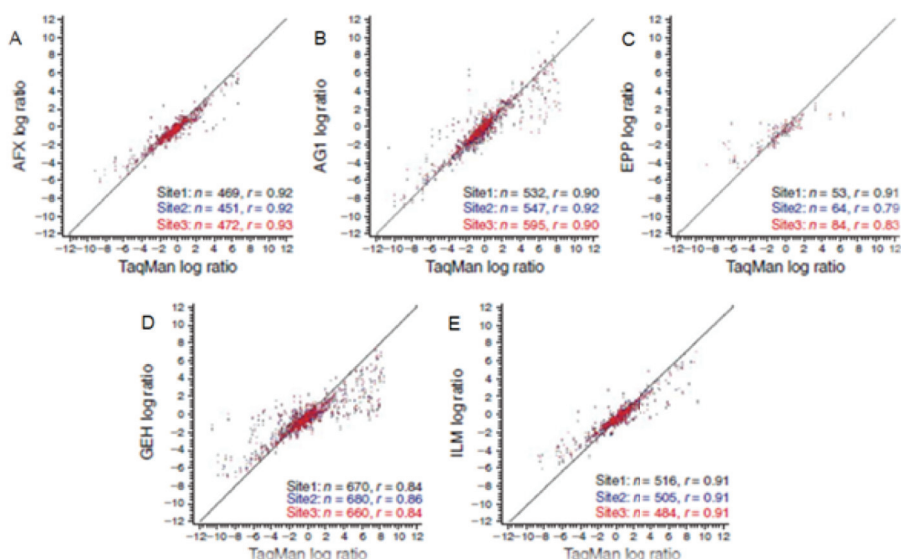


Figure 31: Corrélation entre puces à ADN et des données de TaqMan.

Les diagrammes de dispersion de comparer les valeurs de \log_2 ratio d'expression différentiel (en utilisant A par rapport à B) de chaque plate-forme de puces à ADN par rapport aux valeurs

obtenues par des essais TaqMan. Chaque point est un gène, le couleur de point indique le site d'essai, site 1 est noir, site 2 est bleu et site 3 est rouge.

2.4.3 Procédure expérimentale

2.4.3.1 Synthèse et purification des cibles marquées

A partir des ARN totaux d'hippocampe de souris, les cibles ARNc marquées ont été synthétisées par amplification linéaire et marquage direct en deux couleurs, avec le « *Low RNA Input Linear Amplification kit* » (Agilent Technologies), (marquage Cy3, vert). Des ARN contrôles « *spike-in* » (Agilent Technologies) dont les ratios d'abondance sont pré-établis, sont inclus dans chaque réaction (Figure 16).

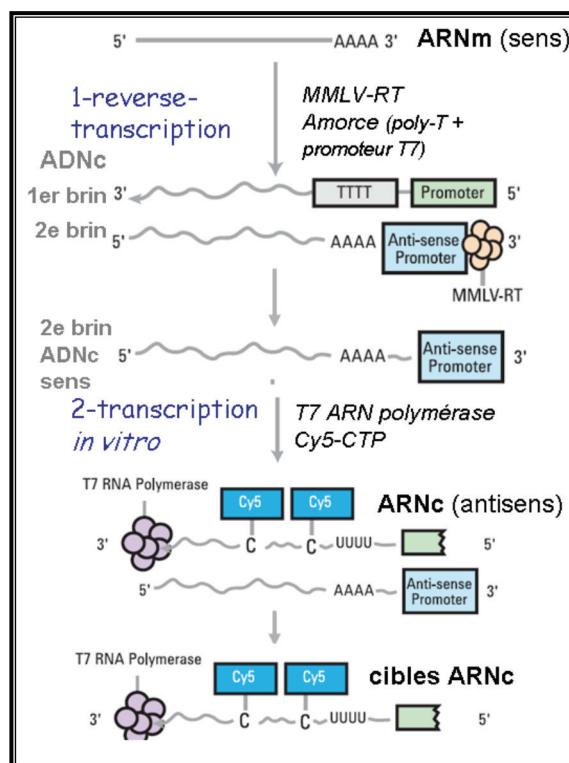


Figure 32: Principe de la synthèse des cibles marquées.

2.4.3.1.1 Transcription inverse

Les ARN totaux (1 µg) et 2 µl d'une dilution 1/3200 des ARN *spike-in* A (Cy3-CTP) ou *spike-in* B (Cy5-CTP) ont été dénaturés 10 min à 65°C en présence de 1,2 µl d'amorce « promoteur T7 », dans un volume total de 11,5 µl. Puis, les ADNc double brin ont été synthétisés par l'enzyme MMLV-RT (200 U) en présence de *RNase OUT* (20 U), DTT 10 mM, dNTP 0,5 mM et *first strand buffer* 1X, dans un

volume de 20 µl, pendant 2 heures à 40°C. Ensuite, les enzymes sont inactivées à 65°C pendant 15 min. Les ADNc ont été laissés sur la glace pendant 5 min.

2.4.3.1.2 Transcription in vitro

Les Cy3- et Cy5-CTP ont été utilisés après avoir été stabilisés à température ambiante pendant 30 min. Les ARNc marqués ont été synthétisés et amplifiés à partir des ADNc par la *T7 RNA polymerase* (0,8 µl) en présence de pyrophosphatase inorganique (120 U), *RNase OUT* (20 U), Cy3-CTP (2,4 µl), DTT (10 mM), NTP (1 mM), PEG 50% (6,4 µl) et tampon de transcription 1X, dans un volume de 80 µl, pendant 2 heures à 40°C, à l'abri de la lumière.

2.4.3.1.3 Purification

Les cibles marquées ont été purifiées par adsorption sur colonne *RNeasy*® (Qiagen) dans un volume de 700 µl en présence de 350 µl de tampon RLT et 250 µl d'éthanol 96-100%. Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 30 secondes, les colonnes ont été lavées 2 fois par 500 µl de tampon RPE (+éthanol) et séchées par une centrifugation à 13000 rpm pendant 1 min. Les cibles marquées ont été éluées dans 30 µl d'eau *RNase-free*. Puis, elles ont été conservées à -20°C à l'abri de la lumière, jusqu'à l'hybridation.

2.4.3.2 **Contrôle de qualité des cibles marquées**

2.4.3.2.1 Analyse spectrophotométrique

Le spectre des DO de chaque cible marquée a été lu entre 220 et 750 nm à l'aide d'un *Biomate3*® (Thermo Scientific) sur 4 à 6 mesures consécutives, et les valeurs médianes ont été utilisées pour le calcul des paramètres de qualité de ces cibles, qui sont principalement les ratios DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} , la concentration en ARNc, le rendement d'amplification, l'activité spécifique et l'efficacité de marquage (Tableau 16).

Paramètres	Unité	Calcul	Seuil
[Cy3]	pmol Cy3 / μ l	$(DO_{550nm} \times 10 \times 10^6) / 150000$	-
[Cy5]	pmol Cy5 / μ l	$DO_{650nm} \times 10 \times 10^6 / 250000$	-
[cRNA]	ng / μ l	$DO_{260nm} \times 40 \times \text{facteur de dilution}$	≥ 825 ng au total
activité spécifique	pmol dye / μ g ARN	$\text{pmol dye}/\mu\text{l} / ([\text{cRNA}] / 1000)$	>8
Efficacité de marquage	nb molécules dye / 1000 pb	$(\text{pmol dye}/\mu\text{l} \times 324,5) / [\text{cRNA}]$	Cy3 : >4
		Cy3 : $(DO_{550nm} / DO_{260nm}) \times 58,5$	Cy5 : >5
		Cy5 : $(DO_{650nm} / DO_{260nm}) \times 35,1$	
amplification	facteur	$([\text{cRNA}] \times 30 \mu\text{l}) / (1000 \times 0,02)$	>600
DO260/280	-	Nanodrop	2 (1,7-1,8 minimum)
DO260/230	-	Nanodrop	2

Tableau 16: Paramètres pour le contrôle de qualité des cibles marquées.

2.4.3.2.2 Analyse fluorimétrique

L'électrophorèse sur LabChip® des ARNc a été effectuée avec le kit RNA 6000 Nano et le programme ARNm, afin de contrôler la distribution des tailles moléculaires (Figure 33).

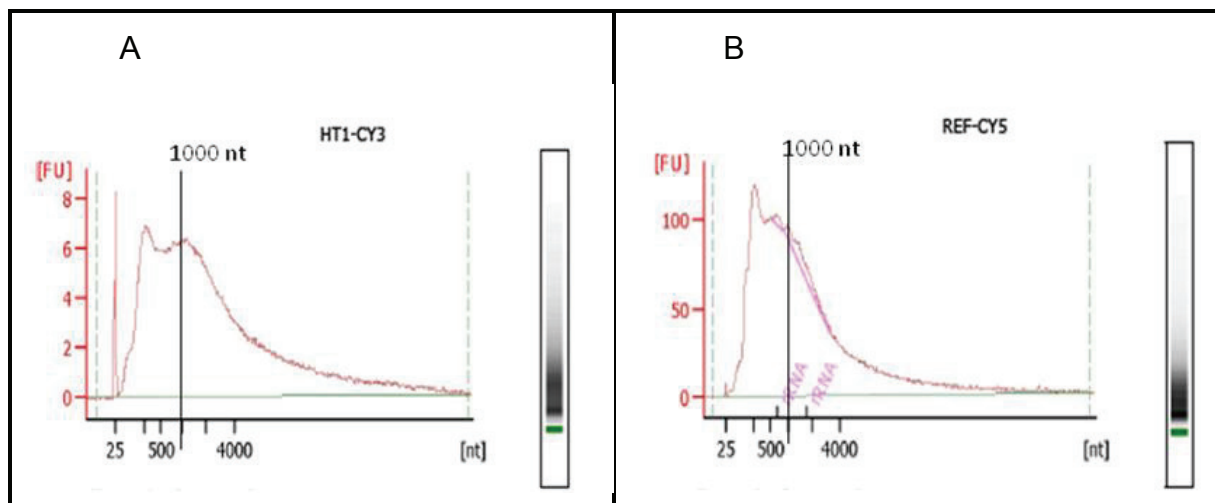


Figure 33 : Profil typique des cibles ARNc marquées en Cy5 (A), ou en Cy3 (B) montrant la présence d'une majorité de molécules dont la taille est comprise entre 200 et 2000 nucléotides (nt), et une taille médiane centrée sur 1000 nt.

La taille de la majorité des molécules de cRNA amplifié doit être comprise entre 200 et 4000 nucléotides. La médiane des tailles doit être proche de 1000 nt : 50% de l'aire totale de chaque côté de cette médiane. Il est à noter que le signal fluorescent des cibles marquées au Cy5 est plus fort que celui des cibles Cy3 car au cours de l'analyse, le laser rouge (630 nm) excite la fluorescence du *dye* Cy5 en plus de la fluorescence du marqueur servant à détecter l'ARN.

2.4.3.3 Hybridation

Pour chaque *array*, les ARNc marqués en Cy3 et en Cy5 ont été mélangés en quantités égales (825 ng), puis fragmentés en présence d'un agent bloquant (1X) et d'un tampon de fragmentation (1X), dans un volume de 55 µl pendant 30 min à 60°C. La réaction a été arrêtée par 55 µl de tampon de *Gex hybridization HI-RPM (2X)* et 100 µl de chaque solution d'hybridation résultante ont été déposés sur un secteur de la lame munie de joints ou *gasket* (Figure 34B), ensuite recouverte par la lame portant les sondes (Figure 34C). Les sandwichs lame-*gasket* ont été incubés dans des chambres d'hybridation, en rotation à 10 rpm à 65°C pendant 17 heures (Figure 34G).

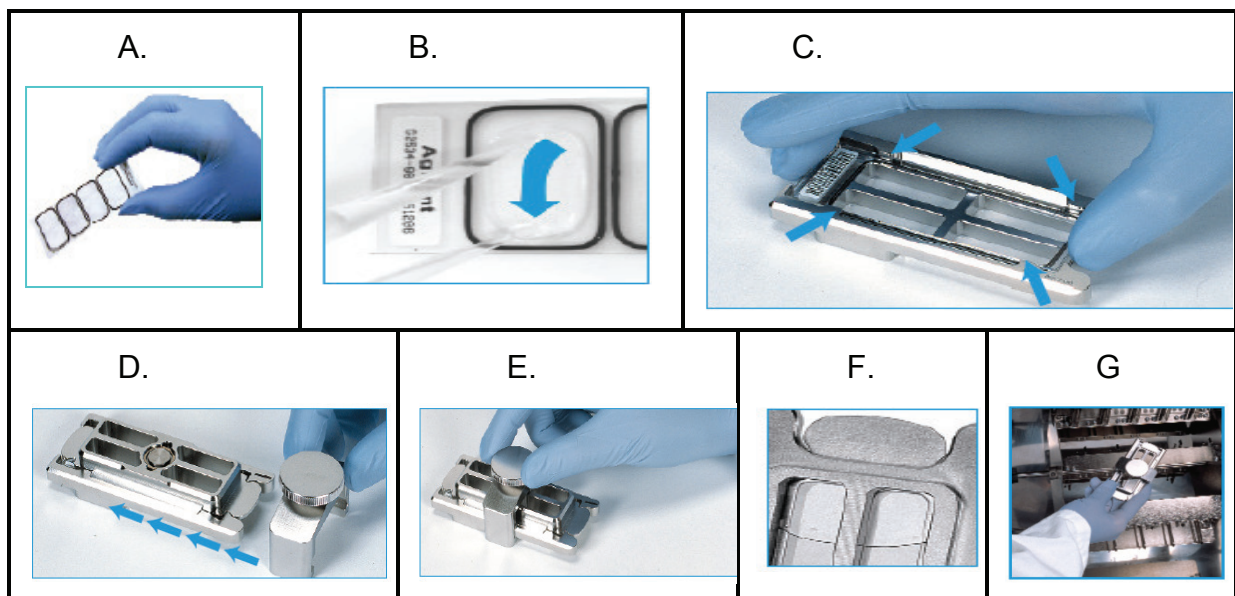


Figure 34: La procédure d'hybridation. A: un gasket ; B: chargement du mélange; C: installation de la lame dans une chambre; D: placement d'un couvercle de la chambre; E: un sandwich lame-gasket; F : bulles mobiles ; G: hybridation à 65°C

2.4.3.4 **Lavage et scan**

Chaque sandwich a été désassemblé en immersion dans le tampon *Wash 1* (Agilent Technologies), et la lame a été rincée sous agitation magnétique dans le *Wash 1* (température ambiante, 1 min) et le *Wash 2* (37°C, 1 min). Ensuite, sortir la lame très lentement (sur 20 s) en faisant un mouvement continu (sans à-coups ni saccades): la tension superficielle du liquide retient les gouttes, la surface des lames doit être sèche à la sortie. La lame a été séchée immédiatement par centrifugation 10 s à 1000 rpm. Elle a été conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité et scannée le jour-même par un Microarray Scanner (Agilent Technologies), équipé de laser 532 nm et 635 nm pour exciter Cy3 et Cy5. Toutes les lames ont été scannées à deux différentes puissances laser (100% et 10%) avec une résolution de 5 µm / pixel en un single passe mode. Les images de chaque lame sont été enregistrées en .tif.

2.4.4 **Traitement des données**

2.4.4.1 **Analyse d'image**

L'analyse d'image a été réalisée avec le logiciel *Feature Extraction* (version 9.5.3, Agilent Technologies) avec le protocole *GE2-QCMT-Feb07*. *Feature Extraction* réalise de manière automatisée le prétraitement des données (soustraction du bruit de fond morphologique, filtrage et normalisation) et un rapport de contrôle qualité de chaque lame, y compris :

- la distribution des spots anormaux. Figure 35A montre des spots anormaux du bruit de fond en jaune, des spots anormaux du signal rouge en rouge foncé et du signal vert en vert foncé. La qualité de lame est meilleure de moins de spots anormaux. Il aussi montre une uniformité des spots normaux que leur distribution doit être décentralisée.
- la distribution des spots des gènes sur- et sous-exprimés significativement (Figure 35B). Cette distribution doit être homogène et les intensités rouges et vertes doivent être équilibrées.

- la reproductibilité des réplicats est montrée en Figure 35C. CV est utilisé pour indiquer les variances entre les réplicats d'un même gène après une soustraction du bruit de fond. La valeur en pourcentage de CV est plus petite que possible.
- la corrélation entre les ratios d'expression observée et attendue pour les ARN contrôles internes (Figure 35D). La bissectrice idéale est en rouge ($R^2=1$).

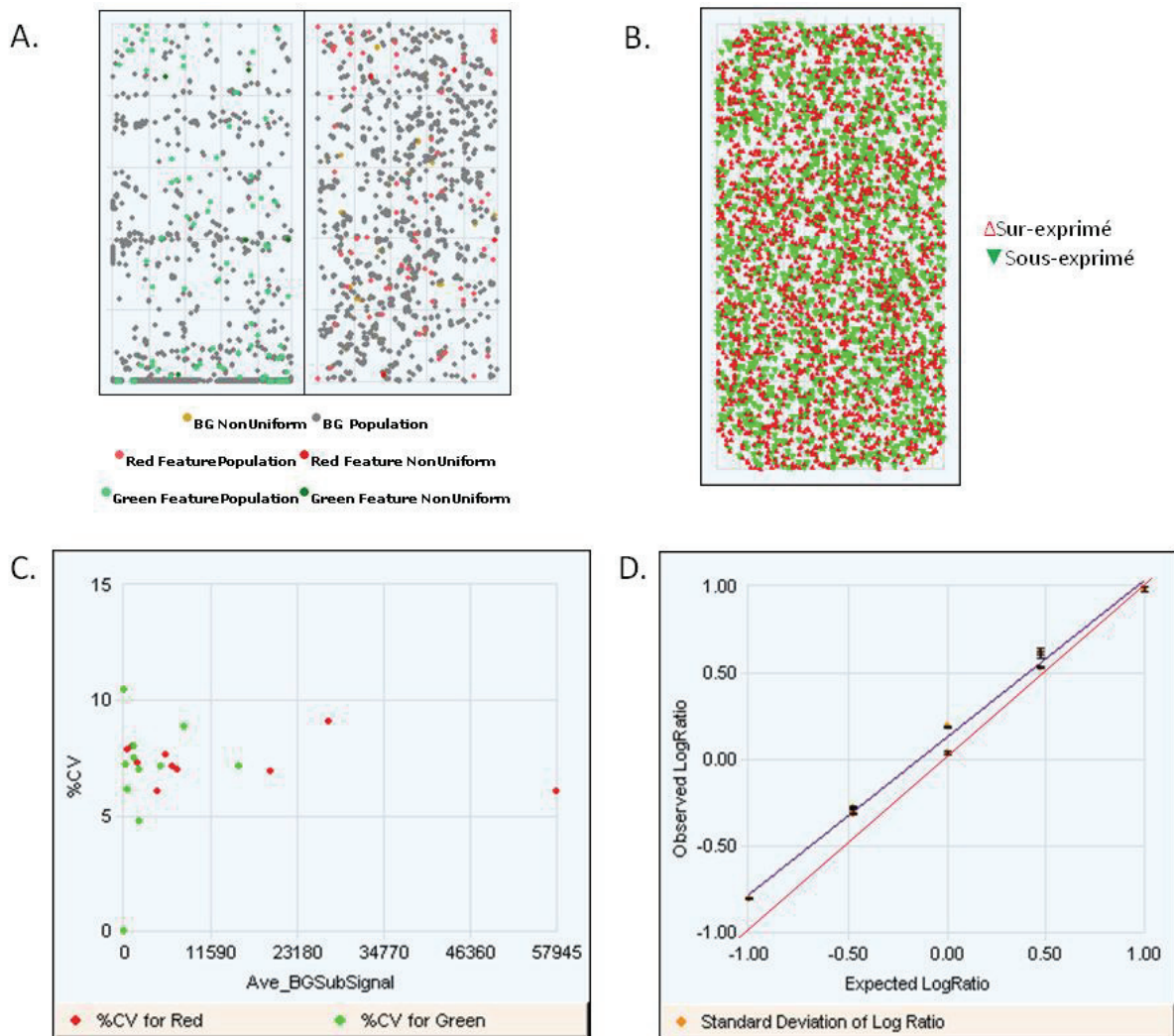


Figure 35 : les images de contrôle qualité des lames dans un rapport de *Feature Extraction*. Une distribution des probes anormaux (A) et des spots des gènes sur- et sous-exprimés (B); C. CV% des signaux moyennes après la soustraction du bruit de fond; D. une corrélation entre les ratios d'expression observé et attendu des ARN contrôles internes.

Les données de chaque image sur l'annotation du gène, la position des probes, l'intensité rouge/vert de l'expression des spots, les valeurs du bruit fond sont

enregistrées en fichier.txt. Les fichiers .txt obtenus par *Feature Extraction* ont été convertis en fichiers .gpr par le logiciel FE2G dans la fenêtre de travail de R.

2.4.4.2 *Normalisation des données*

La normalisation des données brutes a été traitée comme décrit ci-dessous. Comme les différents oligonucleotides *arrays* sur la lame ont été fabriqués de manière très reproductible, les variations de signal de la référence (Cy5) n'ont aucune signification biologique, donc les valeurs des intensités ont été remplacés, pour chaque probe, par leurs valeurs moyennes pour obtenir une référence unique et idéal, quelle que soit la condition. Pour chacune condition étudiée (Cy3), en supposant que la même quantité d'ARN marqués été hybridée, nous avons ajusté globalement le signal de fluorescence entre les différents *arrays* de la même condition, en corrigeant l'intensité de chaque spot, au moyen de la formule suivante :

$$G_{ij \text{ normalisé}} = G_{ij} * \langle G \rangle / \langle G_j \rangle$$

Où G_{ij} est l'intensité du spot, $\langle G \rangle$ est l'intensité moyenne de tous les *arrays* pour une même condition, et $\langle G_j \rangle$ est l'intensité moyenne de tous les spots pour un *array*. Le coefficient de correction des intensités du vert ($\langle G \rangle / \langle G_j \rangle$) dans chaque array doit être relativement proche de 1. S'il s'en écarte beaucoup et des défauts ont été constatés dans l'analyse d'image, ou si le coefficient de correction a été supérieur ou égal à 1,5, il faut éliminer l'array de l'analyse et recommencer les calculs sur les arrays conservés. Cette façon de normaliser conduit à corriger les biais expérimentaux liés à l'incorporation du *dye* et à la mesure des quantités d'ARN.

Les données ont ensuite été traitées avec le logiciel MAnGO.

2.4.4.3 *Analyse de Mango*

MAnGO, un outil de R interactif basé sur le package limma, est dédié à l'analyse d'expériences de microarrays bicolores (Marisa et al. 2007), mis au point par l'équipe Bioinfome (Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR2167 et Plate-

forme Puces-à-ADN Orsay dirigé par l'équipe de Pr Hervé DELACROIX de Godmap à Gif-sur-Yvette). L'analyse a été réalisée en quatre grandes étapes:

- une étape d'«*overview*» qui permet d'évaluer la qualité des données et d'identifier les biais,
- une étape de prétraitement qui corrige les données : soustraction du bruit de fond, filtrage,
- une étape d'analyse différentielle, sur chaque lame ou sur plusieurs lames.
- A chaque étape, la qualité des données a été évaluée sur des représentations graphiques.

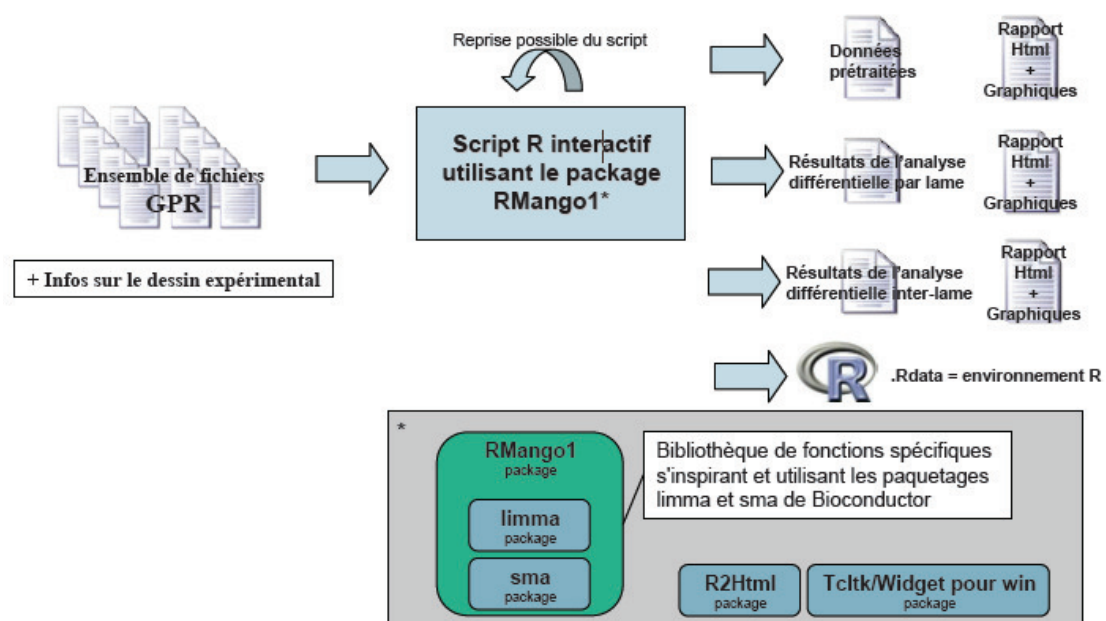


Figure 36: Architecture de ManGO

2.4.4.3.1 Import et prétraitement des données

Par défaut, MAnGo a extrait 5 colonnes de données qui portant les noms suivants : F532 median, B532, F635 median, B635 et Flags à analyser. MAnGo nous a donné un rapport d'une vue d'ensemble pour évaluer la qualité des données et d'identifier les biais. Ensuite, le bruit de fond a été estimé de manière globale en utilisant la procédure "morphological closing followed opening" (Bourens et al., 2009), puis soustrait des mesures d'intensité brutes. Les « mauvais » spots (non détectés, saturés) ont été écartés de l'analyse subséquente. Aucune normalisation dans ou entre les arrays n'a été faite avec Mango.

2.4.4.3.2 L'analyse différentielle

Pour l'analyse différentielle entre les arrays, il faut choisir les deux conditions à comparer, filtrer les données, supprimer tous les spots contrôles (positifs, négatifs, contrôles de calibration), prendre la moyenne des réplicats biologiques de la même condition, fixer un *fold-change* et une valeur de *alpha error risk* par défaut. MAnGO réalise de manière automatisée un test de *Student* entre les valeurs de deux conditions comparées. Les résultats visuels sont été présentés en Volcano plat. Toutes les données de cette étape sont enregistrées sous un fichier *.txt. Les probes différentiellement exprimées de manière significative sont sélectionnées sur la base des paramètres suivants :

- fold-change* (FC) : $FC > 1.3$ ou $FC < -1.3$ ce qui signifie un changement d'expression génique d'un facteur +1,3 fois ou -1,3 fois plus importante dans deux conditions comparées.
- intensité moyenne (*Amean*) : $A_{mean} \geq$ intensité moyenne de probes contrôles positifs, ce qui signifie que le gène est suffisamment exprimé dans la région d'intérêt, ici l'hippocampe ventral.
- p-value* (pval) : $pval \leq 0.05$, ce qui signifie que ces changements sont significativement différents.

2.4.4.4 ***Ingenuity pathway analysis (IPA)***

Ingenuity Pathway analysis est un logiciel qui aide les chercheurs à modéliser, analyser et comprendre les systèmes biologiques et chimiques complexes à plusieurs niveaux en intégrant les données de plates-formes expérimentales très variées et en fournissant un aperçu des interactions moléculaires et chimiques, des phénotypes cellulaires et des processus de notre système, soutenus par une énorme base de données appelée *Ingenuity® Knowledge Database*. Cette base de données regroupe les informations sur des dizaines de milliers de gènes humains, de la souris et le rat. Le chiffre exact est un nombre sans cesse en évolution (plus de 7 millions de gènes et molécules à ce jour) comme le sont les nouvelles découvertes scientifiques issues de la littérature, et extraites manuellement par des scientifiques de niveau doctorat. Cette base de données comprend les différents liées reportés

dans les publications entre les gènes, les médicaments, les biomarqueurs, les produits chimiques, les processus cellulaires, la signalisation et les voies métaboliques et ceci en condition normale comme pathologique (Figure 37).

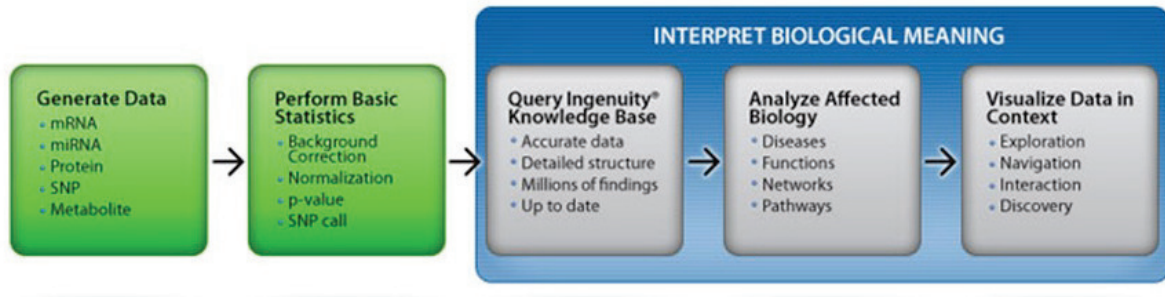


Figure 37: Workflow de l'interprétation de l'analyse biologique d'IPA

Toutes les analyses Ingenuity donnent les informations suivantes:

- Les réseaux d'interactions entre nos données ainsi que des molécules non étudiées. Les molécules et les relations entre ces molécules sont affichées comme des formes et des flèches dans un réseau.
- Les fonctions et maladies associées aux gènes fournis par nos données, et tous les gènes et les produits chimiques qui sont associés avec nos données.
- Les grandes voies de signalisation « Canonical Pathways » et les voies métaboliques affectées associées à nos données.

Les réseaux de gènes fournis par Ingenuity ont été générés par un algorithme en fonction de leur connectivité et sont limités à 35 éléments par réseau (Gaiteri et al., 2010), mais cette limite peut être augmentée jusqu'à 70, notamment lorsque l'on travaille sur des données comprenant de nombreux éléments.

2.5 RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-qPCR a été réalisée afin:

- 1/ de valider la qualité du prélèvement tissulaire cérébral.
- 2/ de confirmer les gènes présentant une sous ou surexpression significative lors de l'analyse des résultats obtenus par les puces à ADN.

2.5.1 Transcription inverse

1 µg d'ARN totaux ont été dénaturés 5 min à 65°C, en présence d'*Anchored-Oligo(dT)₁₈* (2,5 µM) dans un volume de 13 µl. Puis, le premier brin complémentaire (ADNc) des ARNm a été synthétisé par *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche®, , USA) en présence de RNaseOUT (20 U) et de dNTP (1 mM) pendant 60 min à 50°C, dans un volume total de 20 µl (Figure 38). Une réaction de contrôle négatif « RT0 » a été réalisée en parallèle, sans transcriptase inverse, afin de vérifier par qPCR l'absence d'ADN génomique contaminant.

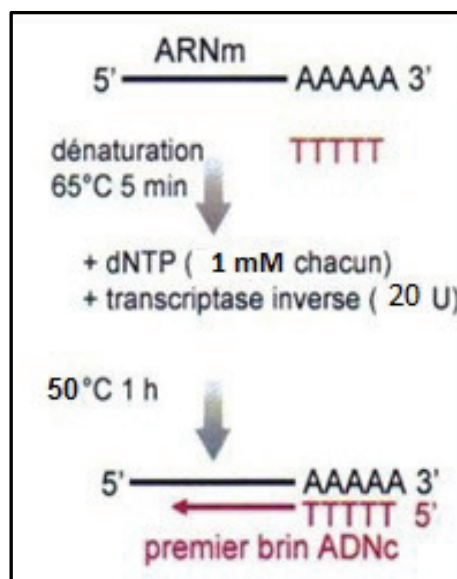


Figure 38: Le processus de transcription inverse

2.5.2 Choix des amorces de PCR quantitative en temps réel

La position des introns dans les gènes d'intérêt a été recherchée avec l'outil d'alignement *BLAT* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Les amorces ont été choisies selon les paramètres en Tableau 17, à l'aide du logiciel *Primer 3 Plus*, en plaçant l'une des deux amorces dans la portion correspondant à la sonde oligonucléotidique présente sur la lame, et dans 2 exons différents si possible (Par exemple : Cap1, Figure 39). Les amorces ont été synthétisées à façon par Operon (Paris, France).

Paramètres	Tm	Taille du produit	Taille du primer	% GC	Max auto-complémentarité		Max stabilité 3'
					<8	3' <3	
Limites	57°C~62°C	80 pb~150 pb	18 pb~25 pb	20%~8%	<8	3' <3	ΔG<9
Optimum	60°C	100 pb	20 pb	50%	-	-	-

Tableau 17: les paramètres pour la désigne des amorces.

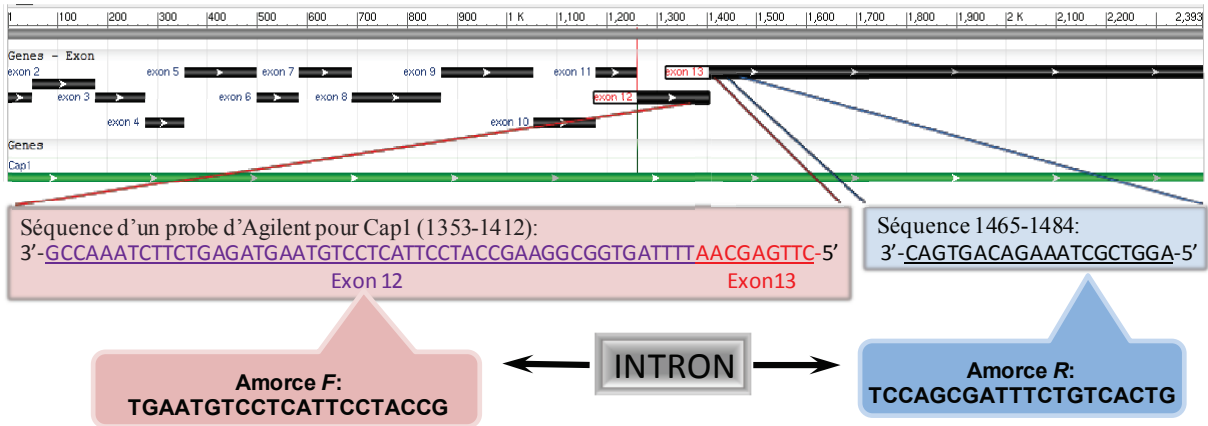


Figure 39: les situations des amorces du gène Cap1.

La séquence du gène Cap1 (vert, GeneID : NM_007598) est divisée en 13 exons (noir). La séquence d'un sonde d'Agilent pour Cap1 est franchie les exons 12 (violet) et 13 (rouge). L'amorce F du Cap1 est choisie dans la partie de l'exon 12 correspondant à la sonde oligonucléotidique présente sur la lame, l'amorce R est désignée dans la partie de l'exon 13 indépendante la sonde oligonucléotidique d'Agilent. Un intron de 1720 pb existe entre les amorces F et R.

2.5.3 PCR quantitative en temps réel

Chaque cycle de polymérase chain reaction (PCR) commence par une étape de dénaturation de l'ADN (95°C). Puis, les amorces sont appariées à une température dépendant de la température de fusion ou Tm des amorces (ici 60°C). Finalement l'étape de polymérisation a lieu à 72°C. Au cours de la PCR, l'accumulation du produit amplifié est mesurée en temps réel grâce à un intercalant (SYBR®Green I) qui se lie à l'ADN double brin en émettant une fluorescence mesurée à 530 nm après excitation à 488 nm (Figure 40).

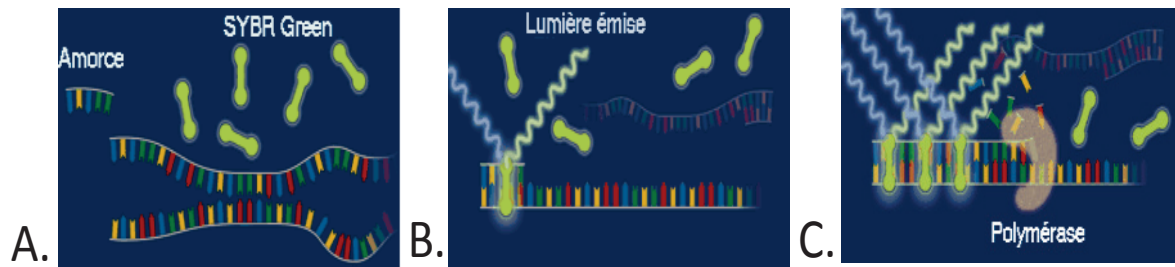


Figure 40: A, lors de la dénaturation, le SYBR Green est libre en solution et très peu fluorescent. B, à la température d'hybridation, les amorces se lient à l'ADN et le colorant commence à se fixer au double brin. C, la polymérisation fait augmenter la quantité d'ADN et donc le niveau de fluorescence.

Au cours des premiers cycles de PCR la quantité de produit amplifiée est trop faible pour être détectable. La courbe d'accumulation du produit, d'allure exponentielle, apparaît ensuite puis atteint un plateau du fait de l'épuisement des substrats et de l'inactivation de l'enzyme. Plus le transcrit est exprimé de façon importante, plus le nombre de cycles nécessaire pour faire apparaître un signal est faible. Ce cycle-seuil ou « *cycle threshold* » (Ct) est le paramètre utilisé pour la quantification. Une gamme étalon externe permet de faire correspondre une valeur quantitative à chaque Ct (Figure 41).

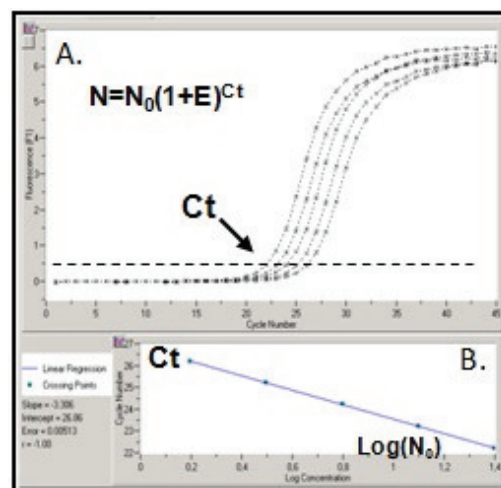


Figure 41: La portion exponentielle des courbes d'amplification (A) est décrite par d'équation : $N = N_0(1+E)^{Ct}$ où N est le nombre de copies d'amplicon présentes au cycle Ct, N_0 , le nombre initial de copies de la séquence dans l'échantillon, E, l'efficacité de PCR L'équation de la gamme standard externe (B) est : $Ct = \text{Log}(N_0) \times k + C$, où k est la pente de la droite.

La PCR est réalisée en tubes capillaires dans un thermocycleur Light Cycler® 1.2 avec le réactif *Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green* (Roche Diagnostics),

dans un volume de 10 µl. Pour chaque paire d'amorces, la spécificité est vérifiée d'après la courbe de fusion et le profil d'électrophorèse en gel d'agarose, puis l'efficacité E est calculée d'après la pente de la gamme standard obtenue sur une série de dilutions successives de l'un des cDNA étudiés, selon la relation : $E = (10^{-1/k}) - 1$ (Figure 41).

Enfin, la quantification relative est faite sur l'ensemble des échantillons dilués au 1/40^{ème} dans l'eau d'après l'équation de la gamme standard, ou par le calcul du $\Delta\Delta Ct$ selon l'équation suivante (où R est le rapport d'abondance normalisé et le calibreur, la condition biologique témoin).

$$R = \frac{(1+E)_{cible}^{Ct_{cible}(\text{calibreur}) - Ct_{cible}(\text{échantillon } x)}}{(1+E)_{ref}^{Ct_{ref}(\text{échantillon } x) - Ct_{ref}(\text{calibreur})}}$$

Les résultats de la quantification des ARNm des gènes d'intérêt (« cible ») sont normalisés par rapport à l'abondance des ARNm de gènes d'expression invariante (« ref »), ici la β -actine, Gapdh, et la cyclophiline G.

2.5.4 Traitement statistique des résultats

Les valeurs de quantification relative obtenues pour les souris KO et WT sont comparées par un test ANOVA à un facteur. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de $\log_2 \text{Ratio} \pm$ l'écart standard à la moyenne (ESM). L'expression d'un gène est considérée comme significativement modifiée si $p < 0.05$.

2.6 Immunohistochimie

Afin de déterminer les effets potentiels des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} ou les traitements pharmacologiques sur la neurogenèse hippocampique, nous avons estimé la survie et la prolifération cellulaire dans le gyrus dentelé de l'hippocampe par des techniques immunohistochimiques.

2.6.1 Marquage au BrdU pour l'étude de la survie neuronal.

La 5-bromo-2-déoxyUridine (BrdU, Roche, France) est administrée aux souris adultes en intrapéritonéal à la dose de 150mg/kg trois semaines (2 fois par jour pendant 3 jours) avant le sacrifice des souris pour l'étude de la survie. Cet analogue de la thymidine va s'intercaler dans un nouveau brin formé et permet de marquer ainsi les cellules nouvellement formées lors de la phase de réplication d'ADN (la phase S du cycle cellulaire). Le marquage est alors visualisé par immunohistochimie. Les cellules colorées sont donc celles qui se sont divisées entre l'injection du produit et le sacrifice.

Après une anesthésie létale à la kétamine (100mg/kg), on réalise une perfusion intracardiaque des animaux (solution saline froide pendant 2 minutes, puis paraformaldéhyde 4% (Sigma Aldrich, France) pendant 4 minutes), avant de prélever les cerveaux qui subiront une post-fixation de 24h dans du PFA 4% à 4°C, puis une cryoprotection dans une solution à 30% de sucrose additionnée d'un antifongique (azide de sodium 0.1%, Sigma Aldrich, France), et stockés à 4°C. Les cerveaux sont ensuite coupés selon un plan frontal à l'aide d'un cryostat (coupes de 35µm), et les coupes d'intérêt (aux niveaux des ventricules latéraux et de l'hippocampe) récupérées dans une solution tampon saline phosphate (PBS + azide de Na 0.1%). Les coupes sont montées sur lames et mises à bouillir dans une solution d'acide citrique (pH 6.0) à 96°C pendant 5 minutes, rincées avec du PBS, et traitées à la trypsine (0.01% dans Tris/CaCl₂) pendant 10 minutes. Les coupes sont ensuite incubées 30 minutes dans du 2N HCl, puis on bloque les sites non spécifiques avec une solution de 3% de sérum de chèvre. Les coupes sont alors incubées pendant une nuit avec l'anticorps anti-BrdU (Beckson Dickson, France, 1:100). Après les lavages au PBS, les coupes sont incubées une heure avec l'anticorps secondaire (1:200 chèvre antisouris biotinylé, Abcys, France), suivi d'une amplification avec le complexe avidine!biotine (kit Vectastain ABC Peroxydase, Vector, USA). Le marquage est visualisé par une coloration à la DAB (DiAminoBenzidine, kit Vectastain DAB, Vector, USA). Par un complexe avidin/biotine. Le marquage est visualisé par le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Les tissus sont plongés dans des bains successifs permettant le contremarquage par FAST-RED (Vector Nuclear Fast Red H-3403, ABCYS, Paris, France) pendant 2 min puis un rinçage à l'eau ultrapure

(1min) ainsi qu'une déshydratation progressive (dans de l'éthanol 70% puis 100% pendant 5 et 10 minutes, respectivement). Les lames sont recouvertes par une lamelle entre lesquelles on dépose un milieu de montage qui permet de fixer définitivement les tissus. La quantification des cellules marquées se fait comme précédemment décrite par Malberg et coll. (2000) à l'aide d'un microscope (Olympus BX51 microscope, Allemagne) au grossissement 40X.

2.6.2 Etude de la prolifération cellulaire : marquage au Ki67

Les coupes ont été lavées trois fois dans du tampon PBS contenant 0,3% de TritonX-100, ensuite elles sont bloquées et incubées avec l'anticorps primaire à 4 °C une nuit (Ki67, 1/100, Vector Labs). Le lendemain, les coupes ont été lavées trois fois dans du PBS et incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent-label-couplé pendant 2 h à température ambiante.

Résultats expérimentaux

Article 1

Characterization of 5-HT1A/1B-/- mice: An animal model sensitive to anxiolytic treatments.

Guilloux JP, David DJ, Xia L, Nguyen HT, Rainer Q, Guiard BP, Repérant C, Deltheil T, Toth M, Hen R, Gardier AM

Neuropharmacology. 2011, Feb 17.

Résumé:

Le but de cette étude a été de décrire un nouveau modèle de souris mutées pour les récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B créée au laboratoire. Pour cela, nous avons croisé les souris KO 5-HT1A de Parks et al. (1998) et de Saudou et al. (1994). La caractérisation des animaux doubles mutés a été réalisée à l'aide de 3 tests de peur non conditionnée : le test de champ ouvert, de labyrinthe en croix surélevée et d'alimentation supprimée par la nouveauté. Les effets d'une administration d'une dose unique d'un anxiolytique de type benzodiazépine (diazépam) et d'un ISRS (paroxétine) a été évaluée dans le labyrinthe en croix surélevé afin de vérifier si ces souris mutées répondaient à un traitement anxiolytique. De même, dans le test de la nage forcée, nous avons évalué l'activité basale des souris KO 5-HT1A/1B et leur réponse à une administration unique de paroxétine.

La double délétion des récepteurs 1A et 1B de la sérotonine qui exercent une action inhibitrice sur la libération de sérotonine allait-elle modifier les concentrations extracellulaires basales de sérotonine? A l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale in vivo, nous avons pu répondre à ces questions.

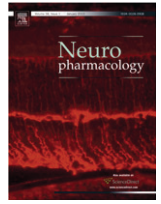
Les études cliniques montrent une bonne efficacité des ISRS dans le traitement des troubles anxieux et notamment la paroxétine dans le traitement de l'anxiété généralisée. Nos souris présentant une forte anxiété, mais ne possédant pas les récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B allaient-elles également répondre à un traitement chronique d'antidépresseur? Nous avons cherché à répondre à cette question en administrant de façon chronique la paroxétine (28 jours, 16 mg/kg, p.o.) chez les souris WT et KO 5-HT1A/1B et évalué leur réponse dans les mêmes tests qui ont permis leur caractérisation (Tests de champ ouvert, labyrinthe en croix surélevée, alimentation supprimée par la nouveauté, nage forcée).

Principaux Résultats :

- Les données comportementales obtenues chez les Souris KO 5-HT1A/1B montrent que :
 - les souris KO 5-HT1A/1B présentent des différences comportementales en comparaison des souris contrôles, observées dans 3 tests de peur non conditionnée observée par :
 - une diminution du nombre d'entrées et du temps passé dans le centre de l'arène du Champ Ouvert comparée aux souris contrôles WT
 - une diminution du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevée comparée aux souris KO 5-HT1A/1B
 - une augmentation de la latence des souris à aller se nourrir comparée aux souris KO 5-HT_{1A/1B} +/+ dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté.
 - le diazépam (mais pas la paroxétine) augmente le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts et diminue le temps passé dans les bras fermés du labyrinthe en croix surélevée chez les souris KO 5-HT1A/1B et WT, indiquant que ces souris hyper-anxieuses conservent une réponse de type anxiolytique suite à l'administration d'une benzodiazépine.
 - ces souris ne présentent pas de diminution du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée après administration d'une dose unique de paroxétine (8 mg/kg, i.p.), contrairement aux souris WT contrôles.
 - Un traitement chronique de paroxétine a partiellement inversé le phénotype anxieux de ces souris KO 5-HT1A/1B, mais sans modifier la réponse dans le test de la nage forcée.
- Les mesures des concentrations extracellulaires de 5-HT ([5-HT]ext) par microdialyse intracérébrale *in vivo* montrent que :
 - les [5-HT]ext basales sont augmentées dans le cortex frontal (WT contrôles vs KO 5-HT1A/1B : 2,41±0,16 vs 3,41±0,11) et le noyau du

raphé dorsal (WT vs KO 5-HT1A/1B : $13,5 \pm 0,88$ vs $19,64 \pm 1,8$) chez les souris KO 5-HT1A/1B suggérant une dérégulation du système sérotoninergique consécutives à la délétion de ces 2 sous-types d'autorécepteurs de la sérotonine.

- l'administration d'une dose unique de paroxétine augmente de façon importante les [5-HT]ext dans le cortex frontal ($351 \pm 17\%$) et le noyau du raphé dorsal ($643 \pm 95\%$) chez les souris KO 5-HT1A/1B et de façon modérée chez les souris WT contrôles (Cortex frontal : $151 \pm 9\%$, NRD : $213 \pm 16\%$), confirmant ainsi les données obtenues par Dawson et al. (2002) qui montrent une potentialisation des effets des ISRS lors de leur co-administration avec des antagonistes des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B en microdialyse intracérébrale chez le Rat.
- La température basale corporelle des souris KO 5-HT1A/1B est élevée par rapport aux souris WT contrôles.
- Dans le noyau du raphé dorsal, les délétions des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B a augmenté significativement le taux de la décharge spontanée des neurones et diminué l'expression d'ARNm de SERT (le transporteur du récepteur de la sérotonine).



Characterization of 5-HT_{1A/1B}–/– mice: An animal model sensitive to anxiolytic treatments

Jean-Philippe Guilloux^{a,*}, Denis J.P. David^a, Lin Xia^a, Hai Thanh Nguyen^a, Quentin Rainer^a, Bruno P. Guiard^a, Christelle Repérant^a, Thierry Deltheil^a, Miklos Toth^b, René Hen^c, Alain M. Gardier^{a,*}

^a Univ Paris-Sud EA 3544, Faculté de Pharmacie, 5, rue JB Clément, Châtenay-Malabry Cedex F-92296, France

^b Department of Pharmacology, Weill Medical College of Cornell University, 1300 York Avenue, New York, NY 10065, USA

^c Center for Neurobiology and Behavior, Columbia University, New York, NY 10032, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2010

Received in revised form

7 February 2011

Accepted 9 February 2011

Keywords:

5-HT_{1A} receptor

5-HT_{1B} receptor

KO mice

Anxiety

SSRI

Paroxetine

Anxiety

Depression

Electrophysiology

Neurochemistry

Behavior

ABSTRACT

Selective serotonin (5-HT) re-uptake inhibitors (SSRIs) are commonly used in the treatment of generalized anxiety disorder in Humans. However, because only few animal models display overt anxious-like behavior, detailed preclinical studies of the anxiolytic properties of antidepressants are still lacking. Here, we studied the neurochemical and behavioral effects of a double 5-HT_{1A/1B} receptor knockout in mice (5-HT_{1A/1B}–/–) as compared to their wild-type littermates (5-HT_{1A/1B}+/+). It is known that single deletion of either 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor induces behavioral changes that are not correlated with differences in brain serotonergic tone. Deletion of both receptors resulted in (i) higher emotionality of animals, as observed in three unconditioned paradigms of anxiety (open field, elevated plus maze and novelty suppressed feeding tests); (ii) a ≈200% increase in the mean spontaneous firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN) compared to 5-HT_{1A/1B}+/+ mice; (iii) elevated basal dialysate levels of 5-HT in the DRN and frontal cortex; (iv) an exaggerated response to acute paroxetine administration in microdialysis experiments, and (v) increased basal core body temperature. These findings suggest that the deletion of both autoreceptors induces a strong anxious-like behavioral state associated with increased 5-HT neurotransmission. Interestingly, 5-HT_{1A/1B}–/– mice are still sensitive to the acute administration of diazepam. Moreover, while deletion of both receptors impacted on the response to acute SSRI treatment in the forced swim test, anxiolytic-like effects of a chronic SSRI treatment were still observed in 5-HT_{1A/1B}–/– mice. Thus, the 5-HT_{1A/1B}–/– mouse model could be of great interest to unveil the mechanisms of action of the anxiolytic effects of SSRIs.

This article is part of a Special Issue entitled 'Serotonin: The New Wave'.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

General anxiety disorders are best treated with benzodiazepines, but these drugs induce several side effects such as dependency after chronic administration (Lader, 1994). Serotonin-selective reuptake inhibitors (SSRIs) antidepressants, as well as the serotonin–noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine, are also effective in the treatment of general anxiety disorders (Ball et al., 2005; Bielski et al., 2005; Rickels et al., 2003; Stein et al., 2005). However, compared to benzodiazepines, the decrease in side effects of SSRI is counterbalanced by their slower onset of therapeutic action (Klein et al., 1995; Rickels et al., 2003).

The anxiolytic properties of SSRIs are difficult to demonstrate in preclinical studies, because current animal models of anxiety are poorly predictive (Borsini et al., 2002). The generation of knockout (KO) mice has however showed promise in this regard. For example, 5-HT_{1A} receptor KO mice (5-HT_{1A}–/–) display an anxious phenotype (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998), associated with decreased exploratory activity, increased fear of aversive environments (Klemenhagen et al., 2006) and other aspects of anxiety, such as autonomic activation, increased stress responsiveness, and neuroendocrine abnormalities (see Toth, 2003 for a review). Moreover, increased 5-HT turnover (Ase et al., 2000) and increased 5-HT neuron firing (Richer et al., 2002) have been reported in 5-HT_{1A}–/– mice, even though not associated with increased basal extracellular 5-HT levels ([5-HT]_{ext}), as measured by microdialysis in the striatum (He et al., 2001; Knobelmann et al., 2001b), dorsal raphe nucleus (DRN) and frontal cortex (Bortolozzi et al., 2004; Guilloux et al., 2006). Moreover, acute

* Corresponding authors. Tel.: +33 1 46 83 54 16; fax: +33 1 46 83 53 55.

E-mail addresses: jean-philippe.guilloux@u-psud.fr (J.-P. Guilloux), alain.gardier@u-psud.fr (A.M. Gardier).

treatment with an SSRI, which increases [5-HT]_{ext} levels in the DRN and frontal cortex of both 5-HT_{1A}^{-/-} and 5-HT_{1A}^{+/+} mice (Guilloux et al., 2006), has a greater effect on the forced swim test in the 5-HT_{1A} KO mice, whereas chronic SSRI treatment does not seem to affect the anxiety phenotype of these mice (Santarelli et al., 2003).

5-HT_{1B}^{-/-} mice do not display overt anxiety (Sari, 2004), but enhanced aggressiveness (Brunner and Hen, 1997; Ramboz et al., 1996; Sari, 2004; Saudou et al., 1994), an abnormality which correlates with brain 5-HT dysfunction (Siever, 2008). Even though axon terminal release of 5-HT is under the control of 5-HT_{1B} autoreceptors (Chaput et al., 1986), changes in 5-HT dynamics are not prominent in the brain of 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Ase et al., 2000, 2001). Nor do these mice show any significant increase in 5-HT neuron firing (Evrard et al., 1999). Accordingly, their basal [5-HT]_{ext} levels appear to be unaffected in 5-HT terminal areas (De Groote et al., 2002b; Gardier et al., 2003; Knobelmann et al., 2001b; Malagie et al., 2001; Trillat et al., 1997). However, by comparison to wild-type mice, acute SSRI treatment produces a greater [5-HT]_{ext} increase in the hippocampus and frontal cortex of 5-HT_{1B}^{-/-} mice (De Groote et al., 2002a,b; Malagie et al., 2001, 2002), even if this treatment has no effect in the forced swim test (Gardier et al., 2001).

Very few studies have been aimed at characterizing the effects of a disruption of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice have been generated previously to evaluate the binding ability of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, to 5-HT₇ receptors (Bonaventure et al., 2002) and the impact of this double deletion on sleep-wakefulness rhythms (Alexandre et al., 2004). However, a behavioral, neurochemical and electrophysiological characterization of these mice is still lacking.

In this context, we hypothesized that a mouse lacking both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors might represent an interesting animal model to test for anxiolytic-like activity of SSRIs. We thus generated double KO mice (5-HT_{1A/1B}^{-/-}), measured the effects of the double mutation on [5-HT]_{ext} in the DRN and frontal cortex of these mice, and correlated such measurements with behavioral responsiveness to either acute or chronic SSRI antidepressant treatment. Our results provide the first demonstration that 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice display an anxiety-like phenotype associated with an increased basal firing rate of DRN 5-HT neurons with increased basal [5-HT]_{ext} in both the DRN and frontal cortex, as well as a reversion of this anxious phenotype by chronic SSRI treatment.

2. Methods

2.1. Animals

5-HT_{1A} receptor KO mice (5-HT_{1A}^{-/-}) generated by Parks et al. (Parks et al., 1998) on the C57BL/6 background were crossed with homozygous 5-HT_{1B} receptor KO mice (5-HT_{1B}^{-/-}) generated by Saudou et al. (1994) on the 129 Sv background. These F1 heterozygous 5-HT_{1A}^{+/-} and 5-HT_{1B}^{+/-} mice were then bred to generate double 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice F2 and their wild-type littermates (5-HT_{1A/1B}^{+/+} control mice). All the animals were genotyped by PCR (Supplementary Materials and Supplementary Fig. 1). Male animals F3 (6–8 weeks old) weighing 25–30 g were used. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines, in compliance with international laws and policies (Council directive # 87-848, October 19, 1987, “Ministère de l’Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale”, permissions # 92-196 to AM.G).

2.2. Chemicals and drugs

Paroxetine hydrochloride, a gift from GlaxoSmithKline laboratory (Harlow, United Kingdom), was dissolved in NaCl 0.9% for acute administration (4 or 8 mg/kg intraperitoneally, i.p.) or in tap water for chronic administration (16 mg/kg/day for 4 weeks). Despite its relative lower selectivity for serotonin reuptake transporter, paroxetine displays greater affinity (Owens et al., 2001) and potency for this transporter than other SSRIs (Mochizuki et al., 2002). Paroxetine doses were chosen according to the literature showing that low doses are sufficient to induce acute effects in the elevated plus maze or in the forced swim test (David et al., 2003b; Koks

et al., 1999), whereas higher doses need to be used for chronic treatment (Elizalde et al., 2008). Diazepam (1 mg/kg, i.p.; Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in Tween 20%. Control animals were injected with the corresponding vehicle.

2.3. Behavior of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice

2.3.1. The open field paradigm

Anxiety and locomotor activity of mice were measured using the open field test (David et al., 2009). Each animal was placed in a 43 × 43 cm open field chamber, and tested for 30 min. Mice were monitored throughout each test session by an infrared tracking system (Med Associates, USA: (Rocha et al., 1998)). Dependent measures in the center were the total time and the number of entries over a 30-min period of test. The overall motor activity was quantified as the total distance travelled.

2.3.2. The elevated plus maze test

Each mouse was allowed to explore the apparatus for 5 min. Global activity was assessed by measuring the number of entries into the four arms (David et al., 2009). Anxiety was assessed by comparing the activity in the open versus enclosed arms.

2.3.3. The novelty suppressed feeding test

The novelty suppressed feeding paradigm (NSF) is a conflict test that elicits competing motivations between the drive to eat and the fear of venturing into the center of brightly lit arena. Latency to begin eating is used as an index of anxiety-like behavior, because classical anxiolytic drugs decrease this measure as well as chronic SSRI treatment (David et al., 2009). Mice were food-deprived for 24 h prior to the test. Testing was performed in a 50 × 50 cm box covered with bedding, and illuminated by a 70-Watts lamp. The latency to eat pellets of food placed in the center of the box, on the top of a piece of white filter paper, was timed. Each mouse was tested individually for 5 min.

2.3.4. The mouse forced swim test

In the forced swim test, mice were dropped individually into glass cylinders (height: 25 cm, diameter: 10 cm) containing 10 cm water height, maintained at 23–25 °C. Animals were tested for a total of 6 min. For acute administration of treatments, vehicle or paroxetine (8 mg/kg) were administered 30 min before the test. Two mice were tested simultaneously, and the time of mobility was recorded during the last 4 min of the 6-min testing period, after 2 min of habituation. The same well-trained experimenter, who was unaware of the treatment administered, performed the test.

2.4. Basal temperature measurement and stress induced hyperthermia (SIH)

Stress exposure induce several autonomic responses, including hyperthermia. The SIH test is based on this phenomenon and consists of a simple experimental procedure, in which the body temperature of mouse is measured twice via a rectal procedure, with an interval of 10 min. The procedure of the rectal temperature measurement (handling, insertion of the probe) is the actual stressor in this test (Olivier et al., 2003; Van der Heyden et al., 1997). After dipping in oil silicon, 2 cm of a thermistor probe was inserted in the rectum of mice to monitor body temperature using a BIO-TK9882 thermometer (BIOSEB, Vitrolles, France; accuracy of ±0.1 °C) (Trillat et al., 1998b). Experiments were performed at 10:00 AM. Digital recordings of basal rectal temperature (T₀) were obtained, and then body temperature was again measured 10 min (T₁₀) after the first measurement (that serves as a stressor). The stress-induced hyperthermia was calculated as the difference between these two temperatures ($\Delta T = T_{10} - T_0$).

2.5. Microdialysis procedure

Anaesthetized mice were implanted with probes located in the frontal cortex (stereotaxic coordinates in mm from bregma: A = +1.6, L = +1.3, V = -1.6) or in the DRN (A = -4.5, L = 0, V = -4.0; A, anterior; L, lateral; and V, ventral). Animals were allowed to recover from the surgery overnight. The next day, ≈ 20 h after surgery, the probes were continuously perfused with an artificial cerebrospinal fluid (flow rate = 1.5 µl/min in cortex, 0.5 µl/min in DRN) while animals were awake, freely moving in their cage. Dialysate samples were analyzed for [5-HT]_{ext} by a HPLC apparatus (limit of sensitivity ≈ 0.5 fmol/sample; signal-to-noise ratio = 2). Four fractions were collected to obtain basal values (means ± S.E.M.) before drug administration (Guiard et al., 2007; Guilloux et al., 2006). At the end of the experiments, localization of microdialysis probes was verified histologically (Bert et al., 2004).

2.6. In vivo electrophysiological recordings

Anaesthetized mice were placed into a stereotaxic frame. The extracellular recordings of the 5-HT neurons in the dorsal raphe were carried out as previously described (Guiard et al., 2008). The single-barreled glass micropipettes were positioned using the following coordinates (in mm from lambda): AP, -0.5 to 1; L, 0 ± 0.1; V, 2.5 to 3.5. Presumed 5-HT neurons were identified by their characteristic slow, regular firing rate (0.5–2.5 Hz) and long duration action potential (2–5 ms)

(Aghajanian and Vandermaelen, 1982). Electrophysiological data were expressed as mean \pm S.E.M of the firing rate. The number of spontaneously active 5-HT neurons was also determined in each experimental group and data were expressed as mean \pm S.E.M of neurons recorded per tract.

2.7. RNA isolation and SERT expression

Coronal brain slices were performed using a Brain matrix, and dorsal raphe nuclei were separated under the microscope from the rest of the tissue and directly put in TRIzol (Invitrogen®, USA). Total RNA from raphe nuclei was extracted from brain sections in TRIzol and assessed by chromatography (Agilent Bioanalyzer, Santa Clara, USA). Samples with an expert scoring number (RIN) above 7.2 were considered of good quality. 2 μ g of RNA were then reverse-transcribed with Anchored-Oligo(dT)₁₈ primers (Deltheil et al., 2008). Small PCR products (80–200 base-pairs) PCR products were amplified in triplicates using a LightCycler® Carousel-Based System (Roche, Mannheim, Germany) and SYBR Green PCR Master Mix Reagent (LightCycler® RNA Amplification Kit SYBR Green, Roche). Primer-dimers were assessed by amplifying primers without cDNA. Primers were retained if they produced no primer-dimers or non-specific signal after 35 cycles. Results were calculated as relative intensity compared to β -actin, and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with the tested primers was used to calculate the relative expression levels of the transcripts (Schmittgen and Livak, 2008).

2.8. Data analysis and statistics

For all experiments, statistical data analysis (StatView 5.0 Abacus Concepts, Berkeley, CA, U.S.A) used means \pm S.E.M. Student *t*-tests, one- or two-way ANOVA (on repeated measures for body temperature) were used followed by Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* test. Significant level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Behavioral phenotyping of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice and their response to chronic paroxetine treatment

3.1.1. Open field test

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the number of entries in the center zone and the time spent in the center revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,47) = 5.96$; $p < 0.05$], treatment factor [$F(1,47) = 9.38$; $p < 0.01$] and treatment \times genotype interaction between these two factors [$F(1,47) = 5.38$; $p < 0.05$] (Fig. 1A). Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the time spent in the center revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,47) = 25.21$; $p < 0.001$], no significant effect of treatment factor [$F(1,47) = 0.064$; $p = 0.80$] and no treatment \times genotype interaction [$F(1,47) = 0.65$; $p = 0.42$] (Fig. 1B). Thus, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a basal anxious-like phenotype characterized by a decrease in the number of entries and the time spent in the center compared to control mice ($p < 0.001$). Chronic treatment with paroxetine reversed this phenotype in part: it increased the number of entries in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p < 0.01$) and flattened the baseline difference observed between mutant and control mice ($p = 0.95$). This treatment induced a 4-fold increase in the time spent in the center in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice but this effect failed to reach statistical significance.

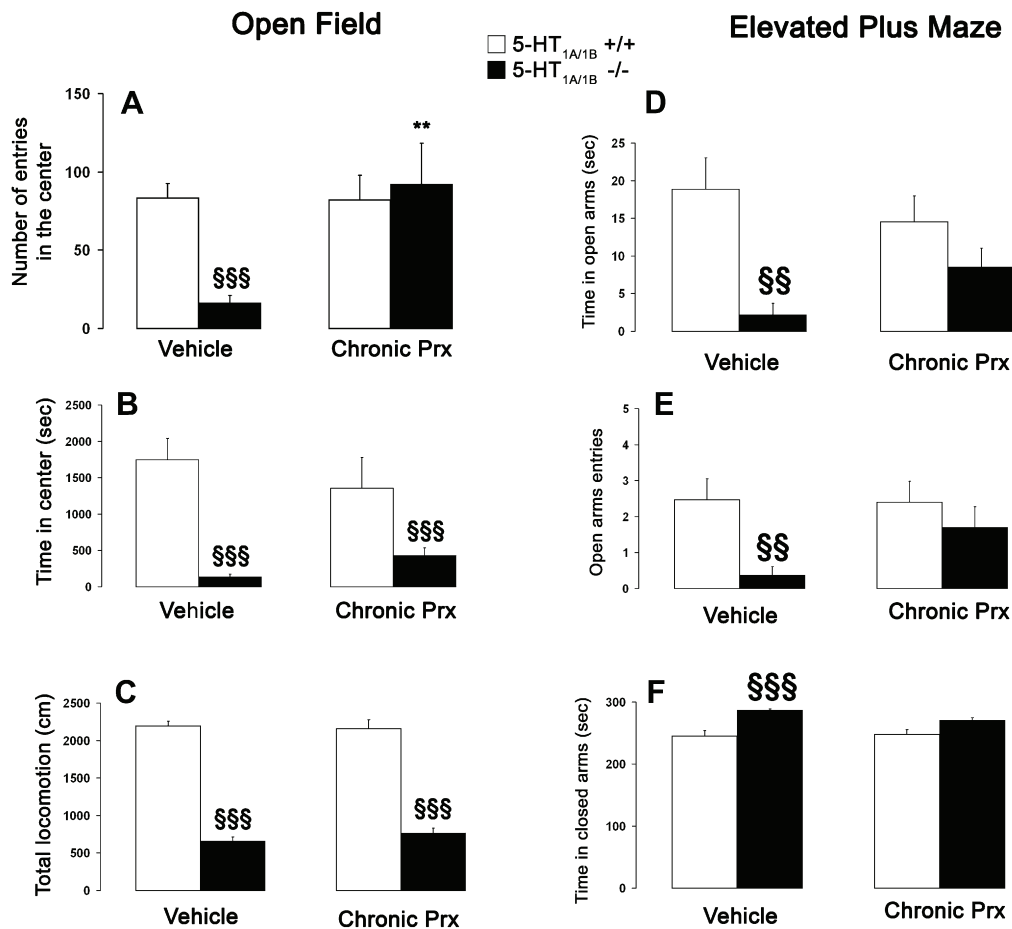


Fig. 1. Effects of chronic paroxetine on 5-HT_{1A/1B}^{-/-} and 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice behavior in the open field (A, B, C) and in the elevated plus maze (D, E, F). Results are expressed as means \pm SEM of parameters measured in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars): Left panel: Open field: number of entries in the zone of the center (Fig. 1A), time spent in the center (in seconds, Fig. 1B), and total locomotor activity (Fig. 1C); Right panel: Elevated plus maze: time spent in the open arms (in seconds, Fig. 1D), number of entries in the open arms (Fig. 1E), and time spent in the closed arms (in seconds, Fig. 1F). ** $p < 0.01$ significantly different from corresponding vehicle group; \$\$\$ $p < 0.001$ significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD *post hoc* test, $n = 11$ – 14 animals per genotype and per treatment.

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the total ambulatory distance revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,47) = 48.08$; $p < 0.001$], no significant main effect of treatment factor [$F(1,47) = 0.07$; $p = 0.79$] and no treatment \times genotype interaction [$F(1,47) = 0.06$; $p = 0.80$] (Fig. 1C). Thus, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a 3-fold decrease in basal locomotor activity compared to controls ($p < 0.001$). This decrease in locomotor activity seemed to be driven by the anxious phenotype, since there was no effect of genotype on the home-cage activity during 24 h (Supplementary Fig. S2 and Supplementary Materials).

3.1.2. Elevated plus maze test (EPM)

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the number of entries in the open arms and the time spent in the open arms revealed significant main effects of genotype factor [entries: $F(1,46) = 11.81$; $p < 0.01$ time: $F(1,46) = 17.45$; $p < 0.001$], not of treatment factor [entries: $F(1,46) = 2.19$; $p = 0.15$; time: $F(1,46) = 0.39$; $p = 0.53$], and no treatment \times genotype interaction [entries: $F(1,46) = 0.24$; $p = 0.63$; time: $F(1,46) = 0.71$; $p = 0.40$] (Fig. 1D and E). Thus, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed an anxious-like phenotype manifested by a decrease in the open arms entries ($p < 0.01$) and time spent in the open arms ($p < 0.01$) as compared to controls. No statistical differences between 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and mutant mice were then observed after chronic paroxetine administration (entries: $p = 0.05$; time: $p = 0.08$).

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the time spent in the closed arms revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,46) = 21.74$; $p < 0.001$], not of treatment factor [$F(1,46) = 1.47$; $p = 0.23$], and no treatment \times genotype interaction [$F(1,46) = 1.18$; $p = 0.28$] (Fig. 1F). The increase in time spent in the closed arms by untreated 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to their controls ($p < 0.001$) disappeared after chronic paroxetine treatment ($p = 0.05$).

3.1.3. Novelty suppressed feeding test (NSF)

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on latency values revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,46) = 8.15$; $p < 0.01$], treatment factor [$F(1,46) = 15.45$; $p < 0.001$], but no treatment \times genotype interaction [$F(1,46) = 0.12$; $p = 0.73$] (Fig. 2A). Untreated 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a major increase in the latency to feed compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($p < 0.05$). Thus, the anxious phenotype of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice observed in the open field experiment was confirmed in this paradigm. The chronic paroxetine treatment decreased the latency to feed in both 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p < 0.05$ for both strains), but a difference between genotypes still occurred following chronic paroxetine treatment ($p < 0.05$).

Neither treatment nor genotype had an effect on food intake measured after the test (genotype [$F(1,46) = 2.62$; $p = 0.12$], treatment [$F(1,46) = 2.34$; $p = 0.13$], treatment \times genotype interaction [$F(1,46) = 0.07$; $p = 0.79$]) (Fig. 2B).

3.2. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice did not respond to acute or chronic paroxetine administration in the mouse forced swim test (FST)

In wild type mice, both acute or chronic paroxetine administration increased mobility time in the FST, as already described (David et al., 2003b). The response to these treatments was different in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

3.2.1. Acute administration (Fig. 3A)

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the mobility time revealed significant no effects of genotype factor [$F(1,61) = 0.22$; $p = 0.64$] and treatment factor [$F(1,61) = 1.15$; $p = 0.29$], but an

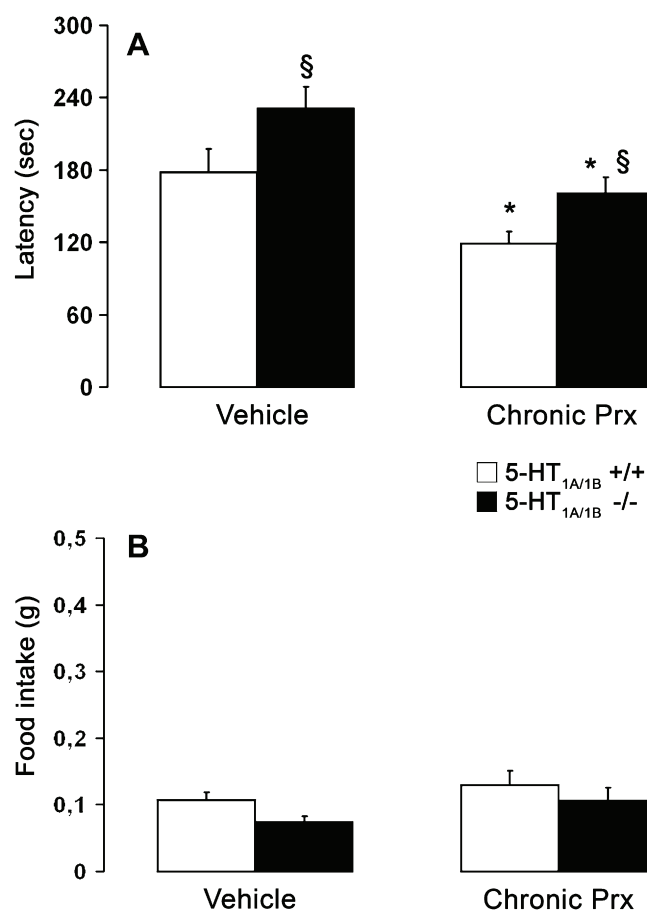


Fig. 2. Effects of chronic paroxetine on 5-HT_{1A/1B}^{-/-} and 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice behavior in the novelty suppressed feeding test. Results are expressed as means \pm SEM of the latency to feed (in seconds, Fig. 2A), and the food intake after the test (in grams) (Fig. 2B) in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars). * $p < 0.05$ significantly different from corresponding vehicle group; § $p < 0.05$ significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD post hoc test, $n = 11$ –14 animals per genotype and per treatment.

interaction between these two factors [$F(1,61) = 27.14$; $p < 0.001$]. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} displayed a change in basal activity i.e., mobility time was increased compared to WT littermates ($p < 0.01$). Acute paroxetine administration (8 mg/kg) increased the mobility time of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} ($p < 0.05$), while it decreased it in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p < 0.001$).

3.2.2. Chronic administration (Fig. 3B)

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on the mobility time revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,46) = 6.88$; $p < 0.05$], not of treatment factor [$F(1,46) = 0.56$; $p = 0.45$], and an interaction between these two factors [$F(1,46) = 12.28$; $p < 0.001$]. Chronic paroxetine administration increased the mobility time in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} ($p < 0.01$) but not ^{-/-} mice ($p = 0.12$). In this second experimental cohort, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice also displayed an increase in basal activity compared to WT littermates ($p < 0.05$). After 4-weeks of paroxetine administration, there was no difference between genotypes as mobility duration was increased in the 5-HT_{1A/1B}^{+/+} group, without any change in the treated mutants.

3.3. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice were sensitive to acute administration of diazepam or paroxetine in the elevated plus maze test

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on open arm entries revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,68) = 19.62$;

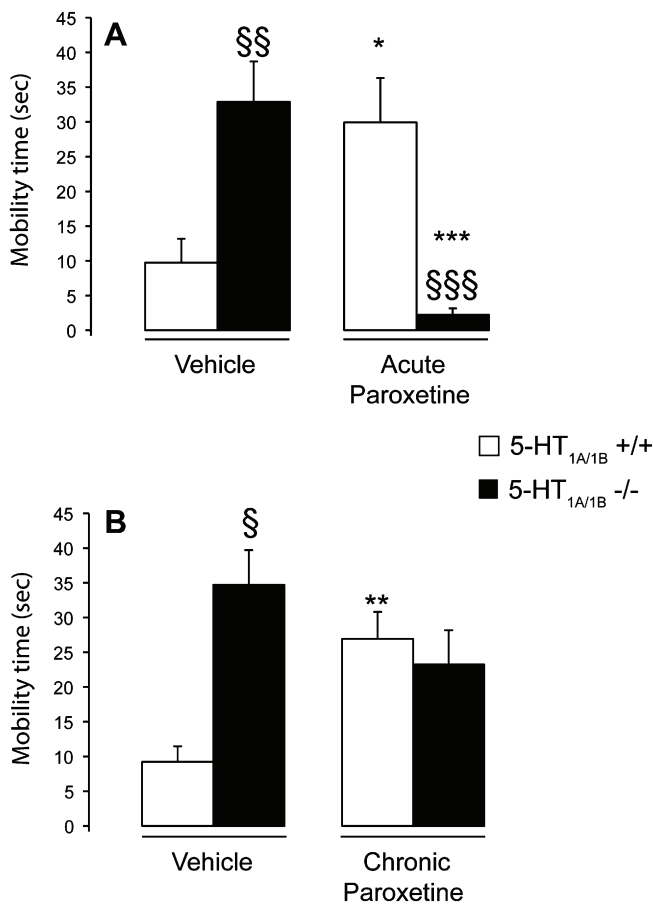


Fig. 3. Effects of acute (A) and chronic paroxetine (B) on the behavior of 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} and ^{+/+} mice in the forced swimming test. Results are expressed as means \pm SEM of the mobility time (in seconds). Fig. 3A: 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice (full bars) received either the vehicle or acute paroxetine (8 mg/kg, i.p.) 30 min before the test ($n = 13$ –19 animals per genotype and per treatment). Fig. 3B: 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice (full bars) received either the vehicle or chronic paroxetine (16 mg/kg/day during 28 days) ($n = 12$ –13 animals per genotype and per treatment). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ significantly different from the genotype-matched vehicle group; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ significantly different from 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by PLSD post hoc test.

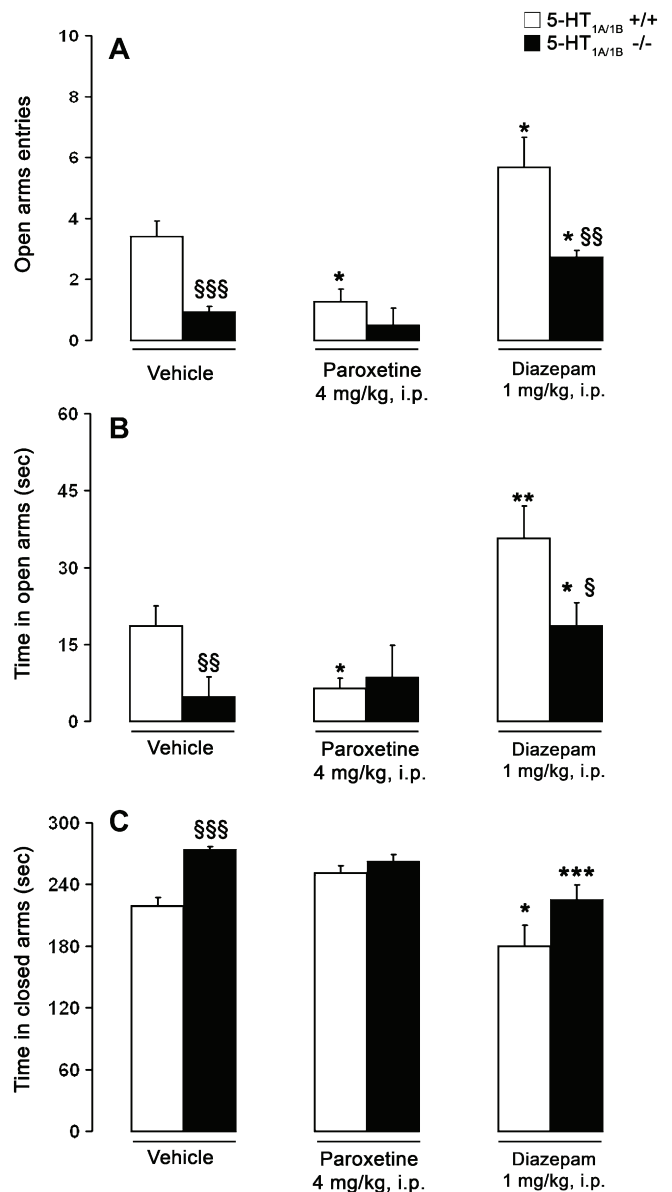


Fig. 4. Effects of the acute administration of diazepam or paroxetine on 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice' behavior in the elevated plus maze test. Results are expressed as means \pm SEM of number of entries in the open arms (in seconds, Fig. 4A), and time spent in the closed arms (in seconds, Fig. 4C). 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice (full bars) received either the vehicle or diazepam (1 mg/kg; i.p.) ($n = 10$ –15 mice per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ significantly different from the corresponding vehicle group; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ significantly different from 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD post hoc test, $n = 11$ –15 animals per genotype and per treatment.

$p < 0.001$], treatment factor [$F(2,68) = 16.48$; $p < 0.001$] and no treatment \times genotype interaction [$F(2,68) = 1.94$; $p = 0.15$] (Fig. 4A). 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice displayed an elevated anxious basal behavior than 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.001$). In this test, paroxetine had an anxiogenic effect in 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.05$), but not in mutants ($p = 0.41$). By contrast, an acute dose of diazepam (1 mg/kg, i.p.) increased the number of entries in open arms in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} ($p < 0.05$) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p < 0.01$), in keeping with its anxiolytic-like activity.

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on time spent in the open arms revealed significant main effects of genotype [$F(1,67) = 6.56$; $p < 0.05$] and treatment [$F(2,67) = 10.0$; $p < 0.001$], but no treatment \times genotype interaction [$F(2,67) = 2.44$; $p = 0.09$] (Fig. 4B). Thus, 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice displayed more anxious-like basal behavior than their controls ($p < 0.01$). Paroxetine had no effects in 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p = 0.56$), but a significant anxiogenic-like effect in 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.05$). By contrast, diazepam increased the time spent in open arms in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} ($p < 0.01$) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p < 0.05$).

Two-way ANOVA (treatment \times genotype) on time spent in the closed arms revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,68) = 14.61$; $p < 0.001$], treatment factor [$F(2,68) = 11.77$;

$p < 0.001$] and no treatment \times genotype interaction [$F(2,68) = 1.88$; $p = 0.16$] (Fig. 4C). 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice spent more time in the closed arms than 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.001$). Paroxetine had no effect in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p = 0.10$ and $p = 0.56$, respectively). Diazepam decreased the time spent in the closed arms in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} ($p < 0.05$) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p < 0.001$).

3.4. Behavioral consequences of stress induced hyperthermia in 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} and ^{-/-} mice

Two-way ANOVA on repeated measurements showed no effects of genotype ($F[1,40] = 0.62$, $p = 0.44$), but an effect of stress

($F[1,40] = 51.22$, $p < 0.001$) and an interaction between these two factors ($F[1,40] = 21.47$, $p < 0.001$; Fig. 5). At T0, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed an elevated basal body temperature compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($p < 0.01$). This higher body temperature was confirmed in another set of experiments using another cohort of animals and performed at 2PM (data not shown). Ten minutes later (T10), analysis of ΔT demonstrated that 5-HT_{1A/1B}^{+/+}, but not 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p = 0.48$), had an elevated body temperature (+1.1 °C), generated by the stress of inserting the rectal probe at T0 ($p < 0.001$).

3.5. Basal extracellular levels of 5-HT in the frontal cortex and DRN in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice

Table 1 shows the means \pm S.E.M. of basal [5-HT]_{ext} levels in the frontal cortex (in fmol/20 μ l) and DRN (in fmol/10 μ l) of the various groups of mice studied. Basal [5-HT]_{ext} were significantly increased in both the frontal cortex [$F(1,27) = 14.46$, $p < 0.001$] and DRN [$F(1,40) = 8.54$, $p < 0.01$] in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to controls.

3.6. Deletion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors potentiated the increase in 5-HT outflows induced by paroxetine administration

In the frontal cortex and DRN (Fig. 6A–D), the lack of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} autoreceptors potentiated the effects of paroxetine on [5-HT]_{ext}: two-way ANOVA (treatment \times genotype) on AUC values revealed significant main effects of genotype factor [frontal cortex: $F(1,25) = 78.84$; $p < 0.001$. DRN: $F(1,22) = 9.04$; $p < 0.01$], treatment factor [frontal cortex: $F(1,25) = 151.68$; $p < 0.001$. DRN: $F(1,22) = 22.53$; $p < 0.001$] and treatment \times genotype interaction [frontal cortex: $F(1,25) = 76.60$; $p < 0.001$. DRN: $F(1,22) = 9.82$; $p < 0.01$]. The acute administration of paroxetine (4 mg/kg, i.p.) increased [5-HT]_{ext} in both regions in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (frontal cortex: $p < 0.05$. DRN: $p < 0.001$) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (frontal cortex: $p < 0.01$. DRN: $p < 0.001$), but this effect was much stronger in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} than in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice (frontal cortex: $p < 0.001$. DRN: $p < 0.01$). After chronic paroxetine treatment, the paroxetine challenge produced a significant increase

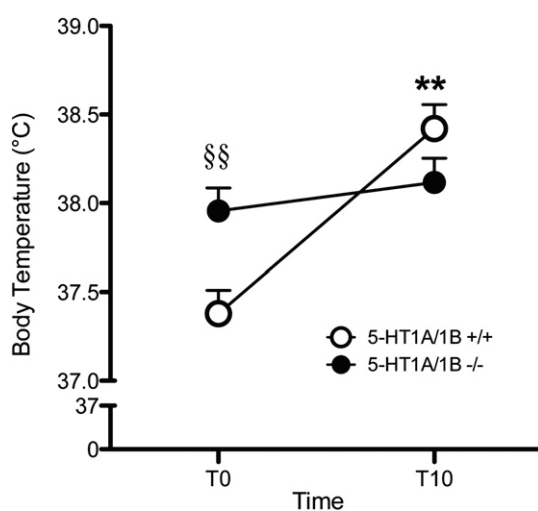


Fig. 5. Behavioral consequences of stress induced hyperthermia in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and ^{-/-} mice. Results are expressed as means \pm SEM of rectal temperature in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (○) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (●) measured at two different times (T = 0 and T = 10 min). ** $p < 0.01$ significantly different from the T0; §§ $p < 0.01$ significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD *post hoc* test, $n = 20$ –22 animals per genotype.

Table 1

Basal extracellular 5-HT levels in the frontal cortex (FCX) and Dorsal Raphe Nucleus (DRN) in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

	5-HT _{1A/1B} ^{+/+} mice	5-HT _{1A/1B} ^{-/-} mice
FCX (fmol/20 μ l)	2.41 (± 0.16 ; $n = 13$)	3.41 (± 0.11 ; $n = 16$)
DRN (fmol/10 μ l)	13.50 (± 0.88 ; $n = 15$)	19.64 (± 1.80 ; $n = 27$)

Results are expressed as means of basal 5-HT levels (\pm SEM, $n = \#$ of mice).

in cortical [5-HT]_{ext} in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice compared to the vehicle-treated group (AUC = 204 \pm 10.5%; $p < 0.001$) (insert, Fig. 6B).

3.7. Influence of 5-HT_{1A/1B} deletions in mice on basal firing rate in the dorsal raphe nucleus (DRN)

A student *t*-test on the firing rate of DRN 5-HT neurons indicated that the mean spontaneous firing rate of these neurons was significantly higher in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice than in controls (2.4 \pm 0.1 Hz vs. 1.2 \pm 0.1 Hz, respectively; $p < 0.001$, Fig. 7A and B). Interestingly, the mean number of DRN 5-HT neurons recorded per track was also significantly higher in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice than in controls (Fig. 7C, $n = 15$ tracks per genotype; $p < 0.001$).

3.8. Influence of 5-HT_{1A/1B} deletion in mice on SERT expression in the raphe nuclei

qPCR analysis of SERT expression in the DRN shown a 28% decrease in SERT mRNA levels in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice when compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice (Fig. 8; [$F(1,24) = 13.88$, $p < 0.001$]).

4. Discussion

This neurochemical and behavioral characterization of a mouse line knock-out for both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor genes complements the few studies performed in similar models (Alexandre et al., 2004; Bonaventure et al., 2002). 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice display a robust, “hyper-anxious” phenotype associated with (i) increased basal firing rate of DRN 5-HT neurons; (ii) increased basal [5-HT]_{ext} levels in both the DRN and frontal cortex; (iii) increased basal body temperature, and (iv) an increased reactivity to stress induced by the FST. This “hyper-anxious” phenotype is corrected in part by either acute diazepam or chronic SSRI administration.

4.1. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice basal phenotype

The anxious-like basal phenotype of the double KO mice appears to be driven mainly by the lack of the 5-HT_{1A} rather than that of 5-HT_{1B} receptors. Indeed, there is convincing evidence that 5-HT_{1A}^{-/-} mice may represent a “genetic model of anxiety” (Toth, 2003), while studies performed in 5-HT_{1B}^{-/-} mice suggest that these exhibit similar or less anxious-like behavior than controls (Brunner et al., 1999; Crabbe et al., 1999; Lopez-Rubalcava et al., 2000; Malleret et al., 1999). Furthermore, 5-HT_{1B} receptor antagonists display anxiolytic-like properties (Dawson et al., 2006). The hypolocomotion of the double mutants in the open field may well be associated with their anxious phenotype as both anxious-like behavior and hypolocomotion share similar neural pathways or genes (Yilmazer-Hanke, 2008) and co-occur in this test (Holmes et al., 2002). Indeed, 24-hours home cage activity measurement indicated that 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice display as much locomotion as their wild-type littermates. 5-HT_{1A}^{-/-} mice also display similar activity compared to their littermates, while 5-HT_{1B}^{-/-} mice display similar or increased total activity, as observed in the open

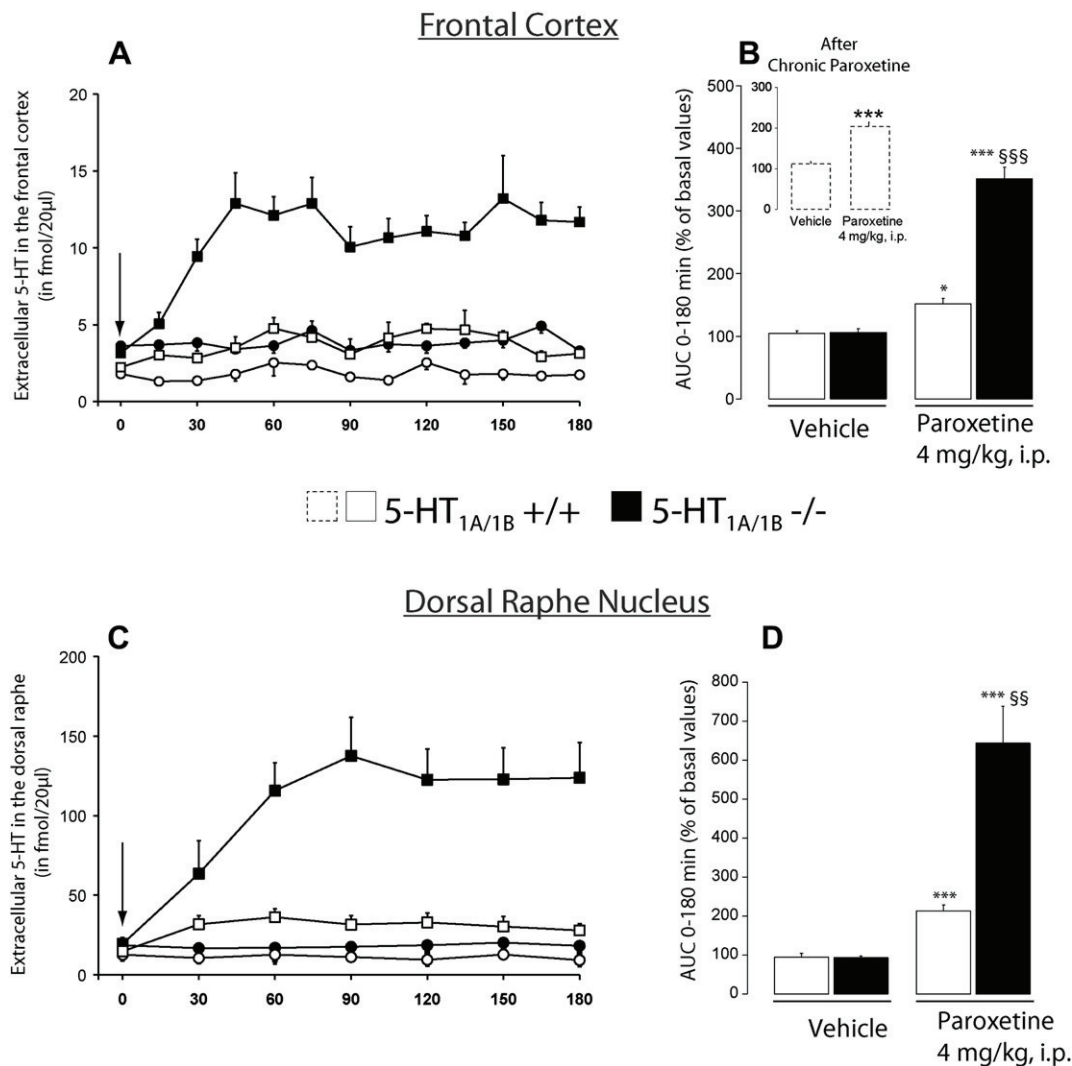


Fig. 6. Effects of acute paroxetine administration on cortical (A, B) or DRN [5-HT]_{ext} levels (C, D) in 5-HT_{1A/1B}+/+ and 5-HT_{1A/1B}-/- mice. In A and C, results are expressed as means \pm SEM of [5-HT]_{ext} (in fmol per 20 μ l) for the frontal cortex and DRN, respectively. 5-HT_{1A/1B}+/+ (empty symbols) and 5-HT_{1A/1B}-/- mice (full symbols; $n = 6-10$ mice per group) were administered either the vehicle (○, ●) or paroxetine (4 mg/kg, i.p.) (□, ■) at arrow. In B and D, data are expressed as area under the curve values (AUC; mean \pm SEM; $n = 5-8$ animals/genotype), i.e., relative amount of 5-HT outflow following the administration of either vehicle or paroxetine in percentage of baseline. The insert in 6A (dotted bars) shows the significant increase in [5-HT]_{ext} measured in the frontal cortex after the administration of an acute dose of paroxetine in 5-HT_{1A/1B}+/+ mice chronically treated with paroxetine. $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, significantly different from the corresponding vehicle-treated group; §§ $p < 0.01$ and §§§ $p < 0.001$, significantly different from 5-HT_{1A/1B}+/+ mice. One-way or two-way ANOVA followed by a PLSD *post hoc* test.

field paradigm (Crabbe et al., 1999; Malleret et al., 1999; Saudou et al., 1994; Scearce-Levie et al., 1999; Zhuang et al., 1999).

This hyper-anxious state was also reflected in the FST, as 5-HT_{1A/1B}-/- mice displayed a robust basal increase in mobility, an effect also observed in single 5-HT_{1A}-/- mice (Guilloux et al., 2006; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1996), but not in 5-HT_{1B}-/- mice (Trillat et al., 1998a). This suggests that the genetic inactivation of 5-HT_{1A} receptors enhanced the response of double mutant mice to stressful conditions, an effect that is not modified by inactivation of 5-HT_{1B} receptors.

Using neurochemical techniques, we tried to link the anxious-like phenotype of 5-HT_{1A/1B}-/- mice to changes in variation in serotonin neurotransmission. We found that the anxiogenic phenotype of 5-HT_{1A/1B}-/- mice correlated with a 40% increase in serotonergic tone in both the frontal cortex and DRN. Comparatively, a single mutation did not change basal frontocortical [5-HT]_{ext}, neither in single 5-HT_{1A}-/- mice (Guilloux et al., 2006; Knobelmann et al., 2001b), nor in single 5-HT_{1B}-/- mice (De Groote et al., 2002a; Gardier et al., 2003; Malagie et al., 2001).

These results suggest a lack of tonic control exerted by these autoreceptors on basal 5-HT release and that, in the single mutants, compensatory changes in the remaining autoreceptor subtype or other secondary developmental adaptations compensate for the absence of the missing autoreceptor.

Similarly, in pharmacological experiments, the co-perfusion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor antagonists in the raphe nuclei of rats has been shown to increase the local efflux of 5-HT, as measured by fast cyclic voltammetry, while no effects were observed when the antagonists were perfused separately (Roberts and Price, 2001), suggesting a synergistic effect of the blockade of both receptors on serotonergic tone. Conversely, it would seem that compensatory changes observed in terminal brain regions of 5-HT neurons in either 5-HT_{1A}-/- mice (Knobelmann et al., 2001a; Ramboz et al., 1998) or 5-HT_{1B}-/- mice (Knobelmann et al., 2001a; Shippenberg et al., 2000) may not be sufficient to dampen the increase in activity of these neurons.

Our electrophysiological results were consistent with the microdialysis data. Indeed, the mean spontaneous firing rate of

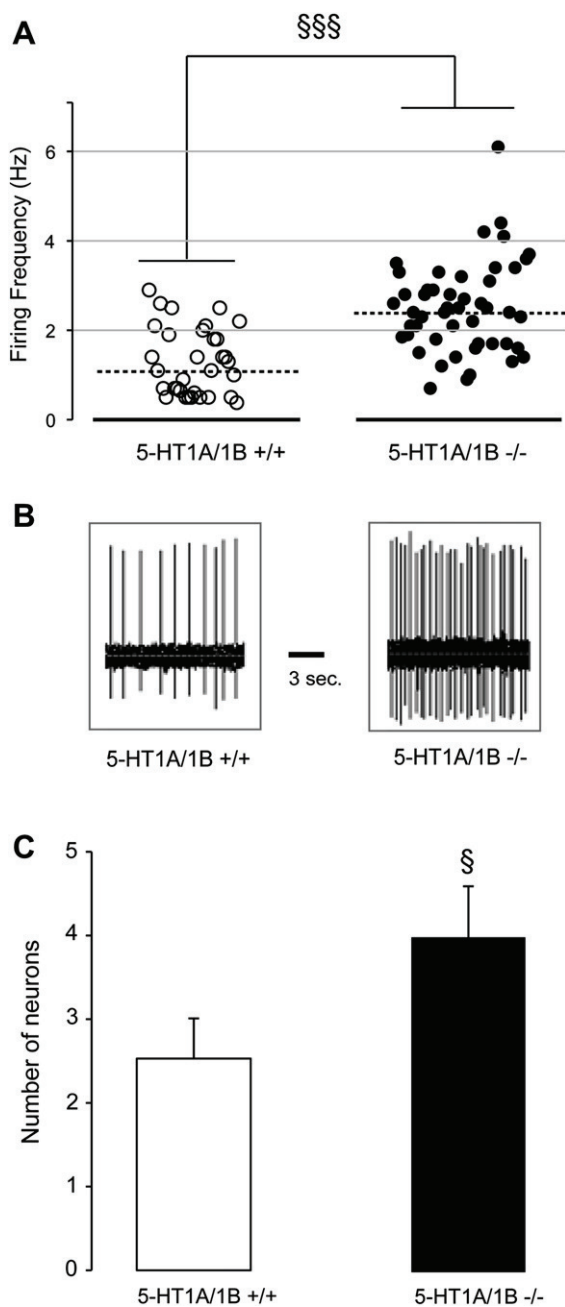


Fig. 7. Influence of 5-HT_{1A/1B} receptors deletion on the firing rate of DRN serotonin neurons. (A) Scattergram depicting the firing frequency of 5-HT neurons in the DRN of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. Dotted line represents the median value. (B) Examples of typical recordings of DR 5-HT neurons from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. (C) Mean \pm SEM for the number of 5-HT neurons recorded per track in the DRN of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars). § $p < 0.05$ and §§§ $p < 0.001$, significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($n = 6–8$ animals per genotype).

5-HT neurons was doubled in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, with 65% of 5-HT neurons still firing in the range measured in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice, as also observed in 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Richer et al., 2002). Thus, the deletion of the 5-HT_{1B} receptor did not amplify the consequences of the deletion of the 5-HT_{1A} receptor on the firing rate of DRN 5-HT neurons. The alterations in 5-HT neurotransmission could also be related to changes in the activity or density of the 5-HT reuptake transporter. Indeed, a 28% decrease in SERT mRNA expression was measured in the DRN in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, which should decrease 5-HT clearance and might thus be responsible for increased basal

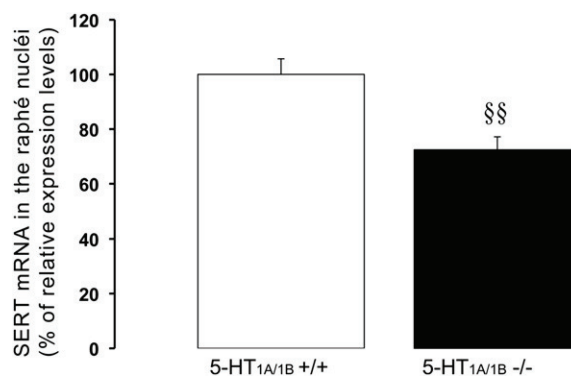


Fig. 8. Influence of 5-HT_{1A/1B} deletion on SERT expression in the dorsal raphe nuclei (DRN). Data are expressed as percentage of relative expression in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars). §§ $p < 0.01$, significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($n = 12$ animals per genotype).

dialysate 5-HT levels. By contrast, it is known that SERT distribution is unchanged in the frontal cortex or DRN of 5-HT_{1A}^{-/-} or 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Ase et al., 2001). While a repressive effect of high serotonin levels on SERT expression cannot be ruled out, no study has yet observed such an effect. Indeed, chronic SSRIs treatments are known to reduce SERT binding and protein levels without affecting mRNA, but by stimulating microRNA-16 levels (Baudry et al., 2010). Furthermore, no studies have looked at the effects of chronic treatment that increase serotonin levels (without acting directly on the serotonin transporter like monoamine oxidase A inhibitors) on serotonin transporter expression.

These neurochemical variations may account for the elevated basal body temperature found in these 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mutant mice. Basal body temperature was not changed in single 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Gross et al., 2002), while stress-induced hyperthermia was described in single 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Bouwknicht et al., 2001). Thus, surprisingly, the increased basal body temperature found in double mutant mice may result from the deletion of terminal 5-HT_{1B} autoreceptors rather than of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors.

The respective role of pre- versus postsynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors is difficult to fully discriminate. Microdialysis, electrophysiology and body temperature measurements are techniques that mainly assess the presynaptic receptors function/activity, and thus we observed that deletion of both these receptors relieve the inhibition exerted by these autoreceptors on serotonergic neurons. Behavioral analyses reflect roles of both pre- and postsynaptic receptors, thus rendering difficult the discrimination of each. However, as we published previously using genetic and pharmacologic approaches in the FST (Guilloux et al., 2006), postsynaptic 5-HT_{1B} receptors might be important for obtaining an antidepressant response to SSRI administration.

4.2. Acute SSRI treatment increases dialysate [5-HT] levels response, but has no antidepressant-like effect in the FST in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice

Genetic blockade of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors resulted in greater SSRI increases of dialysate 5-HT levels in the FCX and the DRN of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Thus, in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, the 5-HT level response to acute SSRI treatment was similar to that of a chronic treatment in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice, which leads to desensitization of both 5-HT_{1A} (Blier et al., 1987; Hervas et al., 2001) and 5-HT_{1B} autoreceptors (Moret and Briley, 1996; Sayer et al., 1999), that is responsible for a greater SSRI-induced increase in dialysate 5-HT levels (insert in Fig. 6A). By

Table 2
Comparison between single and double constitutive KO mice for 5-HT_{1A} and/or 5-HT_{1B} receptors.

	5-HT _{1A} –/– (compared to respective controls)	5-HT _{1B} –/– (compared to respective controls)	5-HT _{1A/1B} –/– (compared to respective controls)
<i>Electrophysiology on 5-HT neurons in the DRN</i>			
Basal	↗ ≈200% (Richer et al., 2002)	Unchanged (Evrard et al., 1999)	↗ ≈200%
Acute SSRI	Not tested	↘ sensitivity (Evrard et al., 1999)	Not tested
Chronic SSRI	Not tested	Not tested	Not tested
<i>Microdialysis</i>			
Basal [5-HT]ext	Unchanged in the FCX (Guilloux et al., 2006), Striatum (He et al., 2001; Knobelmann et al., 2001b) and in the DRN (Bortolozzi et al., 2004; Guilloux et al., 2006)	Unchanged in the FCX (De Groote et al., 2002b; Trillat et al., 1997) and in the hippocampus (De Groote et al., 2002a; Trillat et al., 1997)	↗ 40% in FCX and DRN
Effects of Acute SSRI on [5-HT]ext	FCX and DRN: ↗ (Guilloux et al., 2006)	Hippocampus: ↗ (De Groote et al., 2002a; Malagie et al., 2002; Malagie et al., 2001) or unchanged (Knobelmann et al., 2001a; Knobelmann et al., 2001b). FCX ↗ x2 (De Groote et al., 2002b)	↗ ≈300% in FCX and DRN
Effects of Chronic SSRI on [5-HT]ext	Not tested	FCX and Hippocampus: unchanged (Gardier et al., 2003)	Not tested
<i>Behavior</i>			
Basal anxiety	↗ Anxiety (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998)	Unchanged (Sari, 2004)	↗ Anxiety
Acute SSRI	↗ of SSRI efficacy in the FST (Guilloux et al., 2006)	↘ of SSRI efficacy in the FST (Gardier et al., 2001)	↘ of SSRI efficacy in the FST
Chronic SSRI	Anxiety-phenotype unchanged (Santarelli et al., 2003)	Not tested	Reversion of the anxious-phenotype
<i>Body temperature</i>			
Basal	Unchanged (Groenink et al., 2003)	Unchanged (Groenink et al., 2003)	↗

comparison, selective 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor antagonists have also been shown to potentiate the effects of an acute dose of SSRI on dialysate 5-HT levels in the frontal cortex of either wild-type mice (Malagie et al., 2001) or rats (Hervas et al., 2001). Interestingly, however, the increase in 5-HT dialysate after acute paroxetine in 5-HT_{1A/1B}–/– mice was not reflected in a greater antidepressant-like effect in the FST (Fig. 3).

Indeed, because 5-HT_{1A}–/– mice display a much greater sensitivity to acute SSRI in the FST (Guilloux et al., 2006), we expected to observe similar effects in 5-HT_{1A/1B}–/– mice. Here, we observed that a paroxetine dose that induced an antidepressant-like effect in 5-HT_{1A/1B}+/+ mice, decreased the mobility time in 5-HT_{1A/1B}–/– mice. Such a phenomenon could be due to the very high elevation of dialysate 5-HT levels in both the FCX and DRN following paroxetine administration (observed in microdialysis experiments), which could be reflected in this behavioral test as a serotonergic syndrome (i.e., mice are unable to swim during most of the test) (David et al., 2003b). However, at other low doses tested (1 and 4 mg/kg, i.p.), paroxetine had no antidepressant-like effect in 5-HT_{1A/1B}–/– mice (data not shown). Interestingly, paroxetine did not induce a similar effect after chronic administration, thus suggesting that, in the FST, effects obtained after acute or chronic paroxetine administration rely on different mechanisms. However, in keeping with our previous work, and here in 5-HT_{1A/1B}–/– mice after both acute and chronic paroxetine administration, we confirmed that activation of 5-HT_{1A} receptors dampens the effects of SSRI in the forced swim test (Guilloux et al., 2006), while activation of 5-HT_{1B} receptors is necessary to produce an antidepressant-like response in this test (Gardier et al., 2001).

4.3. Chronic SSRI treatment reverses the anxious-like phenotype of 5HT_{1A/1B}–/– mice

To increase the validity of the present animal model of anxiety, we confirmed in the elevated plus maze test that 5-HT_{1A/1B}–/– mice

respond to the acute administration of diazepam, as reported in other mice with elevated anxiety (Griebel et al., 2000; Olivier et al., 2001). SSRIs can also be effective in relieving anxious states in patients, without inducing the dependence observed with benzodiazepines. Here, chronic (28-days) paroxetine treatment attenuated the basal anxious-like phenotype of 5-HT_{1A/1B}–/– mice in all behavioral tests performed. In 5-HT_{1A/1B}+/+ mice, it only had an effect in the NSF. These findings are consistent with clinical studies reporting beneficial effects of chronic SSRI treatment in anxiety disorders in humans, with only minor or no effects in control subjects (e.g., Stocchi et al., 2003). Similarly, SSRIs are effective in animal models of high anxious-like states, but not in controls or in non-anxious strains of mice (David et al., 2009; Dulawa et al., 2004). The possible mechanisms through which chronic paroxetine treatment has an anxiolytic-like effect could involve serotonin, but also other neurotransmitter systems. Indeed, paroxetine possesses moderate affinity (<50 nmol/L) for the norepinephrine and dopamine transporters (Owens et al., 2001) and *in vivo*, paroxetine has been shown to increase cortical extracellular levels of norepinephrine in mice (David et al., 2003a). Thus, the behavioral effects measured in 5-HT_{1A/1B}–/– mice after chronic SSRI treatment could reflect a combination of the action of antidepressants on both the serotonergic and other monoaminergic systems. Furthermore, the present data confirm the hypothesis that some behavioral effects of chronic SSRI might not require the activation of 5-HT_{1A} receptors (Holick et al., 2008), nor, as shown here, the activation of 5-HT_{1B} receptors. Other molecular and cellular phenomena, such as hippocampal neurogenesis could contribute to the anxiolytic-like effects of SSRIs, even though no study has yet clearly demonstrated the 5-HT_{1A} and/or 5-HT_{1B} receptor dependency of this process.

4.4. Concluding remarks

Table 2 summarizes major similarities and differences reported between single (literature) and double KO (here) mice for 5-HT_{1A}

and/or 5-HT_{1B} receptors. The phenotype of 5-HT_{1A/1B}–/– mice shows many similarities with that of 5-HT_{1A}–/– mice. However, deletion of both receptors did not block the response to antidepressant treatment in several tests of anxious-like behavior. While the present study focused on the impact of the combined deletion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors on the brain serotonergic system, other neurotransmitter systems may be affected, especially since 5-HT_{1B} heteroreceptors are also known to control the release of GABA and glutamate (Maura et al., 1998). The 5-HT_{1A/1B}–/– mice model nevertheless emphasizes the role of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the pathophysiology of anxiety, and reveals that the deletion of these two receptors does not significantly impact on the anxiolytic-like properties of a chronic SSRI treatment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Animal Care Facility and the Transcriptome Platform of the “IFR141” of Paris XI University for their technical assistance.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.neuropharm.2011.02.009.

References

- Aghajanian, G.K., Vandermaelen, C.P., 1982. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J. Neurosci.* 2, 1786–1792.
- Alexandre, C., Fabre, V., Popa, D., Hamon, M., Adrien, J., 2004. Decreased slow wave and increased REM sleeps level in mutant mice lacking 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *J. Sleep Res.* 13, 1.
- Ase, A.R., Reader, T.A., Hen, R., Riad, M., Descarries, L., 2000. Altered serotonin and dopamine metabolism in the CNS of serotonin 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 75, 2415–2426.
- Ase, A.R., Reader, T.A., Hen, R., Riad, M., Descarries, L., 2001. Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT_{1B} knockout. *J. Neurochem.* 78, 619–630.
- Ball, S.G., Kuhn, A., Wall, D., Shekhar, A., Goddard, A.W., 2005. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment for generalized anxiety disorder: a double-blind, prospective comparison between paroxetine and sertraline. *J. Clin. Psychiatry* 66, 94–99.
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.M., Kellermann, O., 2010. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* 329, 1537–1541.
- Bert, L., Favale, D., Jego, G., Greve, P., Guilloux, J.P., Guiard, B.P., Gardier, A.M., Suaud-Chagny, M.F., Lestage, P., 2004. Rapid and precise method to locate microdialysis probe implantation in the rodent brain. *J. Neurosci. Methods* 140, 53–57.
- Bielski, R.J., Bose, A., Chang, C.C., 2005. A double-blind comparison of escitalopram and paroxetine in the long-term treatment of generalized anxiety disorder. *Ann. Clin. Psychiatry* 17, 65–69.
- Blier, P., de Montigny, C., Chaput, Y., 1987. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7, 24S–35S.
- Bonaventure, P., Nepomuceno, D., Kwok, A., Chai, W., Langlois, X., Hen, R., Stark, K., Carruthers, N., Lovenberg, T.W., 2002. Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H] 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT_{1A} knockout and 5-HT_{1A/1B} double-knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 240–248.
- Borsini, F., Podhorna, J., Marazziti, D., 2002. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl.)* 163, 121–141.
- Bortolozzi, A., Amargos-Bosch, M., Toth, M., Artigas, F., Adell, A., 2004. In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 88, 1373–1379.
- Bouwknicht, J.A., Hijzen, T.H., van der Gugten, J., Maes, R.A., Hen, R., Olivier, B., 2001. Absence of 5-HT_{1B} receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT_{1B} knockout mice. *Biol. Psychiatry* 49, 557–568.
- Brunner, D., Hen, R., 1997. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 836, 81–105.
- Brunner, D., Buhot, M.C., Hen, R., Hofer, M., 1999. Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT_{1B} knockout mice. *Behav. Neurosci.* 113, 587–601.
- Chaput, Y., de Montigny, C., Blier, P., 1986. Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 333, 342–348.
- Crabbe, J.C., Wahlsten, D., Dudek, B.C., 1999. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284, 1670–1672.
- David, D.J., Bourin, M., Jego, G., Przybylski, C., Jolliet, P., Gardier, A.M., 2003a. Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1128–1136.
- David, D.J., Renard, C.E., Jolliet, P., Hascoet, M., Bourin, M., 2003b. Antidepressant-like effects in various mouse strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)* 166, 373–382.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D., Hen, R., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479–493.
- Dawson, L.A., Hughes, Z.A., Starr, K.R., Storey, J.D., Bettelini, L., Bacchi, F., Arban, R., Poffe, A., Melotto, S., Hagan, J.J., Price, G.W., 2006. Characterisation of the selective 5-HT_{1B} receptor antagonist SB-616234-A (1-[6-(cis-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-2,3-dihydro-5-methoxyindol-1-yl]-1-[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methanone hydrochloride): in vivo neurochemical and behavioural evidence of anxiolytic/antidepressant activity. *Neuropharmacology* 50, 975–983.
- De Groote, L., Olivier, B., Westenberg, H.G., 2002a. The effects of selective serotonin reuptake inhibitors on extracellular 5-HT levels in the hippocampus of 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 439, 93–100.
- De Groote, L., Olivier, B., Westenberg, H.G., 2002b. Extracellular serotonin in the prefrontal cortex is limited through terminal 5-HT_{1B} autoreceptors: a microdialysis study in knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 162, 419–424.
- Deltheil, T., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Nicolas, L., Delomenie, C., Reperant, C., Le Maitre, E., Leroux-Nicollet, I., Benmansour, S., Coudore, F., David, D.J., Gardier, A.M., 2008. Consequences of changes in BDNF levels on serotonin neurotransmission, 5-HT transporter expression and function: studies in adult mice hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 174–183.
- Dulawa, S.C., Holick, K.A., Gundersen, B., Hen, R., 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1321–1330.
- Elizalde, N., Gil-Bea, F.J., Ramirez, M.J., Aisa, B., Lasheras, B., Del Rio, J., Tordera, R.M., 2008. Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 199, 1–14.
- Evrard, A., Laporte, A.M., Chastanet, M., Hen, R., Hamon, M., Adrien, J., 1999. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors control the firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the mouse: studies in 5-HT_{1B} knock-out mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3823–3831.
- Gardier, A.M., Trillat, A.C., Malagie, I., David, D., Hascoet, M., Colombel, M.C., Jolliet, P., Jacquot, C., Hen, R., Bourin, M., 2001. 5-HT_{1B} serotonin receptors and antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *C.R. Acad. Sci. III* 324, 433–441.
- Gardier, A.M., David, D.J., Jego, G., Przybylski, C., Jacquot, C., Durier, S., Gruwez, B., Douvier, E., Beauverie, P., Poisson, N., Hen, R., Bourin, M., 2003. Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 86, 13–24.
- Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G., Sanger, D.J., 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 148, 164–170.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R., 2002. Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416, 396–400.
- Groenink, L., van Bogaert, M.J., van der Gugten, J., Oosting, R.S., Olivier, B., 2003. 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1B} receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. *Behav. Pharmacol.* 14, 369–383.
- Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Reperant, C., Hunt, S.P., Toth, M., Gardier, A.M., 2007. Substance P neurokinin 1 receptor activation within the dorsal raphe nucleus controls serotonin release in the mouse frontal cortex. *Mol. Pharmacol.* 72, 1411–1418.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., Blier, P., 2008. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol. Pharmacol.* 74, 1463–1475.
- Guilloux, J.P., David, D.J., Guiard, B.P., Chenu, F., Reperant, C., Toth, M., Bourin, M., Gardier, A.M., 2006. Blockade of 5-HT_{1A} receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 31, 2162–2172.
- He, M., Sibille, E., Benjamin, D., Toth, M., Shippenberg, T., 2001. Differential effects of 5-HT_{1A} receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 902, 11–17.
- Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P., Parsons, L.H., Tecott, L.H., 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15049–15054.
- Hervas, I., Vilaro, M.T., Romero, L., Scorza, M.C., Mengod, G., Artigas, F., 2001. Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology* 24, 11–20.
- Holick, K.A., Lee, D.C., Hen, R., Dulawa, S.C., 2008. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/c mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 33, 406–417.

- Holmes, A., Wrenn, C.C., Harris, A.P., Thayer, K.E., Crawley, J.N., 2002. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav.* 1, 55–69.
- Klein, E., Zinder, O., Colin, V., Zilberman, I., Levy, N., Greenberg, A., Lenox, R.H., 1995. Clinical similarity and biological diversity in the response to alprazolam in patients with panic disorder and generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 92, 399–408.
- Klemenhagen, K.C., Gordon, J.A., David, D.J., Hen, R., Gross, C.T., 2006. Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT_{1A} receptor. *Neuropsychopharmacology* 31, 101–111.
- Knobelman, D.A., Hen, R., Blendy, J.A., Lucki, I., 2001a. Regional patterns of compensation following genetic deletion of either 5-hydroxytryptamine(1A) or 5-hydroxytryptamine(1B) receptor in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1092–1100.
- Knobelman, D.A., Hen, R., Lucki, I., 2001b. Genetic regulation of extracellular serotonin by 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) autoreceptors in different brain regions of the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1083–1091.
- Koks, S., Bourin, M., Voikar, V., Soosaar, A., Vasar, E., 1999. Role of CCK in anti-exploratory action of paroxetine, 5-HT reuptake inhibitor. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 9–16.
- Lader, M., 1994. Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 4, 85–91.
- Lopez-Rubalcava, C., Hen, R., Cruz, S.L., 2000. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT(1B) knockout and wild-type mice. *Behav. Brain Res.* 115, 85–94.
- Malagie, I., Trillat, A.C., Bourin, M., Jacquot, C., Hen, R., Gardier, A.M., 2001. 5-HT_{1B} Autoreceptors limit the effects of selective serotonin re-uptake inhibitors in mouse hippocampus and frontal cortex. *J. Neurochem.* 76, 865–871.
- Malagie, I., David, D.J., Jolliet, P., Hen, R., Bourin, M., Gardier, A.M., 2002. Improved efficacy of fluoxetine in increasing hippocampal 5-hydroxytryptamine outflow in 5-HT(1B) receptor knock-out mice. *Eur. J. Pharmacol.* 443, 99–104.
- Malleret, G., Hen, R., Guillou, J.L., Segu, L., Buhot, M.C., 1999. 5-HT_{1B} receptor knockout mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *J. Neurosci.* 19, 6157–6168.
- Maura, G., Marcoli, M., Tortarolo, M., Andrioli, G.C., Raiteri, M., 1998. Glutamate release in human cerebral cortex and its modulation by 5-hydroxytryptamine acting at h 5-HT_{1D} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 123, 45–50.
- Mochizuki, D., Tsujita, R., Yamada, S., Kawasaki, K., Otsuka, Y., Hashimoto, S., Hattori, T., Kitamura, Y., Miki, N., 2002. Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 162, 323–332.
- Moret, C., Briley, M., 1996. Effects of acute and repeated administration of citalopram on extracellular levels of serotonin in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 295, 189–197.
- Olivier, B., Pattij, T., Wood, S.J., Oosting, R., Sarnyai, Z., Toth, M., 2001. The 5-HT(1A) receptor knockout mouse and anxiety. *Behav. Pharmacol.* 12, 439–450.
- Olivier, B., Zethof, T., Pattij, T., van Boogaert, M., van Oorschoot, R., Leahy, C., Oosting, R., Bouwknecht, A., Veening, J., van der Gugten, J., Groenink, L., 2003. Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 117–132.
- Owens, M.J., Knight, D.L., Nemeroff, C.B., 2001. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol. Psychiatry* 50, 345–350.
- Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10734–10739.
- Ramboz, S., Saudou, F., Amara, D.A., Belzung, C., Segu, L., Misslin, R., Buhot, M.C., Hen, R., 1996. 5-HT_{1B} receptor knock out—behavioral consequences. *Behav. Brain Res.* 73, 305–312.
- Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D., Hen, R., 1998. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14476–14481.
- Richer, M., Hen, R., Blier, P., 2002. Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT_{1A} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 435, 195–203.
- Rickels, K., Zaninelli, R., McCafferty, J., Bellew, K., Iyengar, M., Sheehan, D., 2003. Paroxetine treatment of generalized anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled study. *Am. J. Psychiatry* 160, 749–756.
- Roberts, C., Price, G.W., 2001. Interaction of serotonin autoreceptor antagonists in the rat dorsal raphe nucleus: an in vitro fast cyclic voltammetry study. *Neurosci. Lett.* 300, 45–48.
- Rocha, B.A., Scearce-Lavie, K., Lucas, J.J., Hiroi, N., Castanon, N., Crabbe, J.C., Nestler, E.J., Hen, R., 1998. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor. *Nature* 393, 175–178.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.
- Sari, Y., 2004. Serotonin_{1B} receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 565–582.
- Saudou, F., Amara, D.A., Dierker, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C., Hen, R., 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* 265, 1875–1878.
- Sayer, T.J., Hannon, S.D., Redfern, P.H., Martin, K.F., 1999. Diurnal variation in 5-HT_{1B} autoreceptor function in the anterior hypothalamus in vivo: effect of chronic antidepressant drug treatment. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1777–1784.
- Scearce-Lavie, K., Viswanathan, S.S., Hen, R., 1999. Locomotor response to MDMA is attenuated in knockout mice lacking the 5-HT_{1B} receptor. *Psychopharmacology (Berl.)* 141, 154–161.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Shippenberg, T.S., Hen, R., He, M., 2000. Region-specific enhancement of basal extracellular and cocaine-evoked dopamine levels following constitutive deletion of the Serotonin(1B) receptor. *J. Neurochem.* 75, 258–265.
- Siever, L.J., 2008. Neurobiology of aggression and violence. *Am. J. Psychiatry* 165, 429–442.
- Stein, D.J., Andersen, H.F., Goodman, W.K., 2005. Escitalopram for the treatment of GAD: efficacy across different subgroups and outcomes. *Ann. Clin. Psychiatry* 17, 71–75.
- Stocchi, F., Nordera, G., Jokinen, R.H., Lepola, U.M., Hewett, K., Bryson, H., Iyengar, M.K., 2003. Efficacy and tolerability of paroxetine for the long-term treatment of generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psychiatry* 64, 250–258.
- Toth, M., 2003. 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 177–184.
- Trillat, A.C., Malagie, I., Scearce, K., Pons, D., Anmella, M.C., Jacquot, C., Hen, R., Gardier, A.M., 1997. Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT_{1B} receptors: in vivo microdialysis studies. *J. Neurochem.* 69, 2019–2025.
- Trillat, A.C., Malagie, I., Bourin, M., Jacquot, C., Hen, R., Gardier, A.M., 1998a. Homozygote mice deficient in serotonin 5-HT_{1B} receptor and antidepressant effect of selective serotonin reuptake inhibitors. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* 192, 1139–1147.
- Trillat, A.C., Malagie, I., Mathe-Allainmat, M., Anmella, M.C., Jacquot, C., Langlois, M., Gardier, A.M., 1998b. Effects of WAY 100635 and (-)-5-Me-8-OH-DPAT, a novel 5-HT_{1A} receptor antagonist, on 8-OH-DPAT responses. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 41–49.
- Van der Heyden, J.A., Zethof, T.J., Olivier, B., 1997. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol. Behav.* 62, 463–470.
- Yilmazer-Hanke, D.M., 2008. Morphological correlates of emotional and cognitive behaviour: insights from studies on inbred and outbred rodent strains and their crosses. *Behav. Pharmacol.* 19, 403–434.
- Zhuang, X., Gross, C., Santarelli, L., Compan, V., Trillat, A.C., Hen, R., 1999. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* 21, 52S–60S.

Characterization of 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice: a new animal model sensitive to anxiolytic treatments

Supplementary Elements

Authors : Jean-Philippe Guilloux^{1*}, Denis J.P. David¹, Lin Xia¹, Hai Thanh Nguyen¹, Quentin Rainer¹, Bruno P. Guiard¹, Christelle Repérant¹, Thierry Deltheil¹, Miklos Toth², René Hen³, Alain M. Gardier^{1*}

¹ Univ Paris-Sud EA 3544, Fac. Pharmacie, Châtenay-Malabry cedex F-92296, France.

² Department of Pharmacology, Weill Medical College of Cornell University, 1300 York Avenue, New York, NY 10065, USA

³ Center for Neurobiology and Behavior, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

Supplementary Methods

Polymerase Chain Reaction

Mutants and wild-type animals were identified by a PCR assay that could amplify either a fragment from the substituted allele, or a fragment from the wild-type allele, or targeting vector for each receptor gene. The PCR primers were located in the 3' noncoding regions of the heterologous neomycin resistance gene (KO primer only) and the endogenous receptor gene (wild-type primers and KO primers) (Supplementary Figure 1). Primers were designed as follows: 5-HT1A WT primers: 5'-AACGTGACCTTCAGCTACC-3' and 5'-GTCCTTGCTGATGGTGAC-3'; 5-HT1A KO primers: 5'-CTTCTATCGCCTTCTTGACG-3' and 5'-GTCCTTGCTGATGGTGAC-3'; 5-HT1B WT primers: 5'-CCCATCAGCACCATGTACAC-3' and 5'-GACTTGGTTCACGTACACAG-3'; 5-HT1B KO primers: 5'-CTTCTATCGCCTTCTTGACG-3' and 5'-GACTTGGTTCACGTACACAG-3'.

The Home Cage Activity

Home cage activity was quantified using the ActiV-Meter (Bioseb, France) over a 24 hours period. During the experiment, food and water were provided *ad libitum*. Various parameters such as activity time (sec), ambulatory distance (cm) and inactivity duration (calculated from the difference between immobility and motionless activity duration while the animal is eating or scratching) were recorded.

Supplementary Results

Genotyping of 5-HT_{1A/1B} *-/-* mice

Using our PCR assay and specific primers, we confirmed the double disruption of both 5-HT1A and 5-HT1B receptors coding genes in our mice (Supplementary Figure S1).

5-HT_{1A/1B} *-/-* mice showed similar activity than their wild-type littermates.

Two-way ANOVA on repeated measurements showed no effect of genotype on mice activity (Supplementary Figure 1) ($F[1,322]=0.10$, $p=0.75$), but an effect of time

(F[23,322]=7.45, $p < 0.001$) and no interaction (F[23,322]=1.20, $p = 0.25$) (with no difference in terms of ratio of dark/light phase activity between genotypes)

Legends of Supplementary Figures

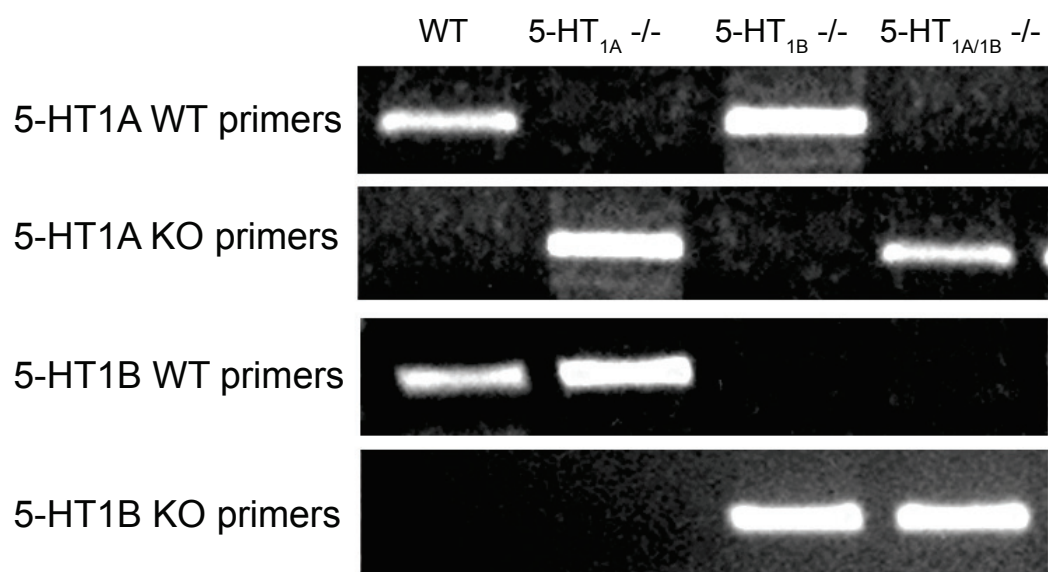
Supplementary Figure S1: Electrophoresis gels images of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1A/1B} receptors mutant mice and their wild-type control.

Supplementary Figure S2: Deletion of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors does not affect home cage activity.

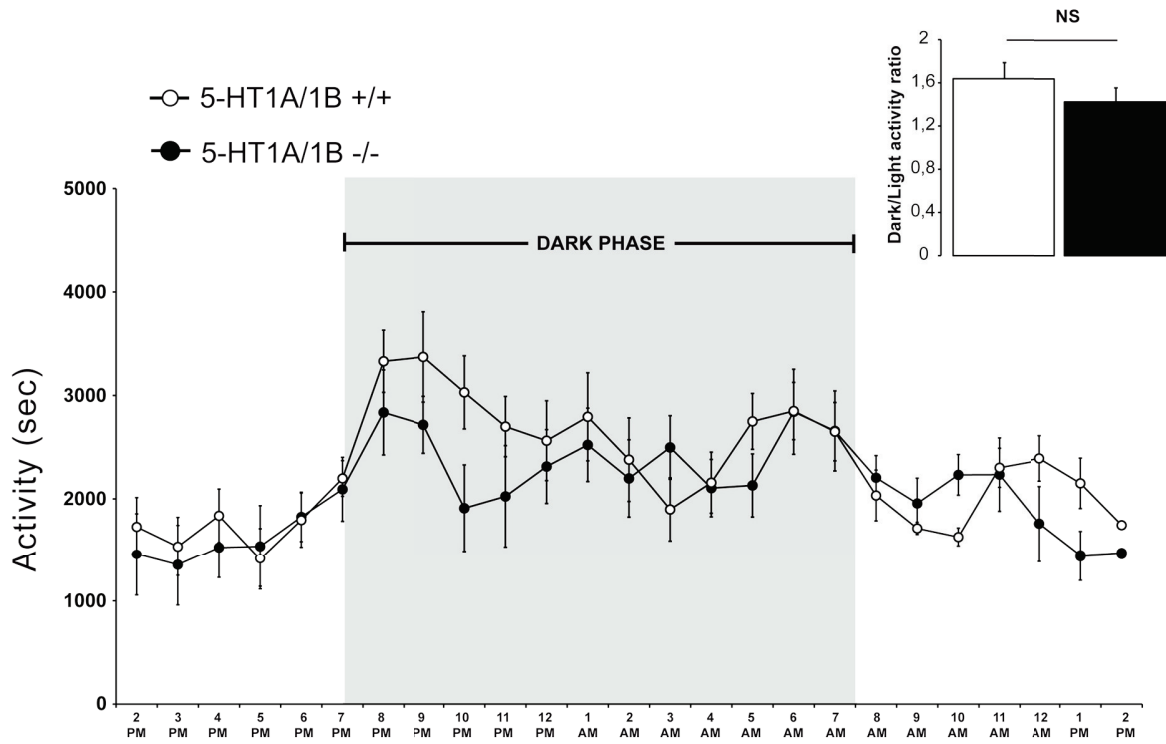
Results are expressed as means \pm SEM of the activity measured as motion by the ACTIV-METER. The active period of mice (dark phase) is represented in gray. Insert: Ratio of activity during dark/light phase (n=12/genotype).

Statistical analysis were carried out using a two-way ANOVA followed by Fisher PLSD: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ significantly different from 5-HT_{1A/1B} +/+ mice. Statistical analysis was carried out using a two-way ANOVA followed by Fisher PLSD post hoc t-test.

SUPPLEMENTARY FIGURE S1



SUPPLEMENTARY FIGURE S2



Article 2

Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors disruption in mice.

Lin Xia, Claudine Deloménie, Indira David, Quentin Rainer, Myriam Marouard, Hervé Delacroix, Denis David, Alain Gardier, Jean-Philippe Guilloux.
Neurosciences Letters, 2012 Jul 11;521(1):20-5.

Résumé :

Les résultats obtenus dans l'Article 1 montraient que un nouveau modèle animal de souris 5-HT_{1A/1B}^{-/-} présentent un trouble de l'homéostasie sérotoninergique associé à un comportement hyper-anxieux décrit dans différents tests comportementaux.

L'hippocampe ventral est une région limbique du cerveau qui participe au contrôle des émotions et est associée au développement et à la maintenance des troubles anxieux.

La mesure de l'expression des gènes par les puces à ADN a été utilisée pour résoudre des questions de plus en plus complexes de biologie et permettre d'élucider le fonctionnement du cerveau au niveau moléculaire et étudier les troubles de l'humeur dans le système nerveux central. Afin de compléter ce phénotypage moléculaire des troubles de l'humeur, nous avons souhaité, à l'aide de la technique des puces à ADN, comparer le profil d'expression des gènes dans l'hippocampe ventral d'un nouveau modèle animal de la pathologie anxio-dépressive, les souris KO 5-HT_{1A/1B} à celui de leurs congénères non mutés.

Principaux Résultats :

Le prélèvement des structures cérébrales a été réalisé grâce à une méthode précise de microdissection. La validation de la microchirurgie et de la bonne séparation des hippocampes ventraux et dorsaux a été réalisée par RT-PCR: en effet, nous avons observé que l'expression du gène codant pour la décorine était ≈14 fois plus élevée dans l'hippocampe ventral que dans l'hippocampe dorsal (p<0.001), tandis que l'expression de la LPH est significativement enrichie ≈14 fois plus dans l'hippocampe dorsal que dans sa partie ventrale (p<0.05).

L'analyse différentielle des 16 *arrays* hybridés a permis de sélectionner 924 probesets correspondant à 723 gènes différentiellement exprimés de manière significative chez les souris KO 5-HT1A/1B, par rapport aux souris WT contrôles. 33 gènes sont surexprimés, et 690 sont sous-exprimés. Parmi les changements de 9 gènes choisis (Ccl19, Creb3, Cap1, Fancg, Usp53, Pttg1, Bdnf, Mapk1, Emb), 8 ont été confirmés par PCR en temps réel avec une haute concordance d'arrays/qPCR.

Une analyse des fonctions associées à ces 723 gènes par *Ingenuity Pathway Analysis* a montré que 25 réseaux de gènes sont associés aux changements de nos gènes identifiés. La grande fonction biologique la plus associée à nos données était le développement et le fonctionnement du système nerveux central. De façon intéressante, dans de nombreux réseaux étaient retrouvés différents gènes participant aux processus de la neurogenèse. La neurogenèse comprend plusieurs étapes et nous avons observé chez les souris KO 5-HT1A/1B une sous-expression des gènes liés à toutes les étapes: la prolifération cellulaire (4), la migration neuronale dans la couche de cellules granulaires (9), la maturation (4) et la différenciation (19) des neurones granulaires et la survie des cellules (3). Le trouble bipolaire et la maladie de Huntington sont les pathologies les plus associées à nos données. Trois voies de signalisation canoniques sont majoritairement associées à nos données : la potentialisation synaptique à long terme ($p < 1e-7$), la voie de la protéine kinase A et la voie de la signalisation calcique.

Nous avons confirmé en partie par des techniques d'immunohistochimie la présence d'une altération de certains paramètres de la neurogenèse chez les souris KO 5-HT1A/1B qui présentent une diminution significative de la survie des cellules dans le gyrus denté de l'hippocampe, mais pas d'effet sur la prolifération cellulaire.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors disruption in mice

Lin Xia^a, Claudine Deloménie^b, Indira David^a, Quentin Rainer^a, Myriam Marouard^c, Hervé Delacroix^c, Denis J. David^a, Alain M. Gardier^a, Jean-Philippe Guilloux^{a,*}

^a Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry F-92296, France

^b Univ Paris-Sud, Plateforme Transcriptome, IFR141, Fac. Pharmacie, Châtenay-Malabry F-92296, France

^c CNRS UPR2167, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette F-91190, France

H I G H L I G H T S

- ▶ Deletion of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors induce higher emotionality in mice.
- ▶ Behavior was associated with 723 differentially expressed genes in the hippocampus
- ▶ Ingenuity analyses revealed gene changes associated with neurogenesis function
- ▶ Cell survival but not proliferation was decreased in the hippocampus of mutant-mice.

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 8 March 2012

Received in revised form 10 May 2012

Accepted 12 May 2012

Keywords:

Serotonin

5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors

Hippocampus

Microarray

Neurogenesis

A B S T R A C T

The serotonergic system has been widely implicated in stress related psychiatric disorders such as depression and anxiety. Generation of receptor knockout mice has offered a new approach to study processes underlying anxiety. For instance, knockout mice for both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors (5-HT_{1A/1B}^{-/-}) display an anxious phenotype, associated with robust physiological and neurochemical changes related to brain serotonin function. As ventral hippocampus is a key region in the mediation and genesis of anxiety, we explored the transcriptome changes induced by the genetic inactivation of these two receptors in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. Dissociation of ventral vs. dorsal hippocampus was confirmed by the over-expression of selective markers in both regions. 723 genes were observed up/down regulated in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. Using Ingenuity, biological networks and signal transduction pathway analysis corresponding to the identified gene revealed putative dysregulation of nervous system development and function, especially genes associated with long-term potentiation and adult neurogenesis (including *Bdnf*, *Camk2a*, *Camk4*, and *Klf9*). Furthermore, immunohistochemistry experiments studying adult hippocampal neurogenesis in adult 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice showed a decreased survival, but not proliferation of newborn cells in our model.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The serotonergic system plays an important role in the control and regulation of anxiety or depression [8]. In clinic, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) are widely used in the treatments of depressive and anxious disorders [1]. However, SSRI activity is limited in the first weeks of treatment by activation of 5-HT_{1A} somatodendritic and 5-HT_{1B} presynaptic receptor subtypes that control the release of serotonin. Knockout animal models for either 5-HT_{1A} [21] or 5-HT_{1B} receptors [28] have been generated to better understand their respective roles in the physiopathology

and treatment of depressive/anxious disorders. Interestingly, mice lacking 5-HT_{1A}/5-HT_{1B} receptors (5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice) display higher anxiety confirmed in different behavioral tests (the open field, the elevated-plus maze and the novelty suppressed feeding paradigms) associated with a greater spontaneous firing rate of dorsal raphe nucleus 5-HT neurons, an elevated basal dialysate levels of 5-HT at serotonergic nerve terminal brain regions and an increased basal core body temperature [10].

This anxious phenotype observed in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice may be associated with changes in gene expression compared to their littermates in brain areas linked to emotion and anxiety regulation. For instance, ventral hippocampus is involved in the development and maintenance of anxious states [3] and has a strong connection with prefrontal cortex [35] and amygdala [22], and a higher innervations density of serotonergic projections than the dorsal part [7]. Moreover, ventral hippocampus can not only regulate the

* Corresponding author at: Univ Paris-Sud, EA3544, 5, rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Tel.: +33 1 46 83 59 68, fax: +33 1 46 83 53 55.

E-mail address: jean-philippe.guilloux@u-psud.fr (J.-P. Guilloux).

dopaminergic transmission in the prefrontal cortex [20] and modulate the serotonin release induced by stress [25] or corticosterone [4], but also affect the emotion and the anxiety-like behavior in rodents in some behavior tests [3]. In addition, recent studies discovered that a long-term exposition to stress can decrease adult hippocampal neurogenesis in ventral dentate gyrus [12], but not in dorsal dentate gyrus, this latest effect being reversed by various antidepressants [12,24].

Now, researchers begin to study the complex brain function and the mechanism of psychiatric diseases on the basis of molecular biology. Thanks to DNA microarrays technologies, researchers discovered that the expression of several genes were different in the ventral and dorsal hippocampus in mice [17]. Furthermore, SSRI treatment [31] or long-term running exercise [11] can modulate the genes expression in several limbic brain regions in mice [33]. In this study, we observed how deletion of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors could affect gene expression and neurogenesis in the ventral hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

2. Methods

2.1. Animals

Male 5-HT_{1A/1B} receptors knockout mice (5-HT_{1A/1B}^{-/-}) and their littermates (5-HT_{1A/1B}^{+/+}) on C57BL6/Sv129 background, 6–8 weeks old, were used in all experiments (see Supplementary methods, [10]). 8 animals/genotype were used for microarray. Microarray findings were confirmed using RT-qPCR on a second cohort of 8 mice/group. 6 mice/genotype were used for immunohistochemistry experiments. All procedures followed the recommendations of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals (permission #92-196).

2.2. Brain area microdissection

After cervical dislocation brains were quickly harvested and dorsal and ventral hippocampi were separated under the microscope and stored at -80 °C before RNA extraction (see Supplementary methods). Their exact separation was confirmed by quantification of expression of 2 tissue-specific genes in ventral (*Decorin*, *Dcn*) versus dorsal hippocampus (lactose-phlorizinhydrolase, *Lct*) respectively [17] (Supplementary methods).

2.3. RNA extraction

Tissue samples were homogenized and total RNA was extracted using TRIzol, following manufacturer's protocol (Invitrogen, France). RNA concentrations and quality were determined by NanoDrop® spectrophotometer (NanoDrop technologies, USA) and a RNA LabChip® 6000 Nano kit (Agilent Technologies, USA). Samples with a RIN < 8.0 (RNA Integrity Number) were excluded.

2.4. Microarray experiments and analysis

Gene expression profile analysis was performed using Whole Mouse Genome Oligo Microarrays 4 × 44k (G4122F, Agilent Technologies, USA). The comparison between samples was performed in an indirect way using a common reference, a pool of total RNA (Universal mouse reference RNA #740,100, Stratagene). Technical details of microarray experiments are available in Supplementary methods. Genes were considered significantly differentially expressed with the following criteria: Student's *t*-test *p*-value for genotype effect < 0.05 and absolute fold-change between genotype ≥ 1.3.

2.5. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR was used for the validation of brain area microdissection and confirmation of our gene expression analysis. Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed with Anchored-Oligo(dT)18 primers by using Transcriptor First Strand cDNA (Roche®, Synthesis Kit, USA). RT-qPCR performance was performed as previously described [10]. *Actin*, *Gapdh* and *Ppig* were used as internal controls and full description of primer sequence is available in Supplementary materials. Normalization of gene expression was performed with GeNorm VBA [34].

2.6. Functional analysis

Selected 723 genes were overlaid on the global molecular network of Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com, see Supplementary methods) allowing for generation of gene networks based on their connectivity. Their score takes into account the relative numbers of network eligible molecules, of molecules analyzed and the total number of molecules in Ingenuity's knowledge base. Disease links are generated on the literature-based association with illness by IPA.

2.7. Immunohistochemistry

Cell survival: Mice were administered with BrdU (150 mg/kg twice a day during 3 days) 4 weeks before sacrifice. We then proceeded as described [5]. BrdU-positive cells were counted under Olympus BX51 microscope (*n* = 6/genotype).

Cell proliferation: For Ki67 immunohistochemistry, floating sections were washed in PBS buffer containing 0.3% Triton X-100, blocked and incubated with Ki67 primary antibody overnight at 4 °C (1/100, Vector Labs, Burlingame, USA). The next day, sections were washed in PBS and incubated with fluorescent-label-coupled secondary antibodies for 2 h at room temperature.

2.8. Statistical analysis

Two-tailed Student's *t*-test analyses were performed on data obtained from the RT-qPCR of relative transcripts levels and on immunostaining levels using StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) and expressed as mean ± SEM. *p*-Values < 0.05 were considered statistically significant. A Pearson correlation coefficient was used to measure the similarity of gene expression profiles between microarrays and RT-qPCR.

3. Results

3.1. Dissociation of ventral versus dorsal hippocampus by qPCR

The accuracy of dissociation of dorsal and ventral hippocampus was confirmed by the differential expression of two gene markers. *Dcn* expression was over 14 times greater in the ventral compared to dorsal hippocampus (*p* < 0.0001, Supplementary Fig. 1B), while *Lct* expression was selectively expressed in the dorsal compared to ventral hippocampus (*p* < 0.0001, Supplementary Fig. 1C).

3.2. Differentially expressed genes in the ventral hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-}

924 probe sets corresponding to 723 genes transcripts were differentially expressed in the ventral hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice (33 genes up-regulated, 690 down-regulated with criteria absolute Fold-Change > 1.3, a mean log₂ intensity level > 9.0 and *p*-value < 0.05 were significantly

Table 1
Summary of genes differentially expressed in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice.

GeneBank ID	Gene name	Gene symbol	Fold change
NM.011888	Chemokine (C–C motif) ligand 19	Ccl19	35.9 (1.00E–6)
AK035950	RIKEN full-length enriched library cDNA	Clone: 9630020E20	5.81 (1.24E–3)
AK170208	DEP domain containing MTOR-interacting protein	Deptor	3.18 (1.24E–3)
AK040896	RIKEN full-length enriched library cDNA	Clone: A530041D01	2.36 (3.00E–5)
NM.172609	Translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	Tomm22	2.23 (5.00E–5)
NM.145457	Polyadenylate binding protein-interacting protein 1	Paip1	2.2 (1.18E–2)
NM.025311	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed	D14Ert449e	1.74 (7.00E–5)
NM.152894	Processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP family (<i>S. cerevisiae</i>)	Pop1	1.62 (1.20E–4)
NM.025938	Ribonuclease P 14 subunit (human)	Rpp14	1.59 (9.00E–4)
NM.007749	Cytochrome c oxidase, subunit VIIIc	Cox7c	1.59 (4.93E–3)
NM.027219	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1	Cdc42ep1	1.58 (8.00E–4)
NM.080728	Myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	Myh7	1.49 (1.79E–2)
NM.009242	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	Sparc	1.48 (7.60E–4)
AK162552	Dynactin 4	Dctn4	1.47 (9.20E–3)
NM.016972	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	Slc7a8	1.46 (1.13E–2)
NM.026174	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	Entpd4	1.46 (2.00E–5)
NM.010127	POU domain, class 6, transcription factor 1	Pou6f1	1.45 (4.09E–2)
NM.183358	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1	Gadd45gip1	1.44 (2.20E–4)
NM.023537	RAB3B, member RAS oncogene family	Rab3b	1.39 (1.73E–3)
AK044807	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	Ube2e2	1.38 (8.12E–3)
NM.145600	Zinc finger protein 330	Zfp330	1.38 (1.90E–2)
NM.010330	Embigin	Emb	–2.22 (1.00E–6)
AK090125	RIKEN full-length enriched library cDNA	Clone: G431002D05	–2.26 (5.00E–5)
NM.172586	Zinc finger protein 322A	Zfp322a	–2.27 (1.00E–6)
NM.013497	CAMP responsive element binding protein 3	Creb3	–2.35 (1.00E–6)
NM.175654	Histone cluster 1, H4d	Hist1h4d	–2.36 (1.00E–6)
NM.007598	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	Cap1	–2.38 (1.00E–6)
NM.021365	X-linked lymphocyte-regulated 4b	Xlr4b	–2.4 (1.90E–4)
NM.146230	Acetyl-coenzyme A acyltransferase 1B	Acaa1b	–2.58 (1.00E–6)
BC050890	Fanconi anemia, complementation group G	Fancg	–2.61 (1.04E–2)
NM.133362	Erythroid differentiation regulator 1	Erdr1	–2.67 (1.00E–5)
NM.026127	RIKEN cDNA 4833420G17 gene	4833420G17Rik	–2.68 (1.00E–6)
BF467941	Histone cluster 1, H4i	Hist1h4i	–2.75 (2.20E–4)
NM.001024712	Predicted gene 3696	ENSMUSG00000072735	–2.82 (2.00E–4)
NM.026035	Mitochondrial ribosomal protein L55	Mrpl55	–2.83 (1.59E–2)
NM.011740	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Ywhaz	–2.89 (1.00E–6)
NM.013917	Pituitary tumor-transforming gene 1	Pttg1	–3.04 (1.00E–6)
NM.008509	Lipoprotein lipase	Lpl	–3.18 (2.00E–5)
NM.029865	Occludin/ELL domain containing 1	Ocel1	–3.4 (1.00E–5)
BC022221	Ubiquitin specific peptidase 53	Usp53	–3.74 (1.00E–6)
BC020150	RIKEN cDNA 4930520004 gene	4930520004Rik	–6.25 (1.00E–6)

Top 20 genes for which expression is significantly up-regulated or down-regulated in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} versus 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice (n=8 mice/genotype), sorted by fold-change (p-value). Genes confirmed by RT-qPCR are shown in bold.

differentially expressed, see Supplementary Table 1). Top 20 up- and down-regulated genes are shown in Table 1. Expression changes were confirmed on 9 genes (*Ccl19*, *Creb3*, *Cap1*, *Fancg*, *Usp53*, *Pttg1*, *Bdnf*, *Mapk1*, *Emb*) using RT-qPCR, with a high array/qPCR concordance (r=0.823, p<0.01) and similar directionality of expression for 8 out of 9 genes (Fig. 1).

3.3. Functional analysis suggests impairment of genes involved in neurogenesis

Using IPA analysis, 25 networks were significantly associated with gene changes, with at least 15 genes identified (Table 2). Network including genes involved in the development and function of the nervous system was the second most associated to our dataset (score=41, Table 2 and Fig. 2A), an association observed in other gene networks including different lists of genes (Networks #11, #16, #17 and #20, see Supplementary Table 2), thus making this biological function the most associated one linked to our dataset. Interestingly, 6 genes of this specific network were involved with the neurogenesis, an association also strongly observed in the whole dataset (50 genes, p<0.01, Table 2). Among all steps of neurogenesis, genes were mostly linked (although not exclusively) to differentiation of neurons (*Atp2b2*,

Bdnf, *Eya1*, *Hdac1*, *Id4*, *Klf9*, *Map2k1*, *Mapk1*, *Mib1*, *Ptprz1*, *Rb1*, *Rhoa*, *Rtn4*, *Smarca1*, *Tcf4*, *Tgfb2*, *Thra*, *Ttc3*, *Znf536*, p<4E–20), and 3 genes were also related to survival of neurons (*Tgfb2*, *Bdnf*, *Rb1*, p<8E–6).

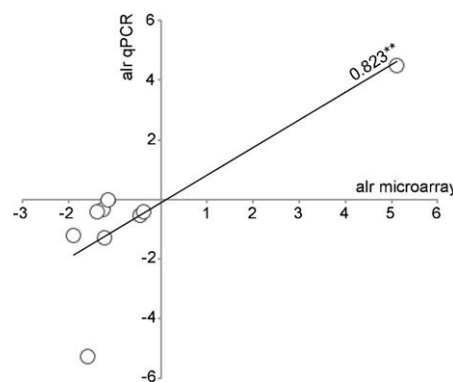


Fig. 1. qPCR validation of differential gene expression in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Microarray results were confirmed by RT-qPCR in another cohort of animals with a high array/qPCR concordance (r=0.823, p=0.006) and similar directionality of expression for 8 out of 9 genes (n=8 mice/genotype).

Table 2Top 5 IPA findings associated with 723 differentially expressed genes in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice.

Top 5 networks	Score	Focus molecules
1. RNA post-transcriptional modification, gene expression, cell-to-cell signaling and interaction	46	30
2. Nervous system development and function, cellular assembly and organization, cell-to-cell signaling and interaction	41	28
3. Gene expression, cellular assembly and organization, cell cycle	41	29
4. Cellular development, hematopoiesis, infectious disease	37	26
5. Infectious disease, cellular development, skeletal and muscular system development and function	36	26
Top diseases and disorders	# Molecules	p-Value
Neurological disease	219	5.56E-09–1.34E-02
Bipolar disorder	58	6.92E-03
Huntington's disease	57	1.46E-08
Genetic disorder	341	1.46E-08–1.34E-02
Skeletal and muscular disorders	171	1.46E-08–1.15E-02
Gastrointestinal disease	208	2.05E-06–1.43E-02
Inflammatory disease	174	2.05E-06–1.15E-02
Top physiological system development and function	# Molecules	p-Value
Nervous system development and function	111	2.66E-06–1.36E-02
Neurogenesis	50	2.01E-02
Guidance of neurites	32	8.08E-03
Neurological process of neurons	29	2.09E-03
Neurotransmission	24	2.74E-03
Connective tissue development and function	49	1.99E-05–1.47E-02
Organismal development	122	3.32E-05–1.43E-02
Tissue development	122	3.46E-05–1.43E-02
Development of nervous tissue	33	3.15E-04
Development of brain	27	2.46E-04
Embryonic development	83	8.78E-05–1.36E-02
Top canonical pathways	-log(p-value)	Ratio
Synaptic long term potentiation	7.03	0.149 (17/114)
Protein kinase A signaling	7.01	0.0945 (31/328)
Calcium signaling	5.61	0.0966 (20/207)
PPARα/RXRα activation	5.21	0.120 (19/186)
Ephrin receptor signaling	5.07	0.095 (19/200)
Others pathways		
CREB signaling in neurons	3.51	0.0792 (16/202)
cAMP-mediated signaling	3.36	0.0822 (18/219)
Synaptic long-term depression	2.83	0.0816 (12/147)

Results show top biological networks, physiological system development and function, diseases and disorders and canonical pathways obtained by Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Network scores represent negative log-values of right-tailed Fisher's Exact Tests for network consistence. Pathways and disease p-values represent significance of over-representation of candidate genes within respective gene groups. p-Value ranges indicate values for various disease sub-classifications.

Among the disease and disorders most associated with our dataset, genetic and neurological diseases, including bipolar disorder (58 genes, $p < 0.001$) and Huntington disease (57 genes, $p < 0.0001$), we found psychological and mood disorders (90 and 65 genes, respectively, $p < 0.001$).

Notably, canonical pathways include genes involved in hippocampus neurotransmission such as synaptic long-term potentiation ($p < 1E-7$), protein kinase A, which is under the control of 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors ($p < 1E-7$) and calcium signaling ($p < 1E-5$) (Table 2).

3.4. Disruption of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors affects cell survival, but not proliferation of hippocampal neurogenesis in adult mice

Cell survival was decreased by $\approx 40\%$ in the adult hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} compared to their control littermates, with no observed differences along the dorso-ventral axis ($F_{(1,10)} = 5.41$, $p < 0.05$, Fig. 2B). No significant change in hippocampus cell proliferation between genotypes was observed ($F_{(1,10)} = 0.09$, $p > 0.7$, Fig. 2C).

4. Discussion

Large-scale genes' expression analysis in the ventral hippocampus allowed to describe the genetic mechanisms, induced by the disruption of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. It might account, at least in part, for the development and maintenance of this anxious phenotype. We report here robust, qPCR-confirmed transcriptional changes, affecting the expression of 723 genes in the ventral hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to wild-type littermates. We previously describe these double mutants as a mouse model of an anxiety/depressive-like state induced by genetic deletion of both receptors and chronic paroxetine treatment reversed the anxious phenotype [10].

Main IPA findings obtained from these differentially expressed genes confirmed their association with (1) the nervous system development and function and (2) neurological diseases. Unsurprisingly, our dataset was associated with Huntington's disease and bipolar disorder, both pathologies sharing biological pathways, and for which anxiety has been mentioned as a high comorbidity in humans [6,14], as well as in transgenic mouse models of both diseases [16,19]. In 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, among the 111 differentially expressed genes associated with nervous system development and function, 24 were associated with

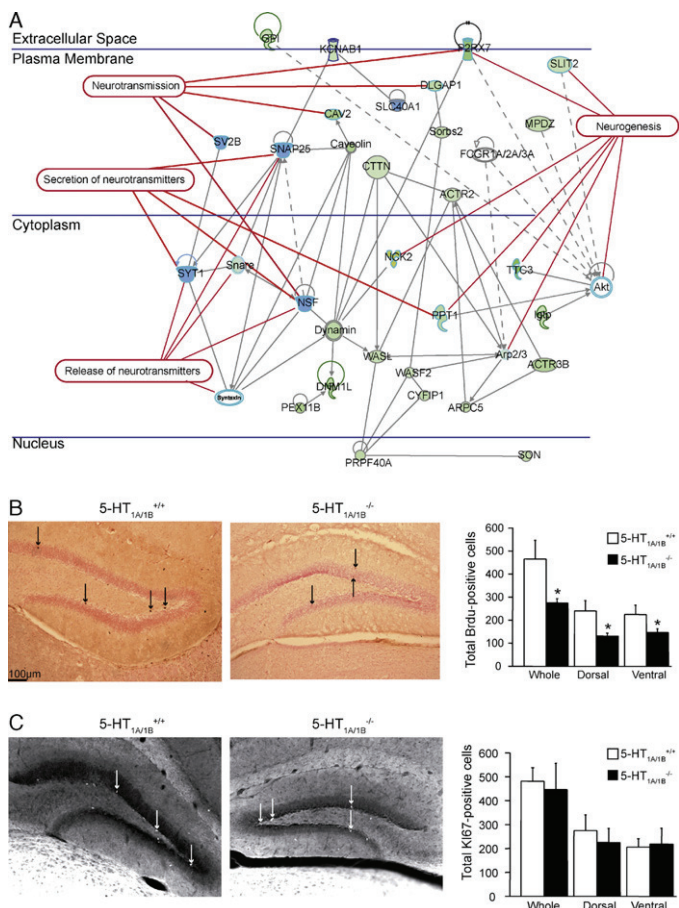


Fig. 2. Altered neurogenesis in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. (A) The top genes and molecules interaction network built on gene selected was significantly connected to neurogenesis, release/secretions of neurotransmitters, and neurotransmission. (B) Representative illustrations of BrdU immunoreactivity (10× magnification) in the dentate gyrus of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice showing a decrease in cell survival in the hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} (*n* = 6/genotype); **p* < 0.05. (C) Representative illustrations of Ki67 immunoreactivity (10× magnification) in the dentate gyrus of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice showing a lack of change in cell proliferation within hippocampus between genotype (*n* = 6/genotype).

neurotransmission and 50 were associated with neurogenesis, according to IPA categorization. While we previously related altered serotonergic neurotransmission in this mouse model [10], we show here that cell survival (including potentially new-born neurons), but not proliferation of hippocampal newborn cells, was altered in this model. Neurogenesis includes several stages and we found downregulated genes in the adult hippocampus associated with all stages: cellular proliferation (4), neuron migration into the granule cell layer (9), maturation (4) and differentiation (19) into granular neurons and cell survival (3). Thus, both microarrays and immunochemistry suggest that adult hippocampal neurogenesis might be affected in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

Some studies looked at the effects of 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} genetic or pharmacological manipulation, and more precisely their effects on adult hippocampal neurogenesis. Using constitutive knock-out models, 5-HT_{1A} disruption failed to alter cell proliferation in the adult hippocampus [27], as observed here, while yet no studies have been performed in 5-HT_{1B}^{-/-} mice. Pharmacological stimulation of 5-HT_{1A} receptors increased cell proliferation, while their blockade induced opposite effects [2,15,23,27]. Indeed, pharmacological blockade of 5-HT_{1A} receptors may only exert its effects on other stages of neurogenesis [15]. 5-HT_{1B} receptor blockade had no effect on cell proliferation within the

hippocampus, but pharmacological dissection of auto- vs. hetero-receptors suggests that activation of these latter may participate in cell proliferation [2]. Thus, taken together with our data, these studies suggest that the impact of global 5-HT_{1B} receptor deletion on cell proliferation may be undetectable and that studies selectively disrupting pre- vs. post-synaptic 5-HT_{1B} receptors would be of great interest.

We observed a decrease in cell survival within the dentate gyrus in both dorsal and ventral regions of the 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mouse hippocampus. While no studies have looked at effects of genetic disruption of these receptors on cell survival, pharmacological studies may provide some hints on the role exerted by 5-HT_{1A} receptors on this step. Indeed, activation of 5-HT_{1A} receptor agonist in rodents increased cell survival in a time-dependent manner [15,32], while its blockade had opposite effects [15], reinforcing the present results. Unfortunately, yet no study observed the effects of chronic pharmacological blockade or stimulation of 5-HT_{1B} receptors on cell survival in the hippocampus.

At the single gene level, interesting genes were changed in our dataset and are known to be involved in multiple stages of neurogenesis. For instance, *Klf9* mutation (downregulated in adult 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice) decreases both maturation in early phase and differentiation of adult-born neurons in hippocampus, putatively conferring to *Klf9*^{-/-} mice a greater anxious phenotype [30]. Similarly, BDNF (downregulated in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice) has been involved in all steps of neurogenesis [29,36]. Targeted BDNF downregulation in mice has been shown to induce higher anxious/depressed states [26,31], however not consistently reported [1], and a trend for a reduction in *Htr1a* and *Htr1b* expression in the hippocampus [18]. In addition, these heterozygous mutants BDNF^{+/-} mice have increased basal extracellular 5-HT levels in the hippocampus and decreased 5-HT reuptake capacity [9].

5. Summary and limitations

Serotonin is known as a potent regulator of adult hippocampal neurogenesis and cell survival in the hippocampus of adult mice [2,15,27] and our microarray data support an overall effect of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors on neurogenesis, partially confirmed by immunohistochemistry. However, the specific role of the different serotonin receptor subtypes still needs to be dissected, as they may have antagonistic action depending on their localization, *i.e.*, somatodendritic *versus* at nerve terminals [2,15]. In this line of thoughts, we observed no serotonin-related changes in gene expression that could compensate the disruption of *htr1a* and *htr1b* genes in our model. Especially we observed no change in expression of mRNA coding for 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors, which selective and non-selective chronic blockade has been shown to increase cell proliferation [13,32].

Moreover, while we observed alteration in neurogenesis-related genes and cell survival specifically in the ventral hippocampus, gene changes related to cell survival in the dorsal hippocampus may completely differ from what has been observed in the ventral hippocampus, as molecular heterogeneity exists along the dorsal–ventral axis of the hippocampus [17].

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research. We thank Dr Samuel Leman for his technical mentoring, the Animal Care Facility and the Transcriptome Facility of the IFR141 and University Paris-Sud.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.046>.

References

- [1] D.S. Baldwin, S. Waldman, C. Allgulander, Evidence-based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder, *International Journal of Neuropsychopharmacology* 14 (2011) 697–710.
- [2] M. Banasr, M. Hery, R. Printemps, A. Daszuta, Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone, *Neuropsychopharmacology* 29 (2004) 450–460.
- [3] D.M. Bannerman, M. Grubb, R.M. Deacon, B.K. Yee, J. Feldon, J.N. Rawlins, Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning, *Behavioural Brain Research* 139 (2003) 197–213.
- [4] J.L. Barr, G.L. Forster, Serotonergic neurotransmission in the ventral hippocampus is enhanced by corticosterone and altered by chronic amphetamine treatment, *Neuroscience* 182 (2011) 105–114.
- [5] D.J. David, B.A. Samuels, Q. Rainer, J.W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D.A. Craig, B.P. Guiard, J.P. Guilloux, R.P. Artymyshyn, A.M. Gardier, C. Gerald, I.A. Antonijevic, E.D. Leonardo, R. Hen, Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression, *Neuron* 62 (2009) 479–493.
- [6] K. Duff, J.S. Paulsen, L.J. Beglinger, D.R. Langbehn, J.C. Stout, Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study, *Biological Psychiatry* 62 (2007) 1341–1346.
- [7] F.H. Gage, R.G. Thompson, Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorsal–ventral axis of the hippocampal formation, *Brain Research Bulletin* 5 (1980) 771–773.
- [8] J.A. Gingrich, R. Hen, Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice, *Psychopharmacology* 155 (2001) 1–10.
- [9] B.P. Guiard, D.J. David, T. Deltheil, F. Chenu, E. Le Maitre, T. Renoir, I. Leroux-Nicollet, P. Sokoloff, L. Lanfumey, M. Hamon, A.M. Andrews, R. Hen, A.M. Gardier, Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype, *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11 (2008) 79–92.
- [10] J.P. Guilloux, D.J. David, L. Xia, H.T. Nguyen, Q. Rainer, B.P. Guiard, C. Reperant, T. Deltheil, M. Toth, R. Hen, A.M. Gardier, Characterization of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments, *Neuropharmacology* 61 (2011) 478–488.
- [11] J.G. Hunsberger, S.S. Newton, A.H. Bennett, C.H. Duman, D.S. Russell, S.R. Salton, R.S. Duman, Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF, *Nature Medicine* 13 (2007) 1476–1482.
- [12] M.N. Jayatissa, C. Bisgaard, A. Tingstrom, M. Papp, O. Wiborg, Hippocampal cytochrome correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression, *Neuropsychopharmacology* 31 (2006) 2395–2404.
- [13] S. Jha, R. Rajendran, K.A. Fernandes, V.A. Vaidya, 5-HT_{2A/2C} receptor blockade regulates progenitor cell proliferation in the adult rat hippocampus, *Neuroscience Letters* 441 (2008) 210–214.
- [14] C.L. Julien, J.C. Thompson, S. Wild, P. Yardumian, J.S. Snowden, G. Turner, D. Craufurd, Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 78 (2007) 939–943.
- [15] F. Klempin, H. Babu, D. De Pietri Tonelli, E. Alarcon, K. Fabel, G. Kempermann, Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT_{1A}, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis, *Frontiers in Molecular Neuroscience* 3 (2010).
- [16] A. Kulak, M. Cuenod, K.Q. Do, Behavioral phenotyping of glutathione-deficient mice: relevance to schizophrenia and bipolar disorder, *Behavioural Brain Research* 226 (2012) 563–570.
- [17] E.D. Leonardo, J.W. Richardson-Jones, E. Sibille, A. Kottman, R. Hen, Molecular heterogeneity along the dorsal–ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression, *Neuroscience* 137 (2006) 177–186.
- [18] W.E. Lyons, L.A. Mamounas, G.A. Ricaurte, V. Coppola, S.W. Reid, S.H. Bora, C. Wihler, V.E. Koliatsos, L. Tessarollo, Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) 15239–15244.
- [19] L. Menalled, B.F. El-Khodori, M. Patry, M. Suarez-Farinas, S.J. Orenstein, B. Zahasky, C. Leahy, V. Wheeler, X.W. Yang, M. MacDonald, A.J. Morton, G. Bates, J. Leeds, L. Park, D. Howland, E. Signer, A. Tobin, D. Brunner, Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models, *Neurobiology of Disease* 35 (2009) 319–336.
- [20] P. O'Donnell, A.A. Grace, Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input, *Journal of Neuroscience* 15 (1995) 3622–3639.
- [21] C.L. Parks, P.S. Robinson, E. Sibille, T. Shenk, M. Toth, Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 10734–10739.
- [22] A. Pitkanen, M. Pikkarainen, N. Nurminen, A. Ylinen, Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postnatal cortex in rat. A review, *Annals of the New York Academy of Sciences* 911 (2000) 369–391.
- [23] J.J. Radley, B.L. Jacobs, 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus, *Brain Research* 955 (2002) 264–267.
- [24] Q. Rainer, L. Xia, J.P. Guilloux, C. Gabriel, E. Mocaer, R. Hen, E. Enhamre, A.M. Gardier, D.J. David, Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety, *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2011) 1–15.
- [25] A. Rex, J.P. Voigt, H. Fink, Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo, *European Journal of Neuroscience* 22 (2005) 1185–1189.
- [26] M. Rios, G. Fan, C. Fekete, J. Kelly, B. Bates, R. Kuehn, R.M. Lechan, R. Jaenisch, Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity, *Molecular Endocrinology* 15 (2001) 1748–1757.
- [27] L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, R. Hen, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science* 301 (2003) 805–809.
- [28] F. Saudou, D.A. Amara, A. Dierich, M. LeMeur, S. Ramboz, L. Segu, M.C. Buhot, R. Hen, Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor, *Science* 265 (1994) 1875–1878.
- [29] H. Scharfman, J. Goodman, A. Macleod, S. Phani, C. Antonelli, S. Croll, Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats, *Experimental Neurology* 192 (2005) 348–356.
- [30] K.N. Scobie, B.J. Hall, S.A. Wilke, K.C. Klemenhausen, Y. Fujii-Kuriyama, A. Ghosh, R. Hen, A. Sahay, Kruppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis, *Journal of Neuroscience* 29 (2009) 9875–9887.
- [31] I. Sillaber, M. Panhuysen, M.S. Henniger, F. Ohl, C. Kuhne, B. Putz, T. Pohl, J.M. Deussing, M. Paez-Pereda, F. Holsboer, Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine, *Psychopharmacology* 200 (2008) 557–572.
- [32] A. Soumier, M. Banasr, L.K. Goff, A. Daszuta, Region- and phase-dependent effects of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptor activation on adult neurogenesis, *European Neuropsychopharmacology* 20 (2010) 336–345.
- [33] A. Surget, Y. Wang, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, N. Edgar, G. Griebel, C. Belzung, E. Sibille, Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal, *Neuropsychopharmacology* 34 (2009) 1363–1380.
- [34] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology* 3 (2002), RESEARCH0034.
- [35] R.W. Verwer, R.J. Meijer, H.F. Van Uum, M.P. Witter, Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex, *Hippocampus* 7 (1997) 397–402.
- [36] Q. Zhang, G. Liu, Y. Wu, H. Sha, P. Zhang, J. Jia, BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway, *Molecules* 16 (2011) 10146–10156.

-- SUPPLEMENTARY INFORMATION --

**Ventral hippocampal molecular pathways and impaired
neurogenesis associated with 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors
disruption in mice**

Lin Xia¹, Claudine Deloménie², Indira David¹, Quentin Rainer¹ Myriam Marouard³, Hervé Delacroix³, Denis David¹, Alain Gardier¹, Jean-Philippe Guilloux^{1,§}

¹Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, F-92296

²Univ Paris-Sud, Plateforme Transcriptome, IFR141, Fac. Pharmacie, Châtenay-Malabry, F-92296

³CNRS UPR2167, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette, F-91190

§ Corresponding Author :Dr Jean-Philippe Guilloux

Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie

5, rue JB Clément

92296 Châtenay-Malabry cedex

France.

Tel: +33.1.46.83.59.68

Fax: +33.1.46.83.53.55

E-mail: jean-philippe.guilloux@u-psud.fr

CONTENTS

Page #

SUPPLEMENTARY METHODS	2
Animals	2
Brain area microdissection	2
Microarray experiments and analysis	2
Microarray Normalization Protocol	3
Functional analysis using Ingenuity Knowledge Database	4
REFERENCES OF THE SUPPLEMENTARY INFORMATION	4
SUPPLEMENTARY TABLES	5
SUPPLEMENTARY FIGURE	9

Supplementary Methods

Animals

5-HT_{1A} receptor knockout mice (5-HT_{1A}^{-/-}) generated on the C57BL/6 background [4] were crossed with homozygous 5-HT_{1B} receptor knockout mice (5-HT_{1B}^{-/-}) generated on the 129Sv background [5]. These F1 heterozygous 5-HT_{1A}^{+/-} and 5-HT_{1B}^{+/-} mice were then bred to generate double 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice F2. All the animals were genotyped by PCR. Male animals (6 to 8 weeks old) weighing 25-30g were used. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines, in compliance with international laws and policies (Council directive # 87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions # 92-196 to AM.G).

Brain area microdissection

After cervical dislocation brains were quickly harvested. Brains were placed in a mouse brain tissue blocker (World Precision Instruments, USA) where 3 consecutive rostro-caudal 1mm sections were collected [2] and transferred into RNA stabilization solution (Applied Biosystems, France). The dorsal hippocampus was isolated from the first section, while the ventral hippocampus was dissected from the third section (Supplementary Figure 1A) under the microscope and then stored at -80°C before RNA extraction. The accuracy of dissociation of dorsal and ventral hippocampus was confirmed by the differential expression of two gene markers of these sub-regions, *Dcn* and *Lct* (Supplementary Figure 1B-C).

Microarray experiments and analysis

Gene expression profile analysis was performed using Whole Mouse Genome Oligo Microarrays 4x44k (G4122F, Agilent technologies, USA). The comparison between samples was performed in an indirect way using a common reference, a pool of total RNA (Universal mouse reference RNA #740,100, Stratagene). 1 µg of RNA was labeled using the LILPAK PLUS kit, Cy5-CTP for the reference RNA, Cy3-CTP for all samples and internal standards came from Two-color the RNA Spike-in Kit (Agilent Technologies, USA). The labeled targets were purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, France) and their quality and quantity were confirmed. 825ng of Cy3- and Cy5-labeled targets were

mixed according to Agilent instructions and incubated on the microarrays slides at 65°C for 17 hours. After washing, slides were scanned using the DNA Array Scanner at 5µm resolution. Photomultiplier tube voltages were automatically adjusted to balance the distributions of the red and green intensities and to optimize the dynamics of image quantification. The data were extracted from these images using the Agilent Feature Extraction v.9.1 software, normalized (See Supplementary Information and [1]) and processed with the MAnGO software [3]. Gene expression was considered significantly detectable with a log₂ intensity value threshold above 9.0. Genes were considered significantly differentially expressed with the following criteria: Student's t-test p-value for genotype effect <0.05 and absolute fold-change between genotype ≥1.3.

Microarray Normalization Protocol

As the different oligonucleotide arrays are manufactured in a very reproducible manner, the reference signals were stable and homogenous, therefore allowing replacement of intensities values for each spot by their mean values to obtain a unique mean and ideal reference, whatever the conditions. For each of the studied conditions, assuming that the same quantity of labeled RNA should be hybridized, we globally adjusted the overall fluorescence signal between the different arrays of the same condition. Thus intensities of each spot were adjusted using the following formula:

$$G_{ij} \text{ normalized} = G_{ij} * \langle G \rangle / \langle G_j \rangle$$

Where G_{ij} is the intensity of the spot, $\langle G \rangle$ is the mean intensity of all the arrays for a same condition, and $\langle G_j \rangle$ is the mean intensity of all spots for one array. Backgrounds were estimated in a global manner using the "morphological closing followed opening" method [1]; such strategy needs values that are low enough to be considered as negligible. Thus, they were not subtracted from the raw signal measurements. Not found, saturated, and bad spots were discarded from the subsequent analysis.

Data were then processed with the MAnGO software [3]. A Student's t-test was computed to measure the significance associated with each expression difference. Detectable expression of genes was measured using Mean log₂ of intensity which is defined as the median of pixel to pixel geometric means of the "red" and "green" intensities. When this value was ≥9, the signal homogeneity was improved significantly [6]. Genes were considered significantly differentially expressed with the following

criteria: Student's t-test p-value for genotype effect <0.05 and absolute fold-change between genotype \geq 1.3.

Functional analysis using Ingenuity Knowledge Database

Selected genes were overlaid on the global molecular network developed from information contained in the Ingenuity Pathway knowledge base (www.ingenuity.com). This network is composed of >3.5 million literature-based biological links between genes and bioactive molecules, and sub-networks are built on genes of interest based on their connectivity within this global network. Gene networks were limited to 35 nodes. The score for a network takes into account the relative numbers of network eligible molecules, of molecules analyzed and the total number of molecules in Ingenuity's knowledge base. These scores are based on the hypergeometric distribution and represent the negative log of the right-tailed Fisher's Exact Test p-value. Disease links are based on literature-based association with illness.

References of the supplementary information

- [1] M. Bourens, C. Panozzo, A. Nowacka, S. Imbeaud, M.H. Mucchielli, C.J. Herbert, Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* kinase Cbk1p lead to a fertility defect that can be suppressed by the absence of Brr1p or Mpt5p (Puf5p), proteins involved in RNA metabolism, *Genetics* 183 (2009) 161-173.
- [2] K.B.J. Franklin, G. Paxinos, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press,, Amsterdam ; Boston, 2008.
- [3] L. Marisa, J.L. Ichante, N. Reymond, L. Aggerbeck, H. Delacroix, M.H. Mucchielli-Giorgi, MAnGO: an interactive R-based tool for two-colour microarray analysis, *Bioinformatics* 23 (2007) 2339-2341.
- [4] C.L. Parks, P.S. Robinson, E. Sibille, T. Shenk, M. Toth, Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 10734-10739.
- [5] F. Saudou, D.A. Amara, A. Dierich, M. LeMeur, S. Ramboz, L. Segu, M.C. Buhot, R. Hen, Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor, *Science* 265 (1994) 1875-1878.
- [6] T. Tang, N. Francois, A. Glatigny, N. Agier, M.H. Mucchielli, L. Aggerbeck, H. Delacroix, Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment, *Bioinformatics* 23 (2007) 2686-2691.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1: Full List of 723 genes significantly affected in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

(Separate download)

This list contains the 723 genes differentially expressed in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} versus 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice, sorted by fold change value (up-regulated genes in red and down-regulated in green) and with their associated Student T-test p-value. Genes selected to test in RT-qPCR are shown in bold.

Supplementary Table 2: 25 biological networks associated with our dataset of genes differentially expressed in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

The top biological networks over-represented using our gene list (723 genes differentially expressed following these criteria fold change>30% and p<0.05) were associated with 25 biological networks according to IPA analysis. Notably, nervous system development was among the most recurrent association.

Supplementary Table 3: Serotonin-related genes expression in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice.

This list contains the detectable serotonin-related genes expression in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} versus 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice, with their fold change and associated p-value. No changes were observed between genotypes.

Supplementary Table 4: List of qPCR primers sequences.

Supplementary Table 2

ID	Top Functions	Score	Focus Molecules	Molecules in Network
1	RNA Post-Transcriptional Modification, Gene Expression, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	46	30	ADCY1, ALCAM, ALG2, CASD1, CDC88A, CD6, CPNE4, DDX3X, EEA1, EIF1A1, EIF5B, ENSA, ERK1/2, FUS, GNAI2, HNRNPU, KIF21A, LARS, MIB1, MYCBP2, NIPSNAP1, PABPC4, PDZGEF, PKC alpha/beta, PURB, Rap1, RAP2A, RAPGEF2, RAPGEF6, RBMX, Smad2/3, SREK1, SRPK2, SRSF5, TANK
2	Nervous System Development and Function , Cellular Assembly and Organization, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	41	28	ACTR2, ACTR3B, Akt, Arp2/3, ARPC5, CAV2, Caveolin, CTTN, CYFIP1, DLGAP1, DNMI1, Dynamin, FCGR1A/2A/3A, GPI, Igfb, KCNAB1, MPDZ, NCK2, NSF, P2RX7, PEX11B, PPT1, PRPF40A, SLC40A1, SLIT2, SNAP25, Snare, SON, Sorbs2, SV2B, Syntaxin, SY11, TTC3, WASF2, WASL
3	Gene Expression, Cellular Assembly and Organization, Cell Cycle	41	29	APC, BCLAF1, C18orf8, Cbp/p300, CBX3, CCAR1, CLK1, Ctbp, DIAPH2, DZIP3, ELL2, EYA1, FYCO1, GTF2H2/LOC100510744, HDAC1, HISTONE, Holo RNA polymerase II, HSPA4, KIF5B, Mi2, NCOB1, PNISR, PNN, PPIG, Profilin, RANBP2, RBM4B, RCOR1, RHOA, SMARCA5, TAF1, TIMM44, TOMM22, WWTR1, ZFP106
4	Cellular Development, Hematopoiesis, Infectious Disease	37	26	ACSL4, ARHGAP21, CTSS, DENND4A, DNAJB4, DNAJC2, DYNC1I2, DYNLT3, EDIL3, EIF2S3, EIF3A, FANCG, Gm-csf, HIVEP2, Hsp70, Hsp90, HSP, HSPA12A, IL12 (complex), INTS6, LARP1, Mediator, MHC Class II (complex), NDEL1, PLC gamma, Rac, RPS6KB1, SACS, SH3BP5L, THRA, TNCP2, YWHAE, YWHAZ, ZC3H13, ZFC3H1
5	Infectious Disease, Cellular Development, Skeletal and Muscular System Development and Function	36	26	ACAA1, Acaa1b, ANKS1B, BCL11B, CASP8AP2, Cbp, Cdc2, CREB3, CSDE1, DEK, EF2F, E2f, ENPP1, GADD45GIP1, GPD1, Hat, Hdac, NFKB (complex), PIP5K1A, PPARalpha, PTP4A2, RECQL, ROK3, RPS6KA3, Rsk, SLC27A1, SNX27, STS81A1, TAX1BP1, Thymidine Kinase, TNFAIP8, TNFRSF25, VSNL1, ZFAND5, ZMYND11
6	Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Decreased Levels of Albumin	35	26	26s Proteasome, Alpha tubulin, ASPH, ATF2, C5orf34, CENPC1, CSNK1E, ELP2, ELP3, FBXO34, FUT8, HARS, Hist2h4 (includes others), Histone h3, Histone h4, HMG CoA synthase, ID1, Ikb, IKK (complex), KDM1B, Pmaip1, PTEN, QKI, RFXO1, RNF138, SRSF11, TGFb2, TGFBR1, THRAP3, TOP1, TOP2B, TRAP/Meia, Ubiquitin, WSB1, YY1
7	Cell Cycle, Gene Expression, Infectious Disease	34	25	APC, ARHGDI1, CCND1, CCND2, CDC27, Cdk, CUL1, CUL3, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D, Cyclin E, DCUN1D1, DNA-directed DNA polymerase, DUSP7, HAUS8, LATS1, LATS2, LIM1, Mapk, MDM1, NACC1, PAP07, POLD2, POP1, PTTG1, RAB4A, Rb, RBP1, REV3L, Rho gdi, RPP14, SPOP, STRAP, ZNF281
8	Gene Expression, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Embryonic Development	34	25	AHCYL2, Ahr-aryl hydrocarbon-Amt, ANK3, ARID2, ARID1B, CENPE, CNTN1, CROCC, DBX3B, Eotaxin, Ephb, Estrogen Receptor, GUCY1B3, KALRN, LIM3SL, MAPK1, MED1, NFIA, NFIB, NPR2, NRIP1, Nuclear factor 1, PARVA, PBRM1, PTPR21, PTS, Rxr, SMARCA2, STRBP, SWI-SNF, T3-TR-RXR, TESK1, Thyroid hormone receptor, TRIP11, Vitamin D3 VDR, RXR
9	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cancer, Gastrointestinal Disease	32	24	Alpha Actinin, Alpha catenin, ATP2B1, ATR22, ATR23, BSN, Cateherin, Calcineurin A, Calcineurin protein(s), Calm1 (includes others), Calmodulin, CASK, Cytochrome c, Cytosolic Dynein, KCNN2, KTN1, LINTC, MARCKSL1, PCL0, P3K (complex), PLA2G6, Pma, Pp2b, PPF1A2, PPF1B1, PPP3CA, PPP3CB, RAB3B, RAB6A, Rims1, RYR3, SSX2IP, TP22, TRPC4, UNG13A, ZFP12
10	Cell Signaling, Molecular Transport, Nucleic Acid Metabolism	30	23	ABCA1, AKAP7, ARHGAP22, CBR1, CLIP1, CTNNG-TCF/LEF, DYRK3, DZIP1, FOXP1, FSH, GJA1, hCG-Histone H1, HMGCR, HMGNS, IFN alpha/beta, IPO7, KIRREL, Lh, MAPRE1, MPPE1, p70S6k, Pde, PDE1A, Pka, PKA, PPA2, PRKAC, PRKAR1A, S100A10, SMARCA1, SRD5A1, TDP2, TJP1, TSH
11	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function , Cellular Function and Maintenance	25	20	Adaptor protein 2, Ampa Receptor, Ap1, ARNT, ATL1, Bcl9/Bcl9p300-C1nb1-Lef/Tcf, BDNF, CAMK4, CAMK2A, CaMKII, COL4A3BP, Crab, GABRA5, GAS1, GRI1, GRI2, GRIA3, GRIK4, HABP4, Ikk (family), Importin alpha, Importin beta, NAMPT, NCF4, NMDA Receptor, Pias (Pks), RAD23B, Rar, RNMT, RTN4, Smad, TMEM184C, UBE3A, ZNF440/ZNF808
12	Cellular Assembly and Organization, Cell Death, Gene Expression	24	20	Actin, ADCY, AIFM3, AP1AR, Galpain, CAP1, CAP2, Caspase, CCN12, CHD8, Ck2, DCLK1, DCTN4, DCTN5, DCTN6, Fibronectin, GSR, HNRNFC, H1ATSP1, LSM10, LSM12, N-cor, NR3C1, NUCKS1, PRPF39, RB1, RNA polymerase II, RNU2-1, SNAPC1, snRNP, TCF4, TPM3, Tubulin, UPF3B, ZBTB20
13	Cell Death, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry	24	20	AGL, AMPK, ATF7IP, ATPase, BLVRB, GLCN3, DLAT, F Actin, FOXN2, Growth hormone, HDL, IFN TYPE 1, IFNAR1, IgG, Immunoglobulin, INO80, Insulin, Interferon alpha, KCTD12, LPL, LUC7L2, MAP1S, MICAL2, MLH1, MYD88, MYH7, NFKB1, NOV, P38 MAPK, Pro-inflammatory Cytokine, RHOBTB3, STAT5a/b, SYT7, Trypsin, Vegf
14	Reproductive System Development and Function, Connective Tissue Disorders, Genetic Disorder	21	18	AMY2A, ANXA3, B3GALNT1, CIDEC, COL5A1, COL6A1, DIRAS3, ENPP1, EPB49, ESPL1, GARS, GATM, GSTCD, HGFCF, HNF1A, HNRPDL, IHH, KLF9, MARCH7, MBNL2, Meg3, NNMT, PDHB, PDLIM4, PDPN, PRL, progesterone, PZR, RYR3, SLC39A14, TBC1D8B, TGFb1, USO1, WNT5B, ZNF365
15	Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	21	18	ADAM23, CCL19, CD44, CD2AP, CHEMOKINE, CHGB, DDN, DEPTOR, Focal adhesion kinase, G protein alpha, GNA11, GNAQ, GNRH, Gpr, GRM5, GRP, Gq, HMG81L1, Iln gamma, IL12 (family), JAK2, Laminin, LGR4, LPAR6, LY8T, Metalloprotease, Mmp, p85 (pik3r), PLC, PTK2B, SCYL3, Shc, SRC, Tlr, Trf
16	Cell Morphology, Cellular Compromise, Nervous System Development and Function	18	18	AKAP9, Cofilin, DLGAP2, DUSP8, EPHA4, EPHA5, EPHA, ERBB2IP, Fcgr1, Ige, Jnk, KIDINS220, Mek, Mic, Mlcp, MLL5, MYLK, Myosin, Myosin Light Chain Kinase, NCK, PABPN1, Pak, Pkg, PP1 protein complex group, PP1-C, Ppy1B, Ppp1r2 (includes others), RNF6, ROCK1, Rock, TAOK1, TIAL1, TRAF, ZC3H4, ZDHHC2
17	Nervous System Development and Function , Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Genetic Disorder	18	16	ADAM22, ADCY1, ARAP2, ATP11A, ATP11B, ATP2B2, ATP2B3, ATP9A, Ca2+, CACNA1B, CACNG7, CCL21, CSM2D, Doc dimer, DLGA, DMXL2, FYN, JPH3, LPHN1, LRRC7, METAP2, Mg2+-ATPase, NBEA, NCKAP5, PCL0, RBM26, S100BPB, SELPLG, SLC24A2, SNX20, SNX24, VLDLR, WDR7, YTHDC1
18	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Tissue Development, Developmental Disorder	18	16	ABHD3, BCAN, C4orf41, CBR1, COL18A1, COL9A1, COL9A3, CUTA, ECHS1, EGFR, Egr dimer, FBLN2, FLT4, FN1, GLOD4, GPCPD1, GRB2, HIC1, ID4, LIF, MCC, MCMBP, NOV, PIK3C2B, PLOD3, PUS7, RIN2, SH3BGR, TECPR1, TESK1, TMEM47, TRAPPC8, TTC15, USP53, VANGL1
19	Cancer, Cellular Assembly and Organization, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	17	18	14-3-3, ARHGAP12, atypical protein kinase C, BCR, CRK, DHX40, DMTF1, DOCK10, ERK, G3BP1, Gef, HNRNPR, ID4, IFRD2, Integrin, MAP2K1, MAP2K1/2, MAP3K, MARK3, Nfat (family), NRG, Pdgfr, PGM2L1, POU6F1, Ptk, Raf, Ras homolog, RASA1, RASGRF1, RB1CC1, RhoGap, Sos, TCR, THOC2, THOC7
20	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function , Molecular Transport	17	16	AGT, APOD, ATAD2, ATP2B1, beta-estradiol, CNI, CDCA7, Cox7c/Gm10012, CRNKL1, CTPS1, D-glucose, DECR1, dihydrotestosterone, epi-androstosterone, GBA2, GIGYF1, GPD1, GPD2, IGF1R, INHIBIN B, KLHL26, LIMA1, MMD, MFGF1, MYOF, NSUN2, OSBP13, PIK3C2B, PMEPA1, RBM3, RPL19, SLC44A, SLC7A8, SRP54, TKT
21	Post-Translational Modification, Cellular Function and Maintenance, Gene Expression	17	16	AMFR, ANAPC5, ANAPC1/LOC100286979, CMBL, CNOT6, CUL2, DDT, DSTYK, EPC2, FXYD6, HSPB11, HSP1E1, HSPH1, let-7a/let-7f/let-7c (includes others), LSM12, miR-124, MORF4L1, MRPL9, RAB40B, RABGAP1L, RDH10, SAT1, SPCS3, TCEB1, Tceb2, TLR1, TP53, UBXN4, VHL, WSB1, ZCCHC11, ZCCHC24, ZER1, ZNF131, ZYG11B
22	Free Radical Scavenging, Connective Tissue Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	16	15	ADAMTS1, Alp, ARF5, CD3, CD52, collagen, Collagen(s), EMB, Fc gamma receptor, Fgf, G protein beta gamma, HMGCS1, Ifi203, Ifn, IFN Beta, IL1, IL33, IL1RL1, LDL, LUM, MTDH, Neurotrophin, NFKB (family), ODC1, Pdgfr (complex), PDGFBB, PLA2, Pld, PTPN12, Ras, Sapk, SPARC, Tgf beta, TNFAIP3, XDH
23	Developmental Disorder, Genetic Disorder, Neurological Disease	16	15	AB12, AKIRIN2, ANKHD1, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, CCDC53, FAM21A, GRHL1, HNF4A, HOOK3, ISOC1, KIAA0196, KIAA1033, LUC7L2, NDC80, NUP62, PCM1, PCNP, PCYT1A, PEX3, PEX16, PHTF1, SEC23A, SEC23IP, SSBP1, STAU2, TRAPPC3, TRAPPC4, TRAPPC6A, TTC8, ZNF644
24	Protein Synthesis, Cell Morphology, Cellular Development	16	15	ABCE1, ACAP3, BAZ2B, CBR1, CCPG1, CDCA2, CDCA7, CSGALNACT1, DCL1, EIF6, EIF2C1, FUS, GMFG, let-7, LMNB2, MSC, MYOD1, NOV, NPEPPS, ORC3, ORC6, PRNP, RFC2, RFC4, RPL4, RPL5, RPL6, RPL34, Rpl29 (includes others), RPS16, THSD4, TNRC6C, trelinoin, UCP3, ZNF536
25	Cellular Assembly and Organization, Post-Translational Modification, Cell Cycle	16	15	CDC45, CDK9, HCFC2, HNRNPA3, LAMTOR3, LARP7, LCN1, LCN1L1, Ncl, NOL8, PARP4, PARP8, PARP12, PARP14, PARP, PDS5A, PDS5B, REC8, RRAGA, RRAAG, SF11, SMC1B, STAG1, STAG2, STAG3, STATA4, TANC1, TIPARP, TNF, TNIK, TNKS2, TNKS, TNP2, WAPAL, ZNF330

Supplementary Table 3

Gene Symbol	GeneBank Accession No.	Fold Change KO/WT	p-value
Htr1d	NM_008309	-1.03	0.85
Htr1f	NM_008310	1.07	0.70
Htr2a	NM_172812	1.03	0.82
Htr2b	NM_008311	1.05	0.76
Htr2c	NM_008312	-1.06	0.56
Htr3b	NM_020274	-1.02	0.92
Htr4	NM_008313	-1.02	0.89
Htr5a	NM_008314	-1.05	0.78
Htr5b	NM_010483	-1.13	0.12
Htr6	NM_021358	1.03	0.83
Htr7	NM_008315	-1.10	0.41
Tph1	NM_009414	-1.03	0.67
Tph2	NM_173391	-1.01	0.91
Slc6a4	NM_010484	1.03	0.87

Supplementary Table 4

Gene Symbol	GeneBank Accession No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Amplicon size(bp)
Dcn	NM_007833	AGCTTCAACAGCATCACCGTT	AGGAACATTGGCCAGACTGC	51
Lct	NM_001081078	AGCACAAGAGCGAAGAGGAC	CAAAGGGTGAGTGAGGCATT	131
Ccl19	NM_011888.2	CTGCTGGTTCTCTGGACCTT	GAAGGCTTTCACGATGTTCC	114
Bdnf	NM_007540	GTGACAGGCGTTGAGAAAGC	ATCCACCTTGGCGACTACAG	206
Mapk1	NM_001038663	TCTCCCGCACAAAATAAGG	GCCAGAGCCTGTCAACTTC	129
Emb	NM_010330	TGCTGCGAATGCCTTAGACT	CAACCATCCAAGGCACATTT	140
Creb3	NM_013497	TGCTCACGTGCTCTGTTAGG	CTATTCACGGGGCAACAGAT	105
Cap1	NM_007598	TGAATGTCCTCATTCTACCG	TCCAGCGATTTCTGTCACTG	116
Fancg	BC050890	TCCCCATTCCACCCTTTTC	ACTGCTCCTCCAGAAGGATTAAC	101
Usp53	BC022221	TCCCGGAGTCAGAACCATAG	AATTTGCTTATGGCTGTTTTCAA	122
Pttg1	NM_013917	ACGAGAAACTCCTCTTCTCCA	AATATCTGCATCGTAACAAACAGG	100
Ppig	NM_001081086	AACTCCCAGCCTGCTTCATA	CTGGATCTGGAAGGAGTTCG	104
Actin	NM_007393	GATCTGGCACCACACCTTCT	GGGGTGTGGAAGGTCTCAAA	139
Gapdh	NM_0008084	GTGGACCTCATGGCCTACAT	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	125

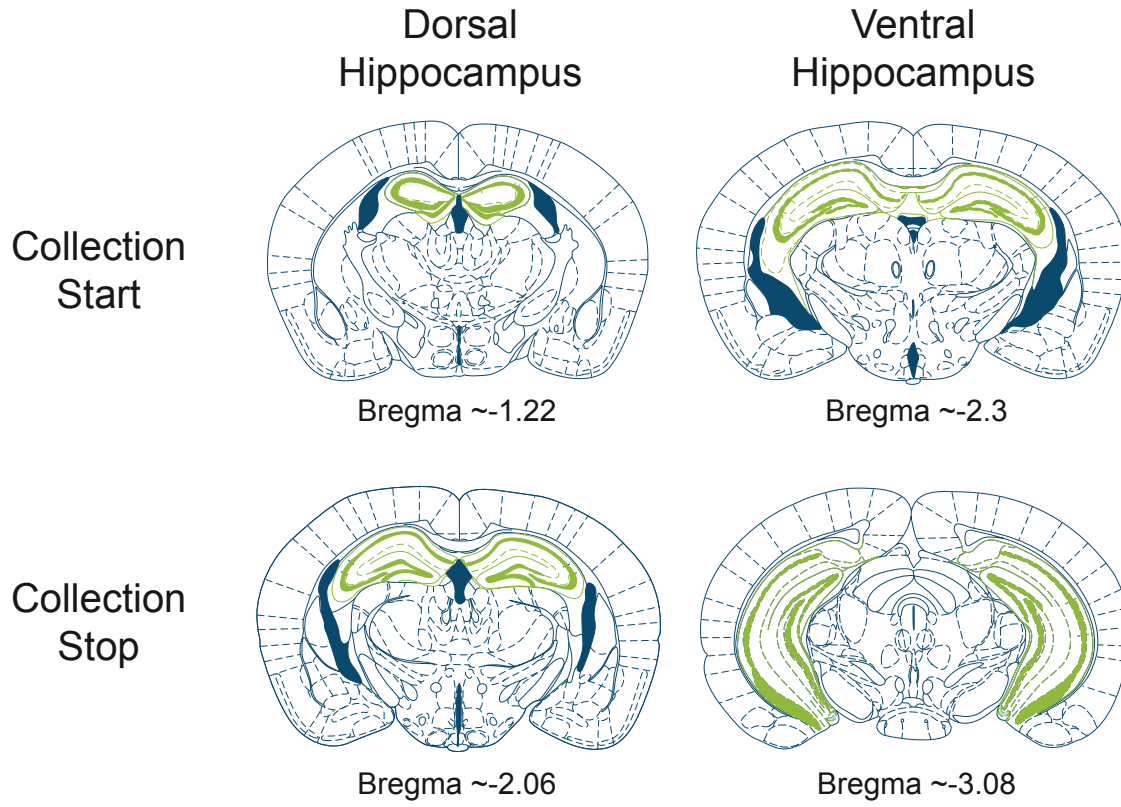
Supplementary Figure

Supplementary Figure 1: Hippocampus microdissection and RT-qPCR confirmation of hippocampus dissection.

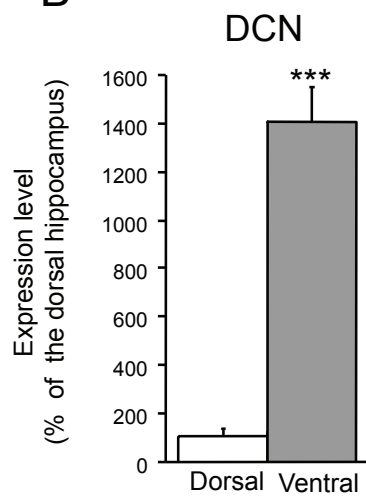
(A) Schematic representation of area microdissection according to Franklin and Paxinos atlases. (B-C) Differential expression of *Dcn* and *Lct* in ventral (B) and dorsal (C) hippocampus of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} and 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice was used as a confirmation of accurate dissection. *** p<0.0001 using two-tail Student T-test.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

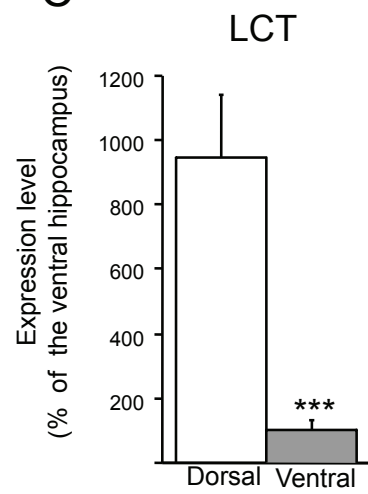
A



B



C



Article 3

Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety.

Rainer Q, **Xia L**, Guilloux JP, Gabriel C, Mocaër E, Hen R, Enhamre E,
Gardier AM, David DJ.

The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2011, Apr 8:1-15

Résumé :

En clinique, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont des médicaments les plus couramment prescrits pour le traitement des épisodes dépressifs ou de l'anxiété généralisée. Cependant, de nombreux patients demeurent résistants aux antidépresseurs monoaminergiques et le délai d'action de ces médicaments est de plusieurs semaines avant l'apparition des premiers effets cliniques appréciables d'un traitement par ISRS. Il est donc nécessaire d'identifier et de développer des alternatives thérapeutiques pour le traitement de l'anxiété/dépression.

L'agomélatine (S20098) est un nouvel antidépresseur au mécanisme d'action innovant. C'est à la fois un agoniste des récepteurs mélatoninergiques MT1 et MT2 et un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C}. Les effets antidépresseurs et anxiolytiques de cette molécule ont été démontrés dans différentes études cliniques et dans plusieurs modèles animaux.

Les souris CORT présentent un phénotype anxio-dépressif suite à une administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson. On sait qu'un traitement chronique de la fluoxétine peut améliorer les comportements anxieux dans les tests comportementaux et augmenter la prolifération, la survie cellulaire et la maturation de la neurogenèse hippocampique dans ce modèle.

Afin de compléter les études sur les effets antidépresseurs/anxiolytiques de l'agomélatine, nous souhaitons savoir si l'agomélatine (par rapport à la fluoxétine) pouvait inverser les déficits comportementaux liés à la dépression / anxiété et améliorer la neurogenèse dans l'hippocampe adulte chez les souris CORT.

Principaux Résultats :

Dans cette étude, nous montrons que l'agomélatine (10 et 40 mg/kg/jour) et la fluoxétine (18 mg/kg/jour) sont capables de contrer les altérations comportementales induites par une exposition prolongée à la corticostérone dans plusieurs paradigmes comportementaux prédictifs d'un phénotype anxio/dépressif (test du champ ouvert, test de la nouveauté supprimant la faim, « splash test »). Ce travail confirme l'étude précédente (Article 1), dans laquelle nous avons déjà montré qu'un traitement chronique de corticostérone ne modifiait en rien le temps de nage dans le test de la nage forcée. Par contre, que ce soit la fluoxétine, ou l'agomélatine, les deux antidépresseurs augmentent bien le temps de nage, confirmant ainsi que le test de la nage forcée peut être utilisé comme test de criblage des antidépresseurs.

En outre, l'agomélatine et la fluoxétine restaurent l'état du pelage chez les animaux sous corticostérone, un indicateur du phénotype dépressif chez la souris. Par contre, l'agomélatine se démarque de la fluoxétine, puisque qu'aux deux doses étudiées, elle renforce les différences d'activité locomotrice entre les périodes de lumière/obscurité chez les animaux contrôles. En outre, contrairement à la fluoxétine, l'agomélatine restaure les perturbations du rythme circadien chez les animaux « stressés » exposés à la corticostérone.

Enfin, afin d'approfondir les mécanismes cellulaires potentiels impliqués dans les effets comportementaux de l'agomélatine, nous avons étudié l'impact d'un traitement chronique ainsi que celui de la fluoxétine sur la neurogenèse hippocampique adulte. Les deux composés sont capables de restaurer la diminution de la prolifération cellulaire provoquée par un pré-traitement avec la corticostérone. De plus, l'agomélatine et la fluoxétine sont capables d'augmenter le nombre de cellules DCX-positives avec des dendrites tertiaires chez les animaux du modèle CORT, indiquant que ces deux antidépresseurs augmentent l'arborisation dendritique des jeunes neurones.

Enfin, nos résultats montrent que les effets de l'agomélatine sur la maturation des jeunes neurones dans le gyrus dentelé de l'hippocampe adulte des souris du modèle CORT sont essentiellement la conséquence d'une augmentation de l'arborisation dendritique dans l'hippocampe ventral.

Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety



Quentin Rainer¹, Lin Xia¹, Jean-Philippe Guilloux¹, Cecilia Gabriel², Elisabeth Mocaër², René Hen³, Erika Enhamre¹, Alain M. Gardier¹ and Denis J. David¹

¹ Université Paris-Sud EA3544, Laboratoire Neuropharmacologie, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

² Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France

³ Departments of Neuroscience and Psychiatry, Columbia University, New York, NY, USA

Abstract

Agomelatine (S20098) is a novel antidepressant drug with melatonergic agonist and 5-HT_{2C} receptor antagonist properties, displaying antidepressant/anxiolytic-like properties in animal models and in humans. In a depression/anxiety-like mouse model in which the response of the HPA axis is blunted, we investigated whether agomelatine could reverse behavioural deficits related to depression/anxiety compared to the classical selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. Adult mice were treated for 8 wk with either vehicle or corticosterone (35 µg/ml.d) via drinking water. During the final 4 wk, animals were treated with vehicle, agomelatine (10 or 40 mg/kg i.p.) or fluoxetine (18 mg/kg i.p.) and tested in several behavioural paradigms and also evaluated for home-cage activity. Our results showed that the depressive/anxiety-like phenotype induced by corticosterone treatment is reversed by either chronic agomelatine or fluoxetine treatment. Moreover, agomelatine increased the dark/light ratio of home-cage activity in vehicle-treated mice and reversed the alterations in this ratio induced by chronic corticosterone, suggesting a normalization of disturbed circadian rhythms. Finally, we investigated the effects of this new antidepressant on neurogenesis. Agomelatine reversed the decreased cell proliferation in the whole hippocampus in corticosterone-treated mice and increased maturation of newborn neurons in both vehicle- and corticosterone-treated mice. Overall, the present study suggests that agomelatine, with its distinct mechanism of action based on the synergy between the melatonergic agonist and 5-HT_{2C} antagonist properties, provides a distinct antidepressant/anxiolytic spectrum including circadian rhythm normalization.

Received 13 September 2010; Reviewed 14 November 2010; Revised 17 December 2010; Accepted 26 January 2011

Key words: Antidepressant, behavioural paradigm, corticosterone, dorsoventral, hippocampus, neurogenesis.

Introduction

Depression and anxiety, two distinct psychiatric disorders with high comorbidity, are major causes of disability worldwide. The major shortcomings in treating these disorders with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) is that the therapeutic response develops slowly (3–4 wk), that side-effects often occur and that there is a significant percentage

(30%) of non-responders (Wong & Licinio, 2001). Thus, it is necessary to identify and develop alternative therapeutic options for the treatment of depression and anxiety disorders (Millan, 2006).

The development of antidepressant drugs with melatonergic agonist and 5-HT_{2C} antagonist properties may be promising given that affective disorders are characterized by abnormal circadian rhythms (Germain & Kupfer, 2008). Agomelatine, acting as an agonist at melatonergic receptors and antagonist at 5-HT_{2C} receptors (De Bodinat *et al.* 2010), has demonstrated efficacy in major depressive disorders in several clinical trials (Kennedy & Emsley, 2006; Léo *et al.* 2002; Olié & Kasper, 2007). Possibly because of this novel receptor profile, one reason agomelatine

Address for correspondence: Professor A. M. Gardier and Dr D. David, Université Paris-Sud EA 3544, Faculté de Pharmacie, 5 rue J. B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, Cedex, France.
Tel.: +33 (0)1 46 83 59 68 Fax: +33 (0)1 46 83 53 55
Email: alain.gardier@u-psud.fr
Email: denis.david@u-psud.fr

is efficacious in depression is through the re-synchronization of circadian rhythms (for review see, Gorwood, 2010; Kasper *et al.* 2010). It is noteworthy that agomelatine also displays robust antidepressant and anxiolytic-like activities in several animal paradigms (Barden *et al.* 2005; Bertaina-Anglade *et al.* 2006; Bourin *et al.* 2004; Millan *et al.* 2005; Papp *et al.* 2003, 2006; Tuma *et al.* 2005).

Recently, we developed a new mouse model of a depressive/anxiety-like state induced by long-term exposure of exogenous corticosterone (4-pregnen-11 β -diol-3,20-dione 21-hemisuccinate) in rodents. In this model, we showed that chronic fluoxetine treatment reversed the inhibition of hippocampal neurogenesis and the behavioural dysfunction induced by chronic corticosterone in several behavioural paradigms, but was ineffective in reversing the flattened circadian rhythm (David *et al.* 2009).

Since agomelatine has a different mechanism of action from currently available antidepressants, we first assessed its antidepressant/anxiety-like activity in the chronic corticosterone animal model of a depressive/anxiety-like state. We compared the behavioural consequences of either chronic agomelatine (10 or 40 mg/kg.d) or fluoxetine (18 mg/kg.d) treatment in various paradigms such as the open-field paradigm (OF), novelty suppressed feeding (NSF), the splash test (ST), the forced swim test (FST) as well as the coat state. Moreover, considering that desynchronization of circadian rhythms plays a key role in mood disorders, we also enquired whether agomelatine reversed the flattened circadian rhythm in chronic corticosterone-treated mice.

Finally, recent preclinical data also demonstrated that agomelatine, similar to other antidepressants such as SSRIs and tricyclics, increases cell proliferation in the dentate gyrus of non-stressed adult rats (Banar *et al.* 2006; Soumier *et al.* 2009). Furthermore, chronic agomelatine reversed the decreased neurogenesis in the glucocorticoid receptor-impaired mice (GR-1 mice) model of depression (Paizanis *et al.* 2010). Interestingly, Banar *et al.* (2006) and Soumier *et al.* (2009) showed that this effect was specifically seen in the ventral hippocampus. This is of particular interest, since the hippocampus may be functionally segregated along its dorsal/ventral axis, with the dorsal hippocampus more responsible for spatial memory and the ventral hippocampus implicated in anxiety and mood regulation (Bannerman *et al.* 2004; Fanselow & Dong, 2010; Moser & Moser, 1998). Thus, since the selective effect of agomelatine on ventral hippocampus neurogenesis may have implications for its mechanism of action, we assessed the effects of

agomelatine on neurogenesis in both the ventral and dorsal hippocampus.

Experimental procedures

An extensive description of methods is provided in Supplementary Material (available online).

Animals

Adult male C57BL/6Ntac mice were purchased from Taconic Farms (Germantown, USA; Lille Skensved, Denmark). All corticosterone-treated mice were aged 7–8 wk and weighed 20–24 g at the beginning of the treatment, and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 06:00 hours). Mice were housed in groups of five. Food and water were available *ad libitum*. Behavioural testing occurred during the light phase between 09:00 and 17:00 hours for the OF, NSF, FST and ST. Separated groups were used to assess home-cage activity. All testing was conducted in compliance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Council directive no. 87–848, 19 October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions no. 92–256 to D. J. David).

Drugs

The dose and duration of corticosterone treatment was selected based on previous study (David *et al.* 2009). Corticosterone (35 μ g/ml.d, equivalent to about 5 mg/kg.d) or vehicle (0.45% β -cyclodextrine, β -CD), was available *ad libitum* in the drinking water in opaque bottles to protect it from light. Corticosterone-treated water was changed every 3 d to prevent any possible degradation. Thereafter, while administration with β -CD or corticosterone continued, mice were treated intraperitoneally (i.p.) with vehicle [hydroxyethylcellulose (HEC) 1%], agomelatine (S20098) (10 or 40 mg/kg) or fluoxetine (18 mg/kg) for 28 d (see timeline, Supplementary Fig. 1, available online). Fluoxetine served as a positive control in these experiments. Drug administration occurred daily at 05:00 hours; 1 h before the start of the dark phase.

Behavioural testing

OF paradigm

We used the procedure described previously (David *et al.* 2009). Motor activity was quantified in four Plexiglas open-field boxes 43 \times 43 cm² (Med Associates, France). Total time in the centre and number of entries into the centre over a 30-min test period were

recorded. The total ambulatory distance was also measured to ensure the absence of any locomotor effects of the treatment (Supplementary Fig. 2). This test was performed 23 d after the beginning of treatment, in the morning (~16 h after drug administration on day 22).

NSF paradigm

The NSF paradigm is a conflict test that elicits competing motivations between the drive to eat and the fear of venturing into the centre of a brightly lit arena. Latency to begin eating is used as an index of depressive/anxiety-like behaviour. The NSF test was performed during a 10-min period as previously described (David *et al.* 2009). This test was performed 26 d after the beginning of treatment, in the morning (~16 h after drug administration on day 25).

Changes in coat state

The state of the coat was assessed 27 d after the beginning of treatment in the morning (~16 h after drug administration on day 26). The total score resulted from the sum of the score of five different body parts: head, neck, dorsal/ventral coat, tail, fore/hindpaws. For each of the five body areas, a score of 0 was given for a well-groomed coat and 1 for an unkempt coat (Santarelli *et al.* 2003).

Splash test

This test consisted of squirting 200 μ l of a 10% sucrose solution on the mouse's snout (Ducottet & Belzung, 2004). The grooming frequency was recorded. This test was performed 28 d after the beginning of treatment, in the morning (~16 h after drug administration on day 27).

FST

The FST procedure was modified to enhance the sensitivity for detecting the putative antidepressant-like activity of drugs (Holick *et al.* 2008; Porsolt *et al.* 1977). Briefly, mice were placed into clear plastic buckets, 20 cm in diameter and 23 cm deep, filled up to two thirds with water at 23–25 °C. Automated scoring was done using the automated X'PERT FST (Bioseb, France). Dependent variables were mobility, swimming and climbing duration. This test was performed 29 d after the beginning of treatment, in the morning (~16 h after the last administration of drug).

Home-cage activity

Home-cage activity was quantified using the ActiV-Meter (Bioseb) over a 24-h period during the last

week of treatment. During the experiment, food and water were available *ad libitum*. To assess any effects of chronic antidepressant treatment in reversing the flattened circadian rhythm induced by corticosterone (indicated by a reduction in home-cage activity), total ambulatory activity over a 24-h period, and total activity during the light and dark phase were measured. Finally, the ratio of ambulatory distance during the dark phase over the light phase was calculated.

Immunohistochemistry

5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) labelling for proliferation study

Mice were administered BrdU (150 mg/kg i.p.) 2 h before sacrifice. We then proceeded as described previously in David *et al.* (2009). BrdU-positive (BrdU⁺) cells were counted using an Olympus BX51 microscope (Germany).

Doublecortin (DCX) labelling for maturation index study

Histo-immunochemistry protocol was adapted from David *et al.* (2009). DCX-positive (DCX⁺) cells were subcategorized according to their dendritic morphology: DCX⁺ cells and DCX⁺ cells with tertiary (or higher order) dendrites. The maturation index was defined as the ratio of DCX⁺ cells possessing tertiary dendrites over the total DCX⁺ cells.

Data analysis and statistics

Results from data analyses were expressed as mean \pm S.E.M. Data were analysed using StatView 5.0 software (SAS Institute, USA). For all experiments a two-way ANOVA with repeated measures was applied to the data as appropriate. Significant main effects and/or interactions were resolved by Student Newman–Keuls *post-hoc* ANOVA analysis or *post-hoc* unpaired *t* test as appropriate.

In the NSF test, we used also the Kaplan–Meier survival analysis because of the lack of normal distribution of the data. Animals that did not eat during the 10-min test period were statistically censored. The Mantel–Cox log-rank test was used to evaluate differences between experimental groups

Results

Chronic agomelatine reversed depressive/anxiety-related behaviours induced by chronic corticosterone treatment.

We first assessed the effect of 4-wk treatment with agomelatine (10 or 40 mg/kg.d) or fluoxetine

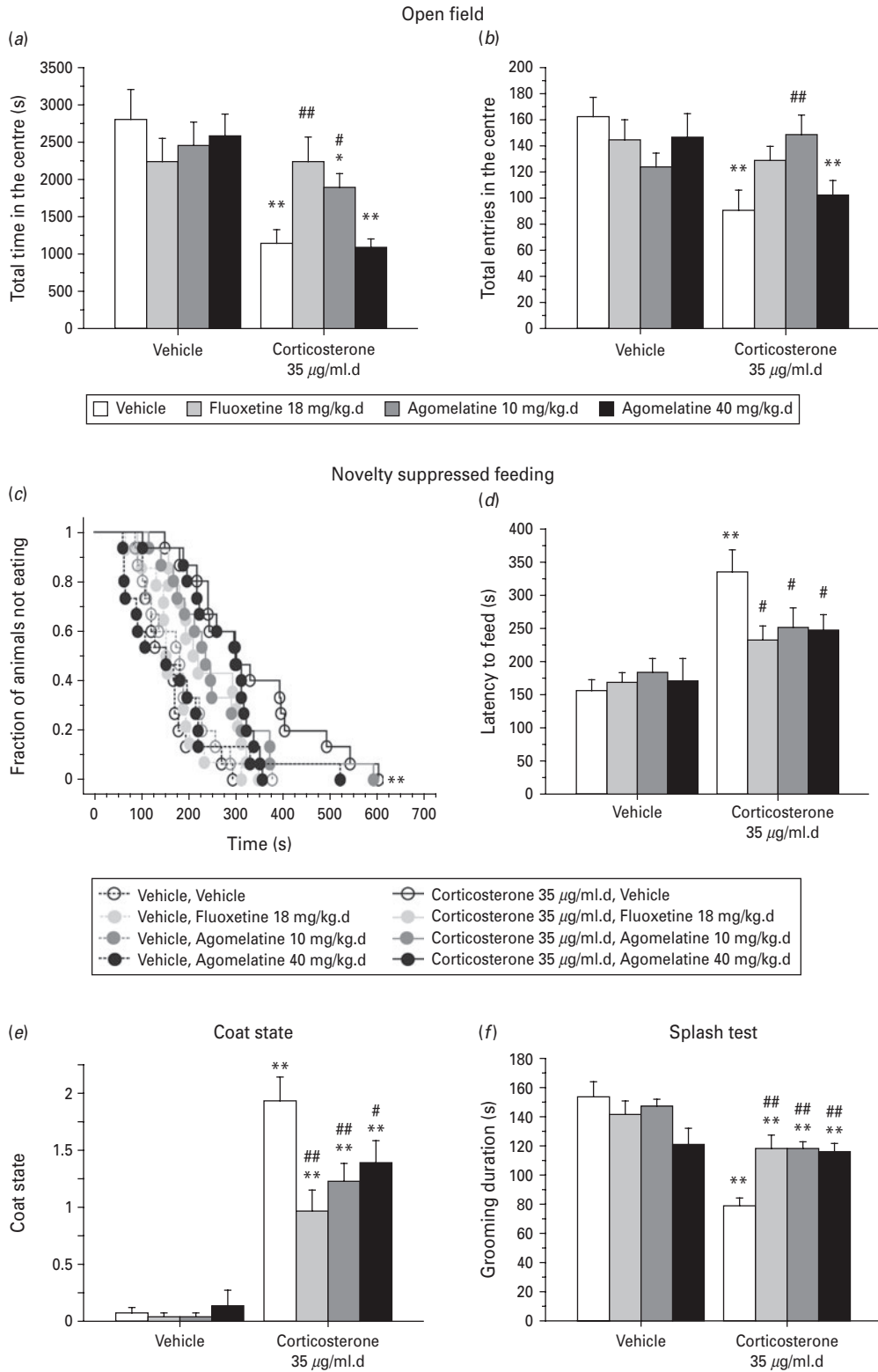


Fig. 1. Chronic agomelatine reversed anxiety/depressive-related behaviours induced by chronic corticosterone treatment. Effects of 4-wk antidepressant treatment (fluoxetine 18 mg/kg.d or agomelatine 10 and 40 mg/kg.d), started after a 4-wk corticosterone regimen (35 µg/ml.d), on anxiety behaviours in the open-field (OF) or the novelty suppressed feeding (NSF) tests and on depressive-like behaviour on coat state degradation over days or in the splash test (ST). In the OF paradigm, anxiety is

(18 mg/kg.d), in our model of corticosterone-induced depression/anxiety-like behaviour in C57BL/6Ntac mice in the OF paradigm. A two-way ANOVA on time spent in the centre revealed a significant effect of pretreatment [$F(1, 125)=24.5, p<0.01$] (Fig. 1a) and a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 125)=3.3, p<0.05$]. Similar to the time spent in centre, a two-way ANOVA on the entries in the centre showed a significant effect of pretreatment [$F(1, 125)=8.7, p<0.01$] (Fig. 1b) and a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 125)=4.3, p<0.05$]. In the OF test, chronic exogenous corticosterone had a marked effect on all anxiety parameters, resulting in decreased time spent (Fig. 1a) and decreased number of entries (Fig. 1b) with no change in the ambulatory distance (Supplementary Fig. 2). Interestingly, this anxiety phenotype in the OF paradigm was reversed by chronic fluoxetine or agomelatine treatment (10 mg/kg.d) for all the parameters tested (Fig. 1a, b).

In the NSF test, another anxiety-related behavioural paradigm (Fig. 1c, d), we explored whether agomelatine and fluoxetine, were able to reverse the depressive/anxiety-like state observed in NSF (Fig. 1c; Kaplan–Meier survival analysis, Mantel–Cox log-rank test, $p<0.01$). A two-way ANOVA revealed a significant effect of pretreatment [$F(1, 115)=29.5, p<0.01$] on the latency to feed (Fig. 1d). Overall, agomelatine, at both doses, and fluoxetine prevented the increase in the latency to feed without affecting the home food consumption (Supplementary Table 1), suggesting that both drugs modulate the depressive/anxiety-like state.

We next assessed the coat state of the animals, a well-validated index of a depressed-like state (Santarelli *et al.* 2003). Long-term glucocorticoid exposure, similar to chronic stress (Surget *et al.* 2008), induced physical changes including deterioration of the coat state. A two-way ANOVA on the coat state indicated a significant effect of pretreatment [$F(1, 111)=194.46, p<0.01$], treatment [$F(3, 111)=4.57, p<0.01$] and a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 111)=4.51, p<0.01$]. Interestingly, both doses of agomelatine, and fluoxetine, reversed the deterioration of the coat state (Fig. 1e).

We next investigated whether the deterioration of the coat state was linked to changes in grooming behaviour by squirting a 10% sucrose solution on the mouse's snout (Fig. 1f). A two-way ANOVA revealed a significant effect of pretreatment [$F(1, 109)=33.0, p<0.01$] and a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 109)=6.6, p<0.01$]. A 4-wk agomelatine regimen at 10 or 40 mg/kg.d, and fluoxetine reversed the decrease in grooming activity induced by corticosterone treatment in this sucrose splash test.

Chronic agomelatine treatment induced antidepressant-like activity in the mouse FST by increasing swimming and climbing behaviour

Since the FST is well recognized as a screening test for antidepressant action, we explored the behavioural effects of chronic corticosterone treatment in the presence of either agomelatine or fluoxetine. We also tested mice treated with antidepressants but not subjected to chronic corticosterone. A two-way ANOVA on mobility duration showed a significant effect of treatment [$F(3, 112)=15.8, p<0.01$]. In both corticosterone- and non-corticosterone-treated animals, either dose of agomelatine (10 or 40 mg/kg.d) and fluoxetine increased mobility duration (Fig. 2a). Interestingly, a two-way ANOVA on swimming duration revealed a significant effect of treatment [$F(3, 112)=12.7, p<0.01$] and a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 112)=2.6, p<0.05$]. Agomelatine at 10 or 40 mg/kg.d or fluoxetine increased swimming duration in corticosterone- and non-corticosterone-treated animals (Fig. 2b). Regarding the climbing duration, a two-way ANOVA showed a significant effect of treatment [$F(3, 112)=8.1, p<0.01$]. In non-corticosterone- and corticosterone-treated animals, only agomelatine at 10 mg/kg.d induced a significant increase in climbing duration (Fig. 2c). Finally, a chronic fluoxetine treatment increased the climbing duration in corticosterone-treated animals (Fig. 2c).

Taken together, these results suggest through multiple behavioural readouts that chronic agomelatine and fluoxetine treatments were effective in reversing a depression/anxiety-like phenotype induced by excess of glucocorticoids.

measured as the time spent in the centre in seconds (a) and as mean of the total entries in the centre (b). In the NSF paradigm, results are expressed as cumulative survival of animals that have not eaten over 10 min (c) or as mean of latency to feed in seconds (d). For the coat state, results are expressed as the sum of the score of five different body parts (e). In the ST, results are expressed as mean of grooming duration after receiving a 10% sucrose solution on the snout (f). Values plotted are mean \pm S.E.M. ($n=14$ – 20 per group). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, # $p<0.05$, ## $p<0.01$.

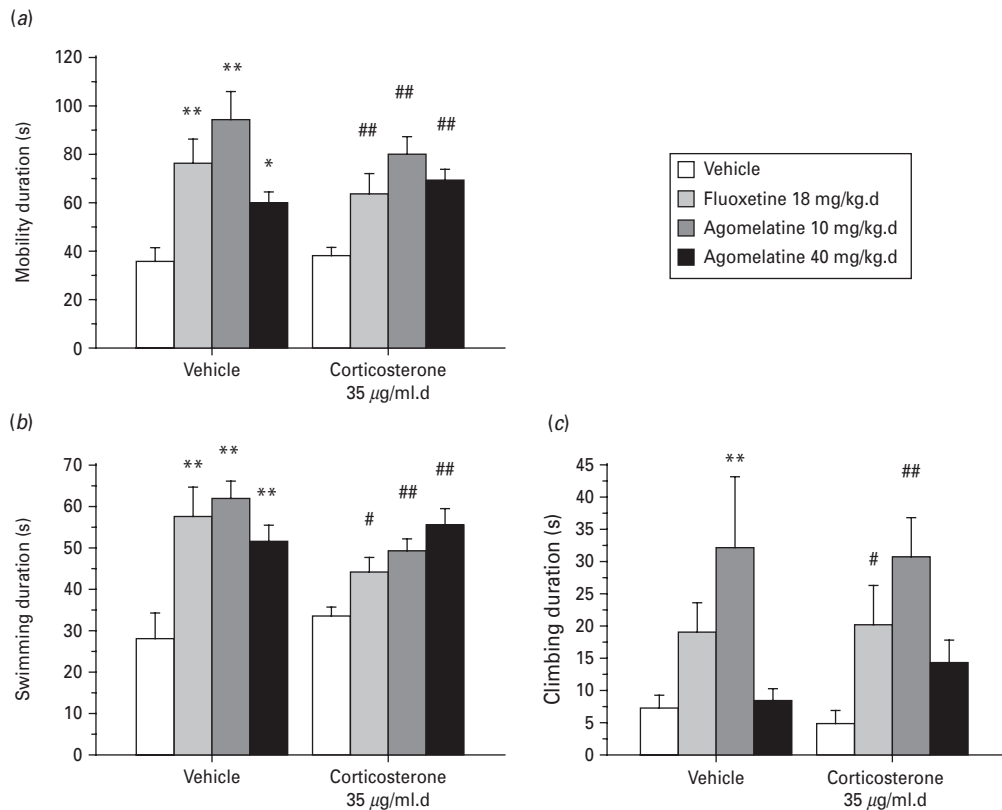


Fig. 2. Chronic agomelatine treatment induced antidepressant-like activity in the mouse forced swim test (FST) by increasing swimming and climbing behaviour. Effects of 4-wk antidepressant treatment (fluoxetine 18 mg/kg.d or agomelatine 10 and 40 mg/kg.d), started after a 4-wk corticosterone regimen (35 µg/ml.d), on the FST. Results are expressed as the total mobility duration (a), the swimming duration (b) and the climbing duration (c) in seconds. Values plotted are mean \pm S.E.M. ($n = 14$ –17 per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, vs. control group and corticosterone/vehicle group, respectively.

Chronic agomelatine normalized disturbances of circadian rhythm

Since agomelatine induces a phase advance in animals and resynchronization of circadian rhythms (Redman *et al.* 1995, Van Reeth *et al.* 2001), a phase advance of circadian rhythms in healthy human volunteers (Kräuchi *et al.* 1997; Leproult *et al.* 2005) and depressed patients (Quera-Salva *et al.* 2007), as well as resynchronization of circadian rhythms in depressed patients (Kasper *et al.* 2010) we wanted to assess whether it could reverse the flattened circadian rhythm in our animal model. We measured the ratio activity of the ambulatory distance during the dark phase over the light phase (Fig. 3a) and total ambulatory activity over a period of 24 h (Fig. 3b). We also showed the segregation of the total activity during the light phase (Fig. 3c) and the dark phase (Fig. 3d). A two-way ANOVA revealed an effect of the main treatment

factor on the ratio for activity in the home cage [$F(3, 89) = 9.6$, $p < 0.01$]. A planned comparison showed that chronic corticosterone treatment induced a reduction in home-cage activity, decreasing the ratio of ambulatory distance during night over day by $> 20\%$. Agomelatine, at both doses studied, increased this parameter in both vehicle- (from $+30\%$) and corticosterone-treated mice (from $+40\%$) (Fig. 3a) indicating an increase in the amplitude of the rhythm. In addition, a two-way ANOVA showed an effect of both pretreatment [$F(1, 89) = 34.7$, $p < 0.01$] and treatment [$F(3, 89) = 5.2$, $p < 0.01$] on the total activity over 24 h (Fig. 3b). A reduction of 35% and 30%, respectively, of the total activity was observed in agomelatine (10 mg/kg.d) and fluoxetine groups with corticosterone pretreatment compared to corticosterone/vehicle-treated mice. Mice that were not exposed to corticosterone did not have any differences with antidepressant treatment. Regarding activity during the light phase

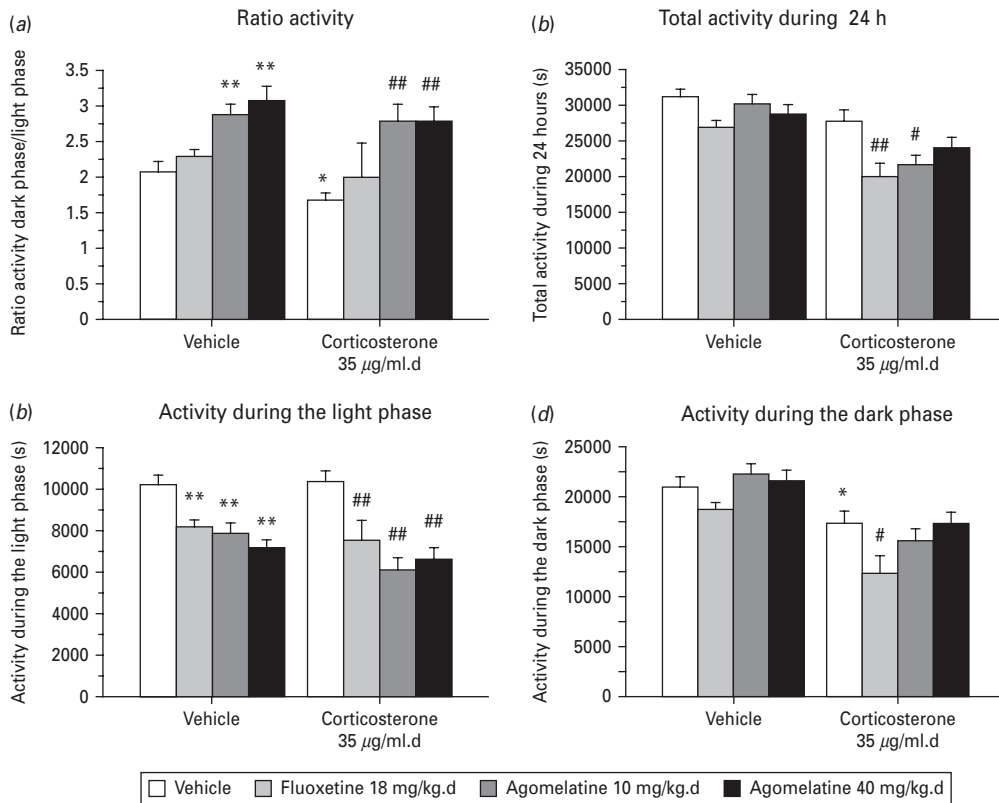


Fig. 3. Chronic agomelatine treatment following corticosterone-induced home-cage activity changes. Effects of 4-wk antidepressant treatment (fluoxetine 18 mg/kg.d or agomelatine 10 and 40 mg/kg.d), started after 4 wk corticosterone (35 µg/ml/d), on home-cage activity. Results are expressed as mean of the ambulatory distance in the dark over the ambulatory distance in the light phase activity (a), the total ambulatory activity over a 24-h period (b), the total ambulatory activity during the light phase (c) and the dark phase (d). Values plotted are mean \pm s.e.m. ($n=10-14$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, vs. control group and corticosterone/vehicle group, respectively.

(Fig. 3c), a two-way ANOVA revealed an effect of treatment [$F(3, 89) = 16.1$, $p < 0.01$]. All antidepressant treatments decreased light phase activity in both vehicle- and corticosterone-treated mice by around 30%. A two-way ANOVA for activity during the dark phase (Fig. 3d) revealed an effect of pretreatment [$F(1, 89) = 39.5$, $p < 0.01$] and treatment [$F(3, 89) = 4.5$, $p < 0.01$]. Indeed, corticosterone decreases activity during the dark phase, an effect that was actually enhanced by 20% with fluoxetine treatment compared to the control group.

Chronic agomelatine treatment after long-term corticosterone exposure affects proliferation and maturation of adult hippocampal neurogenesis

To investigate the potential cellular mechanisms underlying the behavioural effects of agomelatine, we next evaluated changes in adult hippocampal neurogenesis. A two-way ANOVA on the number of

BrdU⁺ cells showed a significant effect of pretreatment [$F(1, 59) = 4.3$, $p < 0.05$], treatment [$F(3, 59) = 5.6$, $p < 0.01$] and a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 59) = 9.3$, $p < 0.01$]. As previously described, chronic corticosterone treatment mimicked the effects of chronic stress on cell proliferation by decreasing the number of proliferating (BrdU⁺) cells in the dentate gyrus (Fig. 4a) of the adult mouse hippocampus. This change in proliferation was completely reversed by antidepressant treatment, either with agomelatine (10 or 40 mg/kg.d) or fluoxetine. No change in BrdU⁺ cells was observed in non-stressed mice.

We next explored whether chronic corticosterone in the presence or absence of antidepressant treatment had any selective influence on neurogenesis along the dorsal/ventral axis of the hippocampus. A two-way ANOVA on BrdU⁺ cells in the dorsal hippocampus revealed a significant pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 59) = 5.1$, $p < 0.01$]. In the

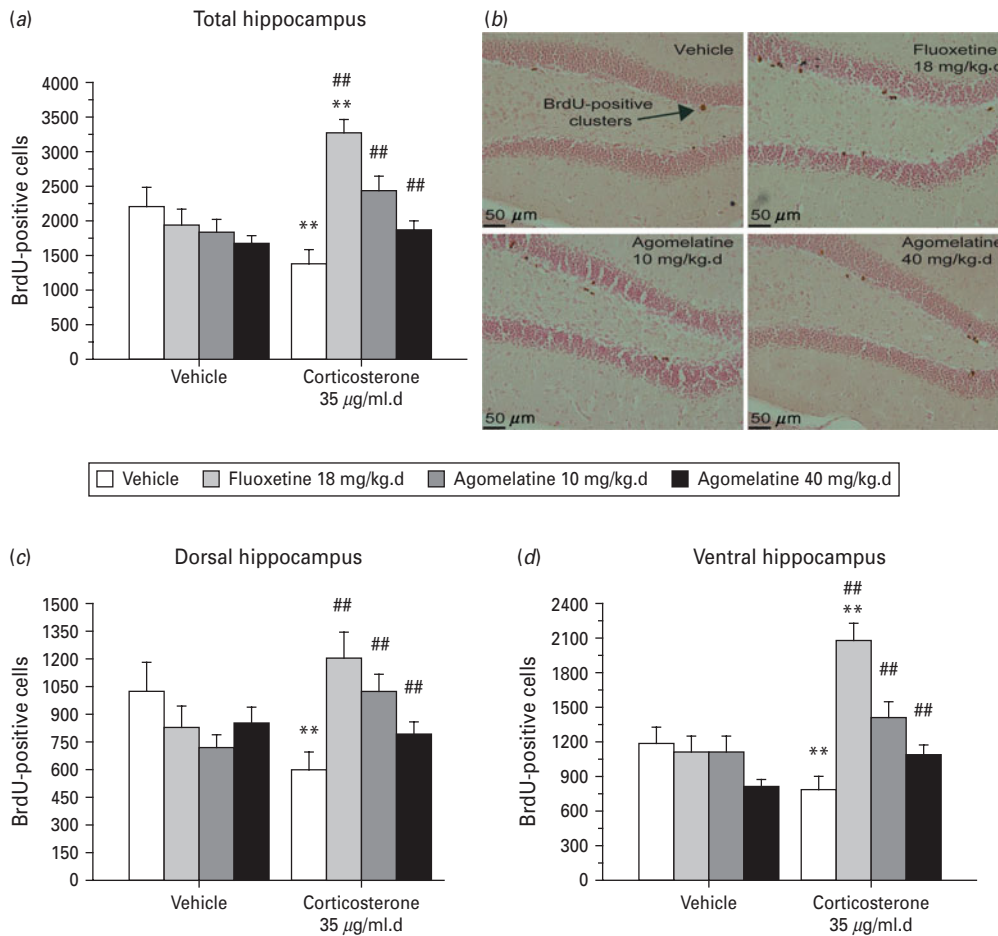


Fig. 4. Chronic agomelatine treatment stimulates cell proliferation in the dentate gyrus of adult hippocampus after chronic corticosterone treatment. BrdU (150 mg/kg) was given 2 h before sacrifice to examine the effects of 8-wk corticosterone (35 µg/ml/d) ± fluoxetine (18 mg/kg.d) or agomelatine (10 and 40 mg/kg.d) during the last 4 wk. Data are expressed as the mean ± S.E.M. of the BrdU⁺ cell counts for 6–11 animals per treatment group for the subgranular zone (SGZ), an adjacent zone defined as a two-cell body-wide zone along the hilar cortex (40 × magnification) in total hippocampus (a), dorsal hippocampus (c) or ventral hippocampus (d). ** $p < 0.01$, ## $p < 0.01$, vs. control group and corticosterone/vehicle group, respectively. (b) Representative illustrations of BrdU immunoreactivity (10 × magnification) in the dentate gyrus after 7 wk pretreatment with corticosterone, and 28 d treatment with vehicle, fluoxetine (18 mg/kg.d), agomelatine (10 or 40 mg/kg.d). BrdU⁺ cell counts were made within the SGZ and adjacent zone defined as a two-cell body-wide zone along the hilar border (40 × magnification).

ventral hippocampus, a two-way ANOVA also revealed a significant effect of pretreatment [$F(1, 59) = 9.0$, $p < 0.01$], treatment [$F(3, 59) = 9.2$, $p < 0.01$] and a significant interaction [$F(3, 59) = 10.3$, $p < 0.01$]. Therefore, the effects of agomelatine or fluoxetine on cell proliferation in corticosterone-treated animals were similar between the dorsal and the ventral hippocampus.

Furthermore, we assessed the effects of agomelatine or fluoxetine on dendritic maturation in our animal model (Fig. 5). To this end, we examined the dendritic morphology of cells that express DCX. A two-way

ANOVA revealed a significant effect of treatment [$F(3, 43) = 21.9$, $p < 0.01$] and pretreatment × treatment interaction [$F(3, 43) = 3.4$, $p < 0.05$] on DCX⁺ cells with tertiary dendrites. Indeed, both doses of agomelatine induced an increase in the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites in control and corticosterone-treated animals. Moreover, chronic antidepressant treatment induced an increase in the maturation index for newborn neurons in the dentate gyrus of the hippocampus [effect of treatment: $F(3, 43) = 11.9$, $p < 0.01$], in both basal and chronic corticosterone conditions. Fluoxetine, as previously published, significantly

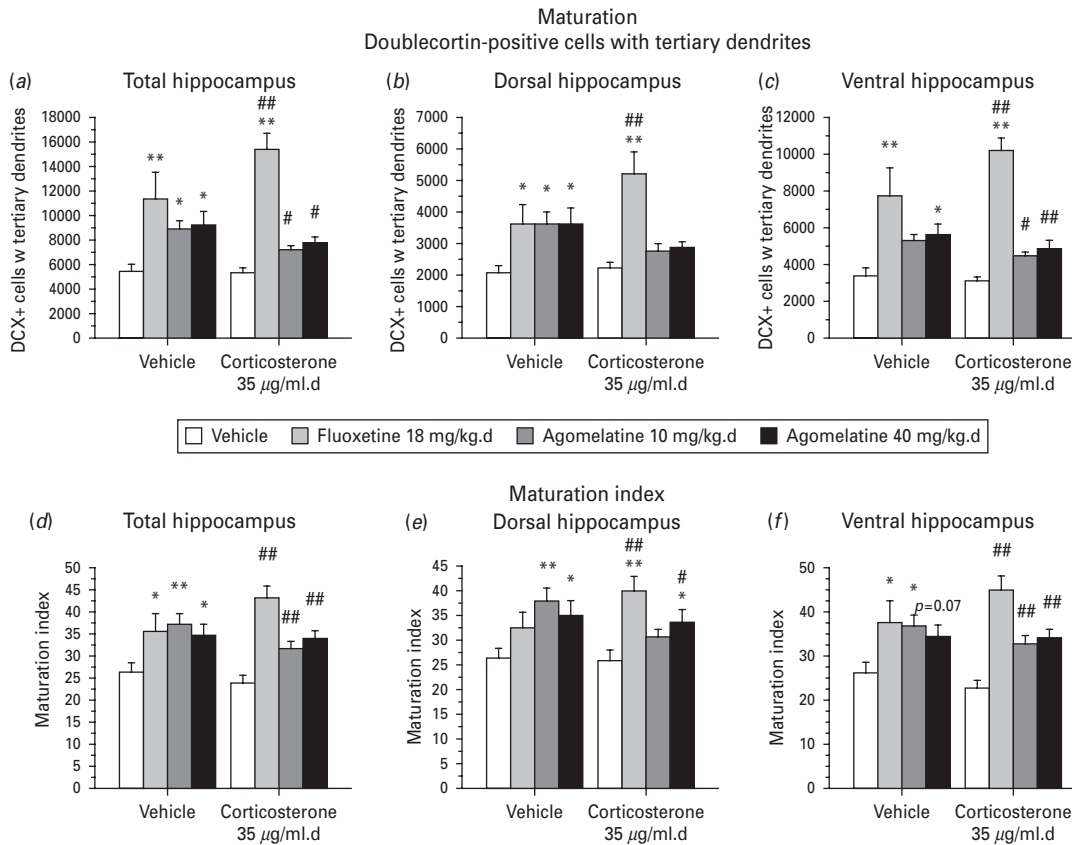


Fig. 5. Chronic agomelatine treatment stimulates dendritic maturation of young neurons in the dentate gyrus of adult hippocampus after chronic corticosterone treatment. Effects of fluoxetine and agomelatine treatment on the DCX⁺ cells with tertiary dendrites in total hippocampus (a), dorsal hippocampus (b) and ventral hippocampus (c) and maturation in total hippocampus (d), dorsal hippocampus (e) and ventral hippocampus (f) of newborn granule cells were measured after 8-wk corticosterone treatment. Values are mean \pm S.E.M. ($n=5-7$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, vs. control group and corticosterone/vehicle group, respectively.

increased the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites (Wang *et al.* 2008).

So far the regional influence of agomelatine on dendritic morphology has not been studied in stressed or non-stressed animals. In the dorsal part of the hippocampus, a two-way ANOVA indicated a significant effect of treatment [$F(3, 43)=10.2$, $p < 0.01$] and a pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 43)=3.7$, $p < 0.05$] on DCX⁺ cells with tertiary dendrites and significant effects of treatment [$F(3, 43)=6.7$, $p < 0.01$] and pretreatment \times treatment interaction [$F(3, 43)=2.9$, $p < 0.05$] on maturation index. Moreover, in the ventral part of the hippocampus, a two-way ANOVA indicated a significant effect of treatment [$F(3, 43)=26.4$, $p < 0.01$] on DCX⁺ cells with tertiary dendrites and a significant effect of treatment [$F(3, 43)=12.9$, $p < 0.01$] on maturation index. Thus, in contrast to chronic glucocorticoid treatment,

both antidepressants modified the maturation index. Interestingly, the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites is increased with agomelatine (10 or 40 mg/kg.d) in corticosterone-treated animals only in the ventral hippocampus.

Discussion

The present study aimed to investigate the antidepressant/anxiolytic-like and neurogenic activities of agomelatine, a novel antidepressant with melatonergic agonist and 5-HT_{2C} receptor antagonist properties in a model of depression/anxiety based on elevation of glucocorticoid levels.

Enhanced activity of the HPA axis involving elevated glucocorticoid levels is considered a key neurobiological alteration in major depression. In depressed patients, many studies have shown that successful

antidepressant therapies are associated with normalization of impaired HPA axis negative feedback (Greden *et al.* 1983; Heuser *et al.* 1996; Holsboer-Trachsler *et al.* 1991; Linkowski *et al.* 1987). Consistent with previous findings, the present results demonstrate that an elevation of glucocorticoid levels is sufficient to induce a depressive/anxiety-like state in C57BL/6Ntac mice in various paradigms including OF (Fig. 1*a,b*), NSF (Fig. 1*c,d*), coat state (Fig. 1*e*), and the sucrose splash test (Fig. 1*f*). As previously shown these deficits were reversed by fluoxetine (David *et al.* 2009). Here we show that the new antidepressant agomelatine is also capable of reversing these deficits.

Overall, in the OF, the NSF, the sucrose splash test and the coat state, the magnitude of agomelatine-induced effects was comparable to that of fluoxetine. Indeed, agomelatine exerted antidepressant-like properties in several animal models of depression and anxiety (Bertaina-Anglade *et al.* 2006; Fuchs *et al.* 2006; Millan *et al.* 2005; Papp *et al.* 2003, 2004; Tuma *et al.* 2005). The mechanism underlying the antidepressant/anxiolytic-like activity of agomelatine appears to involve both its melatonergic receptor agonist and its 5-HT_{2C} receptor antagonist properties (Bertaina-Anglade *et al.* 2006; Papp *et al.* 2003, 2004). Interestingly, melatonergic and 5-HT_{2C} receptors are expressed in the suprachiasmatic nuclei and in other brain areas possibly involved in the pathophysiology of depression, such as the cerebral cortex, hippocampus, amygdala and thalamus (Clemett *et al.* 2002; Holmes *et al.* 1995; Weaver *et al.* 1989).

In the FST, our present data are consistent with the conclusion of recent studies including ours, showing that a chronic corticosterone regimen did not change swimming behaviour in mice (David *et al.* 2009; Murray *et al.* 2008). Agomelatine, and fluoxetine, also induced antidepressant-like effects in 'depressed/anxious' and normal 'non-depressed/anxious' animals. Previous data with agomelatine suggest that its efficacy in the FST involves both its melatonergic receptor agonist and 5-HT_{2C} receptor antagonist properties (Bourin *et al.* 2004). When analysing mice in the FST, we explored swimming, climbing and mobility duration. Swimming behaviour relies on the serotonergic system, and climbing behaviour on the noradrenergic system in rats (Page *et al.* 1999). Interestingly, we provided evidence that changes in mobility duration after chronic agomelatine treatment at the higher dose is mainly related to a change in swimming activity, whereas at the lower dose (10 mg/kg.d), both swimming and climbing duration were increased. This effect on climbing duration could be linked to the enhancement of the extracellular

levels of noradrenaline in the frontal cortex and dorsal hippocampus (Millan *et al.* 2003, 2005). With regard to swimming behaviour, even though agomelatine failed to change extracellular levels of 5-HT in the dorsal hippocampus or the frontal cortex (Millan *et al.* 2005), or the levels of 5-HT_{1A} receptors (Hanoun *et al.* 2004), it has been demonstrated that reciprocal interactions among norepinephrine, dopamine and serotonin exist (Guiard *et al.* 2010).

Moreover, a number of studies have demonstrated chronobiotic activity of agomelatine (Martinet *et al.* 1996). This component of the pharmacological activity of agomelatine is important since abnormal circadian rhythms including modifications of active/sleep state have been described in depression as a major symptom (Germain & Kupfer, 2008; Healy, 1987; Mendelson *et al.* 1987; Perlis *et al.* 1997). Our animal model is particularly attractive for assessing compounds with chronobiotic and antidepressant properties, since a flattened circadian rhythm with reduction in home-cage activity was observed with depression/anxiety-like state in corticosterone-treated animals (Fig. 3). Indeed, agomelatine at 10 or 40 mg/kg.d normalized the disturbance of circadian rhythms in corticosterone-treated animals, increasing the dark/light ratio (Fig. 3*a*). This change in the ratio is a consequence of decreased activity during the light period (Fig. 3*c*), since no change was observed during the dark period. Overall, these data are consistent with the well-known effects of agomelatine on normalization of circadian rhythm disturbance in several animal models (Armstrong *et al.* 1993; Martinet *et al.* 1996; Pitrosky *et al.* 1999; Redman *et al.* 1995) as well as in depressed patients (see de Bodinat *et al.* 2010 for review; Kasper *et al.* 2010). Interestingly, an increase in dark/light home-cage activity ratio is also observed in vehicle-treated mice confirming circadian effects of agomelatine in both baseline and pathological situations. The absence of an increase in the total activity rules out a stimulant-like effect of agomelatine administration (Fig. 3*b*). As mentioned above, this change is a consequence of decreased activity during the light phase only (Fig. 3*c*).

In order to investigate the potential cellular mechanisms underlying the behavioural effects of agomelatine, we next evaluated changes in adult hippocampal neurogenesis hypothesized to be relevant for antidepressant action (Airan *et al.* 2007; David *et al.* 2007, 2009; Santarelli *et al.* 2003; Wang *et al.* 2008). In agreement with previous findings (David *et al.* 2009; Murray *et al.* 2008; Qiu *et al.* 2007), we found a reduction in the proliferation of progenitor cells after chronic corticosterone treatment was observed (Fig. 5),

emphasizing a role for glucocorticoids in the regulation of the proliferation stage of the neurogenic process.

Here, chronic administration of agomelatine or fluoxetine reversed the decrease in cell proliferation in the hippocampus without any discrimination between the dorsal and the ventral hippocampus. Previous data obtained in stress paradigms with fluoxetine in mice (David *et al.* 2009) or with agomelatine in rats (Dagyté *et al.* 2010) corroborate our results. No regional differences in the effects of agomelatine on cell proliferation were observed in our model, suggesting that this effect may be prominent only in unstressed rodents (Banar *et al.* 2006; Païzanis *et al.* 2010; Soumier *et al.* 2009). Furthermore, another report demonstrated that effects of chronic agomelatine treatment on cell proliferation appeared throughout the dentate gyrus in mice with decreased expression of glucocorticoids in the brain (Païzanis *et al.* 2010). Interestingly, neither chronic agomelatine nor fluoxetine administration affected hippocampal cell proliferation in non-corticosterone-treated C57BL/6Ntac mice. In contrast, some other studies have shown that 3-wk treatment with agomelatine promoted cell proliferation in the ventral hippocampus of non-stressed Wistar rats (Banar *et al.* 2006; Soumier *et al.* 2009), wild-type GR-1 mice (Païzanis *et al.* 2010), or the dorsal part of the hippocampus of Sprague–Dawley rats (AlAhmed & Herbert, 2010). Overall, strains and species differences (rats *vs.* mice) in hippocampal adult cell proliferation are more likely to account for these differences (David *et al.* 2010 for review) than changes in the experimental protocols as suggested by Dagyté & colleagues (2010). Indeed, as previously demonstrated, various antidepressants do not have any effects on strains with high basal hippocampal neurogenesis levels such as non-stressed C57BL/6 (David *et al.* 2009; Navailles *et al.* 2008; Schauwecker, 2006). The facilitation of cell proliferation in the dentate gyrus by agomelatine could reflect, at least in part, its 5-HT_{2C} receptor antagonist properties (Soumier *et al.* 2009; AlAhmed & Herbert, 2010).

The characterization of the neurogenic effects of new compounds requires an understanding of the effects on maturation of young neurons in addition to proliferation effects. Maturation is a crucial step for the functional integration of young neurons into neural circuits. In the adult dentate gyrus, DCX is exclusively expressed in immature neurons from age 1 d to 4 wk (Couillard-Despres *et al.* 2005) and thus has been widely used as a reliable marker of immature neurons that reflects the level of neurogenesis and its modulation. While about 20% of DCX⁺ cells are still in the

cell cycle, 70% are post-mitotic and represent young immature neurons; the remaining 10% are progressing from late neuroblasts to immature neurons. Studies done in rats demonstrated that agomelatine, or other antidepressants such as fluoxetine, promote maturation of post-mitotic neurons (Banar *et al.* 2006; Dagyté *et al.* 2010; Soumier *et al.* 2009, Wang *et al.* 2008). In a recent study, agomelatine appeared to induce an early acceleration of cell maturation at 8 d development (Soumier *et al.* 2009). To date, no data with an earlier time-point than 21 d examined the effects of fluoxetine on cell maturation (Wang *et al.* 2008). However, it is unlikely that SSRIs have an effect on maturation at 8 d since it has been well documented that fluoxetine does not induce any changes in proliferation (Santarelli *et al.* 2003) or survival (Wang *et al.* 2008) during the first week of treatment. The latest data obtained by Daszuta's group might therefore suggest that agomelatine, in comparison to other monoaminergic antidepressants, has a more rapid effect on cell maturation in non-stressed conditions (Soumier *et al.* 2009).

We investigated the effect of chronic agomelatine and fluoxetine treatment on cell maturation in corticosterone-treated animals. Agomelatine and fluoxetine induced an increase in the dendritic arborization complexity of newborn neurons in the hippocampus. Indeed, a larger fraction of DCX⁺ cells possessed tertiary dendrites after chronic agomelatine treatment in both corticosterone- and non-corticosterone-treated animals suggesting that agomelatine facilitates maturation. These results could be linked to previous data where agomelatine increased the proportion of mature *vs.* immature neurons after 15 d treatment in rats, a time-point when newborn cells start to develop dendritic arborization, extend axon terminals for establishing synapses with their targets, and become integrated into hippocampal circuitry. In keeping with these results, agomelatine also increased dendritic length and branching points *in vitro* in postnatal hippocampal cultures at 8 d *in vitro* (Soumier *et al.* 2009). Finally, the effects on maturation observed in previous studies under basal or stressed conditions (Banar *et al.* 2006; Dagyté *et al.* 2010; Soumier *et al.* 2009) in rats were confirmed with the increase in the maturation index induced by chronic agomelatine treatment.

Our study distinguishes for the time, the effects of antidepressants on neuronal maturation between the dorsal and the ventral hippocampus. Interestingly, in contrast to the non-selective increase in dendritic maturation with fluoxetine, agomelatine-induced increase in maturation of newborn neurons was primarily observed in the ventral hippocampus of

corticosterone-treated mice. The ventral hippocampus is of particular interest due to the anatomical and functional differences between the ventral and dorsal hippocampus (Bannerman *et al.* 2004; Fanselow & Dong, 2010; Moser & Moser, 1998). The projections of the ventral hippocampus to the prefrontal cortex and amygdala support the view that the ventral hippocampus is particularly involved in 'emotional circuitry', especially in the control of anxiety/depressive states (Bannerman *et al.* 2004; Engin & Treit, 2007). This regional effect of agomelatine could be related to its 5-HT_{2C} properties since this receptor seems to be located in the ventral hippocampus (Alves *et al.* 2004). However, a joint action of agomelatine on cell maturation through its action on melatonergic and 5-HT_{2C} receptors cannot be ruled out as suggested by Soumier *et al.* (2009).

It should be also noted that the effects of agomelatine on neurogenesis (proliferation and maturation) both dorsally and ventrally are slightly lower than those of fluoxetine particularly in chronic corticosterone-treated animals. On the other hand, comparable behavioural responses are observed for both drugs in tests of antidepressant and anxiolytic activity.

Conclusion

Our work shows that agomelatine induces an antidepressant-like effect in a model of anxiety/depression that is comparable to that of fluoxetine, a classical SSRI. However, agomelatine also induced a change in circadian rhythm, which may contribute to its distinct profile of antidepressant action. Agomelatine is therefore a strong candidate for a new approach to treating depression and anxiety due to an innovative mechanism of action based on melatonin agonist and 5-HT_{2C} antagonistic properties.

Note

Supplementary material accompanies this paper on the Journal's website (<http://journals.cambridge.org/npn>).

Acknowledgements

Q.R. was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR, Paris, France) during the performance of this work. This work was supported by the technical assistance of the Animal care facility of the IPSIT – Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique of the Paris-Sud 11

University and by a grant from Servier. Finally, we are grateful to Dr Benjamin A. Samuels (Columbia University, USA) for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

Statement of Interest

None.

References

- Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, *et al.* (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science* **317**, 819–823.
- AlAhmed S, Herbert J (2010). Effect of agomelatine and its interaction with the daily corticosterone rhythm on progenitor cell proliferation in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuropharmacology* **59**, 375–379.
- Alves SH, Pinheiro G, Motta V, Landeira-Fernandez J, *et al.* (2004). Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioural Pharmacology* **15**, 37–43.
- Armstrong SM, McNulty OM, Guardiola-Lemaitre B, Redman JR (1993). Successful use of S20098 and melatonin in an animal model of delayed sleep-phase syndrome (DSPS). *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **46**, 45–49.
- Banasr M, Soumier A, Hery M, Mocaër E, *et al.* (2006). Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry* **59**, 1087–1096.
- Bannerman DM, Deacon RM, Brady S, Bruce A, *et al.* (2004). A comparison of GluR-A-deficient and wild-type mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviors. *Behavioral Neuroscience* **118**, 643–647.
- Barden N, Shink E, Labbé M, Vacher R, *et al.* (2005). Antidepressant action of agomelatine (S 20098) in a transgenic mouse model. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **29**, 908–916.
- Bertaina-Anglade V, la Rochelle CD, Boyer PA, Mocaër E (2006). Antidepressant-like effects of agomelatine (S 20098) in the learned helplessness model. *Behavioural Pharmacology* **17**, 703–713.
- Bourin M, Mocaër E, Porsolt R (2004). Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* **29**, 126–133.
- Clemett DA, Punhani T, Duxon MS, Blackburn TP, *et al.* (2002). Immunohistochemical localization of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology* **39**, 123–132.

- Couillard-Despres S, Winner B, Schauback S, Aigner R, et al.** (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* **21**, 1–14.
- Dagyté G, Trentani A, Postema F, Luiten PG, et al.** (2010). The novel antidepressant agomelatine normalizes hippocampal neuronal activity and promotes neurogenesis in chronically stressed rats. *CNS Neuroscience and Therapeutics* **16**, 195–207.
- David DJ, Klemenhausen KC, Holick KA, Saxe MD et al.** (2007). Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl)(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **321**, 237–248.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, et al.** (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* **62**, 479–493.
- David DJ, Wang J, Samuels BA, Rainer Q, et al.** (2010). Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist* **16**, 578–591.
- De Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E, Rnard P, et al.** (2010). Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 628–642.
- Ducottet C, Belzung C** (2004). Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiology and Behavior* **81**, 417–426.
- Engin E, Treit D** (2007). The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behavioural Pharmacology* **18**, 365–374.
- Fanselow MS, Dong HW** (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**, 7–19.
- Fuchs E, Simon M, Schmelting B** (2006). Pharmacology of a new antidepressant: benefit of the implication of the melatonergic system. *International Clinical Psychopharmacology* **21**, 17–20.
- Germain A, Kupfer DJ** (2008). Circadian disturbances in depression. *Human Psychopharmacology* **23**, 571–585.
- Gorwood P** (2010). Restoring circadian rhythms: a new way to successfully manage depression. *Journal of Psychopharmacology* **24**, 15–19.
- Greden JF, Gardner R, King D, Grunhaus L, et al.** (1983). Dexamethasone suppression tests in antidepressant treatment of melancholia. The process of normalization and test-retest reproducibility. *Archives of General Psychiatry* **40**, 493–500.
- Guiard BP, Chenu F, Mansari ME, Blier P** (2010). Characterization of the electrophysiological properties of triple reuptake inhibitors on monoaminergic neurons. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **11**, 1–13.
- Hanoun N, Mocaër E, Boyer PA, Hamon M, et al.** (2004). Differential effects of the novel antidepressant agomelatine (S 20098) vs. fluoxetine on 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Neuropharmacology* **47**, 515–526.
- Healy D** (1987). Rhythm and blues. Neurochemical, neuropharmacological and neuropsychological implications of a hypothesis of circadian rhythm dysfunction in the affective disorders. *Psychopharmacology* **93**, 271–285.
- Heuser IJ, Schweiger U, Gotthardt U, Schmider J, et al.** (1996). Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects. *American Journal of Psychiatry* **153**, 93–99.
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC** (2008). Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/c mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* **33**, 406–417.
- Holmes MC, French KL, Seckl JR** (1995). Modulation of serotonin and corticosteroid receptor gene expression in the rat hippocampus with circadian rhythm and stress. *Brain Research Molecular Brain Research* **28**, 186–192.
- Holsboer-Trachsler E, Stohler R, Hatzinger M** (1991). Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression. *Psychiatry Research* **38**, 163–171.
- Kasper S, Hajak G, Wulff K, Hoogendijk WJG, et al.** (2010). Efficacy of the novel antidepressant agomelatine on the circadian rest-activity cycle and depressive and anxiety symptoms in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind comparison vs. sertraline. *Journal of Clinical Psychiatry* **71**, 109–120.
- Kennedy SH, Emsley R** (2006). Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology* **16**, 93–100.
- Kräuchi K, Cajochen C, Möri D, Graw P, et al.** (1997). Early evening melatonin and S 20098 advance circadian phase and nocturnal regulation of core body temperature. *American Journal of Physiology* **272**, 1178–1188.
- Leproult R, Van Onderbergen A, L'Hermite-Baleriaux M, Van Cauter E, et al.** (2005). Phase-shifts of 24-h rhythms of hormonal release and body temperature following early evening administration of the melatonin agonist agomelatine in healthy older men. *Clinical Endocrinology* **63**, 298–304.
- Linkowski P, Mendlewicz J, Kerkhofs M, Leclercq R, et al.** (1987). 24-hour profiles of adrenocorticotropin, cortisol, and growth hormone in major depressive illness: effect of antidepressant treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **65**, 141–152.
- Lôo H, Hale A, D'haenen H** (2002). Determination of the dose of agomelatine, a melatonergic agonist and selective

- 5-HT_{2C} antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *International Clinical Psychopharmacology* **17**, 239–247.
- Martinet L, Guardiola-Lemaitre B, Mocaer E** (1996). Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **54**, 713–718.
- Mendelson WB, Sack DA, James SP, Martin JV, et al.** (1987). Frequency analysis of the sleep EEG in depression. *Psychiatry Research* **21**, 89–94.
- Millan MJ** (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology and Therapeutics* **110**, 135–370.
- Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Dekeyne A** (2005). Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5-HT_{2C} receptor blockade. *Psychopharmacology* **177**, 448–458.
- Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, et al.** (2003). The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**, 954–964.
- Moser MB, Moser EI** (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* **8**, 608–619.
- Murray F, Smith DW, Hutson PH** (2008). Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *European Journal of Pharmacology* **583**, 115–127.
- Navailles S, Hof PR, Schmauss C** (2008). Antidepressant drug-induced stimulation of mouse hippocampal neurogenesis is age-dependent and altered by early life stress. *Journal of Comparative Neurology* **509**, 372–381.
- Olié JP, Kasper S** (2007). Efficacy of agomelatine, a MT₁/MT₂ receptor agonist with 5-HT_{2C} antagonistic properties, in major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **10**, 661–673.
- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, et al.** (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology* **147**, 162–167.
- Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, Saurini F, et al.** (2010). Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **13**, 759–774.
- Papp M, Gruca P, Boyer PA, Mocaer E** (2003). Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology* **28**, 694–703.
- Papp M, Litwa E, Gruca P, Mocaer E** (2006). Anxiolytic-like activity of agomelatine and melatonin in three animal models of anxiety. *Behavioural Pharmacology* **17**, 9–18.
- Perlis ML, Giles DE, Buysse DJ, Thase ME, et al.** (1997). Which depressive symptoms are related to which sleep electroencephalographic variables? *Biological Psychiatry* **15**, 904–913.
- Pitrosky B, Kirsch R, Malan A, Mocaer E, et al.** (1999). Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *American Journal of Physiology* **277**, 812–828.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M** (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**, 730–732.
- Qiu G, Helmeste DM, Samaranayake AN, Lau WM, et al.** (2007). Modulation of the suppressive effect of corticosterone on adult rat hippocampal cell proliferation by paroxetine. *Neuroscience Bulletin* **23**, 131–136.
- Quera-Salva MA, Vanier B, Laredo J, Hartley S, et al.** (2007). Major depressive disorder, sleep EEG and agomelatine: an open-label study. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **10**, 691–696.
- Redman JR, Guardiola-Lemaitre B, Brown M, Delagrangé P, et al.** (1995). Dose dependent effects of S-20098, a melatonin agonist, on direction of re-entrainment of rat circadian activity rhythms. *Psychopharmacology* **118**, 385–390.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, et al.** (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805–809.
- Schauwecker PE** (2006). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of two strains of adult mice. *Brain Research* **1120**, 83–92.
- Soumier A, Banasr M, Lortet S, Masméjean F, et al.** (2009). Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2390–2403.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, et al.** (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biological Psychiatry* **64**, 293–301.
- Tuma J, Strubbe JH, Mocaer E, Koolhaas JM** (2005). Anxiolytic-like action of the antidepressant agomelatine (S 20098) after a social defeat requires the integrity of the SCN. *European Neuropsychopharmacology* **15**, 545–555.
- Van Reeth O, Weibel L, Olivares E, Maccari S, Mocaer E, Turek FW** (2001). Melatonin or a melatonin agonist corrects age-related changes in circadian response to an environmental

stimulus. *American Journal of Physiology* **280**, 1582–1591.

Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, et al. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *Journal of Neuroscience* **28**, 1374–1384.

Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by *in vitro* autoradiography. *Journal of Neuroscience* **9**, 2581–2590.

Wong ML, Licinio J (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 343–351.

Supplementary experimental procedures

Drugs

The doses of agomelatine used in the present study were chosen on the basis of their activity in various animal models of depression and anxiety in the range of 2–50 mg/kg (Bourin et al., 2004; Millan et al., 2005; Papp et al., 2003). The dose of fluoxetine employed corresponds to the plasma fluoxetine levels found in depressed patients (taking 20-80 mg/day fluoxetine) (Dulawa et al., 2004).

Behavioral testing

Novelty suppressed feeding paradigm: The testing apparatus consisted of a plastic box (50x50x20 cm), the floor of which was covered with approximately 2 cm of wooden bedding. 24 hours prior to behavioral testing, all food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food was placed on a white paper platform in the center of the box. An animal was placed in a corner of the box, and a stopwatch was immediately started. The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet with the use of forepaws) was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage, and the amount of food consumed by the mouse in the subsequent 5 min was measured. Each mouse was weighed before food deprivation and before testing to assess the percentage of body weight loss (data not shown).

Forced swim test: Automated scoring was performed using the automated X'PERT FST (Bioseb, Vitrolles, France). Each bucket was instrumented with a sensor recording the vibrations due to movements of the mice and a video was recorded

from above. The system synchronizes mice position data calculated from the video recording, and the vibrations data. These information allow the system to compute characteristic values (based on speed of the animal, as well as different frequencies and powers of the vibrations through Fast Fourier Transforms calculation) describing the animal behavior every seconds.

Immunohistochemistry

BrdU labeling for proliferation study: Mice were administered with BrdU (150 mg/kg, i.p. dissolved in saline), 2h before sacrifice for cell proliferation. After anesthesia with ketamine/xylazine (100 and 7 mg/kg, respectively), mice were perfused transcardially (cold saline for 2 min, followed by 4% cold paraformaldehyde at 4°C). The brains were then removed and cryoprotected in 30% sucrose and stored at 4°C. Serial sections (35 µM) were cut through the entire hippocampus (plate 41-61; Franklin and Paxinos, 2007) on a cryostat and stored in PBS with 0.1% NaN₃. For DAB staining, sections were mounted on slides and boiled in citric acid (pH 6.0) for 5 min, rinsed with PBS, and treated with 0.01% trypsin in Tris/CaCl₂ for 10 min. Brain sections were incubated for 30 min with 2N HCl and blocked with 5% NGS. Sections were then incubated overnight at room temperature with anti-mouse BrdU (1:100). After washing with PBS, sections were incubated for 1 hr with secondary antibody (1:200 biotinylated goat anti-mouse) followed by amplification with an avidinbiotin complex. The staining was visualized with DAB. For the quantification, a stereological procedure was used as previously described (Malberg et al., 2000). Effects of chronic agomelatine treatments on the number of BrdU-labeled cells were also examined separately in the rostral (Bregma -1.20 to -3.00 mm; Franklin and Paxinos, 2007) and caudal (Bregma -3.00 to -3.80 mm) hippocampus. The rostral region contains the DG

in most of the dorsal hippocampus, whereas the caudal region contains a part of the DG in the dorsal hippocampus and the entire DG in the ventral hippocampus (Banasr et al., 2006).

Doublecortin (DCX) labeling for maturation index study: For doublecortin staining, the procedure consisted of the following steps (David et al., 2009). Sections were rinsed in TBS, treated with 1% H₂O₂ in TBS for 15 min to quench endogenous peroxidase activity (and to enhance dendritic staining), incubated in 10% normal donkey serum and 0.3% Triton X- 100 for 30 min, and then incubated overnight at 4°C in primary antibody for DCX (goat;1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The secondary antibody was biotinylated donkey anti-goat (1:500) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in TBS for 2 hr at room temperature. Sections were developed using avidin-biotin complex (Vector, USA) and DAB kit. Bright-field images were taken with an Olympus BX51 (Germany) upright microscope. DCX+ cells were subcategorized according to their dendritic morphology (Wang et al., 2008). Effects of chronic agomelatine treatments on the number of DCX-labeled cells were also examined separately in the rostral and caudal hippocampus.

References

Banasr M, Soumier A, Hery M, Mocaër E, et al. (2006). Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry* **59**, 1087-1096.

Bourin M, Mocaër E, Porsolt R (2004). Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* **29**, 126-133.

David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* **62**, 479-493.

Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1321-1330.

Franklin KBJ, Paxinos F (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Third Edition*. New York: Elsevier.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **20**, 9104-9110.

Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Dekeyne A (2005). Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5-HT_{2C} receptor blockade. *Psychopharmacology* **177**, 448-458.

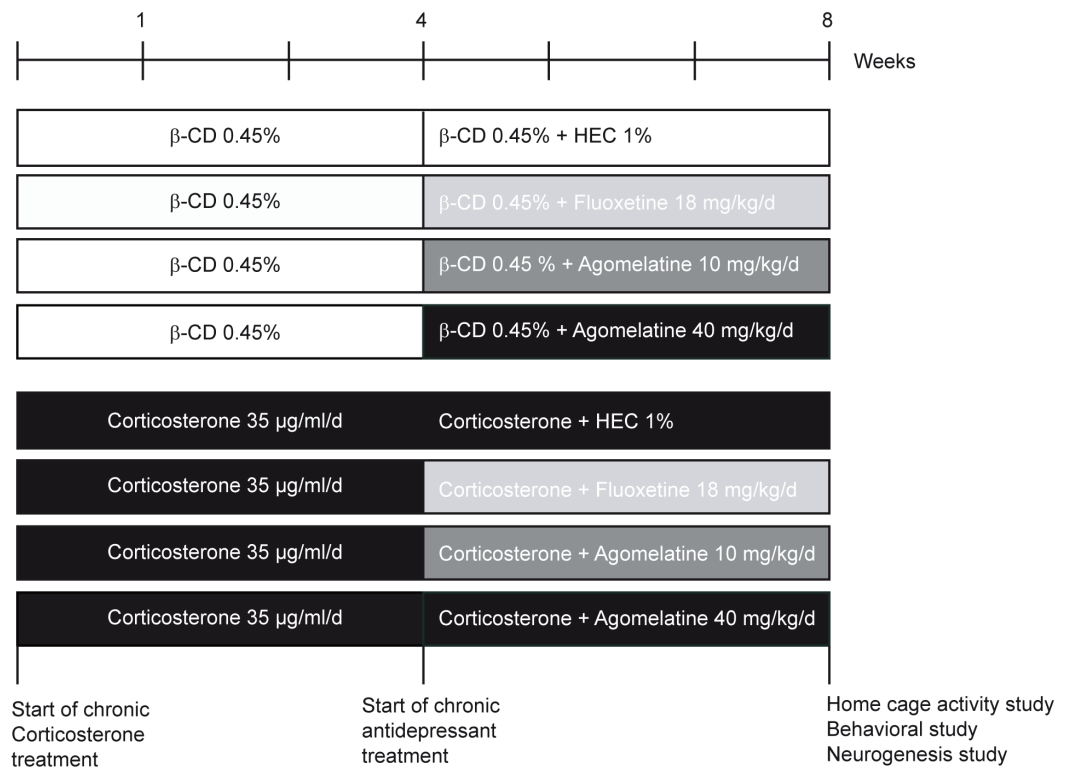
Papp M, Gruca P, Boyer PA, Mocaër E (2003). Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology* **28**, 694-703.

Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, et al. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of Neuroscience* **28**, 1374-1384.

Supplementary Table 1

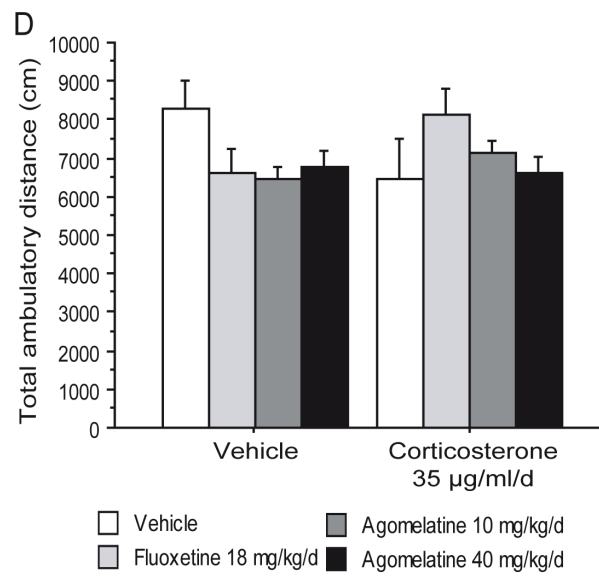
	Vehicle	Corticosterone 35 μ g/ml/d
Vehicle	0.336 \pm 0.048	0.298 \pm 0.054
Fluoxetine 18 mg/kg/d	0.344 \pm 0.033	0.411 \pm 0.053
Agomelatine 10 mg/kg/d	0.248 \pm 0.046	0.332 \pm 0.073
Agomelatine 40 mg/kg/d	0.337 \pm 0.048	0.241 \pm 0.029

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

Open Field



Article 4 (en preparation)

Chronic Agomelatine reverse corticolimbic transcriptome changes induced by corticosterone in a neuroendocrine model of depression

Lin Xia, Lun-Ching Chang, Quentin Rainer, Claudine Deloménie, Cecilia Gabriel, Elisabeth Mocaer, Denis J. David, Alain Gardier, Etienne Sibille, Jean-Philippe Guilloux

En préparation

Résumé :

L'agomélatine est un nouvel antidépresseur agissant sur deux systèmes de neurotransmetteurs différents, sérotoninergique et mélatoninergique. Les propriétés anxiolytique et antidépressive de l'agomélatine ont été confirmées dans différentes études cliniques et dans plusieurs modèles animaux des troubles anxio-dépressifs.

Notre équipe a créé un nouveau modèle d'anxiété/dépression chez la souris, par administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson (modèle CORT). Nous avons montré que l'administration chronique d'agomélatine ou de fluoxétine améliore les rythmes circadiens et les comportements anxieux induits par le traitement chronique de corticostérone. Le déficit de neurogenèse observé dans l'hippocampe adulte chez les souris CORT est également corrigé par le traitement,

Dans ce travail, nous étudions le phénotype moléculaire des troubles anxio-dépresseurs induits par le traitement chronique de corticostérone et les effets transcriptomiques de l'agomélatine sur les profils d'expression des gènes dans 4 régions cérébrales cortico- limbiques, l'hippocampe ventral (HV) et dorsal (HD), le cortex cingulaire (CC) et l'amygdale (AMY) chez les souris du modèle CORT.

Principaux Résultats :

Chez les souris du modèle CORT, on observe une augmentation de « l'emotionality score » qui reflète une élévation du comportement anxio-dépressif des souris. Ce score est diminué après traitement chronique par des antidépresseurs.

À l'aide de la technique des puces à ADN, on observe que la corticostérone a changé l'expression de nombreux gènes dans chaque région cérébrale. En effet, 385 gènes sont exprimés différemment après traitement de corticostérone dans l'Hippocampe Ventral (HV), 734 gènes dans l'Hippocampe Dorsal (HD), 465 gènes dans l'Amygdale (AMY) et 560 gènes dans le cortex cingulaire (CC), mais aucun gène commun n'a été observé dans les 4 régions. Un traitement chronique d'agomélatine a dans 3 régions sur les 4 (HD, HV, AMY) inversé au moins en partie le profil d'expression induit par la corticostérone.

Plusieurs comparaisons sur les expressions du gène entre les 4 régions cérébrales sont utilisées pour étudier les effets globaux génomiques de l'agomélatine dans les différentes régions et dans les différents modèles. Les résultats montrent que les faibles liaisons génomiques affectés par l'agomélatine sont découvertes dans les 4 régions cortico-limbiques, cependant une faible similarité significative des expressions transcriptomiques est observée entre le HV et HD. L'agomélatine a montré des différents effets transcriptomiques régionaux entre les souris CORT et les souris normales non-stressées. Dans le cortex cingulaire, une bonne corrélation des expressions du gène est obtenue chez les deux groupes de souris, mais des effets opposés sur transcriptions génomiques de l'agomélatine sont observés dans l'amygdale et l'hippocampe dorsal. Malheureusement, aucune liaison des profils de l'expression génomiques dans l'hippocampe ventral est découverte entre les souris stressées et non-stressées.

Enfin, on a trouvé que les traitements chroniques de l'agomélatine et de la fluoxétine produisent des grands effets similaires sur les changements transcriptomiques induits par la corticostérone et aussi sur l'expression des gènes dans l'hippocampe ventral chez les souris du modèle CORT.

Chronic Agomelatine reverses corticolimbic transcriptome changes induced by corticosterone in a neuroendocrine model of depression

Lin Xia¹, Lun-Ching Chang³, Quentin Rainer¹, Claudine Deloménie², Cecilia Gabriel⁴, Elisabeth Mocaer⁴, Denis David¹, Alain Gardier¹, Etienne Sibille^{3,5}, Jean-Philippe Guilloux^{1,§}

¹Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, F-92296

²Univ Paris-Sud, Plateforme Transcriptome, IFR141, Fac. Pharmacie, Châtenay-Malabry, F-92296

³Department of Psychiatry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

⁴Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie, France

⁵Center for Neuroscience, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

§ Corresponding Author :Dr Jean-Philippe Guilloux
Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie
5, rue JB Clément
92296 Châtenay-Malabry cedex
France.
Tel: +33.1.46.83.59.68
Fax: +33.1.46.83.53.55
E-mail: jean-philippe.guilloux@u-psud.fr

ABSTRACT

Agomelatine is a novel antidepressant acting as melatonergic agonist and 5-HT_{2C} receptor antagonist with demonstrated antidepressant and anxiolytic properties in both animal models and patients. We have previously shown that chronic agomelatine administration reversed both behavioural and neurogenesis deficits observed in a mouse model of depression/anxiety-like disorders induced by chronic corticosterone administration (Rainer et al., 2011). The aim of this study, was to investigate agomelatine-related transcriptome changes in this model. In 4-weeks corticosterone-treated mice (35 µg/ml/d), we administered either vehicle or agomelatine (10 mg/kg/d) for 4 additional weeks. Mice subjected to chronic corticosterone administration displayed increased in emotionality levels as well as physiological changes (weight, coat state). Agomelatine partly reversed corticosterone-induced increases in emotionality score. After behavioral analysis, animals were sacrificed and brain regions microdissected. Using microarray and RT-qPCR, we monitored changes in gene expression among cingulate cortex (CC), amygdala (AMY) ventral (VH) and dorsal hippocampus (DH). Chronic corticosterone induced gene changes in all brain regions, similar to what can be observed after unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression (Surget et al., 2009). Corticosterone-induced gene expression changes were reversed by chronic agomelatine in VH, DH, AMY and to a lesser extent in CC. Molecular profiles induced by chronic corticosterone were similar across regions, while agomelatine effect showed less correlation across regions. Finally, the effects of agomelatine on gene changes differed between control and corticosterone-treated animals. Globally, these effects of agomelatine in both basal conditions and in the corticosterone-treated mice model of depression confirmed on a large-scale that agomelatine effects on transcriptome are region-specific and state-dependent, and can play a role in its antidepressant/anxiolytic properties.

Keywords

Hippocampus/Cingulate/Amygdala/Behaviour/Microarray

INTRODUCTION

Major depression and anxiety are the two most common chronic psychiatric disorders in human. Currently, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are considered as the first choice for the first-line treatment of depression and anxiety. However, SSRIs still requires 2-4 weeks of delay before appearance of clinical benefits (Wang et al., 2001, Blier and De Montigny, 1994; Wong & Licinio, 2001), a period during which increased risk of suicide has been reported (Morag et al., 2011). Moreover SSRI-treated patients still display a high rate of non-response/resistance to the treatment (Souery et al., 2007; Kirchheiner et al., 2004; Wong & Licinio 2001) reinforcing the need to develop new effective drugs with innovative mechanism of action, hoping for better efficacy, tolerance and safety (Millan et al., 2006, Blier et al., 2010).

Agomelatine, is an antidepressant that display dual properties with agonistic action at melatonergic receptors MT₁/MT₂ and antagonistic properties at 5-HT_{2C} receptor (Audinot et al., 2003, Millan et al., 2003; de Bodinat et al., 2010). It has demonstrated efficacy in major depressive disorders in several clinical trials (Kennedy & Emsley, 2006; Lôo et al. 2002; Olié & Kasper, 2007; Goodwin et al., 2009). Furthermore, numerous preclinical studies indicated that agomelatine showed antidepressant and anxiolytic effects on animal behaviors in various animal models (Papp et al., 2003; Papp et al., 2006; Koresh et al., 2012; Millan et al., 2005; Morley-Fletcher et al., 2011; El Yacoubi et al., 2011). Antidepressant and anxiolytic properties of agomelatine were recently confirmed in a mouse model induced by long-term exposure of exogenous corticosterone (David et al., 2009; Rainer et al., 2011). Our results showed that the depressive/anxiety-like phenotype induced by corticosterone treatment was reversed by

either chronic agomelatine or fluoxetine treatment. Moreover, agomelatine normalized the corticosterone-induced alterations in the dark/light ratio of home-cage activity, suggesting a normalization of disturbed circadian rhythms. Behavioral benefits of chronic agomelatine were supported at least in part, by an increase in cell proliferation in the whole hippocampus of corticosterone-treated mice and increased maturation of newborn neurons in both vehicle- and corticosterone-treated mice (Rainer et al., 2011).

Numerous microarray studies aimed at characterizing the transcriptome correlates of antidepressant treatment in rodents (Landgrebe et al, 2002; Rausch et al, 2002; Newton et al, 2003; Drigues et al, 2003; Palotas et al, 2004; Altar et al, 2004; Wong et al, 2004; Ploski et al, 2006; Takahashi et al, 2006); however, differences in treatments, exposure time, and brain regions investigated have yielded no consensus. Moreover, Conti et al (2007) recently reported that changes in gene transcripts after three different antidepressant modalities in normal control rats were mostly brain region-specific. Importantly, these previous array studies were performed in healthy normal rather than 'depressed' animals, with the underlying assumption that antidepressant effects may be similar to those occurring in depressive-like states. Yet only one study looked at the effects of chronic antidepressant treatments in the UCMS model, an animal model of major depression, showing that transcriptome changes induced by stress and/or antidepressant are state-dependent and region-specific (Surget et al, 2009).

Here, we investigated the biological molecular phenotype of corticosterone-treated mice associated with their increased depressive/anxiety behaviors, and the transcriptome changes induced by chronic agomelatine treatment in corticolimbic brain areas implicated in mood regulation.

METHODS

Animals

Male C57BL/6Ntac mice (Taconic Farms; Denmark), 7-8 weeks old, were used in all experiments. Mice were group-housed (4-6 per cage and kept under standard condition. 40 mice were separated in 6 groups depending on the treatments administered: 1) vehicle/vehicle (Veh/Veh); 2) corticosterone/vehicle (Cort/Veh, corticosterone: 35 µg/ml, equivalent to 5 mg/kg/day); 3) corticosterone/fluoxetine (Cort/Fluox corticosterone: 35 µg/ml, fluoxetine: 18 mg/kg/day); 4) corticosterone/Agomelatine 10 mg/kg (Cort/Ago, corticosterone: 35 µg/ml, agomelatine: 10 mg/kg/day); 5) vehicle/Agomelatine (Veh/Ago, agomelatine: 10 mg/kg/day); vehicle/fluoxetine (Veh/Flx, fluoxetine: 18 mg/kg/day). Drugs and treatments were administered as described in Rainer et al., 2011.

Behavior Analysis

Four commonly behavior tests: Open Field (OF), Novelty Suppressed Feeding (NSF), Forced Swim test (FST) and Splash test performed as previously described (Rainer et al., 2011) were used to measure components of animal emotionality. Z-score methodology was used to investigate the potential of combining results within and across the different behavior tests for depressive/anxious-like behaviors and investigate the treatment effects in the CORT model. In the OF, the total time spent in center and the number of entries in center, the latency to feed in NSF, the immobility duration in FST and grooming duration in Splash test were considered as emotionality parameters.

For each emotionality parameter, the Z-score value for individual mouse was calculated the formula below:

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

which indicated how many standard deviation (σ) an observation (X) is above or below the mean of a control group. The emotionality-related data was normalized as previously described (Guilloux et al., 2011), the veh/veh group was defined as the control. In each test, individual Z-score value was calculated respectively for Cort/Veh, Cort/Flx, Cort/Ago and Veh/Ago groups using the means (μ) and standard deviation (σ) of the control group Veh/Veh. The increased emotionality was defined as decreased normalized OF center activity, increased NSF latency, decreased FST immobility and decreased grooming in Splash test compared to control group means. The finally individual emotionality score across the tests and finally group emotionality score means were calculated as previously described (Guilloux et al., 2011).

Brain areas microdissection

Brain areas were collected at the end of behavioral experiments (Figure 1A). After cervical dislocation brains were quickly harvested and placed in a mouse brain tissue blocker (World Precision Instruments, USA) where 4 consecutive rostro-caudal 1mm sections were collected (Franklin and Paxinos, 2007) and transferred into RNA stabilization solution (Applied Biosystems, France). Cingulate cortex, amygdala, dorsal and ventral hippocampi were then separated under the microscope (Surget et al., 2006;

Xia et al., 2012; Figure 1B). All samples were stored in RNAlater at -80°C until RNA extraction.

RNA extraction

Total RNA was isolated from frozen tissue samples using the TRIzol reagent technique according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, France). RNA quality was assessed using a Biophotometer (Eppendorf, France) and gel electrophoresis on a RNA LabChip® 6000 Nano kit with a Bioanalyzer (Agilent Technologies, France). RNA quality cutoff values were $OD_{260/230}$ and $OD_{260/280} > 1.6$, and $RIN > 7.0$.

Microarrays experiments

Gene expression profile analysis was performed using Whole Mouse Genome Oligo Microarrays 4x44k (G4122F, Agilent technologies, USA). The comparison between samples was performed in a direct way. 1 µg of RNA was labeled using the LILPAK PLUS kit, Cy3-CTP for all samples and internal standards came from RNA Spike-in Kit (Agilent Technologies, USA). Briefly, 1 µg of total RNA of each sample mixed with a spike-in RNA and a T7 promoter primer was reverse transcribed and amplified using the MMLV-RT enzyme in presence of RNaseOUT, DTT 0.1M, dNTP mix 10 mM and first strand buffer 5X at 40°C for 2 hours. Next, our targets were labeled in an in-vitro transcription reaction to biotinylated complementary RNA (cRNA) using an RNA polymerase T7 promoter in presence of monoreactive dye, Cy3-CTP for our samples, at 40°C for 2 hours. The labeled targets were purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, France) and their quality and quantity were determined using a NanoDrop®

ND-1000 spectrophotometer at the absorbance from 220 nm to 750 nm and a Bioanalyzer 2100[®] (Agilent Technologies, France) with a RNA LabChip[®] for size distribution. Identical amounts of Cy3-labeled targets (825 ng) were fragmented using blocking agent 10X and fragmentation buffer 25X at 60°C for 30 minutes and hybridized with the 2x Gel hybridization buffer HI-RPM on the microarrays slides at 65°C for 17 hours in a rotating oven with an Agilent hybridization system. All samples were randomly and equally distributed on slides to avoid any batch/slide effect. After washing, slides were scanned with a DNA Array Scanner (Agilent Technologies, France) equipped with 532 nm laser to excite Cy3. All slides were scanned at two different laser powers (100% and 10%) at 5 µm resolution. Photomultiplier tube voltages were automatically adjusted to balance the distributions of intensity and to optimize the dynamics of image quantification. The data were extracted from these images using the Agilent Feature Extraction v.9.1. Software and the GE2-QCMT-Feb07 protocol applying the e-Xtending Dynamic Range (XDR) extraction algorithm.

Data analysis

Normalization of the raw data was processed as described below. As the different oligo-nucleotide arrays on the slide were manufactured in a very reproducible manner. For each of the conditions studied (Cy3-labelled), assuming that the same quantity of labelled RNA should be hybridized, we globally adjust the overall fluorescence signal between the different arrays of the same condition; we thus adjust the intensities of each spot, using the following formule:

$$G_{ij \text{ normalized}} = G_{ij} * \langle G \rangle / \langle G_j \rangle$$

Where G_{ij} is the intensity of the spot, $\langle G \rangle$ is the mean intensity of all the arrays for a same condition, and $\langle G_j \rangle$ is the mean intensity of all spots for one array. Backgrounds were estimated in a global manner using the "morphological closing followed opening" method [M. Bourens et al., 2009, Xia et al., 2012]; such strategy needs values that are low enough to be considered as negligible. Thus, they were not subtracted from the raw signal measurements. Not found, saturated, and bad spots were discarded from the subsequent analysis. At last, the intensity values were transformed in \log_2 .

Several analyses of the profiles of expression over large numbers of genes were used to evaluate different molecular effects in corticolimbic brain areas in mice. Gene expression in each corticolimbic brain area and the concordance across brain regions were applied to identify CORT and agomelatine effects; unpaired T-student test was performed to investigate the CORT and antidepressant reversal effects within each brain area and to assess the concordance among treatments. To identify CORT effect, the comparisons were performed between Cort/Veh group and Veh/Veh group, genes were considered significantly differentially expressed with the following criteria: p-value <0.05 and absolute changes > 10%. While to assess antidepressants reversal of CORT effects, the comparison between Cort/Ago group and Cort/Veh group was carried out and the extent by which antidepressant treatments brought transcripts back to non-stress level was measured, the efficacy of antidepressant reversal effects on CORT induced genes was calculated as described in Surget et al., 2008.

Next, the antidepressant global effects in CORT model across brain regions were also assessed in four datasets, Genes were selected with the following criteria: transcriptome change > 10% and p-value < 0.05 were defined as a significant drug effect across different brain areas, while q-value < 0.05 was used to decrease the False Discovery Rate which was set at 5%. We compared gene expression impacted by a same drug treatment across any 2 brain areas to investigate a similarity of the profiles of gene expression. Post-hoc test was used to investigate the additional effects of either corticosterone or agomelatine on gene expressions in each brain region between the CORT mice and the normal mice.

At last, we compared the transcriptome effects of agomelatine and fluoxetine treatments in ventral hippocampus in CORT model to investigate whether the treatment of two different types of antidepressant could induce a similar transcriptome effects in a same brain area of stress mice. All probesets on arrays with a significant transcript change (p-value < 0.05) in any antidepressant treatment in CORT model were used to perform this analysis.

RESULTS

High emotionality in model CORT was decreased by antidepressant treatments.

As previously described (Rainer et al., 2011; David et al., 2009), the corticosterone treatment induced the depressive/anxious-like behaviors in several behavioral paradigms (OF, NST, FST and Splash test). Here, emotionality Z-score normalization across these behavioral tests showed a strong elevated emotionality induced by

corticosterone treatment in mice compared to normal group Veh/Veh ($p < 0.01$, Figure 2). This high emotionality was significantly reduced by chronic treatment with either fluoxetine or agomelatine ($p < 0.01$, Figure 2), while antidepressant treatments had no effect on emotionality in normal mice.

Chronic exposure of corticosterone changed gene expression in different brain regions.

Microarray analyses were used to investigate changes in gene expression related to corticosterone effect and agomelatine effect in 4 brain areas: ventral hippocampus (HV), dorsal hippocampus (HD), amygdala (AMY) and cingulate cortex (CC). To identify corticosterone effects within each brain area, unpaired student tests were performed to analyze the expression profiles of more than 40000 genes between control group (Veh/Veh) and corticosterone-treated group (Cort/Veh). Gene with criteria changes greater than 10% and p -value < 0.05 were significantly affected by the corticosterone exposure. Our analyses demonstrated that transcripts level of 414 probesets (385 genes) in HV, 789 probesets (734 genes) in HD, 502 probesets (465 genes) in Amy and 600 probesets (560 genes) in CC were significantly different in CORT mice compared to control group (Figure 3). No overlap was observed across all 4 regions and very little overlap was observed across any 3 brain areas.

The transcripts changes in CC induced by corticosterone administration had no similarity with others brain areas studied and gene expression profiles in other three areas also did not predict similar changes in CC. However, the CORT-induced

transcripts changes between AMY and HD predicted corresponding significant changes in each other and the transcripts changes in HV or in HD showed weakly but significantly similar trends between themselves ($R = p <$). Although transcripts changes in AMY predicted a weak but significant similarity in HV ($r = 0.123$, $p = 0.00283$, black solid line), the gene expression profiles in HV did not show a similar trend in AMY ($r = 0.071$, $p = 0.0753$, gray dotted line).

In these 4 corticolimbic brain areas, microarrays results advised that the gene expression profiles related to CORT-induced high emotionality were specific in cingulate cortex and ventral hippocampus, although transcript changes in ventral and dorsal hippocampi had low but significant similarity in each other (Figure 3, $R = 0.182$, $p < 1e-7$ in HD and $R = 0.264$, $p < 1e-7$ in HV). The CORT-affected gene expression levels showed correlations between the dorsal hippocampus and the amygdala (Figure 3, $R = 0.493$, $p < 1e-7$ in AMY and $R = 0.428$, $p < 1e-7$ in HD). AMY transcript changes predicted significant but low similar trends of same genes in ventral hippocampus ($R = 0.123$, $p = 0.00289$), but the genomic transcription changes in ventral hippocampus do not correspond to the same trends in amygdala. ($R = 0.07$, $p = 0.0746$).

Reversal effects of agomelatine on CORT-induced gene expression

We assessed whether the reversal effects of the chronic treatment of agomelatine on high emotionality in CORT mice were related to the reversal effects of agomelatine on gene expression profiles induced by corticosterone. We calculated the percentage of CORT-affected genes reversed by agomelatine in each brain regions. Respectively, the chronic agomelatine treatment reversed 76.6% of CORT-affected genes' expression

profiles in ventral hippocampus, 69.5% in dorsal hippocampus and 95.2% in amygdala, but agomelatine show weak effects on 11.6% of CORT-induced gene transcript levels in cingulate cortex (Figure 4). Overall, these results indicate that agomelatine reversed most of CORT-induced genomic transcriptions in amygdala, ventral and dorsal hippocampus. From the number of the reversed genes, the reversal effects of agomelatine were the strongest in amygdala compared to other regions. Indeed the effect of agomelatine treatment reversing the effects of CORT on gene expression across brain areas is according to the following order: AMY > HD > HV; on the contrary, the agomelatine had no reversal effect on most of CORT-induced gene expressions in cingulate cortex.

Transcriptome effects of agomelatine on gene expression across different brain areas in the CORT model.

Chronic Agomelatine treatment affected the expression profiles of large numbers of genes in different brain areas of CORT mice (Figure 4). Thus, we also assessed agomelatine global effects including reversal effects and additional effects in CORT model across brain areas, corticosterone treatment and brain areas were considered as co-factors. Probesets on arrays with p-value <0.05, FDR q-value <0.05 and absolute fold change >10 % in any brain area were considered to be affect significantly by agomelatine treatment across all brain areas. Totally, a pool of 5717 probesets was selected to investigate the antidepressant effects across any two different regions in the CORT model. In Figure 5, the agomelatine treatment showed a significantly, however low, positive correlation of effect on gene expression between the ventral and dorsal

hippocampus ($R=0.191$, $P<1e^{-5}$), while inverse or no correlation were observed in other areas. Overall, Pearson correlation values of effects remain low between regions, suggesting that a common and strong agomelatine drive on gene expression across brain regions seems unlikely to occur.

Transcriptome effects of agomelatine on gene expression across different mice model in each brain areas.

Another analysis was performed to compare the additional effects of chronic agomelatine in stressed mice (Cort/Veh) and normal mice (Veh/Veh) in different areas. Overall, chronic agomelatine treatment also affected many additional genes' expression in different brain areas no matter what emotional status of the mice. In each region, all probesets whose expression was significantly affected by agomelatine treatment ($p<0.05$) in any status model were selected to carry out this analysis. Therefore, the expression levels of 6351 probesets in HV, 1681 probesets in HD, 2267 probesets in AMY and 20931 probesets in CC were compared in stress mice and normal mice. Interestingly, in HV, HD and AMY, the expression profiles of same agomelatine-affected genes did not show same expression trends in normal and corticosterone-treated mice. Only in CC the expression profiles of agomelatine-affected genes predicted a higher significantly similarity between the stressed and normal mice ($R= 0.787$, Slope= 0.612 , $p<1e^{-6}$, Figure 6D). In normal mice, the chronic agomelatine treatment seemed product significantly weakly opposite effects on gene expression in HD ($R= -0.33$, Slope = -0.45 , $p<1e^{-6}$.0000001, Figure 6B) and AMY ($R= -0.14$, Slope = -0.203 , $p<1e^{-6}$, Figure 6C), but no concordance in HV ($R=0.02$, Slope= -0.0076 , $P=0.066$, Figure 6A) compared to its

effects in CORT-stress mice. However, these observations of gene expressions could be related to the results of Z-score emotionality (Figure 2), although the chronic agomelatine treatment decreased the increased emotionality score in CORT mice, the emotionality level in agomelatine-treated CORT mice was still significantly higher than in agomelatine-treated normal mice suggesting that at the exception of the CC, different genes should be involved on the effects of agomelatine in normal and stressed mice.

A similar transcriptome effect of agomelatine and fluoxetine treatments was observed in ventral hippocampus in CORT-stress mice.

Chronic treatment of fluoxetine and agomelatine affected the expression of large numbers of genes in ventral hippocampus in CORT model (4155 probesets for agomelatine treatment and 7288 probesets for fluoxetine treatment) and 2776 probesets were affected significantly by both antidepressant treatments. Firstly, we compared the reversal effects of different antidepressant on CORT-induced gene expression. As the chronic agomelatine, the chronic fluoxetine reversed the expression profiles of 71.2% of CORT-induced genes in ventral hippocampus with an average efficacy of 30%. Then, we investigated the additional transcriptome effect of different antidepressant treatments on expression profiles of a pool of 8676 probesets. The different antidepressant treatments showed good similar molecular impacts on gene expressions in CORT-stress mice ($R = 0.646$, Slope = 0.861 and $p\text{-value} = 2.5e^{-7}$, Figure 7). Our results indicated that at least in the VH antidepressant with different mechanism of action produced similar molecular impacts on gene expression.

Legends:

Figure 1: Experimental protocol design and brain areas microdissection

A) Experimental Protocols: the corticosterone treatment (35 µg/ml/day) in mice per group lasted for 8 weeks and the chronic antidepressant treatments (agomelatine 10 mg/kg/day, fluoxetine 18 mg/kg/day or vehicle) started on the fourth week and continued for 4 weeks. The behavior analysis of Open Field (OF), Novelty Suppressed Feeding (NSF), Forced Swim test (FST) and Splash test was carried out on the eighth week and the brain areas were dissected just after the behavior experiments. **B) Brain Areas Microdissections:** ventral hippocampus (HV, Bregam: -2.3 mm to -3.08 mm), dorsal hippocampus (HD, Bregam: -1.22 mm to -2.06 mm), amygdala (AMY, Bregam: -1.43 mm to -2.06 mm) and cingulate cortex (CC, Bregam: 1.42 mm to -0.02 mm) were taken for microarrays experiments from 7-8 mice per group. Representative figures were obtained from Paxinos and Franklin and brain areas were indicated in green.

Figure 2: CORT-induced emotionality in mice is reversed by chronic agomelatine or fluoxetine treatments.

The Veh/Veh group was considered as the control for emotionality z-score calculation. No difference on emotionality score was observed in Veh/Ago or Veh/Flx treated mice compared to the Veh/Veh group. Corticosterone induced higher emotionality score in Cort/Veh compared to Veh/Veh that was partly reversed by chronic antidepressant. **p<0.01 when compared to the Veh/Veh group; ## p<0.01 when compared to the Cort/Veh group.

Figure 3: Venn diagram of genomic transcriptions affected significantly by chronic corticosterone exposure in corticolimbic regions.

Transcriptome was differently and specifically altered by chronic corticosterone depending of the regions tested: HV (414 probesets), HD (789 probesets), AMY (502 probesets) and CC (600 probesets). The CORT treatment induced the specific transcript changes in different brain areas.

The changes in each area and the overlaps across areas were observed. Arrows indicate the directional correlations between expressions profiles of same genes in two different areas, the value of Pearson coefficient factors was indicated and black solid line indicated a significant similarity between the areas ($p < 0.05$), while gray dotted line showed only significant trend ($p < 0.1$).

Figure 4: Reversal effects of agomelatine on CORT-induced gene expression profiles.

Gene expression profiles significantly induced by corticosterone treatment (Cort/Veh vs. Veh/Veh comparisons) from figure 3 in the four corticolimbic brain areas of mice were organized by the magnitude of their transcript level in log 2 ratio (upper graphs). A chronic agomelatine treatment reverse at least in part the expression profiles of these CORT-induced genes (lower graphs).

Figure 5: Transcriptome effects of agomelatine on gene expression across different brain areas in the CORT model.

The transcriptome effects of agomelatine across brain areas show overall low similarity, but some when comparison was performed between dorsal and ventral hippocampus. For a comprehensive overview, the effects of agomelatine on gene transcript levels are depicted for the pool of 5717 genes that were affected by agomelatine in any of the four areas. Low correlations (-0.02 to 0.19) combined with low graph slopes reveal poor similarities in the molecular impact of agomelatine treatment across any two brain areas investigated. x-y axes values are $\log_2(\text{Cort/Ago vs Cort/Veh})$ for the respective brain region studied.

Figure 6: Transcriptome effects of agomelatine on gene expression across different mice model in each brain areas.

The transcriptome effects of agomelatine across conditions (Vehicle or corticosterone treated mice) depends on the region studied where effects show no similarity between conditions in the ventral hippocampus (6A), an inverse relationship between effects in the HD (6B) and AMY (6C) between conditions overall low similarity, but some when comparison was performed between dorsal and ventral hippocampus. Only in CC (6D) the expression profiles of agomelatine-affected genes predicted a higher significantly similarity between the stressed and normal mice ($R= 0.787$, $\text{Slope}=0.612$, $p<1e-6$, Figure 6D).

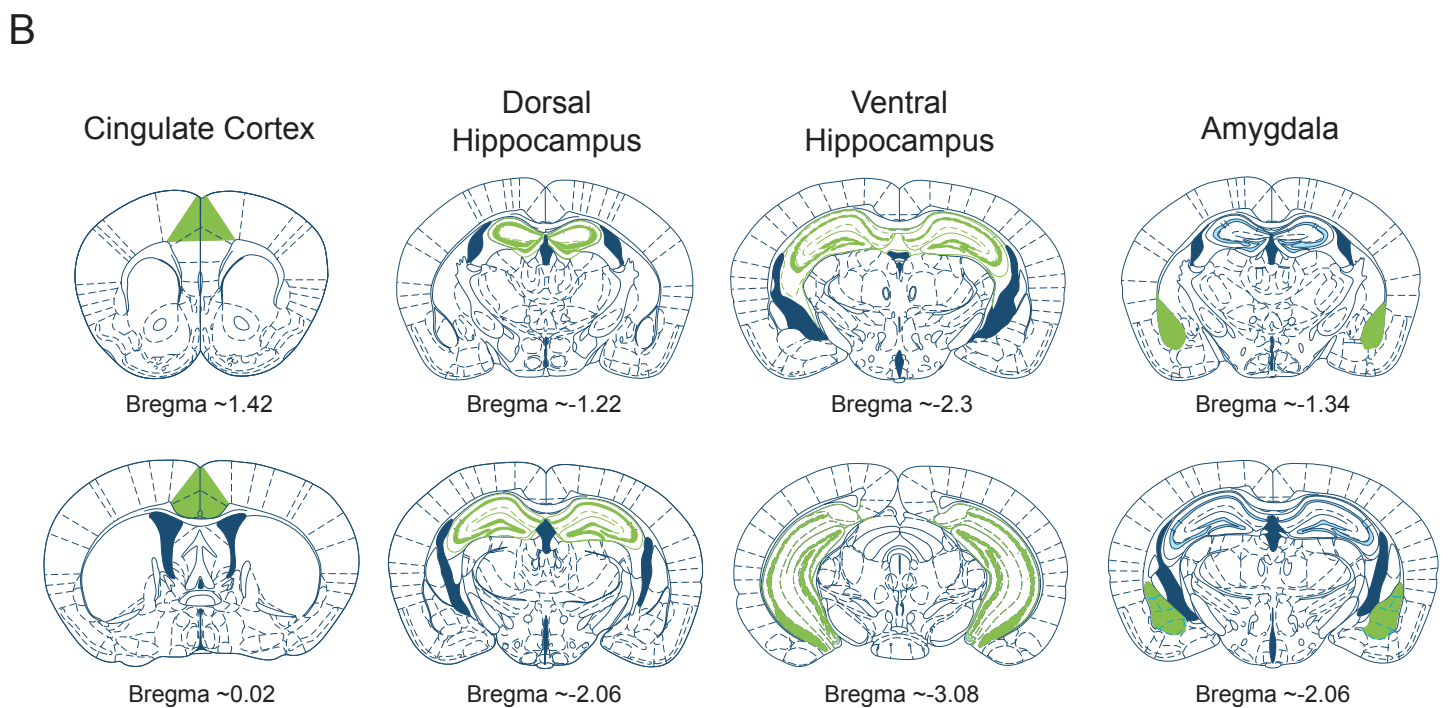
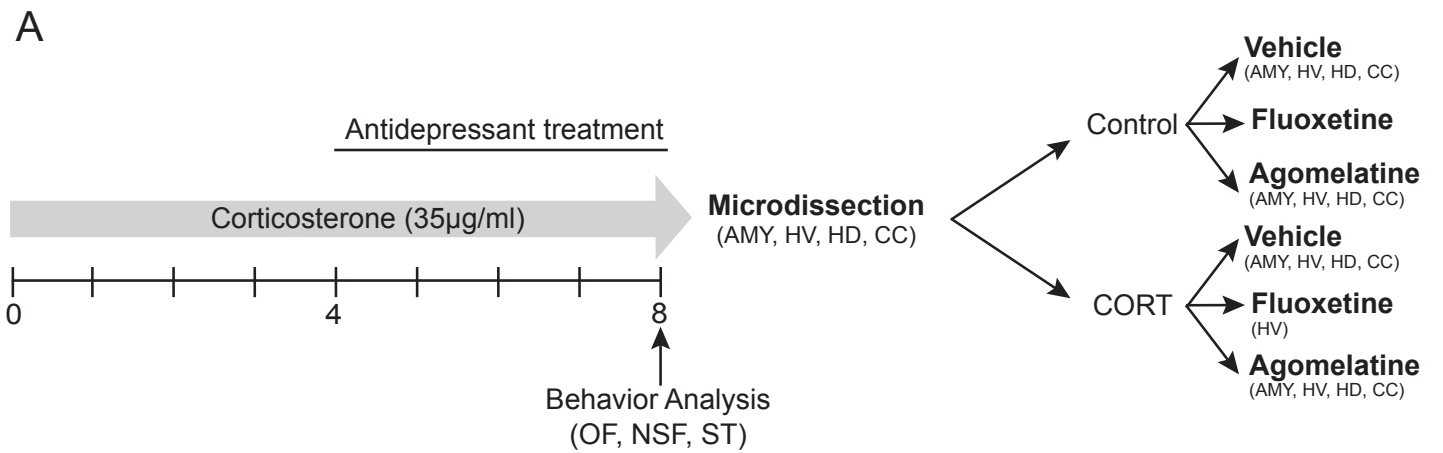
Figure 7: A similar transcriptome effect of agomelatine and fluoxetine treatments was observed in ventral hippocampus in CORT-stress mice.

Chronic agomelatine and chronic fluoxetine treatment induced extensive and highly similar transcriptome changes in corticosterone-treated mice ($R=0.65$)

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research. We thank the Animal Care Facility and the Transcriptome Facility of the IFR141 & University Paris-Sud.

Figure 1



Emotionality score

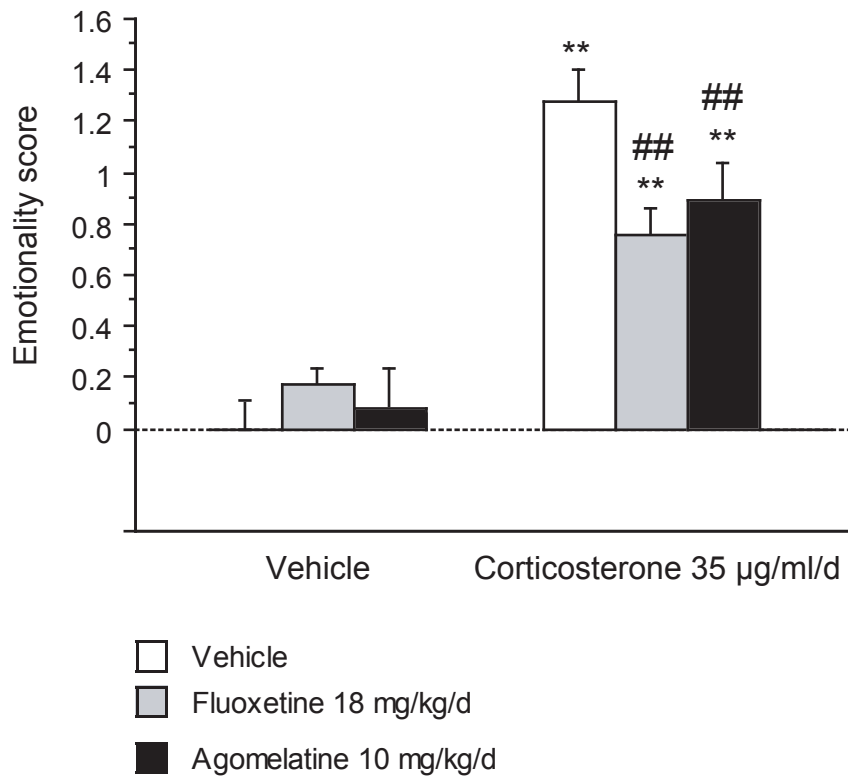


Figure 3

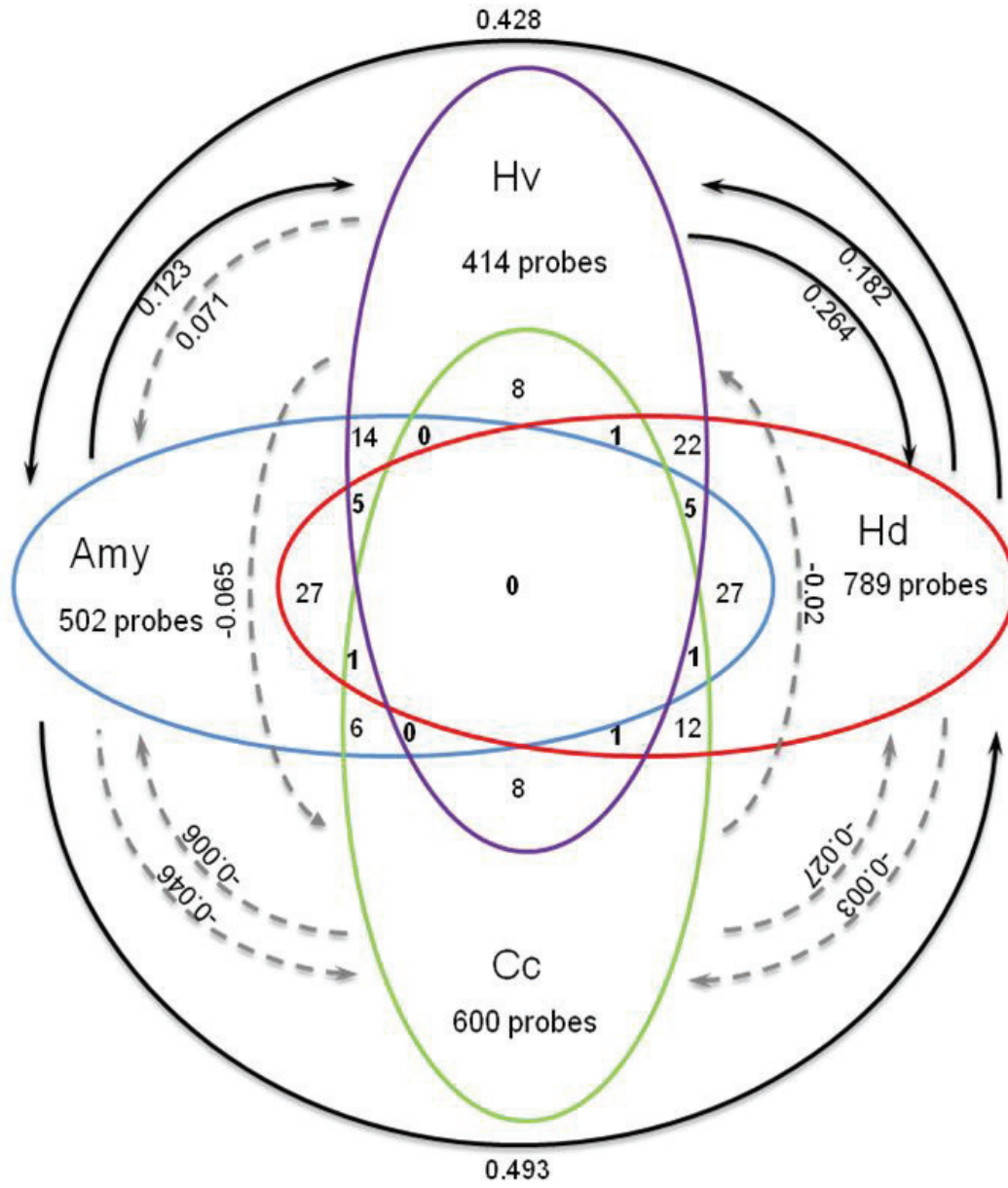


Figure 4

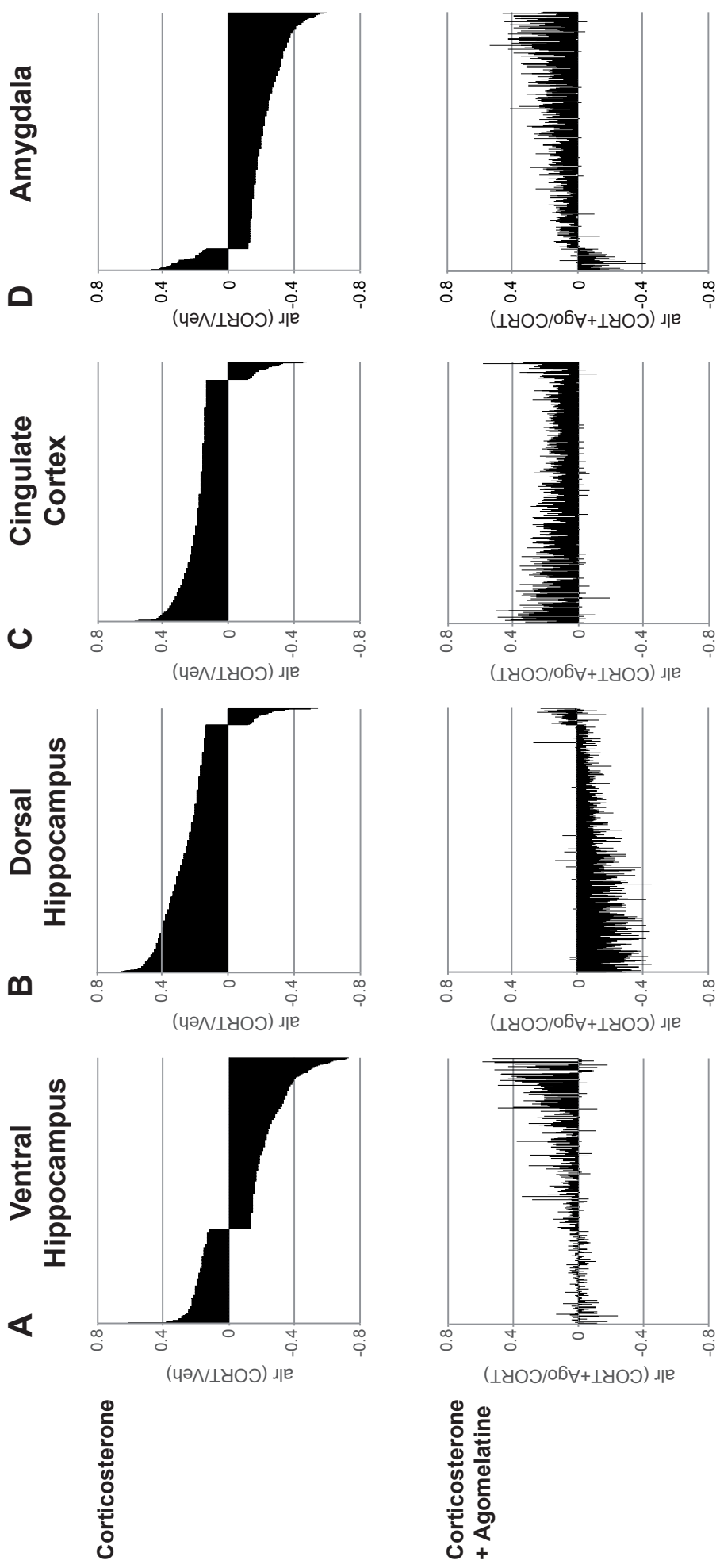


Figure 5

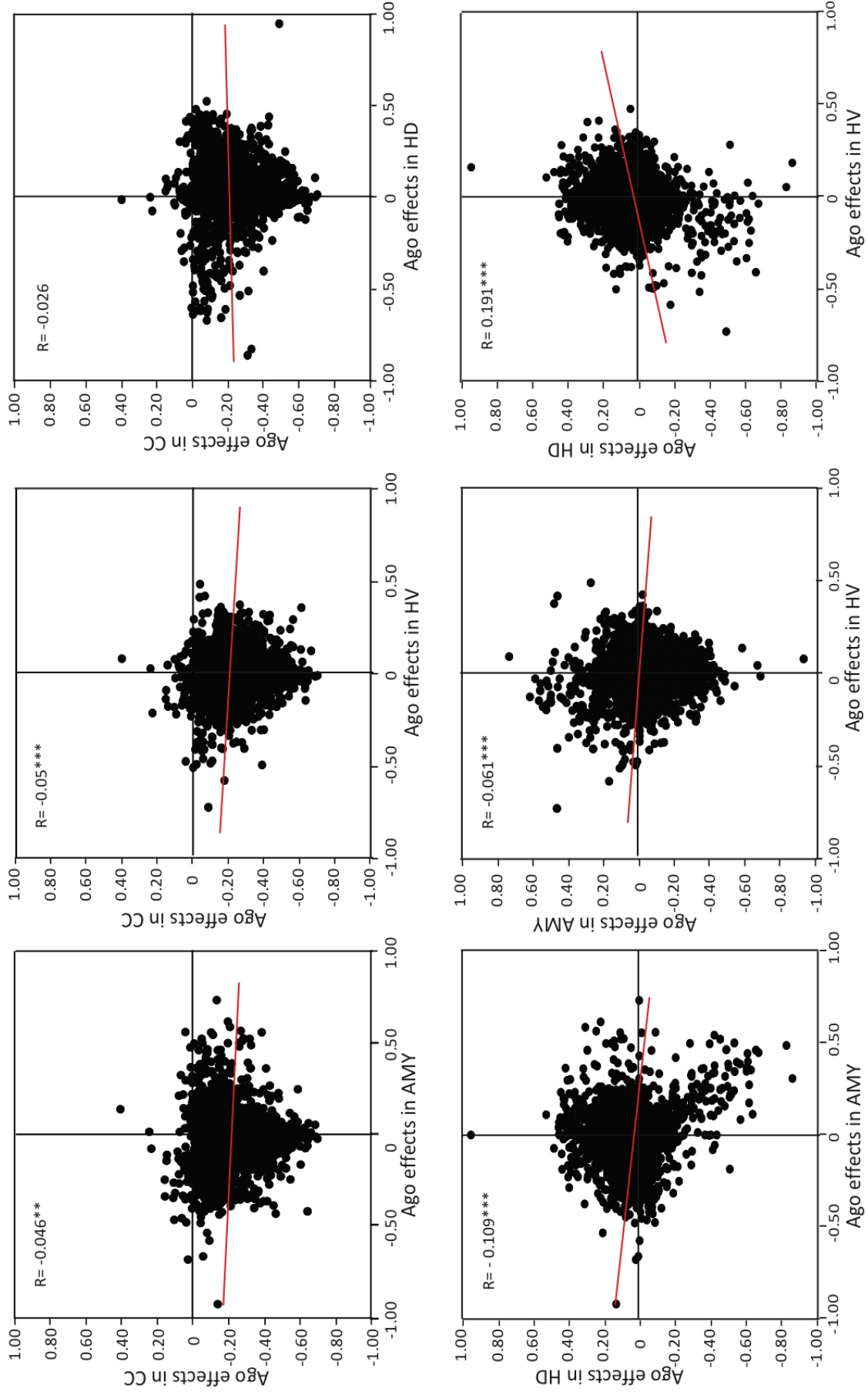


Figure 6

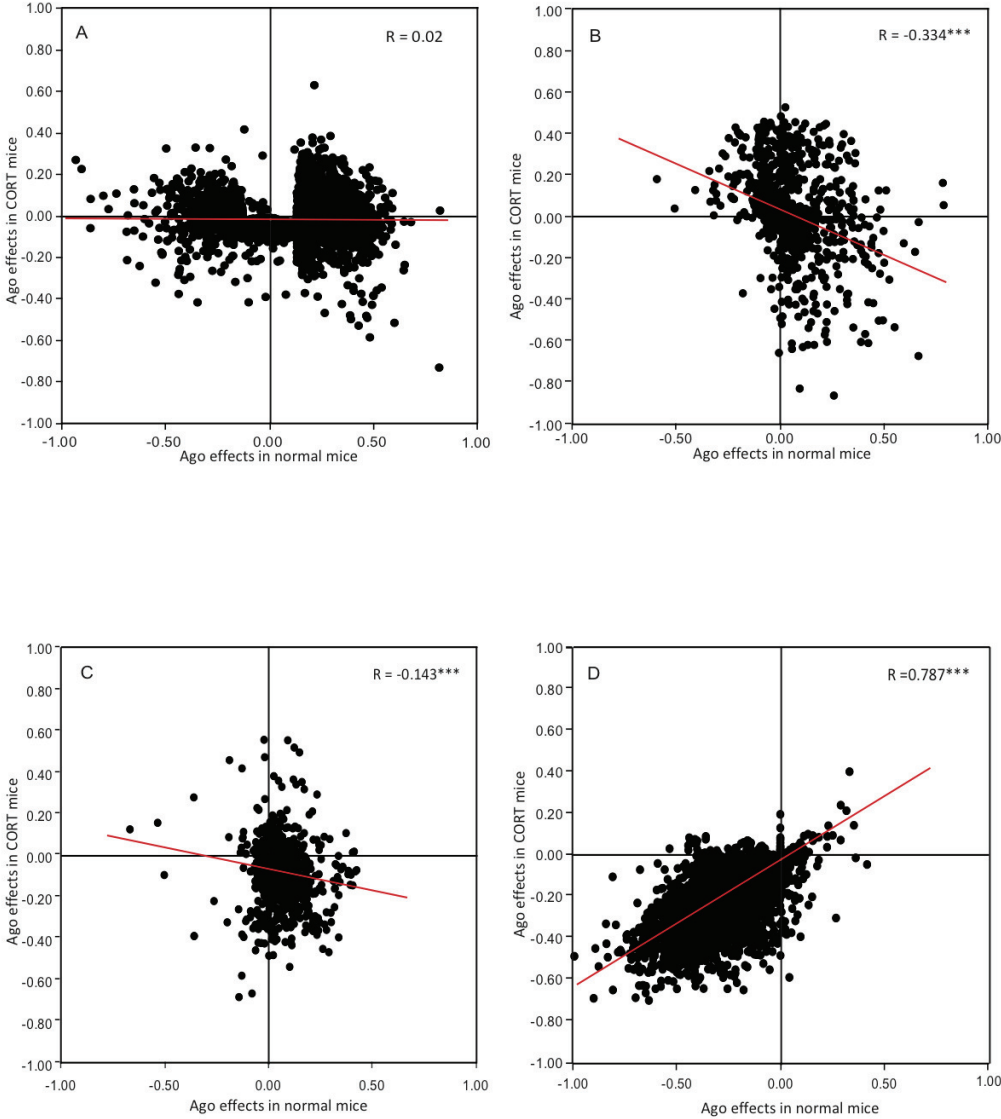
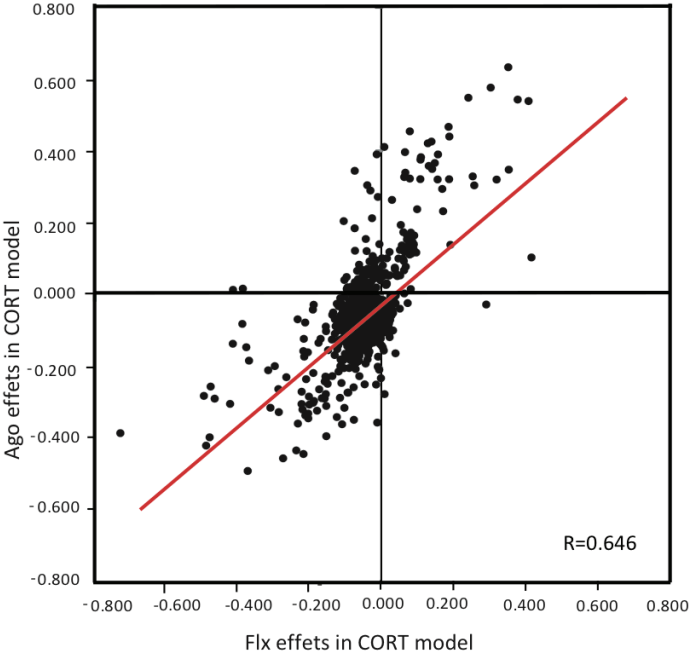


Figure 7



Discussion générale

L'objectif de mes travaux a été 1) de comparer le profil d'expression des gènes dans les régions limbiques (hippocampe ventral et dorsal, amygdale et cortex cingulaire) de deux modèles animaux de la pathologie anxio-dépressive, les souris KO 5-HT1A/1B et le modèle CORT, à celui de leurs congénères non stressés ; 2) d'observer si un traitement antidépresseur chronique (la fluoxétine ou l'agomélatine) permet de modifier les profils d'expression génique particulier induits dans ces modèles. Afin de caractériser le phénotype moléculaire des troubles de l'humeur tel que l'anxiété et la dépression associées aux comportements hyper-anxieux, j'ai entrepris ces travaux au sein de notre équipe à l'aide de la technique des puces à ADN (*microarrays*) afin d'étudier les différents profils de l'expression d'un large nombre de gènes à la fois.

Récemment, plusieurs études de « microarrays » ont tenté de caractériser les corrélats moléculaires des traitements antidépresseurs chez les rongeurs (Landgrebe et al, 2002 ; Rausch et al, 2002; Newton et al, 2003; Palotas et al, 2004; Wong et al, 2004; Ploski et al, 2006; Takahashi et al, 2006). Cependant, les antidépresseurs, les temps de traitement, et les régions cérébrales étudiées étaient différents. De plus, ces études ont été réalisées chez des animaux naïfs, en dehors de toute considération pathologique, et on sait que les antidépresseurs ont peu d'effets comportementaux chez des patients sains, non déprimés. Il est probable que chez les animaux, c'est également le cas, ou tout au moins, les études réalisées n'étaient pas dans des conditions expérimentales optimales pour mettre en évidence de fins mécanismes de dérégulation ou d'efficacité des médicaments. On sait également que 30% des patients sont résistants aux antidépresseurs, paramètre difficile à apprécier ce phénomène chez des animaux naïfs . De plus, Surget et al., (2009) ont montré que les effets génomiques des antidépresseurs diffèrent en fonction de l'état dépressif ou non des animaux.

4.1 Les effets génomiques d'une délétion des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} dans hippocampe ventral

Les souris KO 5-HT_{1A/1B} sont de nouveaux outils génétiques utilisés dans les recherches préc-liniques des troubles anxio-dépressifs. Ce modèle présente un phénotype hyper-anxieux caractérisé dans plusieurs tests comportementaux auquel est associé une augmentation de la libération basale de 5-HT par les terminaisons neuronales : à notre connaissance, la présence de ces deux éléments n'est retrouvée dans aucun autre modèle animal d'anxiété-dépression. Les traitements aigus anxiolytique et chronique d'antidépresseur peuvent diminuer les comportements anxieux de ces souris dans différents tests comportementaux. (Guilloux et al., 2011, **Article 1**).

De nombreuses études montrent que dans le cerveau, l'hippocampe ventral est l'une des structures cortico-limbiques importantes impliquées dans le développement et la maintenance des états anxieux chez les rongeurs. En conséquence, dans ce travail, l'hippocampe ventral a été sélectionné pour l'étude des mécanismes génétiques des troubles de l'humeur.

Grâce à la technique de microarrays, on a montré que, en raison d'une délétion constitutive des récepteurs 1A et 1B de la sérotonine, 924 probesets soit 725 gènes sont différentiellement exprimés de manière significative dans l'hippocampe ventral chez les souris KO 5-HT_{1A/1B} par rapport aux souris contrôles. Une analyse *Ingenuity* a permis de mettre en évidence qu'une majorité de gènes associés à nos données était impliquée dans les processus de neurogenèse. Certaines études effectuées dans différents modèles animaux après stress chronique ont suggéré qu'une altération de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte était associée à des comportements anxio-dépressifs. Dans notre modèle, on observe la sous-expression de 50 gènes participant à toutes les étapes de la neurogenèse. 4 gènes (*Bdnf*, *Camk2a*, *Camk4*, *Id4*) sont liés à la prolifération cellulaire, 9 gènes (*Bdnf*, *Camk4*, *Dclk1*, *Gja1*, *Ndel1*, *Nfia*, *Pten*, *Ptprz1*, *Slit2*) sont associés à la migration des neurones dans la couche de cellules granulaires, 4 gènes (*Bdnf*, *Camk2a*, *Klf9*, *Rb1*) influencent la maturation et 19 gènes (*Atp2b2*, *Bdnf*, *Eya1*, *Hdac1*, *Id4*, *Klf9*, *Map2k1*, *Mapk1*, *Mib1*, *Ptprz1*, *Rb1*, *Rhoa*, *Rtn4*, *Smarca1*, *Tcf4*, *Tgfb2*, *Thra*, *Ttc3*, *Znf536*) affectent la différenciation des neurones granulaires. Enfin, 3 gènes (*Tgfb2*, *Bdnf*, *Rb1*) sont associés à la survie cellulaire. Ces différents résultats nous ont amené à

mesurer les altérations possibles dans ce processus à l'aide des techniques d'immunohistochimie. Cette analyse a montré que la survie cellulaire, mais pas la prolifération cellulaire est diminuée significativement dans l'hippocampe adulte chez les souris KO 5-HT1A/1B.

Comme mentionné précédemment dans la partie introductive de ce document, cette analyse d'expression de gènes dans des modèles animaux d'anxiété de « trait » ouvre des perspectives variées et complexes. Faut-il s'intéresser au gène le plus différenciellement exprimé, créer une souris knock-out (constitutive ? inductible ?) pour ce gène et espérer reproduire sur la base de la suppression (homozygote ? hétérozygote ?) de ce gène un phénotype anxio-dépressif? Ceci est une stratégie risquée car on sait que l'origine des troubles anxio-dépressifs est multifactorielle (environnementale, épigénétique, génétique familiale), et dans ce dernier cas, probablement pluri-génétique. La possibilité de n'observer aucun phénotype particulier dans ce modèle KO n'est donc pas nulle (cf Czibere et al., 2011). De même, une compensation dans ce modèle murin KO constitutif pourrait intervenir. Ainsi, il a été observé chez le patient dépressif, comme chez les souris ayant reçu un stress chronique, une diminution de l'expression d'un gène glial, *Cnp1* dans l'amygdale (Sibille et al., 2009). L'étude du phénotype chez les souris KO pour le gène *Cnp1* montrent que ces souris présentent un phénotype hypo-anxieux en comparaison de leurs congénères contrôles WT à l'état basal. Elles présentent de plus une résistance à différents protocoles de stress (Edgar et al., 2011).

Seules des analyses comparatives, réalisées dans plusieurs modèles animaux et/ou humains permettront d'identifier le ou plus probablement les gènes qui présentent un facteur de vulnérabilité dans le développement d'un phénotype anxio-dépressifs.

4.2 Un traitement chronique de l'agomélatine affecte les changements de la transcription corticolimbique induites par la corticostérone dans un modèle de la dépression (Souris CORT) , (Article 4)

Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés aux effets d'une administration chronique d'un nouvel antidépresseur, l'agomélatine, dont le

mécanisme d'action est tout à fait novateur. L'agomélatine, un analogue synthétique de la mélatonine (Cardinali et al., 2011), et possède des propriétés agoniste des récepteurs de la mélatonine 1 et 2 (Audinot et al., 2003) et antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (Millan et al., 2003a). Ces mécanismes d'action ont démontré une efficacité sur les troubles dépressifs majeurs dans plusieurs essais cliniques (Kennedy & Emsley, 2006 ; Loo et al 2002; Olie & Kasper, 2007). Des propriétés antidépressives et anxiolytiques de l'agomélatine ont été confirmées par plusieurs paradigmes comportementaux dans différents modèles pathologiques animaux (Bourin et al., 2004 ; Rainer et al., 2011, **Article 3** ; Morley-Fletcher et al., 2011 ; Bertaina-Anglade et al., 2006 ; Yacoubi et al., 2011 ; Koresh et al., 2012). Nos précédents travaux ont montré qu'un traitement chronique de la corticostérone a pu induire les comportements anxio-dépressifs (David et al., 2009 ; Rainer et al., 2011, **Article 3**), et un traitement chronique d'agomélatine a inversé ces changements comportementaux chez les souris CORT et augmenté la prolifération cellulaire et la maturation de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte (Rainer et al., 2011, **Article 3**).

J'ai étudié le phénotype biologique moléculaire associé à une augmentation des comportements anxio-dépressifs induits par la corticostérone chez la souris et les changements transcriptomiques affectés par un traitement chronique de l'agomélatine dans 4 régions cérébrales : l'hippocampe ventral (HV) et dorsal (HD), l'amygdale (AMY) et le cortex cingulaire (CC), 4 régions impliquées dans les circuits cortico-limbiques de l'humeur. J'ai fait plusieurs analyses pour évaluer les effets transcriptomiques des traitements de la corticostérone et l'agomélatine.

Tout d'abord, les profils de l'expression des gènes dans 4 régions induits par la corticostérone ont montré des changements spécifiques régionaux. Le traitement chronique de la corticostérone a affecté significativement un grand nombre de gènes dans les différentes régions corticolimbiques. Respectivement, les expressions de 414 probesets (385 gènes) dans HV, 789 probesets (734 gènes) in HD, 502 probesets (465 gènes) in Amy and 600 probesets (560 gènes) in CC sont exprimées différemment significativement chez les souris CORT par rapport aux souris non-traitées. Parmi ces gènes, aucun gène commun n'a été découvert entre ces 4 régions, et très peu de gènes sont communs entre n'importe laquelle des 3 régions. J'ai également analysé si les gènes différemment exprimés dans une région présentaient un profil d'expression similaire dans une autre région. Globalement, on

observe que les profils d'expression induits par la corticostérone sont spécifiques d'une région et présentent peu de corrélation entre les régions. La seule corrélation forte observée était entre l'hippocampe dorsal et l'amygdale où les profils d'expression étaient assez similaires. De façon intéressante ces travaux réalisés dans le modèle CORT se rapprochent de ceux réalisés dans un modèle psychosocial d'anxiété-dépression qu'est le « *chronic mild stress* ». En effet, dans son étude sur le transcriptome cortico-limbique dans ce modèle de souris pathologiques, Surget et al., (2009) présentaient des effets du stress sur l'expression de gènes qui étaient régions-dépendants, et des corrélations entre les régions du même ordre que celles observée dans notre étude. Nous confirmons ici que les profils d'expression de gènes chez les souris CORT sont régions-dépendants. Ces résultats suggèrent également que les différentes fonctions biologiques et les mécanismes d'action de la corticostérone diffèrent en fonction des différentes régions cortico-limbiques étudiées.

Nos études ont également montré qu'un traitement chronique d'agomélatine inverse en partie les changements transcriptomiques induits par la corticostérone, dans l'hippocampe et l'amygdale, mais pas dans le cortex cingulaire. Des résultats similaires ont été aussi observés chez les souris UCMS (Surget et al., 2008), où là également le cortex cingulaire s'est révélé être la région la moins « répondeuse » aux effets des ISRS.

Nos résultats de transcriptions moléculaires ont montré que les effets de la corticostérone diffèrent en fonction des régions cortico-limbiques étudiées et nous pensons ces différences sont liées aux différentes fonctions de ces régions et que différents mécanismes d'action de la corticostérone peuvent être mis en évidence en fonction des régions.

Enfin, la comparaison dans l'hippocampe ventral des effets de différents antidépresseurs de mécanisme d'actions différents sur l'expression des gènes confirment que ces molécules induisent des profils de réponse très similaire, comme ce qui avait été rapporté par Surget et al., (2009) en comparant les effets de la fluoxétine et d'un antagoniste des récepteurs CRF1. L'ensemble de ces résultats confirme ainsi qu'un effet antidépresseur possède une signature moléculaire sur l'expression des gènes, très similaire d'un traitement pharmacologique à un autre.

4.3 Comparaison des changements transcriptomiques entre ces deux modèles des troubles anxio-dépressifs.

Ces deux modèles ne sont pas comparable *per se* car les souris 5-HT_{1A/1B}^{-/-} sont un modèle génétique modifié, présentant une anxiété de « trait » et ne présente aucune analogie avec ce qui peut être observé chez l'homme. Chez l'homme, les troubles anxio-dépressifs sont induits par des facteurs complexes, mêlant l'environnement et des facteurs génétiques. En cela, le modèle CORT présente une meilleure validité de construction car des troubles de l'axe HPA et une hypercortisolémie a été reportée chez certains patients dépressifs. Cependant, dans ce modèle, on ne retrouve pas en comparaison à des modèles comportementaux comme le UCMS, une plus grande sensibilité des femelles à développer un phénotype anxio-dépressif (Guilloux et al., 2011b), et il ne modélise que l'altération neuro-endocrinienne associée à la pathologie dépressive..

Le point commun à ces deux modèles restent l'altération comportementale robuste, notamment sur les paramètres comportementaux d'anxiété (Guilloux et al., 2011a, **Article 1**; David et al., 2009 ; Rainer et al., 2011, **Article 3**). On observe également dans ces modèles une altération de certaines étapes de la neurogenèse (David et al., 2009 ; Rainer et al., 2011 **Article 3**; Xia et al., 2012, **Article 2**). Nos études ont montré que les traitements antidépresseurs ont amélioré les comportements anxio-dépressifs et aussi inversé la diminution de la prolifération cellulaire chez les souris anxio-dépressives (Guilloux et al., 2011a, **Article 1**; David et al., 2009 ; Rainer et al., 2011, **Article 3**). De plus, les résultats de microarrays dans l'hippocampe ventral ont montré qu'un grand nombre de gènes sont affectés par une mutation des récepteurs 5-HT_{1A} et 1B (725 gènes) (Xia et al., 2012, **Article 2**) ou un traitement chronique de la corticostérone (**Article 4**). Selon les analyses réalisées avec *Ingenuity*, les gènes observés modifiés chez les souris 5-HT_{1A/1B}^{-/-} sont majoritairement associés aux fonctions de développement du système nerveux central et à la neurogenèse. Chez les souris CORT, les premières analyses utilisant *Ingenuity* semblent révéler des réseaux de gènes associés aux processus inflammatoires, ce qui n'est en soit pas surprenant étant donné les effets anti-inflammatoires des corticoïdes. (Figure 42).

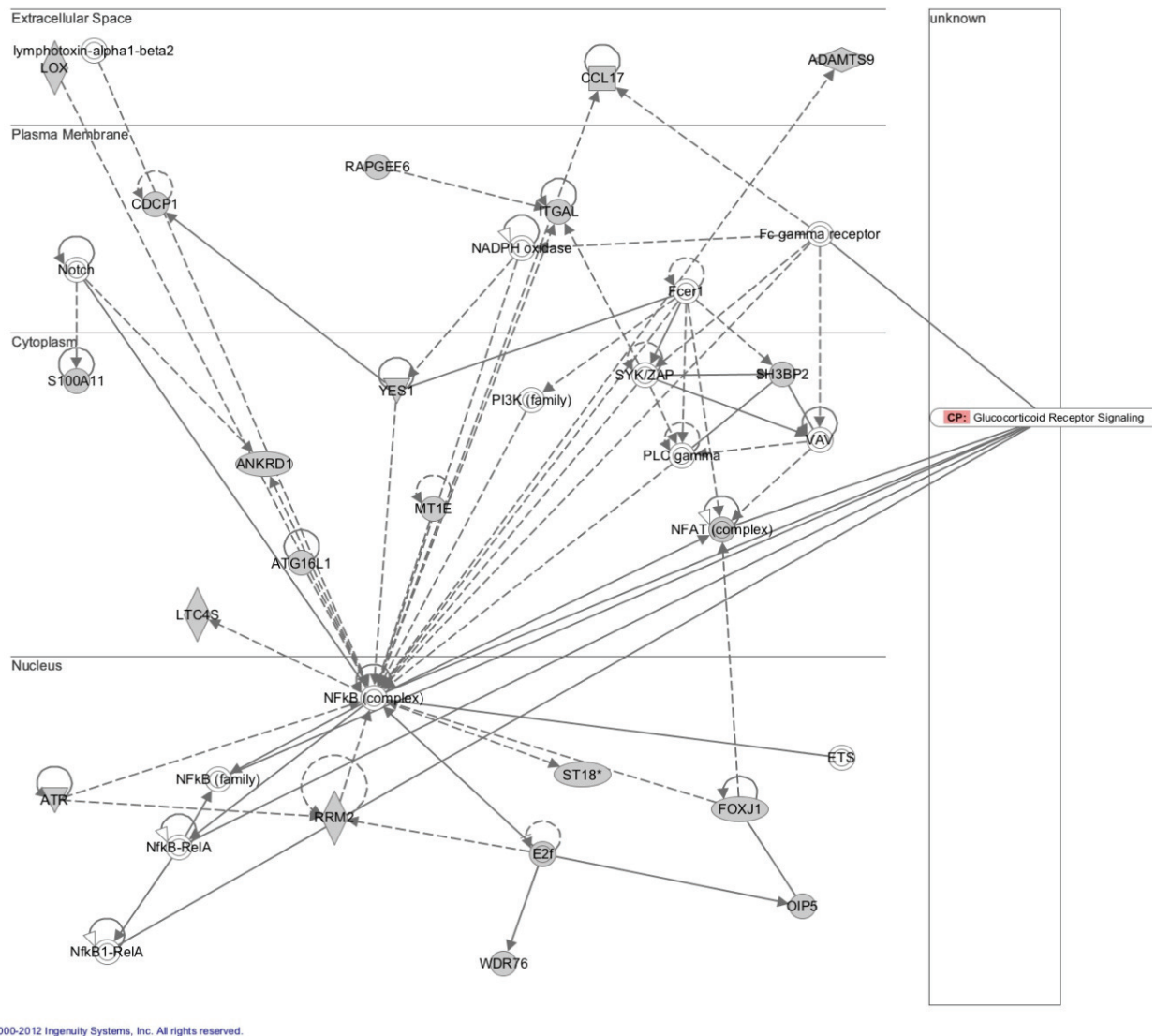


Figure 42: Analyse par « Ingenuity » des changements transcriptomiques induits par un traitement chronique avec la corticostérone chez les souris normales.

Etant donné les similitudes comportementales observées dans ces modèles, j'ai entrepris, à des fins exploratoires de comparer les gènes observés différentiellement exprimés au niveau de l'hippocampe ventral dans ces 2 modèles afin d'identifier des marqueurs biologiques communs qui pourraient être associés au phénotype anxieux de ces modèles. Les résultats sont présentés dans le Tableau 18. Totallement, parmi 725 gènes identifiés chez les souris 5-HT1A/1B-/- et 385 gènes obtenus chez les souris CORT, 8 gènes communs ont été identifiés. Hormis le gène *Osbp13*, tous les autres gènes présentent une diminution de leur expression dans l'hippocampe ventral après administration de corticostérone ou lors d'une ablation de l'expression des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B.

Gène	GeneBank_ID	Name	5-HT _{1A/1B} ^{-/-}	CORT	Fonction domaine
Trpc4	NM_016984	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	↘	↘	
Rapgef6	NM_175258	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	↘	↘	Neurogenèse et gliogenèse (Kempermann et al., 2006)
Cpne4	NM_028719	copine IV	↘	↘	
Lpl	NM_008509	lipoprotein lipase	↘	↘	
Lum	NM_008524	lumican	↘	↘	
P2rx7	NM_011027	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	↘	↘	Marqueur psychiatrique (Zhang et al., 2011)
Osbpl3	NM_027881	oxysterol binding protein-like 3	↗	↗	
Pi4k2b	NM_025951	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	↘	↗	Bipolar disorder (Houlihan et al., 2009)

Tableau 18: 8 gènes communs trouvés dans les deux nouveaux modèles (KO 5-HT1A/1B et modèle CORT) des troubles anxio-dépressifs.

L'analyse bibliographique des gènes communs nous donne les indications suivantes :

- Le gène *Rapgef6* est une cible en aval de la signalisation de m-Ras, en tant que telle, impliqué dans la réorganisation du cytosquelette. Son niveau d'expression est lié à la neurogenèse et l'astrocytgenèse (Kempermann et al., 2006).

- Le gène *Pi4k2b* est un membre de la voie de phosphatidylinositol, qui est une des cibles du lithium pour ses effets thérapeutique dans le trouble bipolaire. Ce gène se trouve dans le chromosome 4p15-p16 où les marqueurs du lien entre le trouble bipolaire et la dépression majeure récurrente sont identifiés. Houlihan en 2009 a suggéré que ce gène a été une bonne candidature qui a joué un rôle potentiel dans les maladies psychiatriques, tel que le trouble bipolaire, la schizophrénie et la dépression majeure récurrente.

- Le gène *P2rx7* est probablement un des plus intéressant car il code pour un récepteur-canal purinergique sensible à l'ATP et non sélectif pour les cations (Skaper et al., 2010). Il est impliqué dans la neuroprotection et de l'inflammation (Bennett et al., 2007 ; Skaper et al., 2010). Différents polymorphismes du gène *P2rx7* ont été associés à la survenue des troubles de l'humeur chez les patients (Soronen et al., 2011 ; Mantere et al., 2012 ; Barden et al., 2006 , Green et al., 2009 ; Lucac et al., 2006). L'expression de *P2rx7* a été diminuée significativement chez les patients

dépressifs (Zhang et al., 2011). Dans nos modèles des troubles anxio-dépressifs, son expression d'ARNm a été diminuée dans l'hippocampe ventral. Ces résultats suggèrent que le gène P2rx7 pourrait constituer une cible intéressante dans la physiopathologie des troubles anxio-dépressifs et pourrait présenter une piste de recherche intéressante dans les mécanismes biologiques responsables de l'apparition de ces troubles.

Conclusion

Les approches d'analyse par '*microarrays*' des variations des gènes responsables de phénotypes anxio-dépressifs induits par le stress ou par une stimulation neuroendocrine restent cependant peu étudiées, du fait de la difficulté technique, de la complexité de l'analyse statistique et de la très importante quantité de données obtenues. Seules des approches translationnelles ou de comparaison de modèles permettront d'affiner notre compréhension des modifications génétiques induites de façon commune et responsable de ces phénotypes. La mise à disposition au niveau public de ces résultats de microarrays permettront à l'avenir la réalisation de méta-analyses, qui espérons le, aboutiront à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques des troubles anxio-dépressifs.

Références bibliographiques

Adell, A., P. Celada, M. T. Abellan, and F. Artigas. 2002. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain research. Brain research reviews* 39: 154-180.

Adolphs, R., D. Tranel, M. Koenigs, and A. R. Damasio. 2005. Preferring one taste over another without recognizing either. *Nature neuroscience* 8: 860-861.

Aggleton, J. P. 2000. *The amygdala: A functional analysis*, second edition ed. Oxford University Press., Oxford.

Aggleton, J. P., M. J. Burton, and R. E. Passingham. 1980. Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Brain research* 190: 347-368.

Aghajanian, G. K. 2000. Electrophysiology of Serotonin Receptor Subtypes and Signal Transduction Pathways: In D. J. K. Floyd E. Bloom (ed.), *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York.

Ago, Y., S. Arikawa, M. Yata, K. Yano, M. Abe, K. Takuma, and T. Matsuda. 2008. Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression. *Neuropharmacology* 55: 1355-1363.

Albert, P. R., and S. Lemonde. 2004. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 10: 575-593.

Albert, P. R., and B. L. Francois. 2010. Modifying 5-HT_{1A} Receptor Gene Expression as a New Target for Antidepressant Therapy. *Frontiers in neuroscience* 4: 35.

Albert, P. R., Q. Y. Zhou, H. H. Van Tol, J. R. Bunzow, and O. Civelli. 1990. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 265: 5825-5832.

Alexandre, C., D. Popa, V. Fabre, S. Bouali, P. Venault, K. P. Lesch, M. Hamon, and J. Adrien. 2006. Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 5554-5564.

Alonso, G. 2000. Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia* 31: 219-231.

Alvarez, R. P., A. Biggs, G. Chen, D. S. Pine, and C. Grillon. 2008. Contextual fear conditioning in humans: cortical-hippocampal and amygdala contributions. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28: 6211-6219.

Anthony, J. P., T. J. Sexton, and J. F. Neumaier. 2000. Antidepressant-induced regulation of 5-HT(1b) mRNA in rat dorsal raphe nucleus reverses rapidly after drug discontinuation. *Journal of neuroscience research* 61: 82-87.

Arango, V., M. D. Underwood, M. Boldrini, H. Tamir, S. A. Kassir, S. Hsiung, J. J. Chen, and J. J. Mann. 2001. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 25: 892-903.

Arborelius, L., G. G. Nomikos, P. Hertel, P. Salmi, P. Grillner, B. B. Hook, U. Hacksell, and T. H. Svensson. 1996. The 5-HT_{1A} receptor antagonist (S)-UH-301 augments the increase in extracellular concentrations of 5-HT in the frontal cortex produced by both acute and chronic treatment with citalopram. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353: 630-640.

Arendt, J. 1998. Complex effects of melatonin. *Therapie* 53: 479-488.

Artigas, F., L. Romero, C. de Montigny, and P. Blier. 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends in neurosciences* 19: 378-383.

Audinot, V., F. Mailliet, C. Lahaye-Brasseur, A. Bonnaud, A. Le Gall, C. Amosse, S. Dromaint, M. Rodriguez, N. Nagel, J. P. Galizzi, B. Malpoux, G. Guillaumet, D. Lesieur, F. Lefoulon, P. Renard, P. Delagrance, and J. A. Boutin. 2003. New selective ligands of human cloned melatonin MT₁ and MT₂ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 367: 553-561.

Auerbach, S. B., and S. Hjorth. 1995. Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 352: 597-606.

Austin, M. C., R. E. Whitehead, C. L. Edgar, J. E. Janosky, and D. A. Lewis. 2002. Localized decrease in serotonin transporter-immunoreactive axons in the prefrontal cortex of depressed subjects committing suicide. *Neuroscience* 114: 807-815.

Axelrod, J., R. A. Mueller, J. P. Henry, and P. M. Stephens. 1970. Changes in enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of noradrenaline and adrenaline after psychosocial stimulation. *Nature* 225: 1059-1060.

Babenko, O., A. Golubov, Y. Ilnytskyy, I. Kovalchuk, and G. A. Metz. 2012. Genomic and epigenomic responses to chronic stress involve miRNA-mediated programming. *PLoS one* 7: e29441.

Baldwin, D. S., and R. V. Nair. 2005. Escitalopram in the treatment of generalized anxiety disorder. *Expert review of neurotherapeutics* 5: 443-449.

Bale, T. L., A. Contarino, G. W. Smith, R. Chan, L. H. Gold, P. E. Sawchenko, G. F. Koob, W. W. Vale, and K. F. Lee. 2000. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature genetics* 24: 410-414.

Ball, S. G., A. Kuhn, D. Wall, A. Shekhar, and A. W. Goddard. 2005. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment for generalized anxiety disorder: a double-blind,

prospective comparison between paroxetine and sertraline. *The Journal of clinical psychiatry* 66: 94-99.

Banasr, M., M. Hery, R. Printemps, and A. Daszuta. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29: 450-460.

Banasr, M., M. Hery, R. Printemps, and A. Daszuta. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29: 450-460.

Banasr, M., A. Soumier, M. Hery, E. Mocaer, and A. Daszuta. 2006. Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry* 59: 1087-1096.

Bandelow, B., J. Zohar, E. Hollander, S. Kasper, H. J. Moller, O.-C. Wfsbp Task Force on Treatment Guidelines for Anxiety, D. Post-Traumatic Stress, J. Zohar, E. Hollander, S. Kasper, H. J. Moller, B. Bandelow, C. Allgulander, J. Ayuso-Gutierrez, D. S. Baldwin, R. Buenvicium, G. Cassano, N. Fineberg, L. Gabriels, I. Hindmarch, H. Kaiya, D. F. Klein, M. Lader, Y. Lecrubier, J. P. Lepine, M. R. Liebowitz, J. J. Lopez-Ibor, D. Marazziti, E. C. Miguel, K. S. Oh, M. Preter, R. Rupprecht, M. Sato, V. Starcevic, D. J. Stein, M. van Ameringen, and J. Vega. 2008. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the pharmacological treatment of anxiety, obsessive-compulsive and post-traumatic stress disorders - first revision. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 9: 248-312.

Banki, C. M., G. Bissette, M. Arato, L. O'Connor, and C. B. Nemeroff. 1987. CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 144: 873-877.

Bannerman, D. M., R. M. Deacon, S. Offen, J. Friswell, M. Grubb, and J. N. Rawlins. 2002. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral neuroscience* 116: 884-901.

Bannerman, D. M., M. Grubb, R. M. Deacon, B. K. Yee, J. Feldon, and J. N. Rawlins. 2003. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural brain research* 139: 197-213.

Bannerman, D. M., J. N. Rawlins, S. B. McHugh, R. M. Deacon, B. K. Yee, T. Bast, W. N. Zhang, H. H. Pothuisen, and J. Feldon. 2004. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28: 273-283.

Bao, A. M., G. Meynen, and D. F. Swaab. 2008. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain research reviews* 57: 531-553.

Barden, N., E. Shink, M. Labbe, R. Vacher, J. Rochford, and E. Mocaer. 2005. Antidepressant action of agomelatine (S 20098) in a transgenic mouse model. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29: 908-916.

- Barlow, C., and D. J. Lockhart. 2002. DNA arrays and neurobiology--what's new and what's next? *Current opinion in neurobiology* 12: 554-561.
- Barnes, N. M., and T. Sharp. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-1152.
- Bearden, C. E., P. M. Thompson, M. Dalwani, K. M. Hayashi, A. D. Lee, M. Nicoletti, M. Trakhtenbroit, D. C. Glahn, P. Brambilla, R. B. Sassi, A. G. Mallinger, E. Frank, D. J. Kupfer, and J. C. Soares. 2007. Greater cortical gray matter density in lithium-treated patients with bipolar disorder. *Biological psychiatry* 62: 7-16.
- Beekman, A. T., E. de Beurs, A. J. van Balkom, D. J. Deeg, R. van Dyck, and W. van Tilburg. 2000. Anxiety and depression in later life: Co-occurrence and communality of risk factors. *The American journal of psychiatry* 157: 89-95.
- Belmaker, R. H., and G. Agam. 2008. Major depressive disorder. *The New England journal of medicine* 358: 55-68.
- Benca, R. M., and M. J. Peterson. 2008. Insomnia and depression. *Sleep medicine* 9 Suppl 1: S3-9.
- Bergstrom, A., M. N. Jayatissa, T. Thykjaer, and O. Wiborg. 2007. Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study. *Journal of molecular neuroscience* : MN 33: 201-215.
- Berkenbosch, F., D. E. de Goeij, A. D. Rey, and H. O. Besedovsky. 1989. Neuroendocrine, sympathetic and metabolic responses induced by interleukin-1. *Neuroendocrinology* 50: 570-576.
- Bertaina-Anglade, V., C. D. la Rochelle, P. A. Boyer, and E. Mocaer. 2006. Antidepressant-like effects of agomelatine (S 20098) in the learned helplessness model. *Behavioural pharmacology* 17: 703-713.
- Beskow, J., C. G. Gottfries, B. E. Roos, and B. Winblad. 1976. Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta psychiatrica Scandinavica* 53: 7-20.
- Bessa, J. M., D. Ferreira, I. Melo, F. Marques, J. J. Cerqueira, J. A. Palha, O. F. Almeida, and N. Sousa. 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular psychiatry* 14: 764-773, 739.
- Bidmon, H. J., A. Schleicher, K. Wicke, G. Gross, and K. Zilles. 2001. Localisation of mRNA for h5-HT1B and h5-HT1D receptors in human dorsal raphe. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 363: 364-368.
- Bissiere, S., N. Plachta, D. Hoyer, K. H. McAllister, H. R. Olpe, A. A. Grace, and J. F. Cryan. 2008. The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning. *Biological psychiatry* 63: 821-831.
- Bjarkam, C. R., J. C. Sorensen, and F. A. Geneser. 2003. Distribution and morphology of serotonin-immunoreactive axons in the hippocampal region of the New Zealand white rabbit. I. Area dentata and hippocampus. *Hippocampus* 13: 21-37.
- Blair, K., J. Shaywitz, B. W. Smith, R. Rhodes, M. Geraci, M. Jones, D. McCaffrey, M. Vythilingam, E. Finger, K. Mondillo, M. Jacobs, D. S. Charney, R. J. Blair, W. C. Drevets, and D. S. Pine. 2008. Response to emotional expressions in generalized

social phobia and generalized anxiety disorder: evidence for separate disorders. *The American journal of psychiatry* 165: 1193-1202.

Blendy, J. A. 2006. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biological psychiatry* 59: 1144-1150.

Blier, P., and C. De Montigny. 1983. Electrophysiological investigations on the effect of repeated zimelidine administration on serotonergic neurotransmission in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3: 1270-1278.

Blier, P., and R. Bergeron. 1995. Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. *Journal of clinical psychopharmacology* 15: 217-222.

Blier, P., R. Bergeron, and C. de Montigny. 1997. Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 16: 333-338.

Blier, P., G. Pineyro, M. el Mansari, R. Bergeron, and C. de Montigny. 1998. Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Annals of the New York Academy of Sciences* 861: 204-216.

Bobker, D. H., and J. T. Williams. 1989. Serotonin agonists inhibit synaptic potentials in the rat locus ceruleus in vitro via 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 250: 37-43.

Boldrini, M., M. D. Underwood, J. J. Mann, and V. Arango. 2008. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *Journal of psychiatric research* 42: 433-442.

Bonaventure, P., D. Nepomuceno, A. Kwok, W. Chai, X. Langlois, R. Hen, K. Stark, N. Carruthers, and T. W. Lovenberg. 2002. Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT(1A) knockout and 5-HT(1A/1B) double-knockout mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302: 240-248.

Boschert, U., D. A. Amara, L. Segu, and R. Hen. 1994. The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience* 58: 167-182.

Bouchard, T. J., Jr. 1994. Genes, environment, and personality. *Science* 264: 1700-1701.

Bourin, M., E. Mocaer, and R. Porsolt. 2004. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 29: 126-133.

Bourne, H. R., W. E. Bunney, Jr., R. W. Colburn, J. M. Davis, J. N. Davis, D. M. Shaw, and A. J. Coppen. 1968. Noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, and 5-hydroxyindoleacetic acid in hindbrains of suicidal patients. *Lancet* 2: 805-808.

Bouwknicht, J. A., T. H. Hijzen, J. van der Gugten, R. A. Maes, R. Hen, and B. Olivier. 2001. Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biological psychiatry* 49: 557-568.

- Bowley, M. P., W. C. Drevets, D. Ongur, and J. L. Price. 2002. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biological psychiatry* 52: 404-412.
- Brady, L. S., P. W. Gold, M. Herkenham, A. B. Lynn, and H. J. Whitfield, Jr. 1992. The antidepressants fluoxetine, idazoxan and phenelzine alter corticotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain: therapeutic implications. *Brain research* 572: 117-125.
- Brambilla, P., M. A. Nicoletti, K. Harenski, R. B. Sassi, A. G. Mallinger, E. Frank, D. J. Kupfer, M. S. Keshavan, and J. C. Soares. 2002. Anatomical MRI study of subgenual prefrontal cortex in bipolar and unipolar subjects. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 27: 792-799.
- Bremner, J. D., M. Narayan, E. R. Anderson, L. H. Staib, H. L. Miller, and D. S. Charney. 2000. Hippocampal volume reduction in major depression. *The American journal of psychiatry* 157: 115-118.
- Britton, J. C., K. L. Phan, S. F. Taylor, R. C. Welsh, K. C. Berridge, and I. Liberzon. 2006. Neural correlates of social and nonsocial emotions: An fMRI study. *NeuroImage* 31: 397-409.
- Brown, T. H., E. W. Kairiss, and C. L. Keenan. 1990. Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. *Annual review of neuroscience* 13: 475-511.
- Brown, T. A., L. A. Campbell, C. L. Lehman, J. R. Grisham, and R. B. Mancill. 2001. Current and lifetime comorbidity of the DSM-IV anxiety and mood disorders in a large clinical sample. *Journal of abnormal psychology* 110: 585-599.
- Bruinvels, A. T., B. Landwehrmeyer, M. A. Moskowitz, and D. Hoyer. 1992. Evidence for the presence of 5-HT_{1B} receptor messenger RNA in neurons of the rat trigeminal ganglia. *European journal of pharmacology* 227: 357-359.
- Brunner, D., and R. Hen. 1997. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 836: 81-105.
- Buchel, C., and R. J. Dolan. 2000. Classical fear conditioning in functional neuroimaging. *Current opinion in neurobiology* 10: 219-223.
- Buijs, R. M., and A. Kalsbeek. 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature reviews. Neuroscience* 2: 521-526.
- Calabrese, F., R. Molteni, C. Gabriel, E. Mocaer, G. Racagni, and M. A. Riva. 2011. Modulation of neuroplastic molecules in selected brain regions after chronic administration of the novel antidepressant agomelatine. *Psychopharmacology* 215: 267-275.
- Canton, E. S.-B. a. H. 2000. Serotonin Receptors: Signal Transduction Pathways. In D. J. K. Floyd E. Bloom (ed.), *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*, vol. PART I. PRECLINICAL SECTION Raven Press, New York.
- Cao, L., X. Jiao, D. S. Zuzga, Y. Liu, D. M. Fong, D. Young, and M. J. During. 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature genetics* 36: 827-835.
- Cardinali, D. P., E. S. Pagano, P. A. Scacchi Bernasconi, R. Reynoso, and P. Scacchi. 2011. Disrupted chronobiology of sleep and cytoprotection in obesity: possible therapeutic value of melatonin. *Neuro endocrinology letters* 32: 588-606.

- Carney, R. M., and R. C. Shelton. 2011. Agomelatine for the treatment of major depressive disorder. *Expert opinion on pharmacotherapy* 12: 2411-2419.
- Carroll, B. J., F. Cassidy, D. Naftolowitz, N. E. Tatham, W. H. Wilson, A. Iranmanesh, P. Y. Liu, and J. D. Veldhuis. 2007. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum*: 90-103.
- Caspi, A., K. Sugden, T. E. Moffitt, A. Taylor, I. W. Craig, H. Harrington, J. McClay, J. Mill, J. Martin, A. Braithwaite, and R. Poulton. 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301: 386-389.
- Cassel, J. C., H. Jeltsch, B. Neufang, D. Lauth, B. Szabo, and R. Jackisch. 1995. Downregulation of muscarinic- and 5-HT_{1B}-mediated modulation of [³H]acetylcholine release in hippocampal slices of rats with fimbria-fornix lesions and intrahippocampal grafts of septal origin. *Brain research* 704: 153-166.
- Castro, M. E., A. Diaz, E. del Olmo, and A. Pazos. 2003. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 44: 93-101.
- Cerda, M., A. Sagdeo, J. Johnson, and S. Galea. 2010. Genetic and environmental influences on psychiatric comorbidity: a systematic review. *Journal of affective disorders* 126: 14-38.
- Chalmers, D. T., T. W. Lovenberg, and E. B. De Souza. 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF₂) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF₁ receptor mRNA expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 6340-6350.
- Chaouloff, F. 1993. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain research. Brain research reviews* 18: 1-32.
- Chen, Z. Y., K. Bath, B. McEwen, B. Hempstead, and F. Lee. 2008. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Foundation symposium* 289: 180-188; discussion 188-195.
- Chenu, F., D. J. David, I. Leroux-Nicollet, E. Le Maitre, A. M. Gardier, and M. Bourin. 2008. Serotonin_{1B} heteroreceptor activation induces an antidepressant-like effect in mice with an alteration of the serotonergic system. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 33: 541-550.
- Choudary, P. V., M. Molnar, S. J. Evans, H. Tomita, J. Z. Li, M. P. Vawter, R. M. Myers, W. E. Bunney, Jr., H. Akil, S. J. Watson, and E. G. Jones. 2005. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 15653-15658.
- Churchill, G. A. 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature genetics* 32 Suppl: 490-495.
- Clarke, J. D., and T. Zhu. 2006. Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45: 630-650.
- Cole, M. W., N. Yeung, W. A. Freiwald, and M. Botvinick. 2009. Cingulate cortex: diverging data from humans and monkeys. *Trends in neurosciences* 32: 566-574.

Consortium, M., L. Shi, L. H. Reid, W. D. Jones, R. Shippy, J. A. Warrington, S. C. Baker, P. J. Collins, F. de Longueville, E. S. Kawasaki, K. Y. Lee, Y. Luo, Y. A. Sun, J. C. Willey, R. A. Setterquist, G. M. Fischer, W. Tong, Y. P. Dragan, D. J. Dix, F. W. Frueh, F. M. Goodsaid, D. Herman, R. V. Jensen, C. D. Johnson, E. K. Lobenhofer, R. K. Puri, U. Schrf, J. Thierry-Mieg, C. Wang, M. Wilson, P. K. Wolber, L. Zhang, S. Amur, W. Bao, C. C. Barbacioru, A. B. Lucas, V. Bertholet, C. Boysen, B. Bromley, D. Brown, A. Brunner, R. Canales, X. M. Cao, T. A. Cebula, J. J. Chen, J. Cheng, T. M. Chu, E. Chudin, J. Corson, J. C. Corton, L. J. Croner, C. Davies, T. S. Davison, G. Delenstarr, X. Deng, D. Dorris, A. C. Eklund, X. H. Fan, H. Fang, S. Fulmer-Smentek, J. C. Fuscoe, K. Gallagher, W. Ge, L. Guo, X. Guo, J. Hager, P. K. Haje, J. Han, T. Han, H. C. Harbottle, S. C. Harris, E. Hatchwell, C. A. Hauser, S. Hester, H. Hong, P. Hurban, S. A. Jackson, H. Ji, C. R. Knight, W. P. Kuo, J. E. LeClerc, S. Levy, Q. Z. Li, C. Liu, Y. Liu, M. J. Lombardi, Y. Ma, S. R. Magnuson, B. Maqsodi, T. McDaniel, N. Mei, O. Myklebost, B. Ning, N. Novoradovskaya, M. S. Orr, T. W. Osborn, A. Papallo, T. A. Patterson, R. G. Perkins, E. H. Peters, et al. 2006. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature biotechnology* 24: 1151-1161.

Coryell, W., P. Nopoulos, W. Drevets, T. Wilson, and N. C. Andreasen. 2005. Subgenual prefrontal cortex volumes in major depressive disorder and schizophrenia: diagnostic specificity and prognostic implications. *The American journal of psychiatry* 162: 1706-1712.

Costall, B., M. E. Kelly, R. J. Naylor, and E. S. Onaivi. 1988. Actions of buspirone in a putative model of anxiety in the mouse. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 40: 494-500.

Cotter, D., D. Mackay, S. Landau, R. Kerwin, and I. Everall. 2001. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of general psychiatry* 58: 545-553.

Coupland, N. J., C. J. Ogilvie, K. M. Hegadoren, P. Seres, C. C. Hanstock, and P. S. Allen. 2005. Decreased prefrontal Myo-inositol in major depressive disorder. *Biological psychiatry* 57: 1526-1534.

Cremers, T. I., P. de Boer, Y. Liao, F. J. Bosker, J. A. den Boer, B. H. Westerink, and H. V. Wikstrom. 2000. Augmentation with a 5-HT(1A), but not a 5-HT(1B) receptor antagonist critically depends on the dose of citalopram. *European journal of pharmacology* 397: 63-74.

Czeh, B., A. Stuchlik, M. Wesierska, J. M. Cimadevilla, J. Pokorny, L. Seress, and J. Bures. 2001. Effect of neonatal dentate gyrus lesion on allothetic and idiothetic navigation in rats. *Neurobiology of learning and memory* 75: 190-213.

Czesak, M., B. Le Francois, A. M. Millar, M. Deria, M. Daigle, J. E. Visvader, H. Anisman, and P. R. Albert. 2012. Increased serotonin-1A (5-HT1A) autoreceptor expression and reduced raphe serotonin levels in deformed epidermal autoregulatory factor-1 (Deaf-1) gene knock-out mice. *The Journal of biological chemistry* 287: 6615-6627.

Czibere, L., L. A. Baur, A. Wittmann, K. Gemmeke, A. Steiner, P. Weber, B. Putz, N. Ahmad, M. Bunck, C. Graf, R. Widner, C. Kuhne, M. Panhuysen, B. Hamsch, G. Rieder, T. Reinheckel, C. Peters, F. Holsboer, R. Landgraf, and J. M. Deussing. 2011. Profiling trait anxiety: transcriptome analysis reveals cathepsin B (Ctsb) as a novel candidate gene for emotionality in mice. *PLoS one* 6: e23604.

- Dagyte, G., P. G. Luiten, T. De Jager, C. Gabriel, E. Mocaer, J. A. Den Boer, and E. A. Van der Zee. 2011. Chronic stress and antidepressant agomelatine induce region-specific changes in synapsin I expression in the rat brain. *Journal of neuroscience research* 89: 1646-1657.
- Dagyte, G., A. Trentani, F. Postema, P. G. Luiten, J. A. Den Boer, C. Gabriel, E. Mocaer, P. Meerlo, and E. A. Van der Zee. 2010. The novel antidepressant agomelatine normalizes hippocampal neuronal activity and promotes neurogenesis in chronically stressed rats. *CNS neuroscience & therapeutics* 16: 195-207.
- Dahlstrom, A., and K. Fuxe. 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20: 398-399.
- Dallman, M. F. 1993. Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 4: 62-69.
- David, D. J., B. A. Samuels, Q. Rainer, J. W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J. P. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijevic, E. D. Leonardo, and R. Hen. 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62: 479-493.
- Davis, M., and C. Shi. 1999. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Annals of the New York Academy of Sciences* 877: 281-291.
- Dawson, L. A., H. Q. Nguyen, D. L. Smith, and L. E. Schechter. 2002. Effect of chronic fluoxetine and WAY-100635 treatment on serotonergic neurotransmission in the frontal cortex. *Journal of psychopharmacology* 16: 145-152.
- de Almeida, J., and G. Mengod. 2008. Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Journal of neurochemistry* 107: 488-496.
- de Bodinat, C., B. Guardiola-Lemaitre, E. Mocaer, P. Renard, C. Munoz, and M. J. Millan. 2010. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nature reviews. Drug discovery* 9: 628-642.
- Deakin, J. F., and F. G. Graeff. 1991. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of psychopharmacology* 5: 305-315.
- Deakin, J. F., I. Pennell, A. J. Upadhyaya, and R. Lofthouse. 1990. A neuroendocrine study of 5HT function in depression: evidence for biological mechanisms of endogenous and psychosocial causation. *Psychopharmacology* 101: 85-92.
- Decker, M. W., P. Curzon, and J. D. Bionni. 1995. Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety, and locomotor activity in rats. *Neurobiology of learning and memory* 64: 156-168.
- Dedovic, K., A. Duchesne, J. Andrews, V. Engert, and J. C. Pruessner. 2009. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage* 47: 864-871.
- Delgado, P. L., D. S. Charney, L. H. Price, G. K. Aghajanian, H. Landis, and G. R. Heninger. 1990. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Archives of general psychiatry* 47: 411-418.

- Demertzis, K. H., and M. G. Craske. 2006. Anxiety in primary care. *Current psychiatry reports* 8: 291-297.
- Dent, G. W., D. M. O'Dell, and J. H. Eberwine. 2001. Gene expression profiling in the amygdala: an approach to examine the molecular substrates of mammalian behavior. *Physiology & behavior* 73: 841-847.
- Devinsky, O., M. J. Morrell, and B. A. Vogt. 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain : a journal of neurology* 118 (Pt 1): 279-306.
- Doucet, E., M. Pohl, C. M. Fattaccini, J. Adrien, S. E. Mestikawy, and M. Hamon. 1995. In situ hybridization evidence for the synthesis of 5-HT_{1B} receptor in serotonergic neurons of anterior raphe nuclei in the rat brain. *Synapse* 19: 18-28.
- Dowlatshahi, D., G. M. MacQueen, J. F. Wang, and L. T. Young. 1998. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet* 352: 1754-1755.
- Drayer, R. A., B. H. Mulsant, E. J. Lenze, B. L. Rollman, M. A. Dew, K. Kelleher, J. F. Karp, A. Begley, H. C. Schulberg, and C. F. Reynolds, 3rd. 2005. Somatic symptoms of depression in elderly patients with medical comorbidities. *International journal of geriatric psychiatry* 20: 973-982.
- Drevets, W. C., M. E. Thase, E. L. Moses-Kolko, J. Price, E. Frank, D. J. Kupfer, and C. Mathis. 2007. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nuclear medicine and biology* 34: 865-877.
- Duman, R. S., and D. S. Charney. 1999. Cell atrophy and loss in major depression. *Biological psychiatry* 45: 1083-1084.
- Duman, R. S., and S. S. Newton. 2007. Epigenetic marking and neuronal plasticity. *Biological psychiatry* 62: 1-3.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, and E. J. Nestler. 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Archives of general psychiatry* 54: 597-606.
- Duman, R. S., J. Malberg, S. Nakagawa, and C. D'Sa. 2000. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological psychiatry* 48: 732-739.
- Duncan, W. C., Jr. 1996. Circadian rhythms and the pharmacology of affective illness. *Pharmacology & therapeutics* 71: 253-312.
- Earnheart, J. C., C. Schweizer, F. Crestani, T. Iwasato, S. Itohara, H. Mohler, and B. Luscher. 2007. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 3845-3854.
- Eaton, W. W., J. C. Anthony, J. Gallo, G. Cai, A. Tien, A. Romanoski, C. Lyketsos, and L. S. Chen. 1997. Natural history of Diagnostic Interview Schedule/DSM-IV major depression. The Baltimore Epidemiologic Catchment Area follow-up. *Archives of general psychiatry* 54: 993-999.
- Edgar, N. T., C. Palme, R. and Sibille E. 2011. Resilient emotionality and molecular compensation in mice lacking the oligodendrocyte-specific gene *Cnp1*. *Translational Psychiatry* 1:11.
- El Yacoubi, M., M. Dubois, C. Gabriel, E. Mocaer, and J. M. Vaugeois. 2011. Chronic agomelatine and fluoxetine induce antidepressant-like effects in H/Rouen mice, a

- genetic mouse model of depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 100: 284-288.
- Encinas, J. M., A. Vaahtokari, and G. Enikolopov. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8233-8238.
- Engin, E., and D. Treit. 2007. The anxiolytic-like effects of allopregnanolone vary as a function of intracerebral microinfusion site: the amygdala, medial prefrontal cortex, or hippocampus. *Behavioural pharmacology* 18: 461-470.
- Etkin, A., T. Egner, and R. Kalisch. 2011. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends in cognitive sciences* 15: 85-93.
- Europe, W. R. O. f. 2011. Impact of economic crises on mental health, pp. 34, Copenhagen Ø, Denmark.
- Evans, S. J., H. Akil, and S. J. Watson. 2009. Analyzing gene expression in depression. *The American journal of psychiatry* 166: 961-963.
- Evrard, A., A. M. Laporte, M. Chastanet, R. Hen, M. Hamon, and J. Adrien. 1999. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors control the firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the mouse: studies in 5-HT_{1B} knock-out mice. *The European journal of neuroscience* 11: 3823-3831.
- Fanselow, M. S., and H. W. Dong. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65: 7-19.
- Farr, S. A., K. Uezu, T. A. Creonte, J. F. Flood, and J. E. Morley. 2000. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 65: 363-368.
- Farrell, M. J., A. R. Laird, and G. F. Egan. 2005. Brain activity associated with painfully hot stimuli applied to the upper limb: a meta-analysis. *Human brain mapping* 25: 129-139.
- Fava, M., and K. S. Kendler. 2000. Major depressive disorder. *Neuron* 28: 335-341.
- Feighner, J. P., and W. F. Boyer. 1989. Serotonin-1A anxiolytics: an overview. *Psychopathology* 22 Suppl 1: 21-26.
- Fernstrom, J. D., and R. J. Wurtman. 1972. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178: 414-416.
- Feuerstein, T. J., H. Huring, V. van Velthoven, C. H. Lucking, and G. B. Landwehrmeyer. 1996. 5-HT_{1D}-like receptors inhibit the release of endogenously formed [3H]GABA in human, but not in rabbit, neocortex. *Neuroscience letters* 209: 210-214.
- Fiddick, L. 2011. There is more than the amygdala: potential threat assessment in the cingulate cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35: 1007-1018.
- Filip, M., and M. Bader. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological reports* : PR 61: 761-777.
- Fink, K. B., and M. Gothert. 2007. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacological reviews* 59: 360-417.

- Fish, E. W., S. Faccidomo, and K. A. Miczek. 1999. Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT(1B) receptor agonist CP-94,253. *Psychopharmacology* 146: 391-399.
- Forster, T., D. Roy, and P. Ghazal. 2003. Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures. *The Journal of endocrinology* 178: 195-204.
- Frankland, P. W., B. Bontempi, L. E. Talton, L. Kaczmarek, and A. J. Silva. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304: 881-883.
- Furmark, T., S. Henningsson, L. Appel, F. Ahs, C. Linnman, A. Pissiota, V. Faria, L. Oreland, M. Bani, E. M. Pich, E. Eriksson, and M. Fredrikson. 2009. Genotype over-diagnosis in amygdala responsiveness: affective processing in social anxiety disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 34: 30-40.
- Fuxe, K. 1965. Evidence for the Existence of Monoamine Neurons in the Central Nervous System. 3. The Monoamine Nerve Terminal. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 65: 573-596.
- Gaiteri, C., and E. Sibille. 2011. Differentially expressed genes in major depression reside on the periphery of resilient gene coexpression networks. *Frontiers in neuroscience* 5: 95.
- Garcia, S., M. B. Spitznagel, R. Cohen, N. Raz, L. Sweet, L. Colbert, R. Josephson, J. Hughes, J. Rosneck, and J. Gunstad. 2011. Depression is associated with cognitive dysfunction in older adults with heart failure. *Cardiovascular psychiatry and neurology* 2011: 368324.
- Gardier, A. M., I. Malagie, A. C. Trillat, C. Jacquot, and F. Artigas. 1996. Role of 5-HT1A autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundamental & clinical pharmacology* 10: 16-27.
- Gardier, A. M., A. C. Trillat, I. Malagie, D. David, M. Hascoet, M. C. Colombel, P. Jolliet, C. Jacquot, R. Hen, and M. Bourin. 2001. [5-HT1B serotonin receptors and antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 324: 433-441.
- Gardier, A. M., D. J. David, G. Jogo, C. Przybylski, C. Jacquot, S. Durier, B. Gruwez, E. Douvier, P. Beauverie, N. Poisson, R. Hen, and M. Bourin. 2003. Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT1B receptor knockout mice. *Journal of neurochemistry* 86: 13-24.
- Germain, A., and D. J. Kupfer. 2008. Circadian rhythm disturbances in depression. *Human psychopharmacology* 23: 571-585.
- Gerner, R. H., and T. A. Hare. 1981. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. *The American journal of psychiatry* 138: 1098-1101.
- Gerson, S., R. Mistry, R. Bastani, F. Blow, R. Gould, M. Llorente, A. Maxwell, J. Moye, E. Olsen, R. Rohrbaugh, J. Rosansky, W. Van Stone, and L. Jarvik. 2004. Symptoms of depression and anxiety (MHI) following acute medical/surgical hospitalization and post-discharge psychiatric diagnoses (DSM) in 839 geriatric US veterans. *International journal of geriatric psychiatry* 19: 1155-1167.

- Gilbertson, M. W., M. E. Shenton, A. Ciszewski, K. Kasai, N. B. Lasko, S. P. Orr, and R. K. Pitman. 2002. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nature neuroscience* 5: 1242-1247.
- Gingrich, J. A., and R. Hen. 2001. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology* 155: 1-10.
- Giorgetti, M., and L. H. Tecott. 2004. Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *European journal of pharmacology* 488: 1-9.
- Gonzalez, L. E., N. Andrews, and S. E. File. 1996. 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain research* 732: 145-153.
- Goodwin, G. M., R. Emsley, S. Rembry, F. Rouillon, and G. Agomelatine Study. 2009. Agomelatine prevents relapse in patients with major depressive disorder without evidence of a discontinuation syndrome: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical psychiatry* 70: 1128-1137.
- Gorzalka, B. B., L. A. Hanson, and J. J. Hong. 2001. Ketanserin attenuates the behavioural effects of corticosterone: implications for 5-HT(2A) receptor regulation. *European journal of pharmacology* 428: 235-240.
- Gorzalka, B., L. Hanson, J. Harrington, S. Killam, and D. Campbell-Meiklejohn. 2003. Conditioned taste aversion: modulation by 5-HT receptor activity and corticosterone. *European journal of pharmacology* 471: 129-134.
- Gould, E., B. S. McEwen, P. Tanapat, L. A. Galea, and E. Fuchs. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17: 2492-2498.
- Gould, E., P. Tanapat, B. S. McEwen, G. Flugge, and E. Fuchs. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3168-3171.
- Gourley, S. L., A. T. Kedves, P. Olausson, and J. R. Taylor. 2009. A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34: 707-716.
- Gourley, S. L., D. D. Kiraly, J. L. Howell, P. Olausson, and J. R. Taylor. 2008. Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biological psychiatry* 64: 884-890.
- Grant, G. M., A. Fortney, F. Gorreta, M. Estep, L. Del Giacco, A. Van Meter, A. Christensen, L. Appalla, C. Naouar, C. Jamison, A. Al-Timimi, J. Donovan, J. Cooper, C. Garrett, and V. Chandhoke. 2004. Microarrays in cancer research. *Anticancer research* 24: 441-448.
- Gray, T. S., and E. W. Bingaman. 1996. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. *Critical reviews in neurobiology* 10: 155-168.
- Greenberg, D. A. 2001. Microarrays, markers of disease, and the myth of "nonhypothesis-driven" research. *Annals of neurology* 50: 695.

- Gregus, A., A. J. Wintink, A. C. Davis, and L. E. Kalynchuk. 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural brain research* 156: 105-114.
- Gross, C., X. Zhuang, K. Stark, S. Ramboz, R. Oosting, L. Kirby, L. Santarelli, S. Beck, and R. Hen. 2002. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416: 396-400.
- Grozdanovic, Z., and H. G. Baumgarten. 1996. Colocalisation of NADPH-diaphorase with neuropeptides in the ureterovesical ganglia of humans. *Acta histochemica* 98: 245-253.
- Guelfi, J. D. 1993. [Comorbidity of anxiety-depression and its treatment]. *L'Encephale* 19 Spec No 2: 397-404.
- Guilloux, J. P., C. Gaiteri, and E. Sibille. 2010. Network analysis of positional candidate genes of schizophrenia highlights...more than... myelin-related pathways. *Molecular psychiatry* 15: 786-788.
- Guilloux, J. P., D. J. David, B. P. Guiard, F. Chenu, C. Reperant, M. Toth, M. Bourin, and A. M. Gardier. 2006. Blockade of 5-HT1A receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT1A receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31: 2162-2172.
- Guilloux, J. P., G. Douillard-Guilloux, R. Kota, X. Wang, A. M. Gardier, K. Martinowich, G. C. Tseng, D. A. Lewis, and E. Sibille. 2011. Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Molecular psychiatry*.
- Guilloux, J. P., D. J. David, L. Xia, H. T. Nguyen, Q. Rainer, B. P. Guiard, C. Reperant, T. Deltheil, M. Toth, R. Hen, and A. M. Gardier. 2011. Characterization of 5-HT(1A/1B)-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology* 61: 478-488.
- Guknecht, L., C. Kriegebaum, A. Schmitt and K. Lesch. 2006. Relative expression of tryptophan hydroxylase 1 and 2 in the brain: spatial and temporal analysis, . *Eur Neuropsychopharmacol* 16: 32.
- Gundlah, C., S. E. Alves, J. A. Clark, L. Y. Pai, J. M. Schaeffer, and S. P. Rohrer. 2005. Estrogen receptor-beta regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe. *Biological psychiatry* 57: 938-942.
- Haddjeri, N., P. Blier, and C. de Montigny. 1998. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT1A receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 10150-10156.
- Hamani, C., H. Mayberg, S. Stone, A. Laxton, S. Haber, and A. M. Lozano. 2011. The subcallosal cingulate gyrus in the context of major depression. *Biological psychiatry* 69: 301-308.
- Hamidi, M., W. C. Drevets, and J. L. Price. 2004. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biological psychiatry* 55: 563-569.
- Hamilton, M. 1960. A rating scale for depression. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 23: 56-62.

- Hamon, M. 1995. *Sérotonine, 5-Hydroxytryptamine (5-HT)*, paris.
- Hamon, M., S. Bourgoin, H. Gozlan, M. D. Hall, C. Goetz, F. Artaud, and A. S. Horn. 1984. Biochemical evidence for the 5-HT agonist properties of PAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin) in the rat brain. *European journal of pharmacology* 100: 263-276.
- Hariri, A. R., A. Tessitore, V. S. Mattay, F. Fera, and D. R. Weinberger. 2002. The amygdala response to emotional stimuli: a comparison of faces and scenes. *NeuroImage* 17: 317-323.
- Hasler, G., J. W. van der Veen, T. Tumonis, N. Meyers, J. Shen, and W. C. Drevets. 2007. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Archives of general psychiatry* 64: 193-200.
- Hasler, G., A. C. Nugent, P. J. Carlson, R. E. Carson, M. Geraci, and W. C. Drevets. 2008. Altered cerebral gamma-aminobutyric acid type A-benzodiazepine receptor binding in panic disorder determined by [¹¹C]flumazenil positron emission tomography. *Archives of general psychiatry* 65: 1166-1175.
- Hasselmo, M. E. 1999. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends in cognitive sciences* 3: 351-359.
- Healy, D. G., A. Harkin, J. F. Cryan, J. P. Kelly, and B. E. Leonard. 1999. Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms. *Psychopharmacology* 145: 303-308.
- Heisler, L. K., H. M. Chu, T. J. Brennan, J. A. Danao, P. Bajwa, L. H. Parsons, and L. H. Tecott. 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15049-15054.
- Herman, J. P., M. M. Ostrander, N. K. Mueller, and H. Figueiredo. 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29: 1201-1213.
- Hervas, I., M. T. Vilaro, L. Romero, M. C. Scorza, G. Mengod, and F. Artigas. 2001. Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 24: 11-20.
- Heuser, I. J., U. Schweiger, U. Gotthardt, J. Schmider, C. H. Lammers, M. Dettling, A. Yassouridis, and F. Holsboer. 1996. Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects. *The American journal of psychiatry* 153: 93-99.
- Hock, B. J., Jr., and M. D. Bunsey. 1998. Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 7027-7032.
- Holick, K. A., D. C. Lee, R. Hen, and S. C. Dulawa. 2008. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33: 406-417.

- Holsboer, F. 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 23: 477-501.
- Hoyer, D., J. P. Hannon, and G. R. Martin. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71: 533-554.
- Hu, P., E. L. Brodie, Y. Suzuki, H. H. McAdams, and G. L. Andersen. 2005. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* 187: 8437-8449.
- Hutchison, W. D., K. D. Davis, A. M. Lozano, R. R. Tasker, and J. O. Dostrovsky. 1999. Pain-related neurons in the human cingulate cortex. *Nature neuroscience* 2: 403-405.
- Imbeaud, S., and C. Auffray. 2005. 'The 39 steps' in gene expression profiling: critical issues and proposed best practices for microarray experiments. *Drug discovery today* 10: 1175-1182.
- Invernizzi, R. W. 2007. Role of TPH-2 in brain function: news from behavioral and pharmacologic studies. *Journal of neuroscience research* 85: 3030-3035.
- Ixart, G., G. Barbanel, J. Nouguié-Soule, and I. Assenmacher. 1991. A quantitative study of the pulsatile parameters of CRH-41 secretion in unanesthetized free-moving rats. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 87: 153-158.
- Jacobs, B. L., H. van Praag, and F. H. Gage. 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular psychiatry* 5: 262-269.
- Jacobsen, K. X., J. L. Vanderluit, R. S. Slack, and P. R. Albert. 2008. HES1 regulates 5-HT1A receptor gene transcription at a functional polymorphism: essential role in developmental expression. *Molecular and cellular neurosciences* 38: 349-358.
- Jacobson, L., and R. Sapolsky. 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine reviews* 12: 118-134.
- Jankord, R., and J. P. Herman. 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148: 64-73.
- Jansson, A., B. Tinner, H. W. Steinbusch, L. F. Agnati, and K. Fuxe. 1998. On the relationship of 5-hydroxytryptamine neurons to 5-hydroxytryptamine 2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the brain stem of rats. A double immunolabelling analysis. *Neuroreport* 9: 2505-2511.
- Jayatissa, M. N., C. Bisgaard, A. Tingstrom, M. Papp, and O. Wiborg. 2006. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 31: 2395-2404.
- Jeffrey A. Gray, N. M. 2000. *The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry into the Functions of the Septo-hippocampal System*, SECOND EDITION ed. OXFORD UNIVERSITY PRESS, Great Britain.

- Jeon, D., S. Kim, M. Chetana, D. Jo, H. E. Ruley, S. Y. Lin, D. Rabah, J. P. Kinet, and H. S. Shin. 2010. Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nature neuroscience* 13: 482-488.
- Jinno, S. 2011. Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 519: 451-466.
- Joels, M., and E. R. de Kloet. 1992. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends in neurosciences* 15: 25-30.
- Joeyen-Waldorf, J., Y. S. Nikolova, N. Edgar, C. Walsh, R. Kota, D. A. Lewis, R. Ferrell, S. B. Manuck, A. R. Hariri, and E. Sibille. 2012. Adenylate cyclase 7 is implicated in the biology of depression and modulation of affective neural circuitry. *Biological psychiatry* 71: 627-632.
- Jongsma, M. E., F. J. Bosker, T. I. Cremers, B. H. Westerink, and J. A. den Boer. 2005. The effect of chronic selective serotonin reuptake inhibitor treatment on serotonin 1B receptor sensitivity and HPA axis activity. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29: 738-744.
- Joshi, T., Y. Chen, N. Alexandrov, and D. Xu. 2004. Cellular function prediction and biological pathway discovery in *Arabidopsis thaliana* using microarray data. Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 4: 2881-2884.
- Jungke, P., G. Ostrow, J. L. Li, S. Norton, K. Nieber, O. Kelber, and V. Butterweck. 2011. Profiling of hypothalamic and hippocampal gene expression in chronically stressed rats treated with St. John's wort extract (STW 3-VI) and fluoxetine. *Psychopharmacology* 213: 757-772.
- Kalueff, A. V., and D. J. Nutt. 2007. Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and anxiety* 24: 495-517.
- Kalynchuk, L. E., A. Gregus, D. Boudreau, and T. S. Perrot-Sinal. 2004. Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. *Behavioral neuroscience* 118: 1365-1377.
- Karege, F., G. Perret, G. Bondolfi, M. Schwald, G. Bertschy, and J. M. Aubry. 2002. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry research* 109: 143-148.
- Kasper, S., G. Hajak, K. Wulff, W. J. Hoogendijk, A. L. Montejo, E. Smeraldi, J. K. Rybakowski, M. A. Quera-Salva, A. M. Wirz-Justice, F. Picarel-Blanchot, and F. J. Bayle. 2010. Efficacy of the novel antidepressant agomelatine on the circadian rest-activity cycle and depressive and anxiety symptoms in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind comparison with sertraline. *The Journal of clinical psychiatry* 71: 109-120.
- Kendler, K. S. 1996. Major depression and generalised anxiety disorder. Same genes, (partly) different environments--revisited. *The British journal of psychiatry. Supplement*: 68-75.
- Kendler, K. S. 1999. Preparing for gene discovery: a further agenda for psychiatry. *Archives of general psychiatry* 56: 554-555.

- Kendler, K. S., C. A. Prescott, J. Myers, and M. C. Neale. 2003. The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Archives of general psychiatry* 60: 929-937.
- Kennedy, S. H., and R. Emsley. 2006. Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 16: 93-100.
- Kennedy, S. H., and S. J. Rizvi. 2010. Agomelatine in the treatment of major depressive disorder: potential for clinical effectiveness. *CNS drugs* 24: 479-499.
- Kennedy, S. H., S. Rizvi, K. Fulton, and J. Rasmussen. 2008. A double-blind comparison of sexual functioning, antidepressant efficacy, and tolerability between agomelatine and venlafaxine XR. *Journal of clinical psychopharmacology* 28: 329-333.
- Kessler, R. C. 2003. Epidemiology of women and depression. *Journal of affective disorders* 74: 5-13.
- Kessler, R. C., K. A. McGonagle, C. B. Nelson, M. Hughes, M. Swartz, and D. G. Blazer. 1994. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. II: Cohort effects. *Journal of affective disorders* 30: 15-26.
- Kessler, R. C., O. Demler, R. G. Frank, M. Olfson, H. A. Pincus, E. E. Walters, P. Wang, K. B. Wells, and A. M. Zaslavsky. 2005. Prevalence and treatment of mental disorders, 1990 to 2003. *The New England journal of medicine* 352: 2515-2523.
- Kishimoto, T., J. Radulovic, M. Radulovic, C. R. Lin, C. Schrick, F. Hooshmand, O. Hermanson, M. G. Rosenfeld, and J. Spiess. 2000. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature genetics* 24: 415-419.
- Kjelstrup, K. G., F. A. Tuvnes, H. A. Steffenach, R. Murison, E. I. Moser, and M. B. Moser. 2002. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10825-10830.
- Klempin, F., H. Babu, D. De Pietri Tonelli, E. Alarcon, K. Fabel, and G. Kempermann. 2010. Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT_{1a}, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* 3.
- Knight, D. C., D. T. Cheng, C. N. Smith, E. A. Stein, and F. J. Helmstetter. 2004. Neural substrates mediating human delay and trace fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 218-228.
- Kober, H., L. F. Barrett, J. Joseph, E. Bliss-Moreau, K. Lindquist, and T. D. Wager. 2008. Functional grouping and cortical-subcortical interactions in emotion: a meta-analysis of neuroimaging studies. *NeuroImage* 42: 998-1031.
- Kobilka, B. K., T. Frielle, S. Collins, T. Yang-Feng, T. S. Kobilka, U. Francke, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron. 1987. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329: 75-79.
- Konarski, J. Z., R. S. McIntyre, S. H. Kennedy, S. Rafi-Tari, J. K. Soczynska, and T. A. Ketter. 2008. Volumetric neuroimaging investigations in mood disorders: bipolar disorder versus major depressive disorder. *Bipolar disorders* 10: 1-37.

- Koob, G. F., and S. C. Heinrichs. 1999. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain research* 848: 141-152.
- Koresh, O., N. Kozlovsky, Z. Kaplan, J. Zohar, M. A. Matar, and H. Cohen. 2012. The long-term abnormalities in circadian expression of Period 1 and Period 2 genes in response to stress is normalized by agomelatine administered immediately after exposure. *Eur Neuropsychopharmacol* 22: 205-221.
- Kovacs, K. J., and P. E. Sawchenko. 1996. Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *Journal of molecular neuroscience* : MN 7: 125-133.
- Kuhn, D. M., W. A. Wolf, and M. B. Youdim. 1986. Serotonin neurochemistry revisited: A new look at some old axioms. *Neurochemistry international* 8: 141-154.
- Kuroda, Y., M. Mikuni, T. Ogawa, and K. Takahashi. 1992. Effect of ACTH, adrenalectomy and the combination treatment on the density of 5-HT₂ receptor binding sites in neocortex of rat forebrain and 5-HT₂ receptor-mediated wet-dog shake behaviors. *Psychopharmacology* 108: 27-32.
- Kusserow, H., B. Davies, H. Hortnagl, I. Voigt, T. Stroh, B. Bert, D. R. Deng, H. Fink, R. W. Veh, and F. Theuring. 2004. Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain research. Molecular brain research* 129: 104-116.
- Kuzelova, H., R. Ptacek, and M. Macek. 2010. The serotonin transporter gene (5-HTT) variant and psychiatric disorders: review of current literature. *Neuro endocrinology letters* 31: 4-10.
- Lam, R. W. 2006. Sleep disturbances and depression: a challenge for antidepressants. *International clinical psychopharmacology* 21 Suppl 1: S25-29.
- Le Francois, B., M. Czesak, D. Steubl, and P. R. Albert. 2008. Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* 55: 977-985.
- Le Poul, E., C. Boni, N. Hanoun, A. M. Laporte, N. Laaris, J. Chauveau, M. Hamon, and L. Lanfumey. 2000. Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* 39: 110-122.
- LeDoux, J. E. 1992. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Current opinion in neurobiology* 2: 191-197.
- Lee, C. K., R. Weindruch, and T. A. Prolla. 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature genetics* 25: 294-297.
- Lenze, E. J., B. H. Mulsant, M. K. Shear, H. C. Schulberg, M. A. Dew, A. E. Begley, B. G. Pollock, and C. F. Reynolds, 3rd. 2000. Comorbid anxiety disorders in depressed elderly patients. *The American journal of psychiatry* 157: 722-728.
- Leonardo, E. D., J. W. Richardson-Jones, E. Sibille, A. Kottman, and R. Hen. 2006. Molecular heterogeneity along the dorsal-ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression. *Neuroscience* 137: 177-186.
- Leproult, R., A. Van Onderbergen, M. L'Hermite-Baleriaux, E. Van Cauter, and G. Copinschi. 2005. Phase-shifts of 24-h rhythms of hormonal release and body

- temperature following early evening administration of the melatonin agonist agomelatine in healthy older men. *Clinical endocrinology* 63: 298-304.
- Lesch, K. P. 2001. Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *Journal of affective disorders* 62: 57-76.
- Lesch, K. P., K. Sohnle, B. Poten, G. Schoellhammer, R. Rupprecht, and H. M. Schulte. 1990. Corticotropin and cortisol secretion after central 5-hydroxytryptamine-1A (5-HT_{1A}) receptor activation: effects of 5-HT receptor and beta-adrenoceptor antagonists. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 70: 670-674.
- Lewinsohn, P. M., P. Rohde, and J. R. Seeley. 1993. Psychosocial characteristics of adolescents with a history of suicide attempt. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 32: 60-68.
- Li, Y., Y. Mu, and F. H. Gage. 2009. Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Current topics in developmental biology* 87: 149-174.
- Li, Y., S. Shi, F. Yang, J. Gao, Y. Li, M. Tao, G. Wang, K. Zhang, C. Gao, L. Liu, K. Li, K. Li, Y. Liu, X. Wang, J. Zhang, L. Lv, X. Wang, Q. Chen, J. Hu, L. Sun, J. Shi, Y. Chen, D. Xie, J. Flint, K. S. Kendler, and Z. Zhang. 2012. Patterns of co-morbidity with anxiety disorders in Chinese women with recurrent major depression. *Psychological medicine* 42: 1239-1248.
- Licht-Strunk, E., D. A. van der Windt, H. W. van Marwijk, M. de Haan, and A. T. Beekman. 2007. The prognosis of depression in older patients in general practice and the community. A systematic review. *Family practice* 24: 168-180.
- Liebsch, G., R. Landgraf, M. Engelmann, P. Lorsch, and F. Holsboer. 1999. Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *Journal of psychiatric research* 33: 153-163.
- Lifschytz, T., E. Gur, B. Lerer, and M. E. Newman. 2004. Effects of triiodothyronine and fluoxetine on 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} autoreceptor activity in rat brain: regional differences. *Journal of neuroscience methods* 140: 133-139.
- Lockhart, D. J., and C. Barlow. 2001. Expressing what's on your mind: DNA arrays and the brain. *Nature reviews. Neuroscience* 2: 63-68.
- Loo, H., A. Hale, and H. D'Haenen. 2002. Determination of the dose of agomelatine, a melatonergic agonist and selective 5-HT_{2C} antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *International clinical psychopharmacology* 17: 239-247.
- Lopez-Figueroa, A. L., C. S. Norton, M. O. Lopez-Figueroa, D. Armellini-Dodel, S. Burke, H. Akil, J. F. Lopez, and S. J. Watson. 2004. Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological psychiatry* 55: 225-233.
- Lustman, P. J., K. E. Freedland, L. S. Griffith, and R. E. Clouse. 2000. Fluoxetine for depression in diabetes: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes care* 23: 618-623.
- Lustman, P. J., L. S. Griffith, R. E. Clouse, K. E. Freedland, S. A. Eisen, E. H. Rubin, R. M. Carney, and J. B. McGill. 1995. Effects of alprazolam on glucose regulation in diabetes. Results of double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes care* 18: 1133-1139.

- Luu, P., and M. I. Posner. 2003. Anterior cingulate cortex regulation of sympathetic activity. *Brain : a journal of neurology* 126: 2119-2120.
- Mackenzie, S., J. R. Wiegel, M. Mundt, D. Brown, E. Saewyc, E. Heiligenstein, B. Harahan, and M. Fleming. 2011. Depression and suicide ideation among students accessing campus health care. *The American journal of orthopsychiatry* 81: 101-107.
- Maes, M. 1999. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Advances in experimental medicine and biology* 461: 25-46.
- Maes, M., M. Vandewoude, C. Schotte, M. Martin, and P. Blockx. 1990. Suppressive effects of dexamethasone on hypothalamic-pituitary-thyroid axis function in depressed patients. *Journal of affective disorders* 20: 55-61.
- Magarinos, A. M., M. Orchinik, and B. S. McEwen. 1998. Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. *Brain research* 809: 314-318.
- Magarinos, A. M., B. S. McEwen, G. Flugge, and E. Fuchs. 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 3534-3540.
- Malagie, I., A. C. Trillat, C. Jacquot, and A. M. Gardier. 1995. Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study. *European journal of pharmacology* 286: 213-217.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler, and R. S. Duman. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 9104-9110.
- Malin, E. L., D. Y. Ibrahim, J. W. Tu, and J. L. McGaugh. 2007. Involvement of the rostral anterior cingulate cortex in consolidation of inhibitory avoidance memory: interaction with the basolateral amygdala. *Neurobiology of learning and memory* 87: 295-302.
- Malleret, G., R. Hen, J. L. Guillou, L. Segu, and M. C. Buhot. 1999. 5-HT_{1B} receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 6157-6168.
- Maren, S. 2005. Building and burying fear memories in the brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11: 89-99.
- Maroteaux, L., F. Saudou, N. Amlaiky, U. Boschert, J. L. Plassat, and R. Hen. 1992. Mouse 5HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 3020-3024.
- Martinet, L., B. Guardiola-Lemaitre, and E. Mocaer. 1996. Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54: 713-718.
- Matzilevich, D. A., J. M. Rall, A. N. Moore, R. J. Grill, and P. K. Dash. 2002. High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *Journal of neuroscience research* 67: 646-663.

- Mayberg, H. S. 2003. Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment. *British medical bulletin* 65: 193-207.
- Mayberg, H. S., A. M. Lozano, V. Voon, H. E. McNeely, D. Seminowicz, C. Hamani, J. M. Schwab, and S. H. Kennedy. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron* 45: 651-660.
- McEwen, B. S. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience* 22: 105-122.
- McEwen, B. S. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews* 87: 873-904.
- McEwen, B. S., and R. M. Sapolsky. 1995. Stress and cognitive function. *Current opinion in neurobiology* 5: 205-216.
- McEwen, B. S., and J. P. Olie. 2005. Neurobiology of mood, anxiety, and emotions as revealed by studies of a unique antidepressant: tianeptine. *Molecular psychiatry* 10: 525-537.
- McEwen, B. S., C. D. Conrad, Y. Kuroda, M. Frankfurt, A. M. Magarinos, and C. McKittrick. 1997. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. *Eur Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 3: S323-328.
- McIntyre, J., and M. A. Moral. 2006. Spotlight on lamotrigine for depression. *Drug news & perspectives* 19: 427-430.
- McKinney, W. T., Jr., and W. E. Bunney, Jr. 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Archives of general psychiatry* 21: 240-248.
- Means-Christensen, A. J., C. D. Sherbourne, P. P. Roy-Byrne, M. C. Schulman, J. Wu, D. C. Dugdale, D. Lessler, and M. B. Stein. 2006. In search of mixed anxiety-depressive disorder: a primary care study. *Depression and anxiety* 23: 183-189.
- Mechias, M. L., A. Etkin, and R. Kalisch. 2010. A meta-analysis of instructed fear studies: implications for conscious appraisal of threat. *NeuroImage* 49: 1760-1768.
- Medford, N., and H. D. Critchley. 2010. Conjoint activity of anterior insular and anterior cingulate cortex: awareness and response. *Brain structure & function* 214: 535-549.
- Meltzer, M. M. a. H. Y. 2000. The Serotonin Hypothesis of Major Depression. In D. J. K. Floyd E. Bloom (ed.), *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*, vol. PART II. CLINICAL SECTION.
- Meltzer, C. C., J. C. Price, C. A. Mathis, M. A. Butters, S. K. Ziolko, E. Moses-Kolko, S. Mazumdar, B. H. Mulsant, P. R. Houck, B. J. Lopresti, L. A. Weissfeld, and C. F. Reynolds. 2004. Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29: 2258-2265.
- Meyer, J. H., N. Ginovart, A. Boovariwala, S. Sagrati, D. Hussey, A. Garcia, T. Young, N. Praschak-Rieder, A. A. Wilson, and S. Houle. 2006. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Archives of general psychiatry* 63: 1209-1216.

- Miczek, K. A., and R. M. de Almeida. 2001. Oral drug self-administration in the home cage of mice: alcohol-heightened aggression and inhibition by the 5-HT_{1B} agonist anpirtoline. *Psychopharmacology* 157: 421-429.
- Middleton, F. A., K. Mirnics, J. N. Pierri, D. A. Lewis, and P. Levitt. 2002. Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 2718-2729.
- Millan, M. J. 2006. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology & therapeutics* 110: 135-370.
- Millan, M. J. 2009. Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6: 53-77.
- Millan, M. J., M. Brocco, A. Gobert, and A. Dekeyne. 2005. Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5-HT_{2C} receptor blockade. *Psychopharmacology* 177: 448-458.
- Millan, M. J., A. Gobert, F. Lejeune, A. Dekeyne, A. Newman-Tancredi, V. Pasteau, J. M. Rivet, and D. Cussac. 2003. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306: 954-964.
- Mineka, S., D. Watson, and L. A. Clark. 1998. Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders. *Annual review of psychology* 49: 377-412.
- Mirnics, K., F. A. Middleton, A. Marquez, D. A. Lewis, and P. Levitt. 2000. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28: 53-67.
- Mitchell, A. J., and H. Subramaniam. 2005. Prognosis of depression in old age compared to middle age: a systematic review of comparative studies. *The American journal of psychiatry* 162: 1588-1601.
- Mohler, H. 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62: 42-53.
- Molteni, R., F. Calabrese, S. Pisoni, C. Gabriel, E. Mocaer, G. Racagni, and M. A. Riva. 2010. Synergistic mechanisms in the modulation of the neurotrophin BDNF in the rat prefrontal cortex following acute agomelatine administration. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 11: 148-153.
- Montejo, A., S. Majadas, S. J. Rizvi, and S. H. Kennedy. 2011. The effects of agomelatine on sexual function in depressed patients and healthy volunteers. *Human psychopharmacology* 26: 537-542.
- Montejo, A. L., N. Prieto, A. Terleira, J. Matias, S. Alonso, G. Paniagua, S. Naval, D. G. Parra, C. Gabriel, E. Mocaer, and A. Portoles. 2010. Better sexual acceptability of agomelatine (25 and 50 mg) compared with paroxetine (20 mg) in healthy male volunteers. An 8-week, placebo-controlled study using the PRSEXDQ-SALSEX scale. *Journal of psychopharmacology* 24: 111-120.

- Montgomery, S. A., and M. Asberg. 1979. A new depression scale designed to be sensitive to change. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 134: 382-389.
- Morgan, C. J., and A. A. Badawy. 1989. Effects of a suppression test dose of dexamethasone on tryptophan metabolism and disposition in the rat. *Biological psychiatry* 25: 359-362.
- MORIN, I. L. e. T. 2006. Facteurs de risque des épisodes dépressifs en population générale In d. é. Direction de la recherche, de l'évaluation et des statistiques [ed.].
- Morley-Fletcher, S., J. Mairesse, A. Soumier, M. Banasr, F. Fagioli, C. Gabriel, E. Mocaer, A. Daszuta, B. McEwen, F. Nicoletti, and S. Maccari. 2011. Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats. *Psychopharmacology* 217: 301-313.
- Mormede, P., S. Andanson, B. Auperin, B. Beerda, D. Guemene, J. Malmkvist, X. Manteca, G. Manteuffel, P. Prunet, C. G. van Reenen, S. Richard, and I. Veissier. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & behavior* 92: 317-339.
- Morozov, A., D. Sukato, and W. Ito. 2011. Selective suppression of plasticity in amygdala inputs from temporal association cortex by the external capsule. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 339-345.
- Moser, M. B., and E. I. Moser. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 608-619.
- Moses-Kolko, E. L., K. L. Wisner, J. C. Price, S. L. Berga, W. C. Drevets, B. H. Hanusa, T. L. Loucks, and C. C. Meltzer. 2008. Serotonin 1A receptor reductions in postpartum depression: a positron emission tomography study. *Fertility and sterility* 89: 685-692.
- Mueller, T. I., R. Kohn, N. Leventhal, A. C. Leon, D. Solomon, W. Coryell, J. Endicott, G. S. Alexopoulos, and M. B. Keller. 2004. The course of depression in elderly patients. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 12: 22-29.
- Murray, F., D. W. Smith, and P. H. Hutson. 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *European journal of pharmacology* 583: 115-127.
- Murrough, J. W., and A. Neumeister. 2011. The serotonin 1B receptor: a new target for depression therapeutics? *Biological psychiatry* 69: 714-715.
- Musazzi, L., M. Milanese, P. Farisello, S. Zappettini, D. Tardito, V. S. Barbiero, T. Bonifacino, A. Mallei, P. Baldelli, G. Racagni, M. Raiteri, F. Benfenati, G. Bonanno, and M. Popoli. 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS one* 5: e8566.
- Nagy, J., K. Zambo, and L. Decsi. 1979. Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid application in the rat. *Neuropharmacology* 18: 573-576.
- Nakagawa, S., J. E. Kim, R. Lee, J. E. Malberg, J. Chen, C. Steffen, Y. J. Zhang, E. J. Nestler, and R. S. Duman. 2002. Regulation of neurogenesis in adult mouse

- hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 3673-3682.
- Nakayama, K. 2002. Effect of paroxetine on extracellular serotonin and dopamine levels in the prefrontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 365: 102-105.
- Nemeroff, C. B. 1998. Psychopharmacology of affective disorders in the 21st century. *Biological psychiatry* 44: 517-525.
- Nemeroff, C. B., E. Widerlov, G. Bissette, H. Walleus, I. Karlsson, K. Eklund, C. D. Kilts, P. T. Loosen, and W. Vale. 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344.
- Neumaier, J. F., D. C. Root, and M. W. Hamblin. 1996. Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT1B mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 15: 515-522.
- Newman, M. E., G. Shalom, A. Ran, E. Gur, and L. D. Van de Kar. 2004. Chronic fluoxetine-induced desensitization of 5-HT1A and 5-HT1B autoreceptors: regional differences and effects of WAY-100635. *European journal of pharmacology* 486: 25-30.
- Nibuya, M., S. Morinobu, and R. S. Duman. 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 7539-7547.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, and R. S. Duman. 1996. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 2365-2372.
- Niehoff, D. L., and M. J. Kuhar. 1983. Benzodiazepine receptors: localization in rat amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3: 2091-2097.
- Nobler, M. S., M. A. Oquendo, L. S. Kegeles, K. M. Malone, C. C. Campbell, H. A. Sackeim, and J. J. Mann. 2001. Decreased regional brain metabolism after ect. *The American journal of psychiatry* 158: 305-308.
- Norman, T. R., I. Cranston, J. A. Irons, C. Gabriel, A. Dekeyne, M. J. Millan, and E. Mocaer. 2012. Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats: a comparison to melatonin and to the 5-HT(2c) antagonist, S32006. *European journal of pharmacology* 674: 27-32.
- Nutt, D. J., and A. L. Malizia. 2001. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 179: 390-396.
- O'Doherty, J. P. 2004. Reward representations and reward-related learning in the human brain: insights from neuroimaging. *Current opinion in neurobiology* 14: 769-776.
- O'Donnell, P., and A. A. Grace. 1995. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical

- input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 3622-3639.
- Oitzl, M. S., M. Fluttert, and E. R. de Kloet. 1994. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *The European journal of neuroscience* 6: 1072-1079.
- Olie, J. P., and S. Kasper. 2007. Efficacy of agomelatine, a MT1/MT2 receptor agonist with 5-HT_{2C} antagonistic properties, in major depressive disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 10: 661-673.
- Olivier, B., and R. van Oorschot. 2005. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. *European journal of pharmacology* 526: 207-217.
- Paizanis, E., T. Renoir, V. Lelievre, F. Saurini, M. Melfort, C. Gabriel, N. Barden, E. Mocaer, M. Hamon, and L. Lanfumey. 2010. Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 13: 759-774.
- Papp, M., P. Gruca, P. A. Boyer, and E. Mocaer. 2003. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28: 694-703.
- Parks, C. L., P. S. Robinson, E. Sibille, T. Shenk, and M. Toth. 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10734-10739.
- Pazos, A., and J. M. Palacios. 1985. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain research* 346: 205-230.
- Pearson, S. D., D. J. Katzelnick, G. E. Simon, W. G. Manning, C. P. Helstad, and H. J. Henk. 1999. Depression among high utilizers of medical care. *Journal of general internal medicine* 14: 461-468.
- Pedigo, N. W., H. I. Yamamura, and D. L. Nelson. 1981. Discrimination of multiple [³H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *Journal of neurochemistry* 36: 220-226.
- Pego, J. M., P. Morgado, L. G. Pinto, J. J. Cerqueira, O. F. Almeida, and N. Sousa. 2008. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. *The European journal of neuroscience* 27: 1503-1516.
- Pesold, C., and D. Treit. 1994. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain research* 638: 295-301.
- Petrov, T., T. L. Krukoff, and J. H. Jhamandas. 1994. Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell and tissue research* 277: 289-295.
- Petty, F., and M. A. Schlessler. 1981. Plasma GABA in affective illness. A preliminary investigation. *Journal of affective disorders* 3: 339-343.

- Petty, F., and A. D. Sherman. 1984. Plasma GABA levels in psychiatric illness. *Journal of affective disorders* 6: 131-138.
- Pignone, M. P., B. N. Gaynes, J. L. Rushton, C. M. Burchell, C. T. Orleans, C. D. Mulrow, and K. N. Lohr. 2002. Screening for depression in adults: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine* 136: 765-776.
- Pineyro, G., and P. Blier. 1999. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacological reviews* 51: 533-591.
- Pineyro, G., N. Castanon, R. Hen, and P. Blier. 1995. Regulation of [3H]5-HT release in raphe, frontal cortex and hippocampus of 5-HT1B knock-out mice. *Neuroreport* 7: 353-359.
- Pittenger, C., and R. S. Duman. 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33: 88-109.
- Plotsky, P. M. 1988. Hypophysiotropic regulation of stress-induced ACTH secretion. *Advances in experimental medicine and biology* 245: 65-81.
- Popa, D., J. Cerdan, C. Reperant, B. P. Guiard, J. P. Guilloux, D. J. David, and A. M. Gardier. 2010. A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *European journal of pharmacology* 628: 83-90.
- Porrino, L. J., A. M. Crane, and P. S. Goldman-Rakic. 1981. Direct and indirect pathways from the amygdala to the frontal lobe in rhesus monkeys. *The Journal of comparative neurology* 198: 121-136.
- Pothuizen, H. H., W. N. Zhang, A. L. Jongen-Relo, J. Feldon, and B. K. Yee. 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *The European journal of neuroscience* 19: 705-712.
- Price, J. L., and W. C. Drevets. 2010. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35: 192-216.
- Prince, M., V. Patel, S. Saxena, M. Maj, J. Maselko, M. R. Phillips, and A. Rahman. 2007. No health without mental health. *Lancet* 370: 859-877.
- Pytliak, M., V. Vargova, V. Mechirova, and M. Felsoci. 2011. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 60: 15-25.
- Quera Salva, M. A., B. Vanier, J. Laredo, S. Hartley, F. Chapotot, C. Moulin, F. Lofaso, and C. Guilleminault. 2007. Major depressive disorder, sleep EEG and agomelatine: an open-label study. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 10: 691-696.
- Raadsheer, F. C., W. J. Hoogendijk, F. C. Stam, F. J. Tilders, and D. F. Swaab. 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60: 436-444.

- Racagni, G., M. A. Riva, R. Molteni, L. Musazzi, F. Calabrese, M. Popoli, and D. Tardito. 2011. Mode of action of agomelatine: synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptors. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 12: 574-587.
- Rainer, Q., L. Xia, J. P. Guilloux, C. Gabriel, E. Mocaer, R. Hen, E. Enhamre, A. M. Gardier, and D. J. David. 2011. Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*: 1-15.
- Rainville, P., G. H. Duncan, D. D. Price, B. Carrier, and M. C. Bushnell. 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 277: 968-971.
- Rajandram, R. K., S. M. Ho, N. Samman, N. Chan, C. McGrath, and R. A. Zwahlen. 2011. Interaction of hope and optimism with anxiety and depression in a specific group of cancer survivors: a preliminary study. *BMC research notes* 4: 519.
- Rajkowska, G., J. J. Miguel-Hidalgo, J. Wei, G. Dilley, S. D. Pittman, H. Y. Meltzer, J. C. Overholser, B. L. Roth, and C. A. Stockmeier. 1999. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological psychiatry* 45: 1085-1098.
- Ramboz, S., R. Oosting, D. A. Amara, H. F. Kung, P. Blier, M. Mendelsohn, J. J. Mann, D. Brunner, and R. Hen. 1998. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14476-14481.
- Rapport, M. M., A. A. Green, and I. H. Page. 1947. Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Federation proceedings* 6: 184.
- Raurich, A., G. Mengod, F. Artigas, and R. Cortes. 1999. Displacement of the binding of 5-HT(1A) receptor ligands to pre- and postsynaptic receptors by (-)pindolol. A comparative study in rodent, primate and human brain. *Synapse* 34: 68-76.
- Redman, J. R., and A. J. Francis. 1998. Entrainment of rat circadian rhythms by the melatonin agonist S-20098 requires intact suprachiasmatic nuclei but not the pineal. *Journal of biological rhythms* 13: 39-51.
- Redman, J. R., B. Guardiola-Lemaitre, M. Brown, P. Delagrangue, and S. M. Armstrong. 1995. Dose dependent effects of S-20098, a melatonin agonist, on direction of re-entrainment of rat circadian activity rhythms. *Psychopharmacology* 118: 385-390.
- Reinhold, J. A., L. A. Mandos, K. Rickels, and F. W. Lohoff. 2011. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. *Expert opinion on pharmacotherapy* 12: 2457-2467.
- Restivo, L., G. Vetere, B. Bontempi, and M. Ammassari-Teule. 2009. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 8206-8214.
- Reul, J. M., J. C. Probst, T. Skutella, M. Hirschmann, I. S. Stec, A. Montkowski, R. Landgraf, and F. Holsboer. 1997. Increased stress-induced adrenocorticotropin

response after long-term intracerebroventricular treatment of rats with antisense mineralocorticoid receptor oligodeoxynucleotides. *Neuroendocrinology* 65: 189-199.

Rex, A., J. P. Voigt, and H. Fink. 2005. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. *The European journal of neuroscience* 22: 1185-1189.

Riad, M., S. Garcia, K. C. Watkins, N. Jodoin, E. Doucet, X. Langlois, S. el Mestikawy, M. Hamon, and L. Descarries. 2000. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *The Journal of comparative neurology* 417: 181-194.

Richardson-Jones, J. W., C. P. Craige, T. H. Nguyen, H. F. Kung, A. M. Gardier, A. Dranovsky, D. J. David, B. P. Guiard, S. G. Beck, R. Hen, and E. D. Leonardo. 2011. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 6008-6018.

Ridderinkhof, K. R., M. Ullsperger, E. A. Crone, and S. Nieuwenhuis. 2004. The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science* 306: 443-447.

Risch, N., R. Herrell, T. Lehner, K. Y. Liang, L. Eaves, J. Hoh, A. Griem, M. Kovacs, J. Ott, and K. R. Merikangas. 2009. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 301: 2462-2471.

Roberson-Nay, R., E. B. McClure, C. S. Monk, E. E. Nelson, A. E. Guyer, S. J. Fromm, D. S. Charney, E. Leibenluft, J. Blair, M. Ernst, and D. S. Pine. 2006. Increased amygdala activity during successful memory encoding in adolescent major depressive disorder: An fMRI study. *Biological psychiatry* 60: 966-973.

Roberto Lewis-Fernández, H. B. S., Yuval Neria et Franklin Schneier. 2010. *Anxiety Disorders: Theory, Research and Clinical Perspectives*, 1st ed. Cambridge University Press.

Rodrigues, S. M., J. E. LeDoux, and R. M. Sapolsky. 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual review of neuroscience* 32: 289-313.

Rudnick, G., and S. C. Wall. 1992. The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1817-1821.

Ruf, B. M., and Z. Bhagwagar. 2009. The 5-HT_{1B} receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. *Current drug targets* 10: 1118-1138.

Russchen, F. T. 1982. Amygdalopetal projections in the cat. I. Cortical afferent connections. A study with retrograde and anterograde tracing techniques. *The Journal of comparative neurology* 206: 159-179.

Sahay, A., and R. Hen. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience* 10: 1110-1115.

Sanchez, M. M., L. J. Young, P. M. Plotsky, and T. R. Insel. 2000. Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 4657-4668.

- Sandberg, R., R. Yasuda, D. G. Pankratz, T. A. Carter, J. A. Del Rio, L. Wodicka, M. Mayford, D. J. Lockhart, and C. Barlow. 2000. Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11038-11043.
- Santana, N., A. Bortolozzi, J. Serrats, G. Mengod, and F. Artigas. 2004. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral cortex* 14: 1100-1109.
- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, and R. Hen. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-809.
- Santé, O. m. d. I. 2001. Rapport sur la santé dans le monde 2001 : La santé mentale : nouvelle conception, nouveaux espoirs, pp. 172. Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse.
- Saper, C. B., T. E. Scammell, and J. Lu. 2005. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437: 1257-1263.
- Sapolsky, R. M. 2000. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological psychiatry* 48: 755-765.
- Sapolsky, R. M. 2003. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochemical research* 28: 1735-1742.
- Sapolsky, R. M. 2004. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biological psychiatry* 56: 137-139.
- Sargent, P. A., K. H. Kjaer, C. J. Bench, E. A. Rabiner, C. Messa, J. Meyer, R. N. Gunn, P. M. Grasby, and P. J. Cowen. 2000. Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Archives of general psychiatry* 57: 174-180.
- Sarhan, H., B. Grimaldi, R. Hen, and G. Fillion. 2000. 5-HT_{1B} receptors modulate release of [³H]dopamine from rat striatal synaptosomes: further evidence using 5-HT moduline, polyclonal 5-HT_{1B} receptor antibodies and 5-HT_{1B} receptor knock-out mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 361: 12-18.
- Sari, Y. 2004. Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28: 565-582.
- Sartorius, N., T. B. Ustun, Y. Lecrubier, and H. U. Wittchen. 1996. Depression comorbid with anxiety: results from the WHO study on psychological disorders in primary health care. *The British journal of psychiatry. Supplement*: 38-43.
- Saudou, F., D. A. Amara, A. Dierich, M. LeMeur, S. Ramboz, L. Segu, M. C. Buhot, and R. Hen. 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* 265: 1875-1878.
- Sausville, E. A., and S. L. Holbeck. 2004. Transcription profiling of gene expression in drug discovery and development: the NCI experience. *European journal of cancer* 40: 2544-2549.
- Sayer, T. J., S. D. Hannon, P. H. Redfern, and K. F. Martin. 1999. Diurnal variation in 5-HT_{1B} autoreceptor function in the anterior hypothalamus in vivo: effect of chronic antidepressant drug treatment. *British journal of pharmacology* 126: 1777-1784.

- Schonberger, M., J. Ponsford, K. R. Gould, and L. Johnston. 2011. The temporal relationship between depression, anxiety, and functional status after traumatic brain injury: a cross-lagged analysis. *Journal of the International Neuropsychological Society* : JINS 17: 781-787.
- Schultz, R. T. 2005. Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. *International journal of developmental neuroscience* : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 23: 125-141.
- Scobie, K. N., B. J. Hall, S. A. Wilke, K. C. Klemenhagen, Y. Fujii-Kuriyama, A. Ghosh, R. Hen, and A. Sahay. 2009. Kruppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 29: 9875-9887.
- Searfoss, G. H., T. P. Ryan, and R. A. Jolly. 2005. The role of transcriptome analysis in pre-clinical toxicology. *Current molecular medicine* 5: 53-64.
- Seckl, J. R., and G. Fink. 1991. Use of in situ hybridization to investigate the regulation of hippocampal corticosteroid receptors by monoamines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40: 685-688.
- Seckl, J. R., K. L. Dickson, C. Yates, and G. Fink. 1991. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNA expression in human postmortem hippocampus. *Brain research* 561: 332-337.
- Seib, L. M., and C. L. Wellman. 2003. Daily injections alter spine density in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience letters* 337: 29-32.
- Sen, S., R. Duman, and G. Sanacora. 2008. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biological psychiatry* 64: 527-532.
- Sequeira, A., and G. Turecki. 2006. Genome wide gene expression studies in mood disorders. *Omics* : a journal of integrative biology 10: 444-454.
- Sequeira, A., T. Klempan, L. Canetti, J. French-Mullen, C. Benkelfat, G. A. Rouleau, and G. Turecki. 2007. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Molecular psychiatry* 12: 640-655.
- Sequeira, A., F. Mamdani, C. Ernst, M. P. Vawter, W. E. Bunney, V. Lebel, S. Rehal, T. Klempan, A. Gratton, C. Benkelfat, G. A. Rouleau, N. Mechawar, and G. Turecki. 2009. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PloS one* 4: e6585.
- Shalon, D., S. J. Smith, and P. O. Brown. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome research* 6: 639-645.
- Sharp, T., S. R. Bramwell, and D. G. Grahame-Smith. 1990. Release of endogenous 5-hydroxytryptamine in rat ventral hippocampus evoked by electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus as detected by microdialysis: sensitivity to tetrodotoxin, calcium and calcium antagonists. *Neuroscience* 39: 629-637.
- Sheline, Y. I. 2000. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biological psychiatry* 48: 791-800.

- Sheline, Y. I., M. Sanghavi, M. A. Mintun, and M. H. Gado. 1999. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 5034-5043.
- Sheline, Y. I., P. W. Wang, M. H. Gado, J. G. Csernansky, and M. W. Vannier. 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3908-3913.
- Sheline, Y. I., D. M. Barch, J. M. Donnelly, J. M. Ollinger, A. Z. Snyder, and M. A. Mintun. 2001. Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biological psychiatry* 50: 651-658.
- Shen, C., H. Li, and E. Meller. 2002. Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT_{1A} agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in rat brain regions. *Neuropharmacology* 42: 1031-1038.
- Shen, H., N. Sabaliauskas, A. Sherpa, A. A. Fenton, A. Stelzer, C. Aoki, and S. S. Smith. 2010. A critical role for alpha4betadelta GABA_A receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science* 327: 1515-1518.
- Shimon, H., G. Agam, R. H. Belmaker, T. M. Hyde, and J. E. Kleinman. 1997. Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *The American journal of psychiatry* 154: 1148-1150.
- Sibille, E., and R. Hen. 2001. Serotonin(1A) receptors in mood disorders: a combined genetic and genomic approach. *Behavioural pharmacology* 12: 429-438.
- Sibille, E., Y. Wang, J. Joeyen-Waldorf, C. Gaiteri, A. Surget, S. Oh, C. Belzung, G. C. Tseng, and D. A. Lewis. 2009. A molecular signature of depression in the amygdala. *The American journal of psychiatry* 166: 1011-1024.
- Siegle, G. J., S. R. Steinhauer, M. E. Thase, V. A. Stenger, and C. S. Carter. 2002. Can't shake that feeling: event-related fMRI assessment of sustained amygdala activity in response to emotional information in depressed individuals. *Biological psychiatry* 51: 693-707.
- Simon, G. E., and M. VonKorff. 1995. Recognition, management, and outcomes of depression in primary care. *Archives of family medicine* 4: 99-105.
- Singh, V. B., E. S. Onaivi, T. H. Phan, and M. C. Boadle-Biber. 1990. The increases in rat cortical and midbrain tryptophan hydroxylase activity in response to acute or repeated sound stress are blocked by bilateral lesions to the central nucleus of the amygdala. *Brain research* 530: 49-53.
- Skorzewska, A., A. Bidzinski, M. Lehner, D. Turzynska, A. Wislowska-Stanek, A. Sobolewska, J. Szyndler, P. Maciejak, E. Taracha, and A. Plaznik. 2006. The effects of acute and chronic administration of corticosterone on rat behavior in two models of fear responses, plasma corticosterone concentration, and c-Fos expression in the brain structures. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 85: 522-534.
- Smith, G. W., J. M. Aubry, F. Dellu, A. Contarino, L. M. Bilezikjian, L. H. Gold, R. Chen, Y. Marchuk, C. Hauser, C. A. Bentley, P. E. Sawchenko, G. F. Koob, W. Vale, and K. F. Lee. 1998. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20: 1093-1102.

- Smolen, P., and J. H. Byrne. 2003. Support of progress in clinical neurology by models of genetic regulation. *Archives of neurology* 60: 1053-1057.
- Sokolski, K. N., J. C. Conney, B. J. Brown, and E. M. DeMet. 2004. Once-daily high-dose pindolol for SSRI-refractory depression. *Psychiatry research* 125: 81-86.
- Sommer, W., C. Moller, L. Wiklund, A. Thorsell, R. Rimondini, H. Nissbrandt, and M. Heilig. 2001. Local 5,7-dihydroxytryptamine lesions of rat amygdala: release of punished drinking, unaffected plus-maze behavior and ethanol consumption. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 24: 430-440.
- Soumier, A., M. Banasr, S. Lortet, F. Masméjean, N. Bernard, L. Kerkerian-Le-Goff, C. Gabriel, M. J. Millan, E. Mocaer, and A. Daszuta. 2009. Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34: 2390-2403.
- Sousa, N., N. V. Lukoyanov, M. D. Madeira, O. F. Almeida, and M. M. Paula-Barbosa. 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97: 253-266.
- Southwick, S. M., M. Vythilingam, and D. S. Charney. 2005. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annual review of clinical psychology* 1: 255-291.
- Sprouse, J. S., and G. K. Aghajanian. 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1: 3-9.
- Squire, L. R., C. E. Stark, and R. E. Clark. 2004. The medial temporal lobe. *Annual review of neuroscience* 27: 279-306.
- Stahl, S. M., M. Fava, M. H. Trivedi, A. Caputo, A. Shah, and A. Post. 2010. Agomelatine in the treatment of major depressive disorder: an 8-week, multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical psychiatry* 71: 616-626.
- Steele, J. D., and S. M. Lawrie. 2004. Segregation of cognitive and emotional function in the prefrontal cortex: a stereotactic meta-analysis. *NeuroImage* 21: 868-875.
- Stein, D. J., A. A. Ahokas, and C. de Bodinat. 2008. Efficacy of agomelatine in generalized anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical psychopharmacology* 28: 561-566.
- Stein, M. B., P. R. Goldin, J. Sareen, L. T. Zorrilla, and G. G. Brown. 2002. Increased amygdala activation to angry and contemptuous faces in generalized social phobia. *Archives of general psychiatry* 59: 1027-1034.
- Stenzel-Poore, M. P., S. C. Heinrichs, S. Rivest, G. F. Koob, and W. W. Vale. 1994. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14: 2579-2584.
- Steward, O. 1976. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *The Journal of comparative neurology* 167: 285-314.

- Stocchi, F., G. Nordera, R. H. Jokinen, U. M. Lepola, K. Hewett, H. Bryson, M. K. Iyengar, and T. Paroxetine Generalized Anxiety Disorder Study. 2003. Efficacy and tolerability of paroxetine for the long-term treatment of generalized anxiety disorder. *The Journal of clinical psychiatry* 64: 250-258.
- Stockmeier, C. A., P. Wingenfeld, and G. A. Gudelsky. 1992. Effects of repeated electroconvulsive shock on serotonin_{1A} receptor binding and receptor-mediated hypothermia in the rat. *Neuropharmacology* 31: 1089-1094.
- Stockmeier, C. A., L. A. Shapiro, G. E. Dilley, T. N. Kolli, L. Friedman, and G. Rajkowska. 1998. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 7394-7401.
- Surget, A., Y. Wang, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, N. Edgar, G. Griebel, C. Belzung, and E. Sibille. 2009. Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34: 1363-1380.
- Tang, J., S. Ko, H. K. Ding, C. S. Qiu, A. A. Calejesan, and M. Zhuo. 2005. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Molecular pain* 1: 6.
- Tardito, D., M. Milanese, T. Bonifacino, L. Musazzi, M. Grilli, A. Mallei, E. Mocaer, C. Gabriel-Gracia, G. Racagni, M. Popoli, and G. Bonanno. 2010. Blockade of stress-induced increase of glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex by agomelatine involves synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptor-dependent pathways. *BMC neuroscience* 11: 68.
- Timpl, P., R. Spanagel, I. Sillaber, A. Kresse, J. M. Reul, G. K. Stalla, V. Blanquet, T. Steckler, F. Holsboer, and W. Wurst. 1998. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nature genetics* 19: 162-166.
- Tischer, R. C., and L. P. Morin. 2003. Reciprocal serotonergic connections between the hamster median and dorsal raphe nuclei. *Brain research* 981: 126-132.
- Tordera, R. M., A. L. Garcia-Garcia, N. Elizalde, V. Segura, E. Aso, E. Venzala, M. J. Ramirez, and J. Del Rio. 2011. Chronic stress and impaired glutamate function elicit a depressive-like phenotype and common changes in gene expression in the mouse frontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol* 21: 23-32.
- Tracey, I. 2007. Neuroimaging of pain mechanisms. *Current opinion in supportive and palliative care* 1: 109-116.
- Treit, D., C. Pesold, and S. Rotzinger. 1993. Noninteractive effects of diazepam and amygdaloid lesions in two animal models of anxiety. *Behavioral neuroscience* 107: 1099-1105.
- Trillat, A. C., I. Malagie, K. Scearce, D. Pons, M. C. Anmella, C. Jacquot, R. Hen, and A. M. Gardier. 1997. Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT_{1B} receptors: in vivo microdialysis studies. *Journal of neurochemistry* 69: 2019-2025.

- Tripp, A., R. S. Kota, D. A. Lewis, and E. Sibille. 2011. Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiology of disease* 42: 116-124.
- Tsien, J. Z. 2000. Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Current opinion in neurobiology* 10: 266-273.
- Tuma, J., J. H. Strubbe, E. Mocaer, and J. M. Koolhaas. 2001. S20098 affects the free-running rhythms of body temperature and activity and decreases light-induced phase delays of circadian rhythms of the rat. *Chronobiology international* 18: 781-799.
- Tuma, J., J. H. Strubbe, E. Mocaer, and J. M. Koolhaas. 2005. Anxiolytic-like action of the antidepressant agomelatine (S 20098) after a social defeat requires the integrity of the SCN. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 545-555.
- Valdizan, E. M., O. Gutierrez, and A. Pazos. 2003. Adenylate cyclase activity in postmortem brain of suicide subjects: reduced response to beta-adrenergic stimulation. *Biological psychiatry* 54: 1457-1464.
- van Haarst, A. D., M. S. Oitzl, J. O. Workel, and E. R. de Kloet. 1996. Chronic brain glucocorticoid receptor blockade enhances the rise in circadian and stress-induced pituitary-adrenal activity. *Endocrinology* 137: 4935-4943.
- Verge, D., G. Daval, M. Marcinkiewicz, A. Patey, S. el Mestikawy, H. Gozlan, and M. Hamon. 1986. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6: 3474-3482.
- Vertes, R. P. 1991. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 313: 643-668.
- Vetulani, J., and I. Nalepa. 2000. Antidepressants: past, present and future. *European journal of pharmacology* 405: 351-363.
- Vialli, M., Erspamer V. 1933. Cellule enterocromaffini e cellule basigranulose acidofile nei Vertebrati. *Z. Zellforsch* 19: 31.
- Vogt, B. A., D. L. Rosene, and D. N. Pandya. 1979. Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. *Science* 204: 205-207.
- Vogt, B. A., L. Vogt, and S. Laureys. 2006. Cytology and functionally correlated circuits of human posterior cingulate areas. *NeuroImage* 29: 452-466.
- Voigt, M. M., D. J. Laurie, P. H. Seeburg, and A. Bach. 1991. Molecular cloning and characterization of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor. *The EMBO journal* 10: 4017-4023.
- Vollenweider, I., K. S. Smith, R. Keist, and U. Rudolph. 2011. Antidepressant-like properties of alpha2-containing GABA(A) receptors. *Behavioural brain research* 217: 77-80.
- Walther, D. J., J. U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink, and M. Bader. 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299: 76.
- Wang, J. W., D. J. David, J. E. Monckton, F. Battaglia, and R. Hen. 2008. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal

granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 1374-1384.

Watanabe, Y., E. Gould, D. C. Daniels, H. Cameron, and B. S. McEwen. 1992. Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *European journal of pharmacology* 222: 157-162.

Weisberg, R. B., I. Dyck, L. Culpepper, and M. B. Keller. 2007. Psychiatric treatment in primary care patients with anxiety disorders: a comparison of care received from primary care providers and psychiatrists. *The American journal of psychiatry* 164: 276-282.

Wellman, C. L. 2001. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *Journal of neurobiology* 49: 245-253.

Wittchen, H. U., S. Muhlig, and K. Beesdo. 2003. Mental disorders in primary care. *Dialogues in clinical neuroscience* 5: 115-128.

Wittchen, H. U., K. Beesdo, A. Bittner, and R. D. Goodwin. 2003. Depressive episodes--evidence for a causal role of primary anxiety disorders? *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 18: 384-393.

Wittchen, H. U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon, and H. C. Steinhausen. 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21: 655-679.

Wong, M. L., and J. Licinio. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nature reviews. Neuroscience* 2: 343-351.

Yamada, M., and T. Higuchi. 2002. Functional genomics and depression research. Beyond the monoamine hypothesis. *Eur Neuropsychopharmacol* 12: 235-244.

Zajecka, J., A. Schatzberg, S. Stahl, A. Shah, A. Caputo, and A. Post. 2010. Efficacy and safety of agomelatine in the treatment of major depressive disorder: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical psychopharmacology* 30: 135-144.

Zhang, X., R. R. Gainetdinov, J. M. Beaulieu, T. D. Sotnikova, L. H. Burch, R. B. Williams, D. A. Schwartz, K. R. Krishnan, and M. G. Caron. 2005. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45: 11-16.

Zhao, X., E. S. Lein, A. He, S. C. Smith, C. Aston, and F. H. Gage. 2001. Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *The Journal of comparative neurology* 441: 187-196.

Zhuang, X., C. Gross, L. Santarelli, V. Compan, A. C. Trillat, and R. Hen. 1999. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21: 52S-60S.

Zhuo, M. 2008. Cortical excitation and chronic pain. *Trends in neurosciences* 31: 199-207.

Zifa, E., and G. Fillion. 1992. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacological reviews* 44: 401-458.

Zimmerman, M., W. McDermt, and J. I. Mattia. 2000. Frequency of anxiety disorders in psychiatric outpatients with major depressive disorder. *The American journal of psychiatry* 157: 1337-1340.

Zirlinger, M., G. Kreiman, and D. J. Anderson. 2001. Amygdala-enriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5270-5275.

Zung, W. W. 1971. A rating instrument for anxiety disorders. *Psychosomatics* 12: 371-379.

Zupancic, M., and C. Guilleminault. 2006. Agomelatine: a preliminary review of a new antidepressant. *CNS drugs* 20: 981-992.