



**HAL**  
open science

# Pathogénicité du stress chronique chez l'adulte dans un modèle murin : impact à long terme et rôle de la somatostatine

Thomas Prévot

► **To cite this version:**

Thomas Prévot. Pathogénicité du stress chronique chez l'adulte dans un modèle murin : impact à long terme et rôle de la somatostatine. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0321 . tel-01275789

**HAL Id: tel-01275789**

**<https://theses.hal.science/tel-01275789>**

Submitted on 18 Feb 2016

**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.

# **THESE**

Présentée à

## **L'Université de Bordeaux**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Par

**Thomas Prévôt**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR**

Spécialité Neurosciences

---

# Pathogénicité du stress chronique chez l'adulte dans un modèle murin : Impact à long terme et rôle de la somatostatine

---

Thèse soutenue le 15 Décembre 2015

### **Après avis de :**

Mme Catherine BELZUNG (Pr., INSERM 930 Univ. Tours, Inst. Univ. de France)

Mr Jean-Louis MILLOT (Pr. EA 481, Univ. Franche-Comté)

### **Devant la commission d'examen composée de :**

Mme Catherine BELZUNG (Pr., INSERM 930, Institut Univ. de France)..... Rapporteur

Mr Jean-Louis MILLOT (Pr. EA 481, Univ. Franche-Comté)..... Rapporteur

Mr Daniel BERACOCHEA (DR, UMR CNRS 5287, Univ. Bordeaux) ..... Examineur

Mr Jean-Philippe GUILLOUX (MCU, UMRS INSERM 1178, Univ. Paris-Sud). Examineur

Mme Cécile VIOLLET (DR, UMR INSERM 894, Univ. Paris-Descarte)..... Examineur

Mr Jean-Louis GUILLOU (Pr. UMR CNRS 5287, Univ. Bordeaux) ..... Directeur de thèse

Mr Jacques EPELBAUM (Pr. UMR INSERM 894, Univ. Paris-Descarte)..... Président du jury

2015



## Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (CNRS UMR-5287) dirigé par Jean-René Cazalets à l'Université de Bordeaux, sous la direction du Pr Jean-Louis Guillou. Le financement de ces travaux a été attribué à hauteur de 50% par la région Aquitaine et à 50% par une subvention de l'ADERA issue de contrats d'origine industrielle. Cette thèse a fait l'objet d'une publication soumise et d'une publication en cours de préparation ainsi que de deux communications affichées. A titre indicatif, une collaboration antérieure faisant l'objet d'une publication a été ajoutée à la liste des publications.

### **Publications :**

**Thomas D. Prévôt**, François Gastambide, Cécile Viollet, Christophe Tronche, Nadia Henkous, Guillaume Martel, Jacques Epelbaum, Daniel Béracochéa and Jean-Louis Guillou (2015) Roles of hippocampal somatostatin receptor subtypes in stress response and emotionality. *Biol. Psychiatry*, *soumis*

**Thomas D. Prévôt**, Cécile Viollet, Jacques Epelbaum, Daniel Béracochéa and Jean-Louis Guillou (2016) Long term impact of chronic stress on emotional and cognitive aging : involvement of sst2 somatostatin receptor subtypes, *Hormone and Behavior*, *En préparation*

Dagnas M, Guillou JL, **Prevot T**, Mons N (2013) HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *J Neurosci* 33:1954-1963.

### **Communications affichées :**

**Thomas D. Prévôt**, Nadia Henkous, Daniel Béracochéa and Jean-Louis Guillou. Impact of Unpredictable Chronic Mild Stress at Different Stages of the Adult Mice – *12ième colloque de la Société Française des Neurosciences* – Montpellier 19 au 22 Mai 2015

**Thomas D. Prévôt**, Nadia Henkous, Daniel Béracochéa and Jean-Louis Guillou, (2014) Impact of Unpredictable Chronic Mild Stress at Different Stages of the Adult Life in Mice - *Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé* – Arcachon, 11 Avril 2014

## Remerciements

Je voudrais remercier le Dr. Jean-René CAZALET, directeur de l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire depuis mon stage de Master 1.

Je remercie le Pr Catherine BELZUNG ainsi que le Pr Jean-Louis MILLOT pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit, ainsi que le Dr Jean-Philippe GUILLOUX et le Dr Cécile VIOLLET pour avoir examiné ce travail le jour de la soutenance. Je remercie également le Dr Jacques EPELBAUM de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je suis très reconnaissant de l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit ainsi que de leurs remarques pertinentes et constructives.

Je tiens bien entendu à remercier mon directeur de thèse, le Pr Jean-Louis GUILLOU, pour m'avoir encadré depuis mon stage de Master 1, puis pour m'avoir accompagné sur le plan professionnel et humain tout au long de ces 3 années de thèse. Un grand Merci pour l'ensemble des discussions que nous avons pu avoir, du soutien et de toute l'aide qu'il a pu m'apporter tout au long de cette thèse (et même avant), aussi bien dans les rédactions que dans les préparations d'oraux. Je le remercie particulièrement pour m'avoir permis de participer aux enseignements en tant que vacataire, un point qui me tenait énormément à cœur. Je garderai un très bon souvenir de ces presque 5 années passées ensemble, qui nous ont permis de nouer un lien qui, je l'espère, saura perdurer malgré mon départ vers de nouveaux horizons.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble de l'équipe « Interactions entre émotions et systèmes de mémoire », nouvellement rebaptisée MINDS (Memory Interaction Networks, Drugs and Stress). Je remercie tout d'abord son directeur, Daniel BERACOCHEA, sans qui cette thèse n'aurait pas eu de financement. Un grand Merci pour sa participation à l'élaboration du projet et pour sa disponibilité. Un immense Merci à Nicole MONS, pour sa contribution sur le projet en nous amenant des aspects plus moléculaires, pour m'avoir appris les bases d'immunohistochimie, pour son aide dans la préparation du manuscrit et de l'oral. Merci aussi aux autres membres de l'équipe : à Vincent DAVID, pour son aide durant cette thèse, sa disponibilité, sa bonne humeur ; à Jacques MICHEAU ; à Marc CORIO, pour toutes ces interactions, scientifiques ou non. Merci aux étudiants de l'équipe : Malorie, Gaëlle, Pierre, ainsi qu'à Marianne (post doc) et à Nadia Henkous, Laurence Decorte et Ali Krazem pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté.

Je tiens également à remercier le personnel administratif et animalier du bâtiment B2. Merci à Marie-Laure ROUSSEAU pour sa bonne humeur, son efficacité et sa patience. Merci à Dominique PANZERI, Nathalie ARGENTA et Elodie POINAMA qui ont pris le plus grand soin de mes animaux pendant toutes ces années.

J'en arrive maintenant à faire des remerciements plus personnels. Comment faire des remerciements sans te remercier toi, Pierre FAUCH' ! Dupond ... on se connaît depuis maintenant 4 ans ! Résumer tout ça en quelques lignes est difficile, et je ne peux décemment pas écrire plus sur toi que sur le sujet de cette thèse, même s'il y a matière à le faire ! Ces années de boulot avec toi ont été géniales, pleines de conneries, de rigolades, de café, de blagues (dont je pense une certaine Marianne H en gardera une trace). Tu auras été l'acolyte idéal durant ces dernières années, un soutien indéfectible et il est certain que tu me manqueras une fois que je serai parti au Canada. Pour tous ces bons moments : Merci.

Deuxième colocataire du bureau 309, Marianne H. Toi qui nous as abandonné la première je te remercie quand même pour ta bonne humeur, et surtout ta patience ! J'avoue que j'ai apprécié t'embêter toutes ces années ... scotcher ton clavier sous ton bureau, faire un copié-collé de ton bureau d'ordi sans les raccourcis, et toutes ces petites blagues (mais je n'étais pas tout seul). J'espère qu'on sera amené à bosser à nouveau ensemble car j'ai apprécié théoriser avec toi, aussi bien en neurosciences, que sur la théorie de la relativité, ou sur les yeux du sphinx ... En tout cas, merci pour tout et saches que, où que j'aille, je passerai toujours par l'escalier !

Cloclo, ou Bouclette, petite parisienne romantique du XVII<sup>ème</sup>, venue en province, toi aussi je te remercie pour ton soutien toutes ces années, même si tu es partie pour un autre labo en cours de route ! On aura passé de super moments ensemble, les kinder-time, les sessions de tennis, puis de bad avec Marianne H. Qui prendra des photos de toi pour immortaliser tes « siestes » à chaque déplacement en voiture ? J'espère pouvoir assister à ta soutenance l'année prochaine. Toi et ton toc de géolocalisation me manquez mais tu viendras rapidement me rejoindre au Canada, je compte sur toi.

Laurent et Malorie, je vous remercie tous les deux car vous avez été les premiers à tout m'apprendre dans le labo, à me montrer comment mettre les barres d'oreilles, où trouver le matériel, m'apprendre les bons tuyaux. J'aurai aimé pouvoir travailler davantage avec vous deux, car tout le monde reconnaît votre talent et votre gentillesse. Malo, je penserai à toi pour mes prochaines chirurgies, en me rappelant quand on écoutait la radio en hallucinant sur les paroles !

Nicole, je t'ai remercié professionnellement plus haut mais je ne pouvais pas omettre de te laisser un petit mot plus léger ici. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, ton aide aura été précieuse durant ces dernières années. Merci d'avoir été là chaque matin pour le café, merci quand même d'avoir un côté d'emmerd\*\*\* qu'on aime tant, notre Kalach'Nicole, et d'avoir été notre gitane du café. Je compte sur toi pour prendre soin de Pierre en mon absence.

Virginie, Angélique et les Fabien, je vous remercie aussi pour tous ces bons moments passés ensemble. Vous êtes aussi parti du B2 trop tôt, mais nous aurons tout de même bien rit tous ensemble. Je remercie aussi l'ensemble des stagiaires qui ont travaillé avec moi, Xavier, Marie, Bertrand, Nouhad, Fanny, Marianne, Aurélien, Aurélie, Pauline et Maylis. Je remercie aussi l'ensemble des chercheurs et enseignants-chercheurs du labo que j'ai pu côtoyer durant ces années.

Enfin, je voudrais remercier certaines personnes appartenant à d'autres mondes que celui du laboratoire. Merci à Laurence Hiroux-Chevillot pour toutes ces années d'amitié (bientôt 8 ans déjà !) avec qui j'ai pu passer du temps certains midis pour discuter science (ou pas). Merci à Mary et Lorraine, mes amies de toujours qui m'ont soutenu malgré la distance qui nous sépare depuis déjà longtemps ... Merci à ma famille, mes parents, mes sœurs, mes frères, mes neveux et nièces pour m'avoir accompagné dans cette aventure de la thèse et de m'avoir encouragé pour en arriver jusque là. Enfin, merci à Guillaume, pour tout, son soutien et sa patience surtout ces derniers mois.

## Résumé

Le stress a une fonction adaptative mais son influence délétère sur la santé physique, cognitive et mentale lorsqu'il se présente de façon excessive et/ou chronique est aujourd'hui reconnue. De très nombreux travaux ont démontré que le jeune enfant, l'adolescent et le sujet âgé y sont particulièrement vulnérables. L'objectif de cette thèse a été de déterminer s'il existe une sensibilité au stress chronique chez l'adulte selon l'âge au moment de l'exposition. Le modèle de stress chronique léger et imprédictible mis au point chez la souris a été utilisé. Les impacts à court et long-terme (sujet âgé), ont été déterminés en analysant les troubles somatiques, hédoniques, anxieux, dépressifs et cognitifs, caractéristiques du syndrome de stress. Contrairement à l'idée selon laquelle l'adulte serait plus résistant et plus résilient aux perturbations induites par le stress, les résultats de cette thèse démontrent qu'une période de stress à l'âge adulte produit des effets délétères drastiques non seulement immédiats mais également à long terme. Toutefois, l'adulte d'âge moyen serait plus résistant et plus résilient relativement aux adultes jeunes ou d'âge avancé qui présentent une symptomatologie plus marquée. La sévérité des symptômes anxieux initialement générés par le stress est corrélée à la fois avec la persistance des troubles et la modification des marques de répression génique dans l'hippocampe indiquant la présence d'une signature épigénétique de l'épisode de stress à long terme. Des études récentes ont suggéré l'implication de la somatostatine centrale dans les régulations émotionnelles et relie la vulnérabilité au stress chronique des neurones somatostatinerigiques avec le développement de troubles anxio-dépressifs. Les résultats de cette thèse ont permis d'identifier l'inhibition à la fois de l'axe HPA et des comportements anxio-dépressifs par les récepteurs sst2 et sst4 de l'hippocampe. Les profils comportementaux induits par l'utilisation d'agonistes sélectifs ou par la délétion de ces deux récepteurs suggèrent l'existence de deux voies de régulation interagissant respectivement avec les systèmes sérotoninergique (voie sst2) et noradrénergique (voie sst4), l'une régulant principalement l'état anxieux, l'autre les désordres dépressifs et cognitifs. Ainsi, cette thèse étaye l'importance de la pathogénicité du stress chronique chez l'adulte et l'importance des régulations neuroendocriniennes et cognitivo-émotionnelles par les récepteurs sst2 et sst4, une spécificité qui doit être prise en considération dans l'utilisation et le développement des traitements somatostatinerigiques ciblant les dérèglements de l'axe HPA et l'atteinte des fonctions centrales qui en résultent.



## Abstract

Stress has an adaptive function but it can have also deleterious effects on physical, cognitive and mental health when its intensity and/or chronicity increase. A large body of evidence supports the idea that young children, adolescents and aged people are highly sensitive to stress. The aim of this study was to determinate if a critical period of sensitivity to stress may be evidenced during adulthood. The Unpredictable Chronic Mild Stress protocol developed in the mouse was used. Short and long-term impacts of stress were quantified by assessing somatic, hedonic, anxious, depressive and cognitive troubles which are characteristic of a stress syndrome. Unlike the view that adults are resistant and resilient to stress, the results presented in this thesis show that a stress period during adulthood induces immediate and long-lasting deleterious effects. However, middle-aged adults were more resistant and more resilient than younger or older subjects which both displayed a more severe symptomatology. The anxiety level initially induced by chronic stress is correlated with the persistence of troubles and with modifications of gene repression marks in the hippocampus, indicating the presence of an epigenetic signature of the chronic stress episode in the long-term. Recent studies have suggested that central somatostatin is involved in emotional regulations, linking the vulnerability of somatostatinergic neurons to chronic stress with the instatement of anxio-depressive disorders. We showed herein that hippocampal sst2 and sst4 receptor subtypes mediate the inhibition of HPA axis and improve anxio-depressive behaviors. Behavioral patterns induced by either selective agonists or deletions of these receptors suggest that two regulatory pathways respectively interact with the serotonergic system (sst2) and the noradrenergic system (sst4). In addition, sst2 receptors mainly regulate anxiety whereas sst4 is mainly involved in the regulation of cognitive and depressive disorders. As a whole, this thesis corroborates the idea that chronic stress has pathogenic effects even in adulthood and highlights the importance of neuroendocrine and cognitivo-emotional regulations by sst2 and sst4 receptor subtypes, a specificity that has to be considered in the use and the development of somatostatin treatments targeting HPA deregulations and stress-related disorders.

# Sommaire

Liste des abréviations .....	15
Liste des figures .....	16
Liste des tableaux .....	20
INTRODUCTION GENERALE.....	23
Notions d'Emotions.....	27
1. Définition .....	27
2. Théories des Emotions .....	27
a. Fondements Historiques .....	27
b. Les Grands Courants Théoriques.....	29
3. Neurobiologie des Emotions .....	30
Neuropsychobiologie du Stress .....	33
1. Le concept de stress.....	33
2. Physiologie et supports anatomiques du stress .....	35
a. L'Axe HPA et les Neuropeptides.....	35
b. Régulation de l'axe HPA .....	37
3. Les glucocorticoïdes.....	39
a. Biosynthèse et circulation .....	39
b. Récepteurs.....	41
c. Mécanisme d'action des GC .....	42
4. Du stress normal à la pathologie .....	45
a. Stress normal : action sur les fonctions cognitives et émotionnelles .....	45
b. Stress pathologiques et conséquences neurobiologiques .....	47
Les Troubles Dépressifs .....	51
1. Historique .....	51
2. Sémiologie et Epidémiologie .....	53
a. Sémiologie, classification et identification des troubles .....	53
b. Epidémiologie .....	54
3. Etiologie, facteurs prédictifs de la dépression.....	56
a. Facteurs extrinsèques .....	56
b. Facteurs Intrinsèques .....	57
4. Neurobiologie de la dépression majeure .....	60
a. Hypothèse monoaminergique.....	61

b.	Hypothèse du dysfonctionnement de l'axe HPA.....	64
c.	Hypothèse de la neuroplasticité.....	66
d.	Hypothèse GABAergique.....	67
e.	Autres hypothèses.....	67
5.	Altérations mnésiques et structurelles de la dépression majeure.....	68
a.	Les systèmes de mémoire.....	68
b.	Mémoire altérée dans la dépression majeure.....	70
c.	Structures cérébrales altérées dans la dépression majeure.....	71
6.	Modèles animaux de la dépression.....	75
a.	Induction Génétique.....	75
b.	Induction Expérimentale/Environnementale.....	76
	La Somatostatine.....	81
1.	Le Système Somatostatinergique.....	81
a.	Les cinq peptides.....	81
b.	Distribution.....	82
c.	Les interneurons à Somatostatine : microcircuit.....	84
d.	Les neurones à Somatostatine : projections longues.....	86
2.	Les récepteurs.....	87
a.	Identification et localisation cérébrales.....	87
b.	Mode d'action des récepteurs à la SST.....	89
3.	Fonctions Biologiques de la Somatostatine.....	90
4.	Stress, Dépression et Somatostatine.....	91
	Objectif de l'étude.....	94
	MATERIELS ET METHODES.....	97
	Modèles animaux.....	99
1.	Lignées.....	99
2.	Hébergement.....	100
3.	Sevrage et Génotypage.....	100
4.	Stress Chronique.....	102
	Evaluations Physiques et Comportementales.....	104
1.	Evaluations somatiques.....	104
2.	Evaluations émotionnelles.....	104
a.	Evaluation de l'état d'Anxiété.....	104
b.	Evaluation de l'état de type-dépressif.....	106

3. Evaluations Cognitives.....	109
4. Activité locomotrice.....	114
Microdialyse Intrahippocampique.....	115
1. Chirurgie Stéréotaxique.....	115
2. Microdialyse intra-hippocampique chez la souris vigile.....	115
3. Traitement pharmacologique.....	117
Immunohistochimie et Biologie Moléculaire.....	118
1. Prélèvements de sang et de tissus.....	118
2. Contrôles histologiques.....	119
3. Immunohistochimie.....	119
a. Préparation des coupes de cerveau au Cryostat.....	119
b. Immunohistochimie.....	119
c. Comptage de noyaux immuno-positifs.....	120
4. Quantification de la corticostérone par ELISA.....	121
Analyses Statistiques.....	121
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>125</b>
Chapitre I : L'émergence des troubles associés au stress chronique est dépendante de l'âge du sujet.....	127
Introduction.....	129
Méthodologie.....	131
Résultats expérimentaux.....	134
1. Effets du SCLI à différents âges adultes et chez le sujet âgé.....	134
a. Taux de corticostérone plasmatiques.....	134
b. Evaluations somatiques.....	136
c. Evaluations des troubles de type dépressif.....	137
d. Evaluations des troubles de type anxieux.....	143
e. Evaluations cognitives.....	146
2. Synthèse des Résultats.....	147
a. Une émergence hiérarchique des troubles induits par le SCLI selon l'âge.....	147
b. Stress chronique chez l'adulte : modèle de vieillissement accéléré.....	150
Discussion.....	151
Chapitre II: Le Stress Chronique rencontré à l'âge adulte entraine des perturbations comportementales à long terme et influence les mécanismes épigénétiques.....	157
Introduction.....	159

Méthodologie .....	160
Résultats expérimentaux .....	162
1. Le SCLI chez l'adulte entraîne une persistance de troubles émotionnels chez le sujet âgé.162	
a. Dosage de corticostérone .....	162
b. Evaluations des troubles de type dépressif.....	163
c. Evaluation des troubles de type anxieux.....	167
d. Conclusion .....	168
2. Le SCLI chez l'adulte altère l'acquisition d'une carte spatiale et affecte la mémoire associative .....	169
a. Evaluations mnésiques en piscine de Morris .....	169
b. Evaluation de la mémoire associative dans une tâche de conditionnement opérant.....	172
a. Conclusion .....	175
3. Le SCLI rencontré à l'âge adulte entraîne des modifications épigénétiques durables en fonction de l'âge du sujet (résultats préliminaires) .....	177
Discussion .....	181
Chapitre III : Implication de la Somatostatine hippocampique dans la régulation de l'axe HPA et des comportements de type anxieux et dépressifs .....	187
Introduction .....	189
Méthodologie .....	190
Résultats et conclusion .....	192
Chapitre IV : Le récepteur sst2 intervient essentiellement dans les régulations de l'état anxieux .....	231
Introduction .....	233
Méthodologie .....	234
Résultats Expérimentaux.....	236
b. Evaluations somatiques et mesures des taux de corticostérone plasmatique .....	236
c. Evaluation de l'hyperhédonie .....	238
d. Evaluations des troubles de type dépressif.....	239
e. Evaluations des troubles de type anxieux.....	241
f. Evaluations des troubles cognitifs.....	243
g. Analyse comportementale .....	244
Discussion .....	247
DISCUSSION GENERALE .....	253
1. La sévérité du syndrome de stress chronique chez l'adulte dépend de l'âge du sujet	255

a.	Les troubles constants générés par un épisode de stress chronique .....	255
b.	Les troubles rencontrés de manière sporadique après un épisode de stress chronique ...	257
c.	Particularités des troubles induits par le stress chez le sujet âgé.....	258
d.	Conclusion .....	259
2.	Le stress chronique rencontré à l'âge adulte entraine des perturbations comportementales à long terme et est associé à l'installation durable de marques épigénétiques.....	260
a.	La persistance/rémission de l'atteinte émotionnelle à long terme est influencée par la sévérité de l'atteinte anxieuse chez l'adulte.....	260
b.	Effets à long terme du stress chronique sur les capacités d'apprentissage spatial et associatif.....	262
c.	Le stress chronique chez le sujet adulte entraine des modifications de la marque répressive retrouvée chez le sujet âgé .....	262
d.	Conclusion .....	263
3.	La SST hippocampique joue un rôle sur la régulation de l'axe HPA et les comportements de type anxieux et dépressif, via une action différentielle des récepteurs sst2 et sst4.....	264
a.	Implication des récepteurs sst2 et sst4 hippocampiques dans l'inhibition de l'axe HPA et les régulations émotionnelles.....	265
b.	Le récepteur sst2 est impliqué dans les phénomènes de résistance à l'installation de troubles anxieux .....	267
c.	Conclusion .....	268
4.	Conclusion Générale et Perspectives .....	268
	ANNEXES .....	271
	Références Bibliographiques.....	285

## Liste des abréviations

11 $\beta$ -HSD : 11- $\beta$ - hydroxystéroïde déhydrogénase  
ACTH : Hormone corticotrope  
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BWT : Beam walking test  
CA : Corne d'Ammon  
CBG : Transcortine  
CORT : Corticostérone  
CRH : Corticolibérine  
CST : Cortistatine  
EPM: Elevated Plus Maze  
FST : Nage forcée de Porsolt  
GABA : Acide gamma-aminobutyrique  
GC : Glucocorticoïde  
GD : Gyrus denté  
GR : Récepteurs aux Glucocorticoïdes  
H3K27 : Histone H3, Lysine 27  
H3K27me3 : Triméthylation d'H3K27  
HPA: Hypothalamo-Pituitaire-Adrénalien  
HPC : Hippocampe  
i.c.v. : Intra cérébroventriculaire  
ISRN : Inhibiteur sélectif de la recapture de la Noradrénaline  
ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture de la Sérotonine  
ITI : Intervalle inter-essais  
MR : Récepteurs aux Minéralocorticoïdes  
NST : Neuronostatine  
OF : Open-field  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PFC : Cortex préfrontal  
PVN : Noyau paraventriculaire  
SCLI : Stress Chronique Léger Imprédictible  
SERT : Transporteur de la sérotonine  
SST : Somatostatine  
TST: Tail Suspension Test  
VTA : Aire Tegmentale Ventrale  
WT : Wild-type

## Liste des figures

Figure 1: La Roue des Emotions de Plutchik .....	28
Figure 2 : Le circuit de Papez.....	30
Figure 3 : Le cerveau triunique de MacLean.....	31
Figure 4 : L'axe corticotrope .....	36
Figure 5 : Rythmicité des concentrations en cortisol chez l'Homme sur une journée .....	38
Figure 6 : Biosynthèse des glucocorticoïdes .....	39
Figure 7 : Mécanisme d'activation et d'inactivation du cortisol .....	40
Figure 8 : Répartition des récepteurs MR et GR dans un cerveau de rat.....	41
Figure 9 : Mécanisme d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes .....	43
Figure 10 : Evolution temporelle de la réponse aux hormones de stress.....	44
Figure 11 : Courbe de Yerkes-Dodson représentant les performances lors d'une tâche mnésique en fonctions du niveau de stress.....	46
Figure 12 : Variation d'arborisation dendritique des neurones des cortex préfrontal et orbitofrontal, de l'amygdale et de l'hippocampe après un stress chronique .....	48
Figure 13 : Différence de ré-arborisation dendritique après un stress chronique dans le PFC.....	49
Figure 14 : Modifications structurelles de régions cérébrales impliquées dans la réponse au stress ....	50
Figure 15 : Incidence des épisodes de dépressions en fonction de l'âge.....	55
Figure 16 : Structure de la chromatine et modifications épigénétiques des histones .....	59
Figure 17 : Innervation des neurones monoaminergiques au niveau du système nerveux central .....	61
Figure 18 : Modifications de l'axe HPA en cas de dépression majeure.....	64
Figure 19 : Taux de cortisol chez patients dépressifs jeunes et âgés jusqu'à 12h après le réveil.....	65
Figure 20 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire à long terme .....	70
Figure 21 : Modification de l'activité physiologique en cas de troubles dépressifs dans le cortex préfrontal chez l'Homme.....	72
Figure 22 : Modifications cellulaires engendrées par le stress et la dépression au niveau de l'hippocampe .....	73
Figure 23 : Variation d'activité en cas de troubles dépressifs dans l'amygdale .....	74
Figure 24 : Modèles animaux de la dépression chez le rongeur.....	77
Figure 25 : Structure de la somatostatine .....	81
Figure 26 : Représentation schématique des 5 peptides somatostatinerigiques, du gène à la protéine ..	82
Figure 27 : Représentation schématique de la distribution de la SST et de la CST dans le cerveau de souris .....	83
Figure 28 : Double immuno-marquage de cortex visuel de souris adulte montrant la colocalisation des neurotransmetteurs GABA et SST. ....	84
Figure 29 : Distribution des interneurons à SST dans le cortex et l'hippocampe de souris adulte <i>SST-Ires-Cre :: RCE-loxP</i> .....	84
Figure 30 : Schéma d'innervation des interneurons à SST sur les cellules pyramidales de l'hippocampe et du néocortex (B) .....	85
Figure 31 : Représentation schématique de la répartition des récepteurs à la SST .....	87
Figure 32 : Localisation des récepteurs <i>sst2</i> (à gauche) et <i>sst4</i> (à droite) par marquage immunofluorescent dans l'hippocampe de souris .....	88
Figure 33 : Cascade de signalisation engendrée par la fixation de SST sur son récepteur.....	89
Figure 34 : Représentation schématique de l'équivalence en âge entre la souris C57BL/6J et l'Homme .....	99

Figure 35 : Identification des génotypes rencontrés chez les animaux transgéniques pour le récepteur SST2.....	101
Figure 36 : Représentation schématique du labyrinthe en croix surélevé.....	104
Figure 37 : Modélisation du test de la nage forcée de Porsolt.....	106
Figure 38 : Modélisation du test de suspension par la queue.....	107
Figure 39 : Représentation des différentes phases du protocole d'alternance dans le labyrinthe en T.....	109
Figure 40 : Schéma du protocole en piscine de Morris avec les zones virtuelles dessinées via le logiciel de tracking.....	111
Figure 41 : Schéma de l'appareil de conditionnement opérant.....	113
Figure 42 : Schéma de l'appareil du Beam Walking test.....	114
Figure 43 : Schématisation du fonctionnement de la microdialyse / microdialyse inverse.....	116
Figure 44 : Schéma de prélèvement sous mandibulaire chez la souris vigile.....	118
Figure 45 : Implantation unilatérale d'une sonde de microdialyse dans le CA1.....	119
Figure 46 : Modèle développemental et dégénératif des altérations liées au stress.....	130
Figure 47 : Chronologie expérimentale du SCLI et des évaluations réalisées.....	132
Figure 48 : Concentration basale de corticostérone plasmatique en fonction de l'âge des animaux et de leur condition de SCLI.....	134
Figure 49 : Ratio des taux de corticostérone en réponse à un SCLI en fonction de l'âge chez la souris adulte et âgée.....	135
Figure 50 : Variations somatiques observables après un protocole de SCLI sur le poids et l'état du pelage chez des souris adultes et des souris âgées.....	136
Figure 51 : Consommation préférentielle de saccharose suite à un stress chronique en fonction de l'âge chez des souris adultes et âgées.....	138
Figure 52 : Latence d'immobilisation dans le test de Nage Forcée de Porsolt chez des animaux adultes et âgés.....	139
Figure 53 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris adulte et âgée dans un test de Nage Forcée de Porsolt.....	140
Figure 54 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris adulte et la souris âgée dans un test de Tail suspension-test.....	142
Figure 55 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris adulte et la souris âgée dans un test de Labyrinthe en Croix Surélevé.....	143
Figure 56 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris adulte et la souris âgée dans un test d'Exploration libre.....	145
Figure 57 : Evaluation comportementale des troubles de mémoire de travail chez la souris adulte et la souris âgée dans un test d'alternance spontanée en T-maze.....	146
Figure 58 : Représentation des profils comportementaux de souris adultes et âgées en fonction de l'âge d'exposition au SCLI.....	148
Figure 59 : Comparaison de profils comportementaux issus de 2 classes d'âge différentes.....	150
Figure 60 : Schéma hypothétique de l'évolution des troubles de l'anxiété liés au stress chronique en fonction de l'âge.....	152
Figure 61 : Schéma hypothétique de l'émergence des troubles de mémoire de travail liés au stress chronique en fonction de l'âge.....	153
Figure 62 : Chronologie expérimentale des évaluations réalisées à long terme.....	161
Figure 63 : Activité basale de l'axe HPA sur la corticostérone plasmatique chez des animaux âgés de 18 mois en fonction de leur condition de SCLI et de leur âge au moment du SCLI.....	162
Figure 64 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris âgée en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI dans un test de Nage Forcée de Porsolt.....	163

Figure 65 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés dans le test de Nage Forcée de Porsolt chez la souris âgée.....	164
Figure 66 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris âgée en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI dans un test de TST.....	165
Figure 67 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés lors d'un test de TST chez la souris âgée.....	166
Figure 68 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris âgée dans un Labyrinthe en Croix Surélevé.....	167
Figure 69 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés dans un test en Labyrinthe en Croix Surélevé chez la souris âgée.....	168
Figure 70 : Latences moyennes à rejoindre la plateforme sur les 6 essais de l'apprentissage indicé chez des animaux âgés de 18 mois, en fonction leur condition de SCLI et de l'âge d'occurrence du SCLI.....	169
Figure 71 : Acquisition de l'information spatiale au cours des 5 jours d'apprentissage chez des animaux âgés de 18 mois ayant suivi un protocole de SCLI à différents âges adultes.....	170
Figure 72 : Evaluation de la précision mnésique d'information spatiale.....	171
Figure 73: Identification de 2 sous-populations chez des animaux âgés ayant été stressés à 10-12 mois.....	172
Figure 74 : Réponses comportementales obtenus en rétention du conditionnement opérant en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI.....	173
Figure 75 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés dans un apprentissage de conditionnement opérant.....	174
Figure 76 : Modifications épigénétiques de la triméthylation d'H3K27 dans l'hippocampe dorsal et l'hippocampe ventral, en fonction de l'âge exposition au SCLI.....	177
Figure 77 : Effet global du SCLI sur les modifications de la triméthylation d'H3K27 dans l'hippocampe dorsal (A) et l'hippocampe ventral (B), indépendamment de l'âge exposition au SCLI.....	178
Figure 78 : Modifications épigénétiques de la triméthylation de l'histone H3, lysine 27 dans l'amygdale en fonction de l'âge exposition au SCLI.....	178
Figure 79 : Modifications épigénétiques de la triméthylation de l'histone H3, lysine 27 dans le striatum.....	179
Figure 80 : Déroulement du protocole de microdialyse.....	191
Figure 81 : Zone d'implantation des guide-canule dans l'hippocampe de souris.....	192
Figure 82 : Chronologie expérimentale du protocole de stress chronique et des évaluations réalisées.....	235
Figure 83 : Evaluations de l'état du pelage chez des animaux WT et sst2KO âgés de 12 mois en fonction de leur condition de stress chronique et de leur génotype.....	236
Figure 84 : Concentration plasmatique de corticostérone chez des animaux WT et sst2KO âgés de 12 mois en fonction de leur condition de SCLI et de leur génotype.....	237
Figure 85 : Consommation préférentielle de saccharose chez des souris WT et sst2KO en fonction de leur condition de stress chronique.....	238
Figure 86 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris WT et sst2KO.....	239
Figure 87 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris WT et sst2KO.....	242
Figure 88 : Evaluation comportementale des troubles de mémoire de travail chez la souris WT et la souris sst2KO dans un test d'alternance spontanée en T-maze.....	243
Figure 89 : Comparaison des profils comportementaux de souris non-stressées et stressées en fonction du génotype.....	245
Figure 90 : Dynamique d'émergence des troubles liés au stress chronique chez la souris adulte.....	259

Figure 91 : Sévérité du syndrome de stress chronique à court et long terme en fonction de l'âge d'exposition au stress et de l'intensité des troubles anxieux à l'âge adulte.....	264
Figure 92 : Schématisation du rôle de la somatostatine hippocampique sur l'axe HPA et sur les réponses comportementales associées à un stress aigu .....	266
Figure 93 : Emergence des troubles liés au stress chronique chez la souris adulte WT et sst2KO.....	267

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Prévalence d'un épisode dépressif en France au cours des 12 derniers mois (Baromètres santé de l'INPES 2005 et 2010) .....	54
Tableau 2 : Modifications volumétriques constatées par neuro-imagerie chez des patients dépressifs (D'après Drevets et al., 2008) .....	74
Tableau 3 : Descriptif des amorces utilisées en PCR pour le génotypage des souris transgéniques...	101
Tableau 4 : Détails du protocole de stress chronique léger imprédictible appliqué sur 6 semaines....	103
Tableau 5 : Analogues et agonistes somatostatinerigiques utilisés .....	117
Tableau 6 : Anticorps utilisés dans l'étude des modifications épigénétiques .....	120
Tableau 7 : Répartition des animaux dans les groupes expérimentaux .....	131
Tableau 8 : Paramètres mesurés dans chacun des tests réalisés .....	133
Tableau 9 : Corrélations entre les différents troubles observés chez le sujet adulte .....	149
Tableau 10 : Corrélations entre les différents troubles observés chez le sujet âgé.....	149
Tableau 11 : Répartition des animaux pour l'étude comportementale en fonction de l'âge auquel est survenu le stress chronique.....	160
Tableau 12 : Répartition des animaux pour l'étude épigénétique en fonction de l'âge auquel est survenu le stress chronique.....	162
Tableau 13 : Corrélations entre les différents troubles observés chez le sujet âgé.....	175
Tableau 14 : Corrélations entre les troubles observés chez le sujet âgé et ceux observés chez le sujet adulte .....	176
Tableau 15 : Corrélations entre les troubles observés et la triméthylation d'H3K27 chez le sujet âgé .....	180
Tableau 16 : Corrélations entre les troubles observés chez le sujet adulte et la triméthylation d'H3K27 mesurée chez le sujet âgé .....	180
Tableau 17 : Répartition des animaux dans les groupes expérimentaux .....	234
Tableau 18 : Corrélations entre les différentes catégories de troubles étudiées en fonction du génotype (A : WT ; B : sst2KO) .....	246





# INTRODUCTION GENERALE

---



« La première fonction du cerveau humain n'est pas de remplir un formulaire d'impôts, mais bien de détecter le danger pour que le corps, aiguillonné par une poussée d'adrénaline et de cortisol (les deux principales hormones de stress), puisse réagir efficacement. Le hic, c'est que le cerveau humain ne distingue guère entre le danger suprême qui guettait l'homme préhistorique face à un mammoth qu'il devait abattre pour se nourrir et la menace que représente pour une personne l'évaluation annuelle que doit lui remettre un patron plus ou moins sympathique. Mammoth ou patron antipathique, pour le cerveau, c'est la même chose : il assure que le corps réagit efficacement à la menace. »

Sonia Lupien – *Par Amour du Stress*, Les Editions Au Carré, 2010

Si aujourd'hui, on réalise une étude sur le terrain, un micro-trottoir pour demander aux gens s'ils connaissent le stress, 100% répondront « oui ». Si on leur demandait de nous l'expliquer, quelle pourrait bien être leur réponse ? Un étudiant pensera à ses examens, un patron surmené au bon fonctionnement de son entreprise ... autant de situations que chacun interprète comme stressantes d'une façon subjective. Souvent le stress est associé à un sentiment, une **émotion**, que l'individu interprète comme la cause de son état de stress. Si chacun a sa propre définition du stress, il n'en reste pas moins que ce dernier est **UNIVERSEL**. Connoté par beaucoup comme un élément négatif, cette réponse physiologique, comportementale et innée, a permis à l'Homme de survivre au cours de ces milliers d'années d'évolution. Mais comme toute bonne machinerie, lorsque le système se dérègle, les répercussions peuvent être importantes. Une des répercussions qui nous a intéressées au cours de ces travaux de thèse a été la **dépression**. Bien que multifactorielle, cette pathologie est intimement liée au dérèglement de l'axe du stress (également connu sous le nom d'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien) et aux perturbations qui y sont associées (anxiété, trouble de l'humeur, troubles alimentaires...). Aux vues de l'universalité de la réponse de stress, les troubles dépressifs majeurs font partie des maladies les plus répandues au monde, avec 450 millions de personnes atteintes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2010). Cependant ils restent mal connus, en partie par la grande variabilité de troubles existants dont les définitions peuvent être difficiles à établir.

Dans cette thèse, nous avons cherché à évaluer l'impact du stress chronique sur différentes classes d'âges adultes de souris afin de constater les différences d'émergence en fonction de l'âge d'exposition. Au regard du fort risque de rechute qui existe chez des patients ayant rencontré un épisode dépressif dans leur vie (environ 70%), nous avons également

évalué la persistance ou la rémission de ces troubles à long terme, chez les animaux ayant atteint un âge avancé. Les outils d'évaluation sur le comportement animal (plus précisément chez la souris) nous ont permis d'étudier plusieurs composantes comportementales. Nous nous sommes intéressés aux troubles qui peuvent apparaître en réponse à l'exposition à un stress chronique léger imprédictible, comme les troubles émotionnels, les troubles de la mémoire, les troubles somatiques ou encore l'anhédonie. En plus de cette approche comportementale, nous avons réalisé une étude immunohistochimique préliminaire sur des changements épigénétiques afin de comprendre par quels mécanismes le stress chronique peut induire une réorganisation durable des circuits neuronaux.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle de la somatostatine dans l'expression de ces troubles et son implication dans les mécanismes de régulation de l'axe du stress. La somatostatine est un neuropeptide libéré en réponse à un stress et dont la régulation est impactée chez les patients souffrant de troubles dépressifs. Nous avons alors souhaité approfondir les données de la littérature concernant l'implication de ce neuropeptide dans les régulations de troubles liés au stress et à la dépression majeure.

Ces travaux amènent ainsi un complément à la littérature existante sur la pathogénicité du stress chronique et sur la dépression, afin de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques et comportementaux sous-jacents. Ils permettront peut-être d'aboutir à l'élaboration de nouveaux composés pharmaceutiques visant à réduire les troubles anxio-dépressifs.

## Notions d'Emotions

### 1. Définition

Le mot émotion provient du latin *motio*, signifiant « action de mouvement ». Cette précision étymologique nous permet de mieux comprendre ce mot, actuellement très employé dans la vie courante, mais dont la réelle signification est souvent mal appréciée. En effet, le terme *émotion* désigne une expérience psychophysologique dynamique et complexe d'un individu en réaction à des stimuli à la fois externes (objectifs : environnementaux) et internes (subjectifs : psychologiques). L'intégration de ces stimuli va alors générer diverses réponses en fonction de l'état de base de l'individu. Ces réponses seront subjectives concernant la valeur à attribuer à cette émotion, aussi appelée valence (ce qui se produit de façon consciente ou non) et objectives concernant les réponses comportementales (expressions faciales, mouvement de fuite, rire, etc.) et physiologiques (tachycardie, hypertension, etc.) associées.

Quotidiennement, l'Homme fait une grande place aux réactions, gestes et agissements que l'on peut décrire *a posteriori* comme relevant du domaine de l'inconscient. C'est une évidence aujourd'hui, connue depuis la Grèce antique, mais ce phénomène n'a pas pu profiter d'études approfondies avant le début du XX<sup>ième</sup> siècle. Ce n'est cependant pas une grande nouveauté que de s'intéresser à l'explication de nos actes et nos pensées puisque les penseurs de l'Antiquité comme Platon et Aristote, et parmi les modernes, Descartes et Spinoza ont tous à leur manière élaboré des théories tentant de faire le lien entre les émotions et la cognition.

### 2. Théories des Emotions

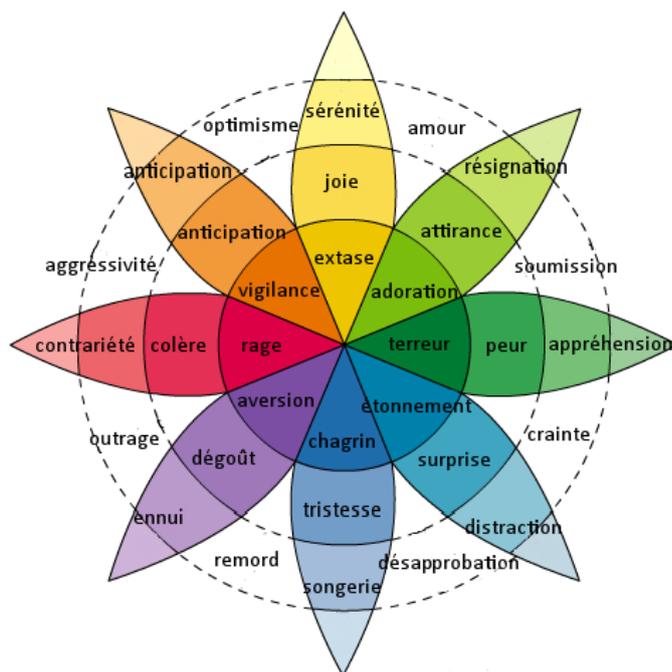
#### a. Fondements Historiques

Platon (427-358 av J.-C.) est le plus ancien penseur dont les écrits sur les émotions nous sont parvenus. Il donne une vision très négative des émotions qu'il décrit comme néfastes au développement et à l'expression de la raison. Aristote (384-322 av J.-C.), disciple de Platon, donne par la suite une vision plus nuancée des émotions. Selon lui, l'Homme n'est pas uniquement spectateur des manifestations biologiques des émotions mais il construit « un univers émotionnel » à partir de ses cadres de référence (croyances) et de ses préférences personnelles (attitudes). L'élément primordial qui demeure de l'analyse des émotions par

Aristote concerne la nécessité de considérer leur dimension **cognitive** : ce que nous ressentons subjectivement dépend en grande partie des choses auxquelles nous croyons et de nos connaissances personnelles. A partir de ces observations, Aristote démontre l'existence d'une valence (valeur subjective) attribuée aux émotions lorsque celles-ci sont perçues par l'individu (DeBoeck, 2008).

Inspiré des travaux de Descartes, et de ceux du français Guillaume-Benjamin Duchenne, Charles Darwin propose en 1877 dans son ouvrage *L'expression des émotions chez*

*l'Homme et les animaux* une théorie selon laquelle l'espèce humaine disposerait de 6 émotions primaires : la joie, la surprise, la colère, la tristesse, le dégoût et la peur (Darwin, 1877). D'après ses recherches et celles de ses contemporains, les expressions faciales représentant ces émotions étaient **universelles** et interprétées de la même manière par tous les Hommes. Pour Darwin, **les émotions étaient adaptatives**, elles auraient favorisé la survie de l'espèce en permettant aux individus de répondre de façon appropriée aux exigences environnementales.



**Figure 1: La Roue des Emotions de Plutchik**

La roue permet de visualiser les émotions primaires et leur degré d'intensité. Deux émotions voisines peuvent s'associer en une dyade primaire (Joie + Attirance = Amour). Si l'écart entre 2 émotions primaires est plus grand, on parle de dyade secondaire (Joie + Peur = Culpabilité) ou tertiaire (Joie + Surprise = Ravissement). (Source : <https://egouvernaire.wordpress.com/2015/01/15/la-roue-des-emotions/>)

d'intensité. Il considérait qu'il existe 8 émotions primaires : la joie, la peur, le dégoût, la colère, la tristesse, la surprise, l'attirance et l'anticipation. Ces émotions étaient pour lui **universelles** et **primitives** sur le plan biologique et avaient évolué afin de permettre à l'animal de **s'adapter**. De cette théorie, il construisit la « Roue des Emotions de Plutchik » qui est une représentation des émotions primaires et de leurs relations entre elles (figure 1).

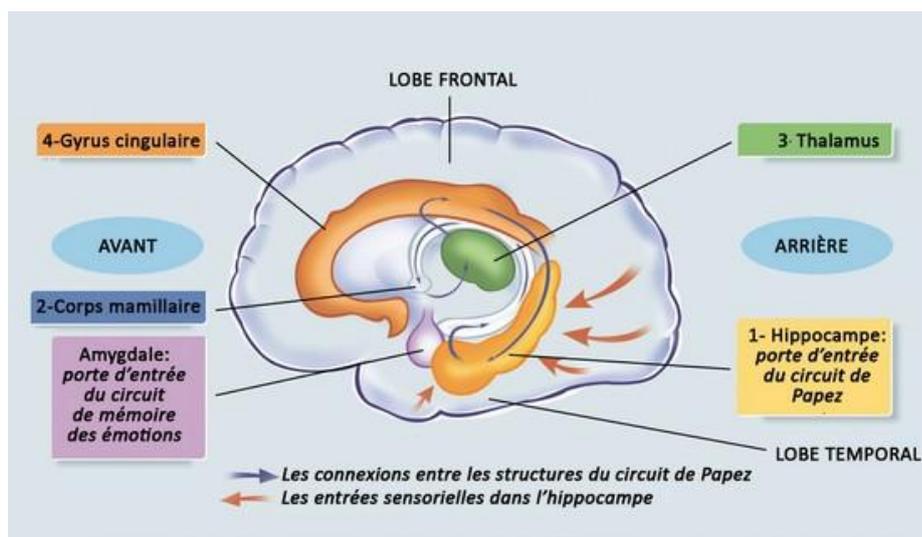
b. Les Grands Courants Théoriques

C'est à partir de 1884, avec William James et Carl Lange qu'apparaît la première théorie des émotions à réelle vocation scientifique. La théorie périphérique des émotions de James et Lange décrit les émotions comme une résultante des modifications physiologiques entraînées par une situation. Pour exemple, James et Lange font le postulat que nous sommes tristes uniquement car nous pleurons (l'action de pleurer entraînant l'émotion de tristesse). D'après cette théorie, la réponse du corps est automatique, entraînant la réaction comportementale qui nous fait prendre conscience de l'émotion (James, 1884; Lange, 1887).

Diamétralement opposée à la théorie de James et Lange, Walter Cannon et Philip Bard suggèrent à la fin des années 1920, que les émotions sont ressenties avant que le corps ne réagisse, c'est la théorie thalamo-hypothalamique des émotions (Cannon, 1927). Les changements physiologiques seraient une conséquence de l'expérience émotionnelle et non les causes. Ainsi, Cannon et Bard prétendent que les **émotions entraînent les réponses physiologiques et comportementales** : on est triste, donc on pleure. Dans les années 1960, Stanley Schachter et Jérôme Singer approfondissent la théorie de Cannon et Bard en y ajoutant une dimension **cognitive**, créant ainsi la théorie des émotions à 2 facteurs. Selon eux, la **cognition** est au centre de l'expression et de l'intégration émotionnelle. Elle déterminerait ainsi la nature et la valence des émotions en fonction du contexte et des réponses physiologiques rencontrées face à un stimulus (Schachter and Singer, 1962).

D'autres courants de pensée tentant d'expliquer les émotions ont été développés depuis les années 1960 comme les théories béhavioristes (Millenson, 1967; Rolls, 2000) ; ou les théories à plusieurs niveaux (Toates, 2002; Panksepp, 2007). Ces théories prennent en considération de plus en plus d'informations et tendent à se complexifier avec l'avancée des travaux scientifiques.

### 3. Neurobiologie des Emotions



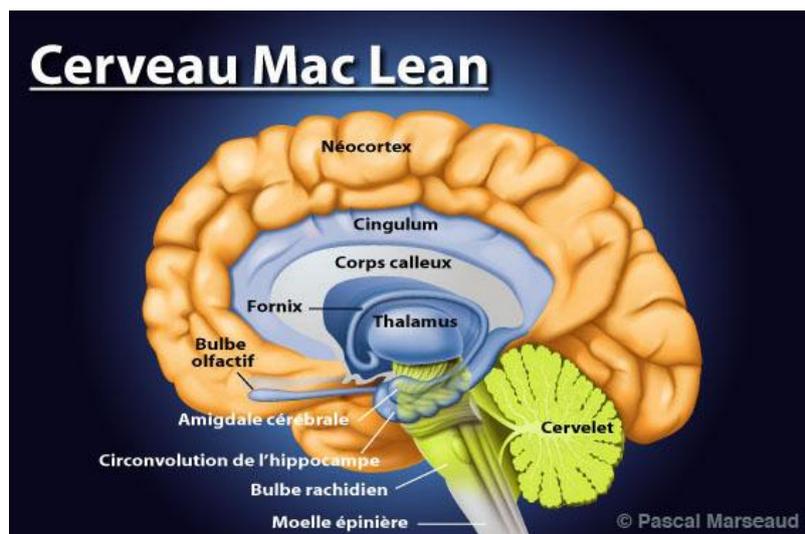
**Figure 2 : Le circuit de Papez**

L'information entre par l'hippocampe (1) qui projette vers les corps mamillaires (2). L'information transite ensuite par le thalamus (3) puis le gyrus cingulaire (4) avant de revenir vers l'hippocampe. (Illustration tirée du Larousse).

Broca au XIX<sup>ième</sup> siècle se trouve enfoui à l'intérieur du lobe temporal et est composé de l'hypothalamus, de l'hippocampe (HPC), du fornix et du gyrus cingulaire. Le circuit de Papez, ou circuit hippocampo-mamillo-thalamo-cingulaire, est impliqué dans le traitement de l'information émotionnelle mais également dans la mise en mémoire des informations ayant une charge émotionnelle (figure 2). L'hypothalamus (plus précisément les corps mamillaires), les noyaux antérieurs du thalamus, le gyrus cingulaire, l'HPC et leurs interconnexions constituent anatomiquement un circuit bien défini. Il sert à coder la valence émotionnelle des stimuli, à évoquer l'expérience subjective des émotions et à générer les réponses comportementales correspondantes. Papez propose que l'hypothalamus ait pour fonction d'attribuer une valence émotionnelle aux afférences sensorielles et de provoquer les réponses expressives et motrices correspondantes, tandis que le gyrus cingulaire (la partie corticale du circuit) serait impliqué dans l'élaboration de l'expérience émotionnelle.

Cependant, durant les années suivantes, un nombre important de recherches menées chez l'animal mais également chez l'Homme ont conduit à introduire des modifications sensibles au modèle anatomique des émotions proposé par Papez en soulignant notamment le rôle majeur joué par l'amygdale dans les traitements émotionnels. L'amygdale, et non l'hypothalamus, constituerait l'une des structures clés où les informations provenant du monde extérieur acquièrent une coloration émotionnelle.

Dès 1937, James Papez propose un circuit cérébral comme **mécanisme émotionnel**, faisant le lien entre perception, action et émotion. Celui-ci serait composé du système limbique et de structures sous corticales. Le système limbique définit par Paul



**Figure 3 : Le cerveau triunique de MacLean**

Selon MacLean le cerveau humain se compose du cerveau reptilien (en vert), du cerveau paléo-mammalien (en bleu) et du néo-cortex (en orange). (Illustration de Pascal Marseaud©)

Reprenant les travaux de Papez et de ses confrères, Paul MacLean décrit dès 1952 une vision neuro-anatomique permettant d'appuyer les théories évolutionnistes, le cerveau tri-unique (MacLean, 1985). D'après cette vision, le cerveau humain, dont l'évolution est maximale, serait en fait composé de trois strates différentes dépendantes du niveau d'évolution (figure 3). La

base de chaque animal, le cerveau reptilien, dit aussi primitif, serait à la base du fonctionnement cérébral et serait apparu il y a 400 millions d'années. Au-dessus de ce premier cerveau, le cerveau paléo-mammalien, ou limbique, serait lui apparu plus tard, chez les mammifères. Il serait responsable de **l'intégration et de l'expression des émotions** ainsi que des **phénomènes mnésiques avancés**. Pour finir, le cerveau néo-mammalien, ou néo cortex, propre à l'Homme, serait beaucoup plus récent (moins de 4 millions d'années) et serait impliqué dans le raisonnement logique, le langage et les phénomènes d'anticipation. La totale indépendance des 3 cerveaux est aujourd'hui rejetée au profit de modèles mettant l'accent sur les interactions dynamiques entre toutes les structures cérébrales (Koelsch et al., 2015).

L'importance des dialogues entre le système limbique et les structures corticales a également été démontrée par les travaux d'Antonio Damasio en 1985. Les arguments en faveur de ces dialogues proviennent de patients présentant des lésions du cortex préfrontal (Damasio et al., 1985). Ces patients font preuve de comportements purement rationnels sans tenir compte du poids émotionnel de leur action. En 1994, Antonio et Hanna Damasio reprennent le cas Phinéas Gage, blessé par une barre de métal lésant les lobes frontaux, ce qui avait entraîné un brutal changement de « comportement ». Harlow fut le premier à décrire le cas de Phinéas Gage (Harlow, 1868) et plus tard, Antonio Damasio conclut que « son cerveau ne faisait plus le lien entre raison et émotion ». Pour lui, l'émotion assiste le raisonnement,

surtout s'il s'agit de décisions personnelles et sociales. Damasio énonce par la suite la théorie des marqueurs somatiques (Damasio, 1996) en reprenant une partie de la théorie de James et Lange. L'information sensorielle en provenance d'un stimulus est intégrée par le cortex préfrontal et l'amygdale qui déclenchent une réponse corporelle aussi appelée marqueur somatique. Ce dernier est par la suite associé à une émotion, plaisante ou non, puis enregistré afin de permettre une meilleure prise de décision si la situation d'origine se représente. Le souvenir des émotions passées, réactivé par un circuit neuronal qui prend en compte les modifications corporelles liées à l'émotion va ainsi influencer la décision finale en attirant l'attention sur les conséquences à venir. Ces « marqueurs » sont issus de notre mémoire émotionnelle qui catégorise petit-à-petit les stimuli (joie, peur, colère, etc.) avec un des états corporels plaisants ou déplaisants. Les patients « préfrontaux » sont privés de ces marqueurs somatiques qui orientent vers les bonnes décisions, ce qui crée chez ces patients une complexification dans les processus de prise de décision. Damasio donne ainsi une part importante à la fois à la **cognition et au système limbique** dans l'intégration et l'expression de stimuli émotionnels, à visée adaptative et anticipatoire.

Ainsi, on comprend que le **système limbique** reçoive un grand intérêt de la part de la communauté scientifique dans le sens où il est impliqué dans de nombreuses grandes fonctions comme l'apprentissage, la prise de décision, la mémoire et les émotions. Le système limbique a ainsi été reconnu comme un support structurel de l'intégration et de l'expression des émotions. Ces dernières sont aujourd'hui considérées comme étant **universelles** et ont une fonction **adaptative** et **préparatoire** pour l'organisme. Ce dernier ajustera sa réponse face au stimulus en fonction du type de comportement à réaliser, le combat ou la fuite par exemple (Cannon et Bard). Les travaux sur les émotions et leur relation avec le système limbique, ont amené de nombreux chercheurs à étudier les déclencheurs de certaines émotions et donc à s'intéresser au stress comme initiateur d'état émotionnel et composante adaptative de l'individu.

## Neuropsychobiologie du Stress

Le stress, mot anglais, provient du latin *stingere* « mettre sous tension ». Il désigne à l'origine la force exercée sur un organisme qui le contraint ou le déforme et la réaction de ce même organisme résistant à cette force. Il définit à la fois la cause (le facteur environnemental créant cet état) et la conséquence (l'état de stress en lui-même et les réponses adaptatives associées).

### 1. Le concept de stress

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, Claude Bernard introduit dans ses *Leçons sur les phénomènes de vie*, le principe que « la constance du milieu intérieur est la condition nécessaire à la vie libre, indépendante ». Walter Cannon reprendra ce principe et le nommera **homéostasie** (Cannon, 1929). Ce maintien des constantes de stabilité intérieure est le support de la physiologie des régulations et du processus d'adaptation de l'individu à son environnement. Cannon décrit alors l'importance du système nerveux central dans la prise en charge des stimuli et la régulation de l'homéostasie. Les perturbations rencontrées engendrent donc des modifications de cet état d'équilibre qui permettront de mettre en œuvre une réponse appropriée. Cette réaction mène à la mobilisation d'énergie de l'organisme pour lutter ou fuir face à la contrainte. Cependant, lorsque le stimulus s'intensifie, la contrainte exercée sur les mécanismes de régulation de l'équilibre interne devient excessive et une généralisation non spécifique de la réponse de l'organisme peut se mettre en place.

En s'intéressant à l'histoire du stress, on s'aperçoit que les éléments déclencheurs de toute la science actuelle du stress furent les deux guerres mondiales. Il existe plusieurs raisons à cela. Tout d'abord, les médecins militaires observaient que beaucoup de soldats montraient des signes d'état de chocs traumatiques. Des chercheurs spécialisés en physiologie et en psychologie examinèrent ce phénomène mais ne réussirent pas à identifier ce mal. D'autre part, de nombreux chercheurs du vieux continent partirent pour les Etats-Unis ou le Canada afin d'échapper à la mobilisation. Beaucoup s'installèrent à Montréal où le Dr Hans Selye était en poste et avait décrit le *Syndrome Général d'Adaptation* en 1936. Selye décrit ce syndrome, ou *stress*, comme la réponse « non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite ». Il est aujourd'hui considéré comme le premier à avoir employé le terme *stress* au sens que nous connaissons. Il emprunta ce terme à l'ingénierie qui utilise ce

terme lors qu'un métal est chauffé jusqu'à un tel point (stressé) qu'il se brise comme du verre. Le terme *stress* est ainsi passé du domaine de l'ingénierie, à la science, la médecine puis au domaine public par l'intermédiaire de Selye. Toutefois, dès 1934, Walter Cannon parlera aussi de *stress* dans ses recherches et plusieurs chercheurs attribueront donc la paternité du terme à Cannon. Pour lui, le terme *stress* renvoyait à toute condition externe qui peut affecter l'homéostasie et induire une production d'adrénaline. Ainsi, le stress n'était qu'un mot pour désigner les différentes conditions qui produiraient une réponse néfaste sur le corps. Contrairement à Selye, Cannon ne décrit pas le stress comme une réponse mais comme un agent. Aujourd'hui, les deux concepts de Cannon et Selye sont utilisés en recherche pour décrire les **conditions adverses** (Stresseurs de Cannon) qui peuvent mener à une « **réponse de stress** » (Selye) qui correspond à la production d'hormone de stress.

Selye explique alors qu'en réponse à un stresseur, l'organisme est soumis à un enchaînement de 3 phases. L'initiation de cette réponse se fait par une **phase d'alarme**. Elle conduit à la mobilisation de l'énergie par l'organisme pour lutter ou fuir face à la contrainte (Cannon, 1914; McEwen and Wingfield, 2003). S'installe ensuite une **phase de résistance** durant laquelle l'organisme utilise les ressources mobilisées permettant une réaction adaptée afin de revenir à l'état d'équilibre, l'homéostasie. Si au contraire, les agents stresseurs se maintiennent, l'organisme risque d'atteindre **une phase d'épuisement**, en réponse à la consommation de toute l'énergie mise en jeu, ce qui peut entraîner l'apparition de troubles somatiques voire pathologiques. Selye considère cette réaction de stress comme une « réponse non spécifique de l'organisme » face à une contrainte. Un autre apport majeur fait par Selye a été de proposer l'existence de médiateurs de ce syndrome, les hormones corticosurréaliennes.

Plus tard, dans les années 1970, John Mason démontre que des stresseurs psychologiques sont tout aussi puissants que des stresseurs physiques et qu'ils peuvent déclencher une réponse de stress. Ses travaux sur le singe démontrent qu'un animal témoin de la détresse d'un de ses congénères déploie également une réponse de stress (Mason, 1975). Aujourd'hui, les études chez l'Homme de Sonia Lupien permettent de déterminer 4 types de perturbations dont le potentiel de chacune est capable d'entraîner une réponse de stress : le manque de Contrôle, l'Imprévisibilité, la Nouveauté et la menace de l'Ego (Lupien, 2010). Elle y décrit le stress dans des termes populaires modernes, comme une pression du temps, qui déclenche une série de réactions physiologiques indiquant l'état de stress en lui-même (Lupien et al., 2007). Cependant, elle nuance ce propos en démontrant également que cette

définition ne suffit pas à expliquer le stress en termes scientifiques, puisque le stress est extrêmement dépendant des expériences individuelles. La réponse de stress apparaît donc comme une réponse non spécifique qui peut se produire suite à une interprétation d'une menace absolue (réelle menace) ou bien relative (stimulus interprété comme dangereux sans réel fondement) et entraîne de nombreuses réponses physiologiques et comportementales (Kim and Diamond, 2002).

## 2. Physiologie et supports anatomiques du stress

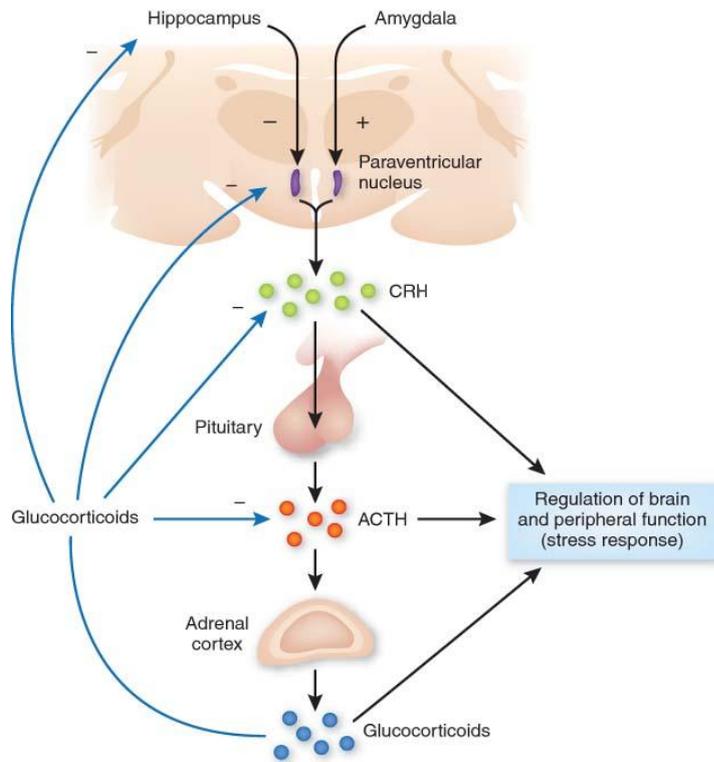
Face à un (ou plusieurs) stressor(s), l'organisme met en place différentes réponses à visée adaptative, mettant en jeu plusieurs circuits neuronaux, centraux et périphériques, par la libération de médiateurs (Joels and Baram, 2009). Le système nerveux central et le système nerveux périphérique interviennent à différents niveaux pour que l'organisme se tienne prêt à élaborer une réponse physiologique et comportementale appropriée. Ainsi, la réponse physiologique du stress dépend de l'activation du système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) et de l'activation de l'axe corticotrope (ou axe **HPA**). L'activation du système nerveux autonome est responsable d'un grand nombre de réponses physiologiques préparant l'organisme à faire face au stress comme une vasoconstriction, une augmentation du rythme cardiaque (afin d'augmenter l'afflux sanguin vers les muscles squelettiques et le cerveau), une dilatation des poumons et une diminution des fonctions végétatives (afin de restreindre momentanément les activités superflues, la digestion par exemple). Ce système est soumis à une régulation complexe par le système nerveux central qui dépasse la portée de cette thèse et ne sera pas développé plus en détail. L'organisme met également en place une réponse physiologique par l'activation de l'axe HPA, permettant une réaction en chaîne liée à une succession de libération de neuropeptides.

### a. L'Axe HPA et les Neuropeptides

Après la libération des catécholamines par le système nerveux autonome, l'axe HPA entre en action. Il s'agit d'un axe neuroendocrinien majeur dans les réponses au stress, qui aboutit à la libération de **glucocorticoïdes** (GC) dans le système sanguin. Les GC rencontrés peuvent varier en fonction des espèces. Ainsi, le cortisol est l'hormone GC sécrétée chez l'Homme tandis que la corticostérone (CORT) est sécrétée chez le rongeur. L'axe HPA se compose de 3 structures : l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales (figure 4).

### L'hypothalamus

L'hypothalamus est le **centre intégrateur** de l'axe HPA. En effet, il reçoit les afférences provenant des centres nerveux sympathiques, notamment celles du système limbique. Suite à ces stimulations, il libère plusieurs neuropeptides, dont la **corticolibérine** (corticotropin release hormone ; CRH) et la **somatostatine** (SST) (Arancibia et al., 2001).



La CRH est un neuropeptide synthétisé dans les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN). Une fois libérée par l'éminence médiane dans les capillaires irriguant l'antéhypophyse, la CRH va agir directement sur cette dernière pour permettre l'activation en chaîne de l'axe HPA. La CRH, au niveau hypothalamique, permet également la libération de SST (Tsigos and Chrousos, 2002). Cette dernière va permettre une diminution de fonctions annexes liées à d'autres hormones, comme l'hormone de croissance ou encore l'hormone de libération des gonadotrophines. L'action centrale de SST (plus détaillée ultérieurement) est complétée par une action

#### Figure 4 : L'axe corticotrope

Le stress déclenche une cascade de réaction permettant la libération de CRH au niveau de l'hypothalamuse, d'ACTH au niveau de l'hypophyse et de GC au niveau des glandes surrénales. Les GC exercent un rétrocontrôle sur l'ensemble de l'axe ainsi que des régulations cérébrales et périphériques. Ce système est modulé positivement par l'amygdale et négativement par l'hippocampe. D'après (Hyman, 2009)

périphérique, intestinale, qui contribue à la diminution des sécrétions de sucs digestifs et met ainsi l'ensemble du tractus digestif à l'état de repos.

### *L'hypophyse*

Au niveau hypophysaire (précisément de l'adénohypophyse), la CRH se lie à ses récepteurs permettant ainsi l'activation d'une chaîne de transduction qui aboutira à la synthèse de proopiomélanocortine, précurseur de **l'hormone corticotrope ou adrénocorticotrophine** (Adrenocorticotrophin hormone ; ACTH), libérée par l'hypophyse dans ce système circulatoire.

L'ACTH possède de nombreuses actions, et particulièrement dans la régulation de l'axe HPA. En effet, une fois libérée, elle agit sur les cellules du cortex surrénalien par l'intermédiaire de récepteurs membranaires couplés à une adénylate cyclase. A court terme (c'est-à-dire quelques minutes), l'activation des récepteurs aux mélanocortines de type 2 par l'ACTH va permettre la synthèse et la libération de GC. A moyen terme, l'ACTH va augmenter la transcription des enzymes impliquées dans la biosynthèse des GC. Enfin à long terme, l'ACTH a des effets trophiques en augmentant à la fois le nombre et la taille des cellules cortico-surrénales.

### *Les glandes surrénales*

L'ACTH, libérée par l'hypophyse, va se fixer sur ses récepteurs au niveau des glandes surrénales et ainsi catalyser la phosphorylation de l'enzyme hydrolysant les esters de cholestérol libres dans l'enclave lipidique des cellules surrénales. Ceci permet alors la synthèse puis la libération de GC. Cette libération de GC s'accompagne également de la libération de catécholamines par la partie médullaire des glandes surrénales.

#### b. Régulation de l'axe HPA

### *Rétrocontrôle*

Comme un grand nombre de systèmes neuroendocriniens, l'axe HPA est capable de s'autoréguler en permettant aux GC d'agir sur les structures qui le composent. En effet, les GC parviennent à freiner leur propre sécrétion, par le biais de récepteurs présents aux niveaux de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Ce rétrocontrôle négatif permet de limiter la durée d'exposition des tissus aux GC, ces derniers pouvant avoir des effets délétères à long terme sur l'organisme.

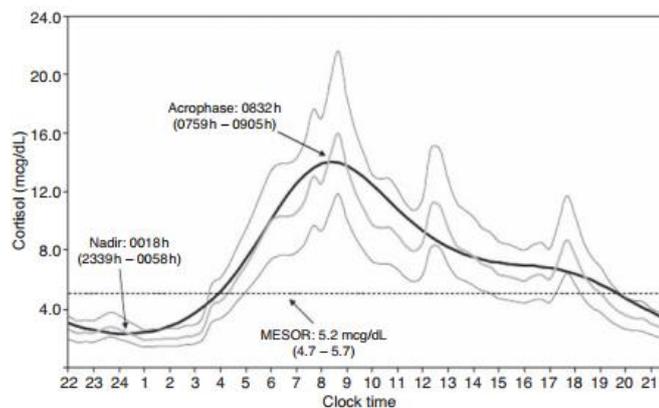
Les GC agissent au niveau des structures clés de l'axe HPA, comme l'hypothalamus (plus précisément au niveau du PVN) et l'hypophyse antérieure afin de bloquer la transcription de gènes nécessaires à la synthèse de la CRH et de l'ACTH (Tasker and Herman, 2011). D'autres structures, appartenant au système limbique, agissent également

dans ce rétrocontrôle, comme l’HPC (Herman et al., 2005), le cortex préfrontal (PFC) ou l’amygdale. L’HPC possède des récepteurs aux GC qui activent un système glutamatergique projetant vers des neurones GABAergique du PVN pouvant ainsi inhiber l’axe HPA (Jacobson and Sapolsky, 1991; Herman and Cullinan, 1997; McEwen, 1999). Le PFC médian possède également une fonction inhibitrice sur l’axe HPA, par des projections provenant du cortex cingulaire antérieur, vers le système GABAergique du PVN (Herman and Cullinan, 1997). Au contraire, la partie inférieure du PFC semble posséder une fonction excitatrice de l’axe HPA, tout comme l’amygdale. Ceci peut en partie s’expliquer par la grande connectivité entre cette partie du PFC et l’amygdale (Hurley et al., 1991). En effet, plusieurs études ont montré qu’une stimulation amygdalienne entraîne une libération de GC aussi bien chez le rongeur (Redgate and Fahringer, 1973) que chez l’Homme (Gallagher et al., 1987).

Cependant, les GC ne sont pas les seuls à jouer un rôle dans la régulation de l’axe HPA. A l’opposé de son action activatrice sur l’axe HPA, l’ACTH exerce également un rétrocontrôle négatif sur l’hypothalamus, en limitant la sécrétion de CRH et ainsi limitant sa propre sécrétion. (Aguilera, 1994; Agulleiro et al., 2013).

### Rythmicité

Le rétrocontrôle de l’axe HPA est également tributaire du cycle circadien. Son efficacité est optimale durant la phase active du cycle (Akana et al., 1992). En condition basale, la sécrétion de GC est rythmée par une oscillation circadienne, liée à l’alternance jour/nuit (Chan and Debono, 2010). En effet la concentration en GC chez l’Homme ou chez le rongeur est faible en état de sommeil et plus importante en début de veille. C’est pourquoi les concentrations de GC



**Figure 5 : Rythmicité des concentrations en cortisol chez l’Homme sur une journée**

L’évolution moyenne des taux de cortisol est présentée en noir avec le nadir vers 00h et l’acrophase vers 8h30. Les courbes grises représentent l’amplitude variable des rythmes ultradiens au cours de la journée (Chan and Debono, 2010).

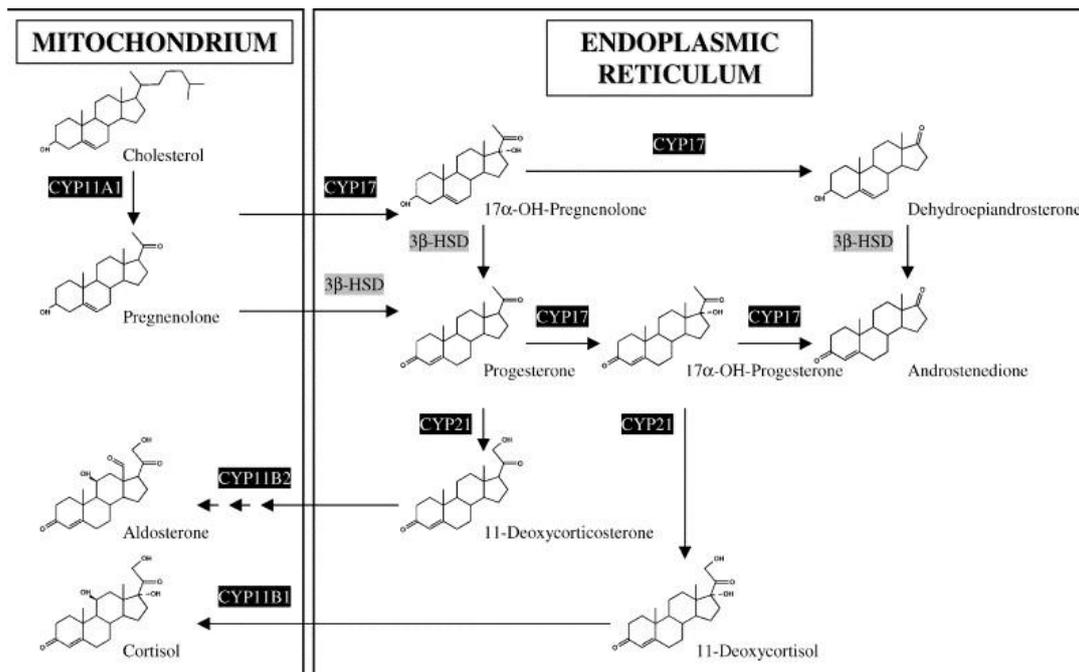
(ainsi que de CRH et d’ACTH) présentent une acrophase au réveil et un nadir en période de sommeil. Ainsi, l’acrophase chez l’Homme a lieu le matin (Figure 5) tandis que chez le rongeur, animal nocturne, elle a lieu en fin d’après-midi qui correspond au début de sa phase

d'activité. Ceci permet une augmentation de l'allocation énergétique nécessaire au début de la phase active, suivie d'une diminution progressive afin de rentrer en état de repos, où les besoins énergétiques sont moindres.

Un autre rythme, ultradien, plus court, est également présent dans le fonctionnement de l'axe HPA. Ce rythme se caractérise par des épisodes sécrétoires de 1 à 3 pulses par heure, d'amplitudes variables, suivi d'une phase d'inhibition et de clairance rapide de ces hormones d'environ 20 minutes (Windle et al., 1998). Ce phénomène de rythmicité ultradienne se retrouve chez de nombreuses espèces, incluant l'Homme et le rongeur (Engeland and Arnhold, 2005). En 2010, il a été proposé que cette rythmicité ultradienne soit cruciale pour le maintien de la réceptivité de l'axe HPA (Lightman and Conway-Campbell, 2010).

### 3. Les glucocorticoïdes

#### a. Biosynthèse et circulation



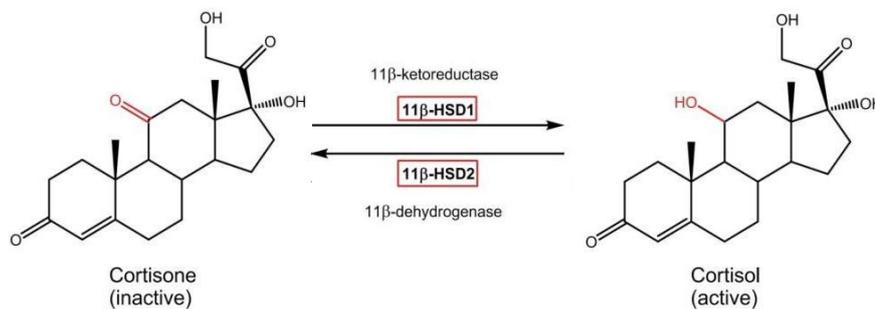
**Figure 6 : Biosynthèse des glucocorticoïdes**

L'initiation de la biosynthèse des glucocorticoïdes se fait par le clivage du cholestérol dans la mitochondrie, suivi d'une réaction enzymatique en chaîne aboutissant à la biosynthèse de cortisol ou de corticostérone. (D'après Lisurek and Bernhardt, 2004).

Les GC sont des dérivés du cholestérol. La fixation de l'ACTH au niveau surrénalien va permettre la synthèse des GC au niveau de la zone fasciculo-réticulée du cortex

surrénalien. En se fixant sur ses récepteurs spécifiques, l'ACTH va permettre la phosphorylation d'enzyme (Lisurek and Bernhardt, 2004) hydrolysant les esters du cholestérol qui, suite à une réaction enzymatique en chaîne, aboutiront à la synthèse de GC (figure 6). Comme tous les stéroïdes surrénaliens, les GC ne sont pas stockés mais directement libérés dans le système circulatoire. Leur propriété lipophile leur permet alors de traverser aisément les membranes lipidiques, ainsi que la barrière hématoencéphalique afin de se lier à leurs récepteurs.

Au niveau circulatoire, les GC circulent principalement sous forme liée à la transcortine (ou CBG pour Corticostéroïd Binding Globulin). Le complexe GC-CBG représente environ 85% des GC dans le système circulatoire, environ 10% étant lié à l'albumine et environ 5 à 10 % étant sous forme libre (Breuner and Orchinik, 2002). La forme liée, inactive, constitue un « stock » de l'hormone qui devient active une fois libérée de la CBG (Mendel et al., 1989). Ainsi libérés, les GC actifs peuvent se lier à leurs récepteurs : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et aux glucocorticoïdes (GR).



**Figure 7 : Mécanisme d'activation et d'inactivation du cortisol**

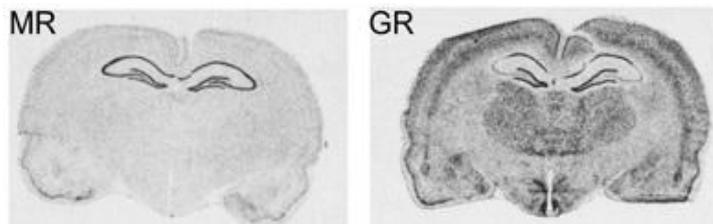
La 11β-HSD1 active la cortisone en cortisol, tandis que la 11β-HSD2 inactive le cortisol en cortisone. (D'après Hintzpeter et al., 2014).

Au niveau tissulaire, la concentration des GC est sous le contrôle de 2 isoenzymes : la 11-β- hydroxystéroïde déhydrogénase de types 1 et 2 (11β-HSD<sub>1</sub> et 11β-HSD<sub>2</sub> respectivement). Ces enzymes catalysent les réactions d'interconversion des hormones actives (cortisol et corticostérone) en leur forme inactive (cortisone et 11-déhydrocorticostérone, respectivement). La 11β-HSD<sub>1</sub> possède une activité ambivalente : elle peut à la fois permettre la déshydrogénation (actif→inactif) que la réduction (inactif→actif) (figure 7). La 11β-HSD<sub>2</sub> possède exclusivement une activité déshydrogénase (Hintzpeter et al., 2014), c'est-à-dire qu'elle inactive le cortisol (ou la corticostérone) en cortisone (ou en 11-

déhydrocorticostérone). Elle est présente dans les tissus cibles de l'aldostérone : les glandes salivaires, les glandes sudoripares, les reins et le côlon. On la retrouve également dans le placenta et les tissus fœtaux. Les récepteurs MR des GC ont également une haute affinité pour l'aldostérone. La  $11\beta$ -HSD<sub>2</sub>, en ciblant les structures cibles de l'aldostérone permet à cette dernière d'avoir une efficacité accrue, puisque la  $11\beta$ -HSD<sub>2</sub> inactive les GC, qui ne peuvent plus se fixer à leurs récepteurs. Ainsi, la  $11\beta$ -HSD<sub>2</sub> joue un rôle protecteur contre les effets des GC sur certains tissus et sur le fœtus.

La demi-vie du cortisol est comprise entre 60 et 90 minutes chez l'Homme et celle de la CORT chez le rongeur est de 50 minutes. Une grande majorité du cortisol est réduite puis conjuguée dans les cellules cibles ainsi que dans le foie, avant d'être excrétée dans les urines. Une partie du cortisol n'est pas réduite et est donc directement éliminée dans les urines sous forme libre.

#### b. Récepteurs



**Figure 8 : Répartition des récepteurs MR et GR dans un cerveau de rat**

Localisation par immunomarquage des récepteurs MR (à gauche) et des GR (à droite) dans un cerveau de rat. (D'après Yau and Seckl, 2012).

L'action des GC est possible grâce à la présence dans les cellules cibles de récepteurs de 2 types différents : les récepteurs MR et les récepteurs GR. Les deux types de récepteurs sont physiologiquement et structurellement très proches mais présentent des affinités différentes pour les GC. En effet, les MR ont

une très grande affinité aux GC (constante de dissociation :  $K_d=0,5-1nM$ ), tandis que les GR lient les GC avec une affinité moins importante que les MR ( $K_d=2,5-5nM$ ). Avec cette différence d'affinité, les MR sont donc principalement impliqués dans les activités basales de l'axe HPA alors que les GR entrent en action en réponse à un pic circadien ou à l'exposition à un stress (de Kloet et al., 2005).

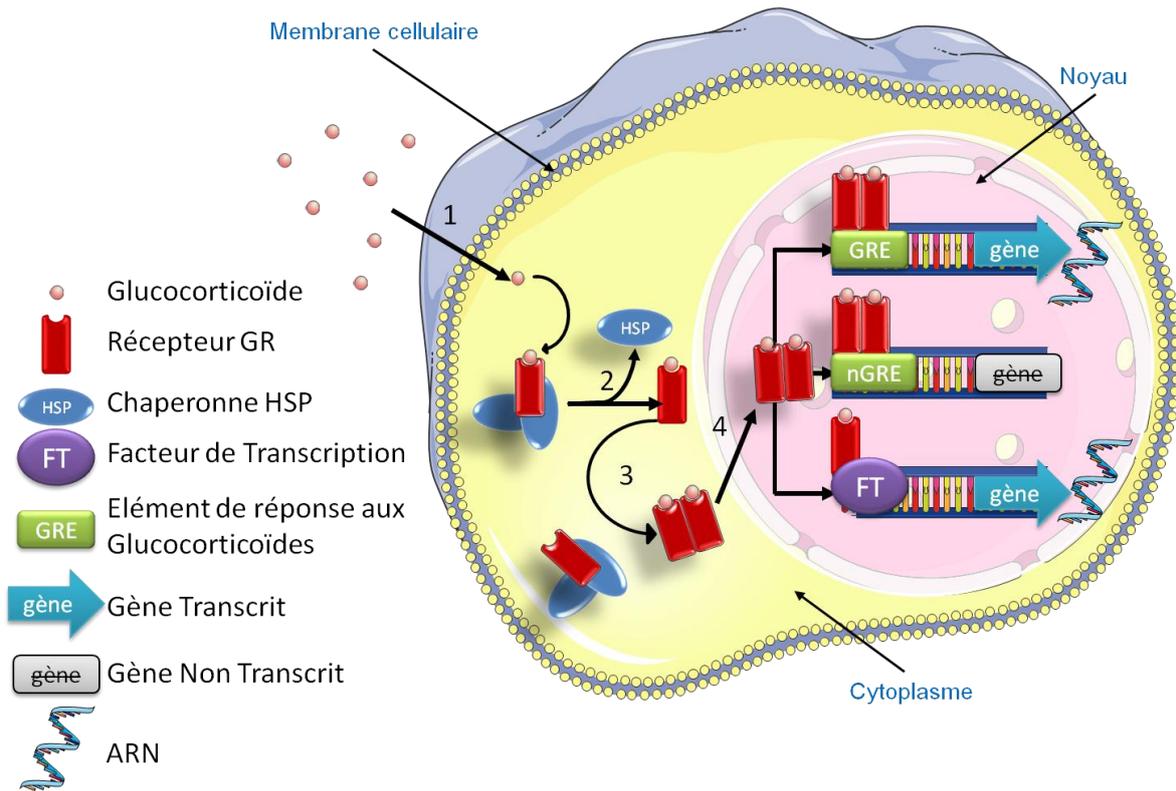
Les récepteurs aux GC ont une demi-vie plus importante que les GC eux-mêmes (50 à 90 minutes pour les GC contre environ 25h pour les récepteurs libres et 10h pour les récepteurs liés). Dans le cerveau, l'expression des MR est confinée au niveau du système limbique notamment dans l'HPC, l'amygdale, le septum et l'hypothalamus. Par contre, la

distribution des GR est ubiquitaire avec une forte densité dans l'HPC et le PVN de l'hypothalamus (figure 8). Les deux types de récepteurs se retrouvent alors co-localisés dans les neurones des structures du système limbique et surtout dans l'HPC (Yau and Seckl, 2012). C'est notamment le cas des neurones du CA1 (corne d'Ammon) et du GD (gyrus denté) (Joels et al., 2007). Il y a aussi une différence de répartition des récepteurs le long de l'axe dorso-ventral de l'HPC : les MR sont deux fois plus nombreux dans l'HPC ventral (HPCv) que dans l'HPC dorsal (HPCd), alors que les GR sont trois fois plus nombreux dans l'HPCd que dans l'HPCv (Robertson et al., 2005). Ceci suggère donc une potentielle dissociation des effets des récepteurs hippocampiques selon un axe dorso-ventral.

### c. Mécanisme d'action des GC

L'action des GC par leurs récepteurs peut être divisée en 2 catégories : l'action non-génomique et l'action génomique. En effet, les récepteurs MR sont capables d'une action non-génomique. Cette action est possible par la présence de MR dans la membrane plasmique (Joels et al., 2008). Contrairement à leurs homologues cytoplasmiques, les MR membranaires ont une plus faible affinité pour les GC (Karst et al, 2005). Leur affinité est comparable à celle des GR ce qui laisse supposer que leur activation est dépendante de fortes concentrations en GC. Leur présence membranaire permet à ces récepteurs d'être les acteurs des réponses rapides, non-génomiques, de l'organisme face à une augmentation des concentrations de GC. Les premières études ont démontré qu'ils pourraient agir en augmentant la neurotransmission glutamatergique (Karst et al., 2005) et réguler le trafic de surface des récepteurs AMPA (Groc et al., 2008; Krugers et al., 2010) facilitant ainsi la transmission et la plasticité synaptique dans l'HPC. De récentes études démontrent également un rôle important des récepteurs MR dans la survie neuronale (Munier et al., 2012) et la neurogénèse (Le Menuet and Lombes, 2014).

En plus de leur action non-génomique, les récepteurs aux GC modulent l'expression de gènes cibles après la fixation de leur ligand (figure 9) par une action génomique. Les MR et les GR sont donc des facteurs de transcription qui régulent l'expression de centaines à plusieurs milliers de gènes en fonction du type cellulaire (Zhou and Cidlowski, 2005).



**Figure 9 : Mécanisme d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes**

Les GC entrent dans la cellule et se fixent à leurs récepteurs (1). Celui-ci se sépare des chaperonnes (2) et se dimérise (3) pour entrer dans le noyau (4) afin d'agir sur les régions cibles du génome, par l'activation ou la répression de l'expression de gènes cibles. Une voie monomérique existe également grâce à la fixation du récepteur GR à un facteur de transcription (Adapté de (Alangari, 2010; Kadmiel and Cidlowski, 2013)

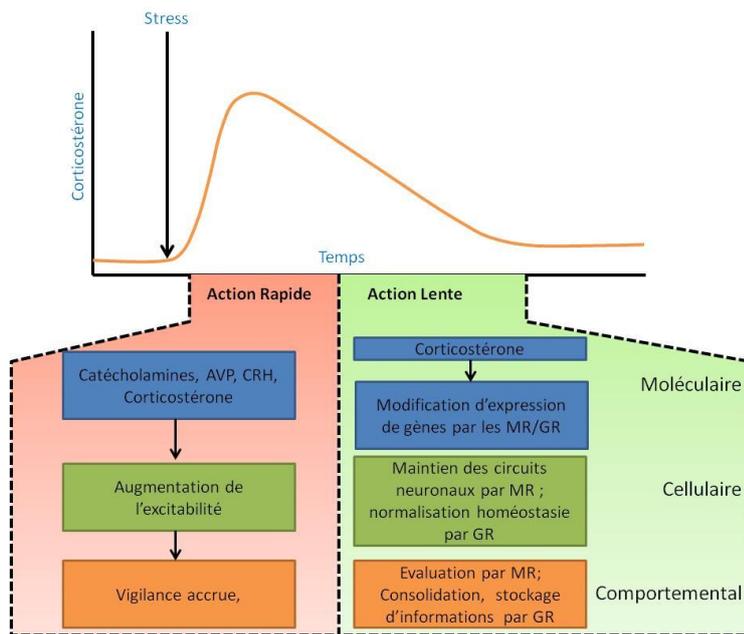
A l'état libre, les récepteurs sont présents dans le cytoplasme sous forme de complexe multiprotéique composé du récepteur lui-même accompagné de chaperonnes (2 protéines hsp90, une protéine hsp70 et une protéine hsp50). Les GC libres, liposolubles, diffusent librement à travers la membrane cytoplasmique pour venir à la rencontre des récepteurs présents à l'état inactif. La liaison ligand/récepteur/chaperonnes induit une modification de conformation, accompagnée d'une hyperphosphorylation du récepteur qui permet la dissociation du récepteur de ses protéines chaperonnes. Le nouveau complexe ligand/récepteur va alors pouvoir se dimériser (homodimérisation GR/GR ou MR/MR, ou hétérodimérisation GR/MR). La dimérisation finalisée, la translocation dans le noyau est alors possible avec l'aide de protéines recrutées par la libération de signaux spécifiques. Une fois dans le noyau, les récepteurs vont pouvoir se fixer à l'ADN sur une séquence spécifique qui reconnaît les récepteurs activés : les HRE (Hormone

Response Element). Il existe 2 types de HRE dans le cas des récepteurs aux GC : les GRE (Glucocorticoid Response Element) et les MRE (Mineralocorticoid Response Element). Ces éléments de réponse se situent sur le promoteur du gène cible. Dans le cas des GRE, on distingue 2 types : les GRE « positifs » qui activent la transcription des gènes cibles, contrairement aux GRE « négatifs » qui répriment leur transcription. Si la transcription a bien lieu, des ARN messagers sont produits puis traduits en protéine.

Cependant, cette voie d'action des GC ne serait pas la seule à agir sur la transcription de gène cible. En effet, une voie d'action ne faisant pas intervenir les HRE seraient également présente en mettant en jeu des interactions protéine-protéine à l'état de monomère. Les récepteurs peuvent alors interagir avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1 (activator protein-1), CRE (cAMP response element) ou encore c-Fos/Jun (Arnett et al., 2015). Ainsi, les récepteurs peuvent réguler la transcription de gène ne possédant pas de HRE. Le complexe récepteur-facteur de transcription se lie à l'ADN au niveau d'une séquence du promoteur reconnaissant le facteur de transcription. Le récepteur interfère avec l'action du facteur de transcription en activant de façon synergique ou en réprimant la transcription du

gène cible.

Ainsi, par leur action génomique, les GC parviennent à induire ou inhiber la synthèse de nombreuses protéines qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions comme l'architecture cellulaire, le métabolisme cellulaire ou encore la transmission synaptique. Ces protéines peuvent être des facteurs de transcription, des enzymes, des récepteurs, des facteurs de croissance, des hormones ou encore des neurotransmetteurs.



**Figure 10 : Evolution temporelle de la réponse aux hormones de stress**

L'activation de l'axe HPA entraîne une série de réponses rapides (en orange) et lentes (en vert) à la fois moléculaires (carrés bleus), cellulaires (carrés verts) et comportementales (carré orange). D'après(de Kloet et al., 2005)

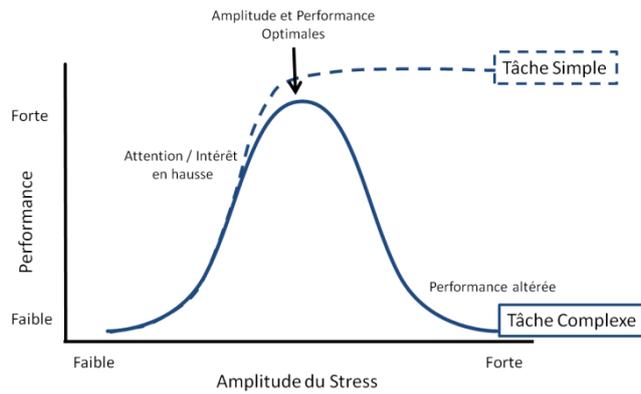
Ainsi, 2 types d'action existent concernant les effets des GC. Une première action rapide, non-génomique est mise en avant en réponse à l'augmentation de la concentration des GC (figure 10). Ce phénomène se met en place dans un délai très court (moins de 5 minutes). Ensuite, les effets génomiques se mettent en place, dans un délai plus important que les effets non génomiques. Ces derniers prennent en effet 10 à 30 minutes de translocation nucléaire, 5 à 120 minutes de transcription et traduction. Cela aboutit, dans le meilleur des cas, à une réponse génomique mise en place en 15 minutes, mais ce délai est généralement plus long. Cette double réponse, à la fois rapide et plus lente, permet une adaptation optimale face à un stress en impliquant différentes structures cérébrales comme le cortex préfrontal, qui en augmentant la vigilance, l'éveil émotionnel et l'attention permet un traitement de l'information et une prise de décision optimisée (Arnsten et al., 2015).

#### 4. Du stress normal à la pathologie

Nous avons jusque-là décrit les mécanismes de base du stress, les acteurs moléculaires mis en jeu, les structures impliquées et les systèmes de régulation. Le stress entraîne un nombre de modifications très important sur différentes fonctions comme la régulation des lipides et des sucres, la croissance et le développement, tout aussi bien que le système immunitaire ou encore les fonctions cérébrales. Dans ce manuscrit, nous ne développerons que les impacts sur le système nerveux central. En effet, l'implication du stress et des GC sur des aspects comportementaux est très importante puisqu'ils agissent sur plusieurs composantes vitales comme le sommeil (Born et al., 1989), la mémoire et les types d'apprentissage (Roozendaal et al., 1997; Sandi et al., 1997; Sandi, 2013; Schwabe, 2013), les troubles de l'humeur (Lupien et al., 1999; Lupien et al., 2009; Papadopoulou et al., 2015), la prise alimentaire (Dallman et al., 2004; Ulrich-Lai et al., 2015) ou encore les comportements sociaux (Sapolsky et al., 1997; Cavigelli and Caruso, 2015).

##### a. Stress normal : action sur les fonctions cognitives et émotionnelles

Le stress, cette réaction physiologique mise en place afin de solliciter les ressources énergétiques nécessaires pour faire face à une menace et permettre la réponse comportementale adaptée, est une réaction vitale primitive pour l'individu. En condition aiguë, il permet de moduler la réponse comportementale pour que celle-ci soit adaptée à la situation.



**Figure 11 : Courbe de Yerkes-Dodson représentant les performances lors d'une tâche mnésique en fonctions du niveau de stress**

Les performances mnésiques sont dépendante de la difficulté de la tâche : tâche simple (Trait en pointillés) ou complexe (Trait plein). (Adapté de Diamond et al., 2007).

Ainsi, le stress permet de moduler différentes fonctions supérieures comme l'apprentissage et la mémoire, certains auteurs allant jusqu'à dire que « le stress façonne la mémoire » (Schwabe et al., 2010a). Schwabe détaille même ces propos en démontrant que le stress joue un rôle à la fois sur la quantité et la qualité de la mémoire. Concernant l'aspect quantitatif, celui-ci est dépendant du contexte ainsi que de l'état émotionnel du sujet. Certains auteurs rapportent des effets facilitateurs du stress sur l'acquisition, la consolidation et le rappel de nouvelles informations

(Nater et al., 2007; Schwabe et al., 2008) et d'autres des effets perturbateurs (Lupien et al., 1997; Arnsten, 2009; Schwabe and Wolf, 2010). Plusieurs facteurs sont à prendre en considération comme le contexte émotionnel dans lequel l'apprentissage se fait, la complexité de la tâche ainsi que l'intensité du stimulus stresseur. Les performances observées sont alors tributaires de ces facteurs, et varient ainsi avec l'intensité du stress (figure 11) (Diamond et al., 1992; Diamond et al., 2007).

Concernant l'aspect qualitatif, le stress va moduler la réponse comportementale en favorisant la mise en place d'associations de type stimulus-réponse, dépendant du striatum, au détriment d'associations de type stimulus-stimulus (spatiales), dépendant de l'HPC (Schwabe et al., 2010b). Le stress contraint donc le sujet à employer des stratégies simples, rapides et rigides au détriment de stratégies cognitives flexibles et adaptables à de nouvelles situations.

D'un point de vue émotionnel, le stress participe à la perception et à l'attribution de valence accordée à un stimulus (Myin-Germeys et al., 2003). De cette façon, un stimulus, stressant ou non, pourra être perçu différemment en fonction de l'état émotionnel de l'individu (Brown et al., 2012). Le stress module également la sensibilité aux stimuli anxiogènes. En effet, de nombreuses études ont démontré une anxiété accrue, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, chez des sujets ayant été exposés à un stress avant d'être exposés à une situation anxiogène (Timpl et al., 1998). Ces données vont de paires avec des perturbations retrouvées chez des animaux génétiquement modifiés. Ces derniers, dont la sensibilité au

stress est accrue par des déficits de modulation de l'axe HPA, présentent des troubles majeurs de l'anxiété (Bale et al., 2000).

b. Stress pathologiques et conséquences neurobiologiques

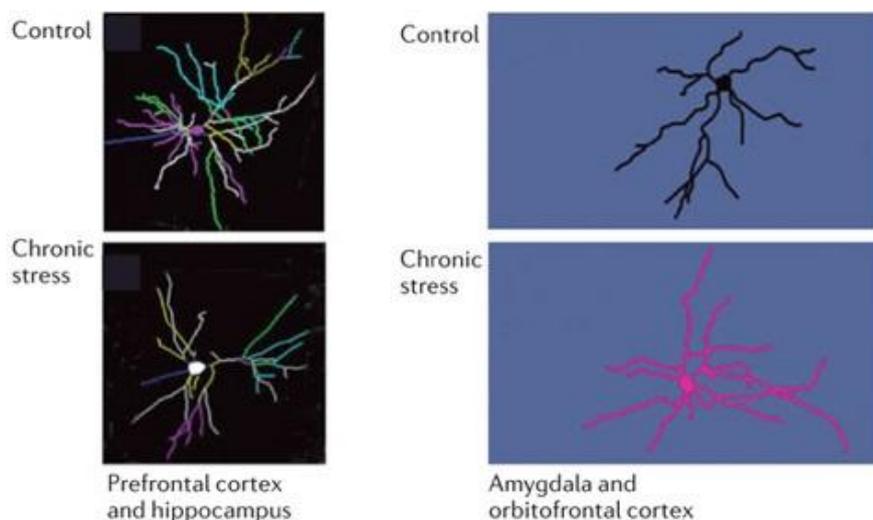
La réaction normale de stress peut se trouver perturbée et mener à l'apparition de nombreux troubles. L'homéostasie existante en condition normale disparaît et engendre ainsi des troubles liés à l'hyperactivité ou hypoactivité de l'axe HPA qui en résulte. Les répercussions de ces modifications peuvent ainsi toucher toutes les fonctions intervenant dans la régulation de l'axe HPA lui-même, ou les fonctions sensibles à l'état émotionnel de l'individu.

Une des premières maladies à avoir été mise en relation avec les GC est la maladie d'Addison, du nom du médecin qui l'a découverte. Il énonce les symptômes de cette maladie en 1855 [voir (Nieman and Chanco Turner, 2006)]. Cette maladie rare, qui touche 3 à 4 personnes sur 1 million d'habitants est une insuffisance rénale lente, en rapport avec une insuffisance des glandes corticosurrénales. Cette maladie entraîne une fatigue profonde, une hypotension artérielle, des douleurs gastriques et lombaires, des troubles psychiques et surtout une coloration bronzée de la peau. Les causes de cette maladie sont souvent liées à une prédisposition génétique ou bien à la tuberculose.

Un autre dérèglement observable en lien avec le stress pathologique est la maladie de Cushing [voir (Newell-Price et al., 2006)]. Découverte par Harvey Cushing en 1932, la maladie de Cushing est due à un adénome, tumeur bénigne, de l'hypophyse qui entraîne une hypersécrétion d'ACTH. Suite à ces concentrations élevées en ACTH, les surrénales vont libérer des GC qui mèneront à une hypercortisolémie générale. Les symptômes observables de cette maladie sont d'important maux de tête, une obésité androïde (en triangle inversé), un aspect « bouffi » du visage, une hypertension artérielle, des troubles anxio-dépressifs, du diabète et des troubles psychologiques. Cette maladie touche préférentiellement les femmes, avec une occurrence de 2 à 3 femmes par million d'habitants et par an.

De plus, avec l'avènement des traitements à base de corticostéroïdes, les effets secondaires de ces molécules ont attiré l'intérêt des scientifiques. Dans certains cas, les patients développaient des troubles de l'humeur, du sommeil et un appétit grandissant. L'état des patients pouvait alors évoluer de l'euphorie à la dysphorie en peu de temps accompagné de logorrhée (flux important de paroles), d'hyperactivité et de psychose (Brown, 2009). Ce

sont ces observations qui ont mené les cliniciens et scientifiques de l'époque à dénoncer la « psychose stéroïdienne » (Rome and Braceland, 1952).



**Figure 12 : Variation d'arborisation dendritique des neurones des cortex préfrontal et orbitofrontal, de l'amygdale et de l'hippocampe après un stress chronique**

Une diminution de l'arborisation dendritique dans le PFC et l'hippocampe (à gauche) et au contraire une augmentation dans l'AMG et le cortex orbitofrontal (à droite) sont observables après une exposition au stress chronique. (D'après Popoli et al., 2012).

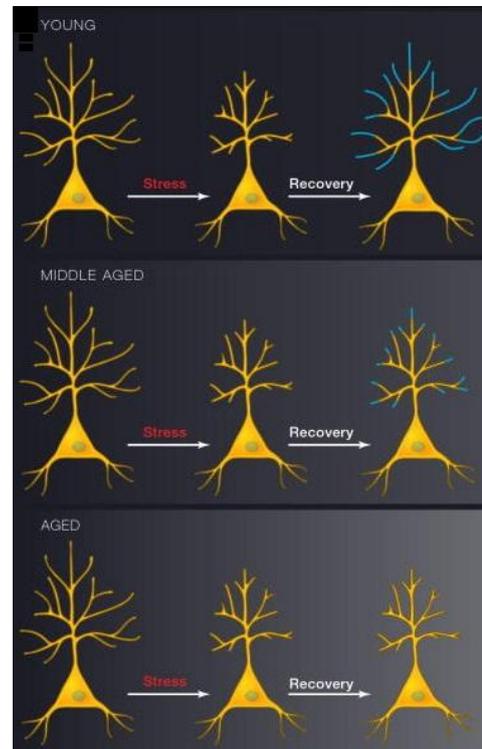
Ces différentes perturbations, ayant pour point commun une hypercortisolémie, peuvent également être rencontrées dans des cas de stress chronique. Aujourd'hui, le stress chronique est une composante très importante d'un point de vue sociétal puisque toutes les tranches d'âge peuvent être touchées par ce phénomène. Les

modifications engendrées par le stress chronique sont généralement importantes aussi bien au niveau comportemental que physiologique. On sait aujourd'hui que le stress chronique agit sur le système nerveux en diminuant l'arborisation dendritique dans l'HPC et le cortex préfrontal et en l'augmentant dans l'amygdale et le cortex orbitofrontal (figure 12) (Popoli et al., 2012).

Ces modifications semblent être sensibles à l'âge d'apparition du stress chronique. Des études récentes ont montré que chez le sujet jeune, l'arborisation dendritique dans le PFC se renouvelait après l'arrêt du stress chronique (McEwen and Morrison, 2013). Cependant, cette récupération ne s'observe pas, ou du moins pas complètement, chez des sujets adultes et âgés (figure 13). De plus, une diminution de la neurogénèse hippocampique a également été rapportée après la survenue d'un épisode de stress chronique. La naissance de nouveaux neurones dans l'HPC se voit diminuée en cas de stress chronique (Lucassen et al., 2010) ce qui participerait à la diminution du volume de l'HPC (Dranovsky and Hen, 2006; Lucassen et al., 2014). Ces modifications dendritiques et de neurogénèse semblent associées à des perturbations de l'expression du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) dans certaines

structures, principalement l’HPC, l’amygdale et le cortex préfrontal (Bennett and Lagopoulos, 2014; Filho et al., 2015).

Le stress entraîne également une perturbation du système glutamatergique. De façon aigu, le stress permet une augmentation de la neurotransmission glutamatergique dans l’HPC et dans le cortex préfrontal (Popoli et al., 2012). De façon chronique, la neurotransmission glutamatergique de l’HPC reste durablement accrue tandis que celle du PFC augmente mais ne se maintient pas (Moghaddam, 2002). Ceci suggérerait une faculté d’adaptation du PFC mais pas de l’HPC dans la réponse au stress chronique. Le stress chronique peut également altérer la capacité à « vidanger » le glutamate synaptique. Cela peut conduire à une concentration excessive en glutamate et donc à l’activation des récepteurs extrasynaptiques au glutamate. Ceci entraîne une excitotoxicité qui pourrait se produire après une exposition à un stress chronique (Banar et al., 2010). De nombreuses études suggèrent que le stress chronique a des effets significatifs sur la fonction des cellules gliales. Plusieurs études ont démontré une diminution dans l’expression de la protéine GFAP (protéine acide fibrillaire gliale) et du nombre de cellules gliales exprimant GFAP dans l’HPC et le cortex préfrontal après l’exposition à un stress chronique (Banar and Duman, 2008).

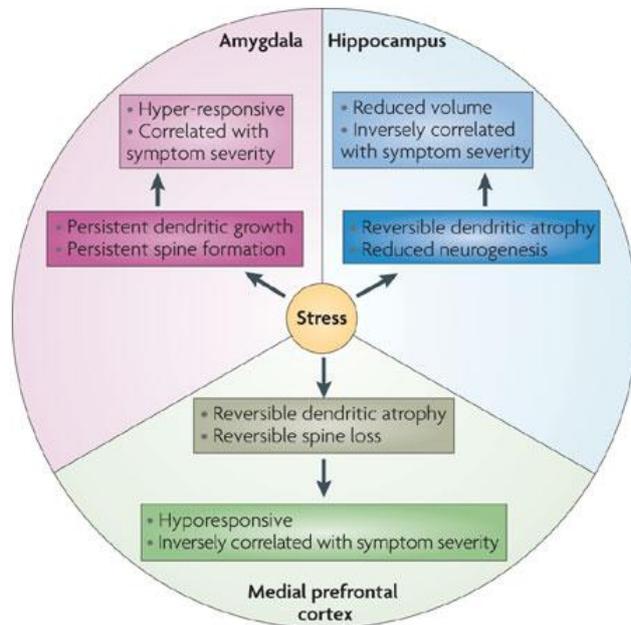


**Figure 13 : Différence de ré-arborisation dendritique après un stress chronique dans le PFC**

Ré-arborisation dendritique chez des jeunes (en haut), des adultes (au milieu) et des personnes âgées (en bas) après l’exposition à un stress chronique. (D’après McEwen and Morrison, 2013).

Ainsi, de nombreuses structures voient leur fonctionnement modifié après un épisode de stress chronique (figure 14) (Roosendaal et al., 2009). Ces modifications touchent principalement des structures impliquées dans la régulation de l’axe HPA. De plus, de nombreuses autres perturbations comportementales, physiologiques et psychologiques sont à mettre au compte des dérèglements stéroïdiens comme l’insomnie (Chrousos et al., 2000; Buckley and Schatzberg, 2005a, b), les troubles de l’humeur (Seney et al., 2012; Cattaneo and Riva, 2015), les troubles mnésiques (Tronche et al., 2010b; Tomar et al., 2014) ou encore les

comportements addictifs (assuétude) (Koob, 2008; Sinha, 2008). De plus, nous pouvons observer des modifications de la régulation de l'axe HPA avec le vieillissement (Sapolsky et



**Figure 14 : Modifications structurelles de régions cérébrales impliquées dans la réponse au stress**

Le stress entraîne des modifications dendritiques, ainsi que des changements de sensibilité dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale. L'hippocampe présente un volume réduit principalement associé à une diminution de la neurogénèse et à une atrophie dendritique réversible. Le cortex préfrontal médian présente lui aussi une atrophie dendritique réversible. Enfin, l'amygdale présente une hyperactivité associée à une augmentation du nombre de dendrites persistante (D'après Roozendaal et al., 2009).

al., 1986; Aguilera, 2011; Garrido, 2011) qui seraient d'autant plus exacerbées chez des sujets présentant les premiers signes de la maladie d'Alzheimer (Campbell et al., 2015).

Aujourd'hui, la population scientifique s'intéresse de plus en plus aux troubles de l'humeur qui apparaissent en cas d'hypercortisolémie chronique. Lors d'une exposition prolongée aux GC, l'organisme n'arrive plus à retrouver son état d'homéostasie et met en place un « équilibre allostatique » dont la dérive augmente avec le temps (Joels, 2008b; Bizik et al., 2013). Cette maladaptation au stress peut alors précipiter le développement de pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Pardon and Rattray, 2008) ou neuropsychiatrique comme la dépression (Miller et al., 2007; Pittenger

and Duman, 2008; Lupien et al., 2009).

## Les Troubles Dépressifs

Du latin *depressio* « enfoncement », « pression de haut vers le bas », la dépression est un trouble psychiatrique, correspondant à une dérégulation de l'humeur. On retrouve actuellement le terme de dépression dans plusieurs déclinaisons médicales comme la dépression majeure, la dépression nerveuse, les troubles dépressifs, les épisodes dépressifs etc.

Cet état pathologique se caractérise principalement par une humeur triste et douloureuse associée à une réduction de l'activité psychomotrice et à un désintérêt intellectuel (définition de l'encyclopédie Larousse). D'autres signes peuvent être associés à la dépression comme des pensées négatives, des intentions suicidaires voire des hallucinations. Aujourd'hui le terme de dépression est couramment utilisé, cependant il semble ne pas être toujours bien interprété par le public qui peut être amené à confondre la déprime, légère fatigue morale et physique passagère avec la dépression, réelle pathologie nécessitant la mise en place d'un suivi thérapeutique et psychologique. Pour une meilleure compréhension, nous allons tenter de donner quelques définitions et informations importantes en ce qui concerne la dépression majeure chez l'Homme et les études qui ont été menées à ce sujet.

### 1. Historique

Dès l'Antiquité, on retrouve des écrits relatant des états dépressifs chez des individus, comme dans le papyrus d'Ebers, datant d'environ 1.550 ans avant notre ère, où un scribe égyptien relate que « La mort est aujourd'hui mon seul espoir ». Ce sont là les plus anciens écrits retrouvés à ce jour, témoignant de la prise de conscience par l'Homme de cet état « psychologique ». Il est cependant difficile d'appréhender la dépression d'un point de vue historique aux vues des changements de mœurs et de courants de pensée qui ont évolué jusqu'à aujourd'hui. Au V<sup>ème</sup> siècle avant notre ère, la médecine antique commence à s'intéresser à la « santé de l'âme ». C'est Hippocrate qui énonce le premier la *mélancolie* comme une pathologie de l'esprit. Il énonce alors les ébauches de la *Théorie des Humeurs*, d'après laquelle le corps de l'Homme se compose de 4 fluides : le sang, la lymphe, la bile jaune et la bile noire. Ces quatre fluides sont alors en équilibre et responsables du bon état de santé de l'individu. D'après cette théorie, un excès de bile noire serait à l'origine d'un *état mélancolique*, ce que nous appelons de nos jours *l'état dépressif*.

D'autres philosophes comme Platon (427-358 av J.-C.) et Aristote (384-322 av J.-C.) reconstruisent les fondements de la théorie d'Hippocrate et la complètent avec la cosmologie des 4 éléments fondamentaux (eau, feu, air et terre) croisée avec des qualités physiques (chaud, froid, sec et humide). La composition d'un élément et d'une qualité donne naissance à un fluide, commun à la première théorie d'Hippocrate. On retrouve toujours cette théorie des humeurs dans notre quotidien, lorsque l'on désigne une personne comme étant sanguine, qui réagit vivement, comme étant sèche, chaleureuse et même dans l'expression « se faire de la bile ». Ainsi on fait encore, sans le savoir, appel à la médecine hippocratique dans notre quotidien.

Après l'Antiquité, l'affect dépressif sera longtemps théologique. Au Moyen-âge, les moines en proie à l'ennui monastique souffrent d'acédie, une tristesse accablante, une torpeur de l'esprit diabolisée par l'église (Forthomme, 2000). Le début du XX<sup>ème</sup> siècle rime avec la première apparition psychiatrique du terme *dépression* avec la publication du psychiatre allemand Emil Kraepelin en 1921, *Maniac depressive insanity and paranoia*. Cet ouvrage est un grand pas dans l'élaboration de classifications des troubles mentaux. Kraepelin y décrit les psychoses maniaco-dépressives (caractérisées par des alternances d'états maniaques suivis d'états dépressifs) qui incluaient alors plusieurs troubles comme la **dépression majeure**. Il y donne alors les premières caractéristiques que nous connaissons aujourd'hui, à savoir un état de tristesse profond, associé à une détresse morale et une inhibition des fonctions motrices.

A la même époque, Sigmund Freud (1856-1939) débute ses travaux sur les fondements de la psychanalyse, et compare la mélancolie au deuil dans *Mourning and Melancholia* en 1917. Freud décrit alors la dépression comme une incapacité de l'individu à faire face à ses problèmes et comme une perte de l'estime de soi, suggérant ainsi que la dépression est d'avantage une faiblesse individuelle qu'une pathologie. Enfin, le terme de *dépression* s'imposera petit-à-petit en lieu et place de *mélancolie* avec l'appui d'Adolf Meyer (1866-1950), psychiatre suisse, qui contribuera à mettre en évidence que la dépression est dépendante du contexte biologique et social dans lequel l'individu évolue (Blazer, 2005). Par la suite, l'intérêt s'est tourné vers une classification objective des troubles psychiatriques afin de pouvoir diagnostiquer ces troubles chez des patients. Naissent alors deux outils primordiaux, toujours employés dans des versions plus récentes, le « Diagnostic and Statistical Manual » (DSM) par l'Association Américaine de Psychiatrie et la « Classification Internationale des Maladies » (CIM) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

## 2. Sémiologie et Epidémiologie

### a. Sémiologie, classification et identification des troubles

Les troubles de l'humeur sont présentes de nombreuses variantes, dépendantes à la fois de la symptomatologie et de l'intensité des symptômes rencontrés. Parmi les troubles de l'humeur, il est possible de rencontrer les troubles dépressifs majeurs (ou dépression majeure), la dysthymie, la psychose maniaco-dépressive et encore d'autres troubles que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit. Au regard du DSM-V, édité depuis 2013, le diagnostic de dépression majeure est établi par la présence d'au moins 5 symptômes parmi une liste définie (avec au moins l'un des deux premiers) et doit se dérouler sur une période d'au moins 2 semaines. Ces symptômes sont :

- **Une tristesse quasi-permanente**
- **Une perte d'intérêt et du plaisir à l'égard des activités quotidiennes, même celles hautement plaisantes**
- Un sentiment de dévalorisation
- Des idées de morts ou de suicide récurrentes
- Des troubles attentionnels, mnésiques et de la concentration
- Un ralentissement psychomoteur
- Une fatigue (asthénie), souvent le matin
- Une perte ou gain d'appétit (associée à une perte ou gain de poids)
- Des troubles du sommeil (insomnie ou hypersomnie)

Ces principaux symptômes sont souvent, mais pas nécessairement accompagnés par des troubles secondaires comme des troubles anxieux, un isolement social ou encore des troubles cognitifs. Le DSM-V reconnaît plusieurs sous-catégories de la dépression majeure appelées « déterminants », dont les plus répandus sont la forme mélancolique (environ 25%) et la forme atypique (entre 15 et 30%) (Harald and Gordon, 2012). On trouve également le déterminant catatonique, post-partum et saisonnier. Le déterminant mélancolique est caractérisé par la présence d'une anhédonie, d'un état dysphorique (surtout le matin), d'insomnie, d'une perte de poids, d'un fort sentiment de culpabilité et d'une hyperactivité. L'ensemble de ces symptômes entraîne chez le patient un sentiment d'infériorité, en discordance avec la réalité ainsi que des troubles de l'humeur et de la pensée. Le déterminant atypique quant-à-lui, présente aussi une anhédonie et un état dysphorique en fin de journée. On note également une forte fatigue associée à une hypersomnie, une hypoactivité et une

augmentation de l'appétit et du poids. Ces symptômes s'accompagnent le plus souvent d'un détachement global de l'individu avec son environnement social.

Enfin, il est à noter que chaque individu présentant des troubles dépressifs majeurs n'est pas nécessairement associé à un des différents déterminants de la maladie. Son état dépressif peut être une combinaison de plusieurs critères de chaque déterminant et ainsi constituer un syndrome unique, rendant la sémiologie de la dépression complexe (Czeh et al., 2015a).

#### b. Epidémiologie

Selon l'OMS, les troubles mentaux constituent une des plus lourdes charges, en termes de morbidité dans le monde avec 16% de la population mondiale soit 450 millions de personnes, dont 120 millions particulièrement touchés par la dépression majeure (Kessler and Bromet, 2013). Les souffrances engendrées par les problèmes de santé mentale ainsi que les répercussions économiques et sociales sont considérables. On estime à 2,5% du produit national brut, le coût annuel cumulé des troubles mentaux aux USA. En Europe, cette part des dépenses, en ne prenant en compte que les frais d'hospitalisation, s'élèverait à 20-25%.

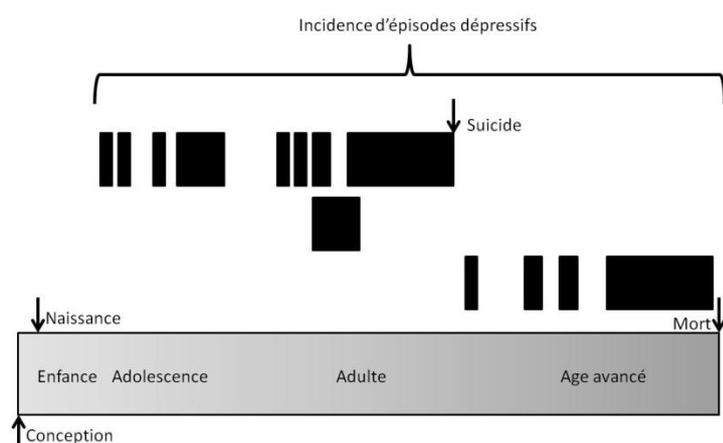
**Tableau 1 : Prévalence d'un épisode dépressif en France au cours des 12 derniers mois (Baromètres santé de l'INPES 2005 et 2010)**

	Ensemble		Hommes		Femmes	
	2005	2010	2005	2010	2005	2010
	n=16883	n=8238	n=7078	n=3686	n=9805	n=4552
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Total 15-75 ans</b>	<b>7.8</b>	<b>7.8</b>	<b>5.1</b>	<b>5.6</b>	<b>10.4</b>	<b>10.0</b>
<b>15-19 ans</b>	<b>7.0</b>	<b>6.4</b>	<b>4.5</b>	<b>3.7</b>	<b>9.7</b>	<b>9.3</b>
<b>20-34 ans</b>	<b>9.1</b>	<b>10.1</b>	<b>6.4</b>	<b>7.0</b>	<b>11.9</b>	<b>13.2</b>
<b>35-54 ans</b>	<b>8.9</b>	<b>9.0</b>	<b>5.4</b>	<b>7.3</b>	<b>12.3</b>	<b>10.7</b>
<b>55-75 ans</b>	<b>5.3</b>	<b>4.7</b>	<b>3.6</b>	<b>2.6</b>	<b>6.8</b>	<b>6.6</b>

Selon le Baromètre de l'INPES (Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé) de 2010, 7,8% des Français de 15 à 75 ans ont vécu un épisode dépressif majeur au cours des douze derniers mois, soit environ 5 millions de personnes (Beck and Guignard, 2012). Sur une vie entière, ce pourcentage s'élève alors à 19%, soit 12,5 millions de

personnes. Les détails des prévalences en fonction de l'âge et du sexe des individus sont présentés dans le tableau 1.

En 2010, on remarque que la prévalence chez l'adulte (20-54 ans) est environ 2 fois plus grande que celle des adolescents (15-19 ans) et des personnes âgées (55-75 ans). Ceci s'explique par les pressions sociales et économiques rencontrées chaque jour dans le monde du travail (ou l'absence de travail) qui peuvent conduire à des états de fatigue mentale, de « BurnOut » voire de dépression majeure (Marchand et al., 2014).



**Figure 15 : Incidence des épisodes de dépressions en fonction de l'âge**

Les fragments noirs correspondent à l'occurrence d'un épisode dépressif. Chaque ligne de fragments noirs représente un schéma possible d'occurrence de la dépression chez l'enfant, l'adulte et la personne âgée. (D'après Czeh et al., 2015a)

Cependant, il est à noter que la variabilité des troubles mentaux et les différences de critères diagnostics rendent difficiles les études épidémiologiques (Czeh et al., 2015a). Il n'en reste pas moins que la dépression majeure est une pathologie sévère qui revêt un aspect récurrent sur toute la vie du patient dans 75% des cas (avec plusieurs schéma d'incidence possible ; figure 15), identifiée par une succession de phases de

**rémission** et de **rechute** (Frank and Thase, 1999). On estime à 60%, le risque de rechute chez un patient ayant déjà rencontré un épisode de dépression majeure. La rechute, si elle a lieu, n'est cependant pas nécessairement liée à la même origine du premier épisode de dépression majeure, ce qui laisse supposer une certaine sensibilité mise en place après un premier épisode dépressif (Burcusa and Iacono, 2007).

En France, chaque année, près de 10.500 personnes souffrant de dépression décèdent par suicide et il est estimé que les tentatives de suicide sont dix fois plus nombreuses. Les suicides accomplis sont le plus souvent le fait de personnes âgées, célibataires, veufs ou divorcés, sans travail ou à la retraite. Environ 60 % des suicides sont reconnus comme directement liés à un trouble dépressif majeur (Mann et al., 2005; Nakao and Takeuchi, 2006).

### 3. Etiologie, facteurs prédictifs de la dépression

L'étiologie exacte de la dépression majeure reste encore mal connue aux vues de l'hétérogénéité des méthodes de classification. Comme décrit précédemment, il reste assez rare qu'un patient dépressif souffre de symptômes correspondant exactement à un déterminant de la dépression majeure. Très souvent, l'état dépressif du patient est une composante de symptômes variés qui, exprimés ensemble, donne naissance à un état dépressif. Ces variations s'expliquent principalement par des variabilités interindividuelles, qui démontrent bien que les troubles dépressifs ne sont pas des pathologies circonscrites à une définition donnée, mais un ensemble de troubles qui partage un certain nombre de manifestations, dont les mécanismes et les causes peuvent diverger. De ce fait, l'étiologie est difficilement définissable mais il est évident qu'elle est multifactorielle et qu'elle intègre à la fois des facteurs extrinsèques et intrinsèques que nous détaillerons ci dessous.

#### a. Facteurs extrinsèques

##### *Facteurs démographiques et psychosociaux*

L'expérience propre à l'individu va grandement contribuer à la formation de sa psychologie future et à sa capacité à réagir aux contraintes. Certaines personnes seront alors plus susceptibles de réagir à une situation que d'autres et seront potentiellement plus enclines à développer un trouble dépressif.

Comme signalé dans le tableau 1, le sexe et l'âge sont des facteurs importants concernant le risque de développer un épisode dépressif. L'INPES révèle une prévalence accrue d'épisodes dépressifs chez l'adulte, à hauteur de 9,5% contre 6,4% chez les adolescents et 4,7% chez les personnes âgées. Cependant, d'autres études ne parviennent pas aux mêmes conclusions. En effet, plusieurs études françaises (Alonso et al., 2004) indiquent que les classes d'âge les plus sensibles au développement de troubles dépressifs sont les adolescents, avec une prévalence à hauteur de 13%, tandis qu'au-delà de 18 ans, l'âge ne semble plus intervenir dans l'émergence de troubles dépressifs. Cette différence de conclusion entre les enquêtes nous montre à quel point il est difficile d'établir une vérité sur les sensibilités en fonction de l'âge des patients.

L'environnement social proche et le statut professionnel jouent également un rôle très important dans la prévalence des troubles dépressifs. A l'adolescence, la sphère amicale (l'entourage) est très importante et permet de prévenir l'apparition de syndrome dépressif (La

Greca and Harrison, 2005). Les revenus du foyer entrent également en jeu, on retrouve ainsi une prévalence accrue chez une personne au chômage comparativement à un employé en CDI. Une étude démontre également que cette différence de prévalence se retrouve aussi chez les enfants de ces foyers aux revenus différents (Lupien et al., 2001).

### *Facteurs environnementaux*

Le stress ou les traumatismes sont considérés comme des facteurs environnementaux majeurs pouvant précipiter un épisode dépressif et influencer sa sévérité, sa durée et sa récurrence (McEwen, 2005). Des événements de vie « anciens » comme les abus sexuels dans l'enfance sont fréquemment documentés dans leur potentielle implication avec la survenue d'un épisode dépressif futur. Certaines données tendent à montrer que les patients ayant subi ces abus et souffrant de troubles dépressifs présentent un trouble plus sévère et résistent davantage aux traitements (Kaplan and Klinetob, 2000; Banou et al., 2009; Polshuck et al., 2009). De plus, le nombre de traumatismes de l'enfance augmente le risque de développer une dépression à l'âge adulte et même de transmettre cette sensibilité à la descendance future (Champagne, 2008). D'autres études se sont intéressées aux rapports entre événements de vie « récents » et dépression. Les résultats rapportés sont assez souvent contradictoires et l'existence d'un état de stress post-traumatique (EPST) peut parfois être considéré comme un facteur aggravant (Lancon, 2009) même si les liens entre ESPT et dépression sont largement discutés dans la littérature (Kaplan and Klinetob, 2000).

Chez l'adulte, les facteurs de stress environnementaux peuvent contribuer à l'émergence d'un épisode dépressif, lequel est renforcé lorsque ceux-ci revêtent un caractère chronique ou traumatique (Kendler et al., 1995). Les habitudes et mode de vie de l'individu sont aussi responsables d'une part des incidences des troubles dépressifs. L'alcoolisme (Fergusson et al., 2009), le tabagisme (Martini et al., 2002), l'abus de drogue (Markou et al., 1998; Fairman and Anthony, 2012) sont autant de facteurs pouvant, à la fois, entraîner des épisodes dépressifs futurs et apparaître avec l'épisode dépressif lui-même (co-morbidité).

#### b. Facteurs Intrinsèques

### *Facteurs Génétiques*

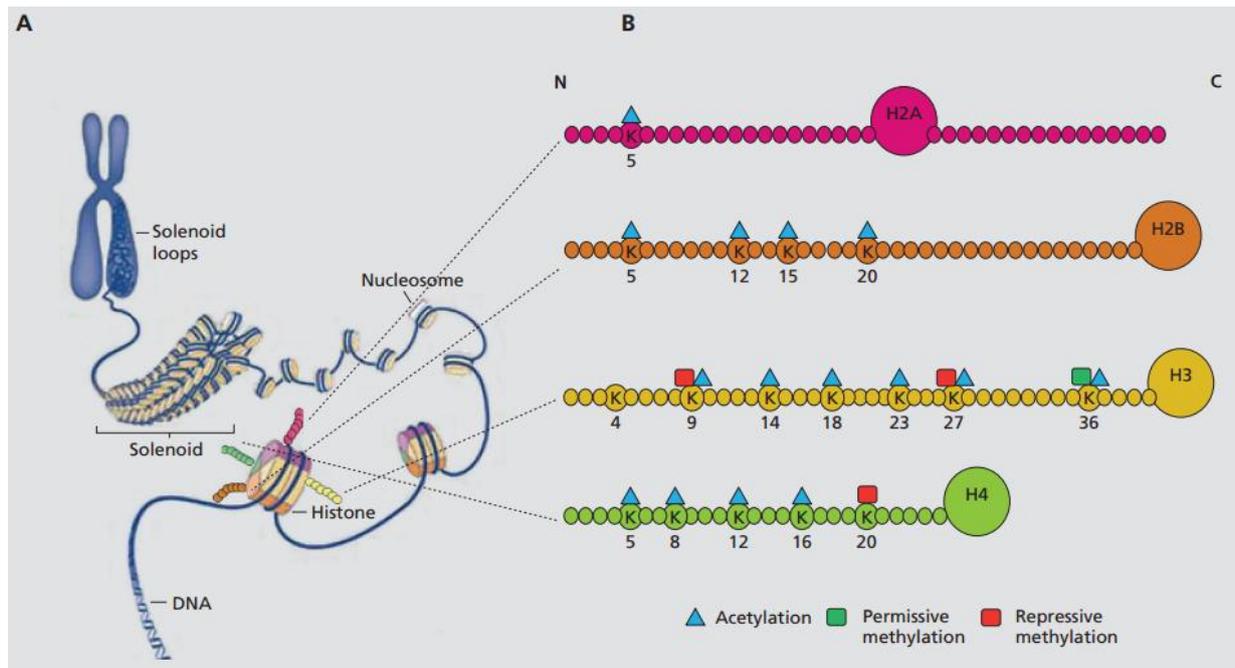
Le profil d'expression des gènes dans les troubles dépressifs majeurs a été longtemps considéré comme difficilement étudiable. Il est aujourd'hui clair que la vulnérabilité génétique n'est pas exclusivement due à un gène unique, mais à toute une population génétique complexe qu'il reste à identifier. Les nouvelles avancées en matière d'études sur le

génomique ont permis de mettre en avant plusieurs candidats potentiels (Flint and Kendler, 2014), dans la présence d'un risque de développement de troubles dépressifs. Ces derniers peuvent également être impliqués dans d'autres troubles psychiatriques (Smoller et al., 2013), d'autant plus que certains traits de personnalité ayant une implication dans la survenue d'épisodes dépressifs comme l'anxiété, le pessimisme ou encore l'évitement des nuisances (Bouchard and Loehlin, 2001) ont une héritabilité importante.

Malgré quelques résultats contradictoires, plusieurs études ont permis d'identifier des régions chromosomiques associées à la dépression majeure (Holmans et al., 2007). Des études comparatives sur les épisodes dépressifs majeurs apparus chez des jumeaux homozygotes et hétérozygotes suggèrent un taux d'héritabilité d'environ 37% (Sullivan et al., 2000). Très récemment, dans une lettre parue dans le journal *Nature*, un consortium a validé des travaux démontrant l'existence de deux loci sur le chromosome 10 contribuant au risque de développer une dépression majeure (Cai, 2015). Un variant polymorphique fréquemment retrouvé chez des sujets dépressifs touche également le promoteur du gène *5-HTTLPR* codant pour un transporteur de la sérotonine. Cette modification entraîne *in fine* une diminution de la recapture de la sérotonine dans la fente synaptique des cellules nerveuses cérébrales qui conduirait à la mise en place de troubles dépressifs à court, moyen ou long terme (Lesch et al., 1996; Starr and Hammen, 2015). Les patients présentant cette modification auraient donc une plus grande sensibilité face au stress, se traduisant également par une hyperactivité amygdalienne (Caspi et al., 2003; Munafò et al., 2008), appuyée par des études d'imagerie cérébrales (Pezawas et al., 2005; Neumeister et al., 2006).

### *Facteurs Epigénétiques*

En plus des modifications génétiques observables, le rôle des modifications dites épigénétiques semblent impliquées dans la dépression majeure (figure 16). L'épigénétique désigne les processus permettant au génome de contrôler le développement et le fonctionnement de l'organisme en fonction des influences qu'exercent l'environnement (Bagot et al., 2014). Les mécanismes de régulation épigénétique peuvent être regroupés en 3 domaines principaux : les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage de la chromatine et la méthylation de l'ADN. Bien que chacun ait une grande importance dans les régulations épigénétiques, ces trois mécanismes agissent de concert pour établir l'expression phénotypique.



**Figure 16 : Structure de la chromatine et modifications épigénétiques des histones**

A : Génome eucaryote organisé autour d'octamères d'histones formant des nucléosomes, eux-mêmes compactés pour former les solénoïdes à la base de la structure chromosomique. B : Composition d'un octamère d'histone, chaque histone (H2A, H2B, H3 et H4) étant présente en 2 exemplaires dans l'octamère. Le schéma présente également les lysines (K) pouvant subir des modifications épigénétiques telles que des acétylations ou méthylation, permettant ou non l'accès des ribosomes au brin d'ADN pour entamer la transcription. (adapté de Bagot et al., 2014).

Ces modifications sont sensibles aux perturbations de l'environnement et à l'expérience comportementale, en particulier concernant les loci de gènes impliqués dans la plasticité neuronale (McEwen et al., 2012). Ainsi, différents facteurs développementaux et environnementaux peuvent conférer une susceptibilité pour la dépression en affectant le génome d'une manière épigénétique (McGowan and Roth, 2015). Par exemple, il a été montré qu'un comportement maternel caractérisé par les soins apportés aux jeunes chez les rongeurs induit des changements épigénétiques dans la région promotrice du gène du récepteur GR qui pourraient être bénéfiques contre l'apparition d'un état « dépressif-like » (McGowan et al., 2011). De même, un protocole de stress chronique basé sur la défaite sociale chez la souris est capable d'induire des changements épigénétiques qui perturbent l'expression du gène du BDNF. Un traitement chronique par un antidépresseur (l'imipramine) permet d'abolir ces effets par de nouveaux changements épigénétiques sur le même gène mais sur des sites différents (Tsankova et al., 2006). Ces modifications peuvent persister dans le temps et peuvent même parfois être irréversibles jusqu'à la mort du patient (Vialou et al., 2013).

En sachant le caractère irrémédiable de certaines de ces modifications, l'épigénétique a été proposée pour expliquer de nombreux aspects de la dépression, incluant les différences de troubles émergents chez des jumeaux homozygotes, les différences interindividuelles, les rechutes chroniques de la maladie et même la prévalence accrue chez les femmes (Mill and Petronis, 2008). Une des premières preuves ayant aiguillé les chercheurs vers les modifications épigénétiques dans la régulation des troubles dépressifs a été l'effet antidépresseur observé par l'administration, systémique ou intracérébral, d'inhibiteur d'histones déacétylases (HDAC) chez différents modèles animaux. Les HDAC permettent de réprimer indirectement la transcription d'un gène, en retirant les groupements acétyles présents sur les histones, entraînant une compaction de l'ADN. Sous l'effet d'inhibiteur d'HDAC, la chromatine reste relâchée, permettant la transcription des gènes cibles (Covington et al., 2009; Volmar and Wahlestedt, 2015).

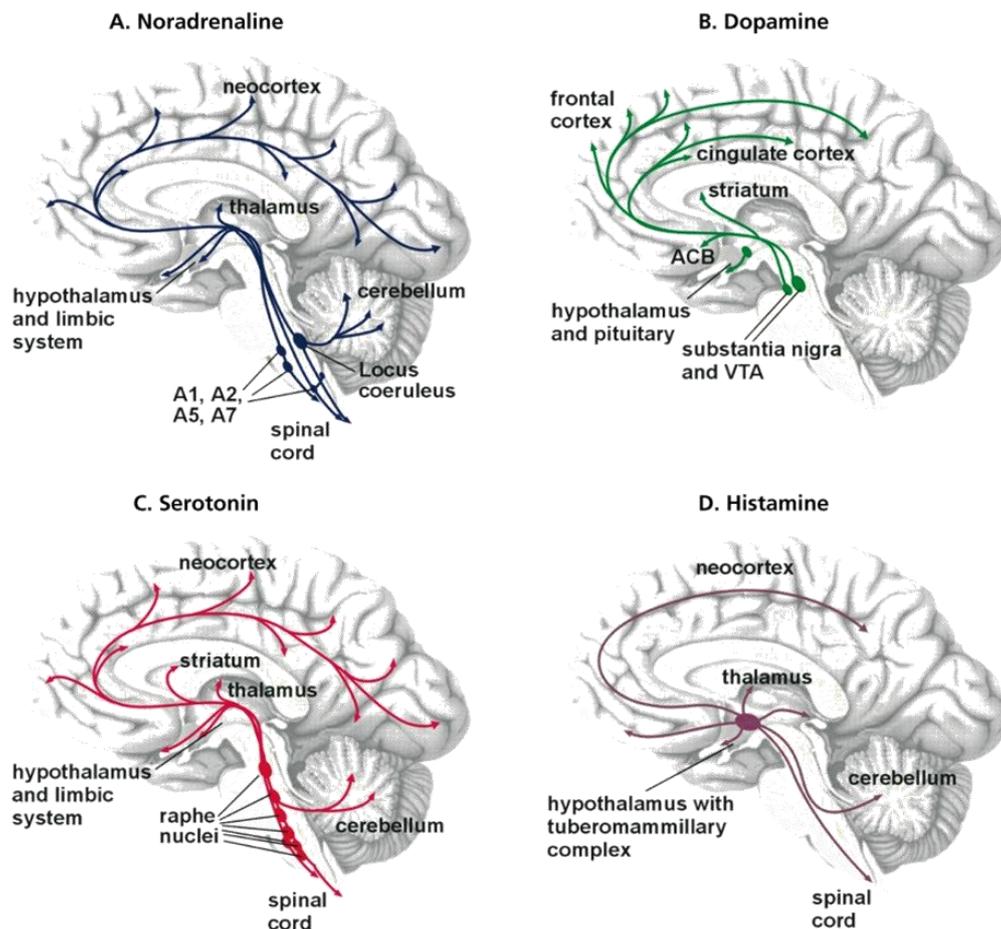
Enfin, la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans l'expression des médiateurs du stress et des troubles dépressifs. Il s'agit de la modification épigénétique la plus stable qui est, par exemple, impliquée dans les régulations de la CRH dans le PVN de l'hypothalamus. Ainsi, chez des animaux soumis à un protocole induisant des troubles dépressifs, on a retrouvé une diminution de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène codant pour la CRH, permettant ainsi une plus grande accessibilité de celui-ci à la machinerie de transcription (Tsankova et al., 2004; Sterrenburg et al., 2011).

L'ensemble des facteurs jusqu'ici présentés participent donc à la mise en place des troubles dépressifs qui se caractérisent par de nombreuses altérations à la fois fonctionnelles et structurelles. Nous allons alors détailler une partie de ces altérations dans les parties suivantes.

#### 4. Neurobiologie de la dépression majeure

Jusqu'à présent, nous avons vu que la dépression majeure affecte l'ensemble de l'organisme, peut toucher les hommes et les femmes, les jeunes et les séniors, et peut avoir de multiples origines. De plus, la dépression majeure entraîne de nombreux dérèglements biologiques dont certains vont être présentés dans la partie suivante. Il est possible de retrouver plusieurs hypothèses concernant la physiopathologie de la dépression majeure dans la littérature. Les 3 principales concernent les altérations des systèmes monoaminergiques (principalement sérotonine et noradrénaline), les dysfonctionnements de l'axe HPA et enfin les altérations de la plasticité neuronale.

a. Hypothèse monoaminergique



**Figure 17 : Innervation des neurones monoaminergiques au niveau du système nerveux central**

A : Projections noradrénergiques depuis le locus coeruleus ; B : projections dopaminergiques depuis la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (VTA) ; C : projections serotoninergiques depuis les noyaux du raphé ; D : projections histaminergiques depuis l'hypothalamus. (D'après Fuchs and Flugge, 2004)

Les monoamines sont des neurotransmetteurs possédant de très nombreuses projections qui sous-tendent des possibilités de modulations de nombreux systèmes. On distingue les catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine), principaux acteurs de la réponse rapide du stress, dérivées de la tyrosine et la sérotonine dérivée du tryptophane. Elles interviennent dans les émotions, la mémoire ou encore le comportement (Fuchs and Flugge, 2004; Belmaker and Agam, 2008). L'hypothèse monoaminergique de la dépression majeure suppose une déficience de disponibilité de ces neurotransmetteurs. Les principales

monoamines concernées sont la noradrénaline et la sérotonine synthétisées respectivement dans le locus cœruleus et dans les neurones du raphé (figure 17).

A l'origine, un effet dépressogène a été observé avec l'utilisation d'un traitement de l'hypertension artérielle, la réserpine (Bunney and Davis, 1965), même si aujourd'hui cet effet est quelque peu controversé (Baumeister et al., 2003). La réserpine entraînait une diminution de sérotonine cérébrale (Brodie et al., 1966) qui pouvait être accompagnée d'une diminution des catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine). Au cours des années 50, les premiers antidépresseurs sont découverts avec sérendipité grâce aux effets secondaires d'un composé antituberculeux : l'ironiazide qui avait pour effet d'améliorer de façon exceptionnelle l'humeur des tuberculeux dans les sanatoriums. Ce médicament s'est avéré bloquer très efficacement la Monoamine Oxydase (MAO). Une nouvelle génération d'antidépresseurs était ainsi découverte (IMAO : inhibiteur de la MAO). De plus récentes études d'imagerie, par une technique de tomographie à émission de positrons utilisant un ligand spécifique de la monoamine oxydase, démontrent une augmentation de 30% de l'activité de cette enzyme chez des patients dépressifs (Meyer et al., 2006; Sacher et al., 2015). Cette augmentation d'activité catabolique est également associée à une diminution de production de noradrénaline chez des patients dépressifs, ce qui diminue d'autant plus les métabolites présents au niveau cérébral (Lambert et al., 2000; Zhang et al., 2005).

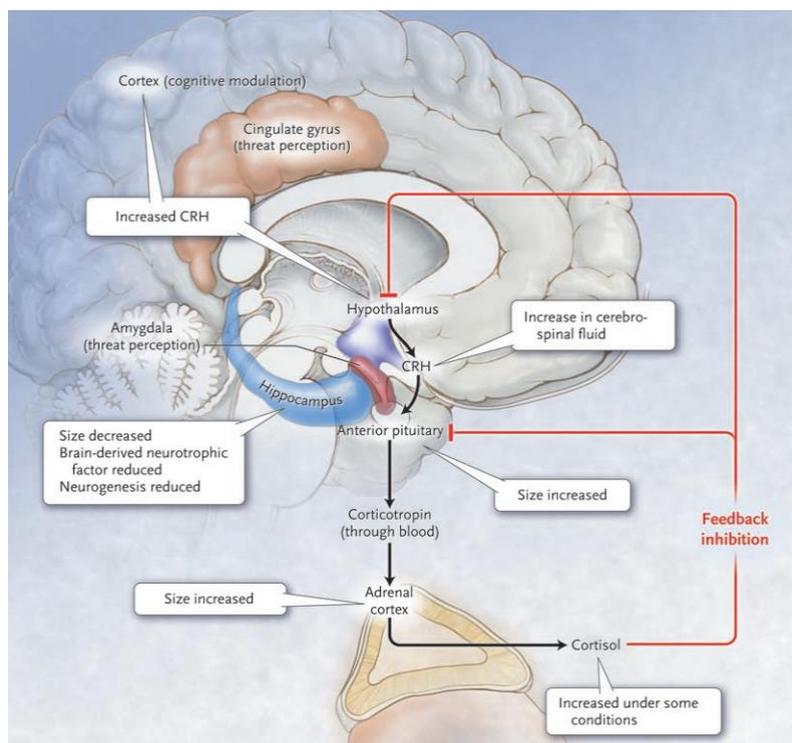
Ces observations ont poussé la communauté scientifique et médicale à proposer l'hypothèse monoaminergique de la dépression. Les premiers antidépresseurs commercialisés en tant que tels, étaient des inhibiteurs de la monoamine oxydase. A la même époque, une deuxième famille d'antidépresseur était découverte : les tricycliques. C'est en cherchant à mettre au point des analogues de la chlorpromazine (Largactil®), le premier neuroleptique montrant une véritable activité antipsychotique, que l'imipramine fut synthétisée par les laboratoires Ceigy (1957). L'imipramine est employée en tant qu'antidépresseur pour ses capacités d'inhibition de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (Glowinski and Axelrod, 1964). Les antidépresseurs tricycliques ont aussi des inconvénients comme un long délai d'action (4 à 6 semaines) ou encore une altération des rythmes cardiaques. Les chercheurs ont alors développé d'autres antidépresseurs, moins toxiques. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) élèvent la concentration de sérotonine dans la synapse en inhibant sélectivement sa recapture 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

postsynaptiques (Lesch, 2001). 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 de la recapture mixte de la sérotonine et de la noradrénaline, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline (ISRN) et d'autres que nous ne détaillerons pas.

Le rôle d'une autre monoamine, la dopamine, dans la dépression est également suggéré par la fréquence importante d'épisodes dépressifs chez des patients atteints de la maladie de Parkinson. Cette maladie, caractérisée par une dégénérescence des neurones de la substance noire, siège de la synthèse de dopamine, présente en effet une forte prévalence à la dépression : environ 30% des patients parkinsoniens développant au moins un épisode dépressif. De plus, quelques agonistes sélectifs des récepteurs à la dopamine comme le pramipexole, démontrent des effets antidépresseurs (Gershon et al., 2007).

Les nombreuses preuves apportées jusqu'ici font de cette hypothèse le candidat idéal dans l'explication neurobiologique des troubles liés à la dépression majeure. Cependant, environ un tiers des patients souffrant de dépression ne voient pas leur état de santé mentale amélioré par un traitement ciblant le système monoaminergique, ce qui laisse suggérer que cette hypothèse n'est pas la seule valable pour expliquer les troubles dépressifs (Mann, 2005).

b. Hypothèse du dysfonctionnement de l'axe HPA



**Figure 18 : Modifications de l'axe HPA en cas de dépression majeure**

Les différentes étapes de l'axe HPA sont représentées par des flèches noires. En réponse au stress, le PVN de l'hypothalamus sécrète l'hormone CRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, qui va alors atteindre l'hypophyse antérieure et stimuler la libération de l'hormone corticotrope (ACTH) dans la circulation sanguine. Celle-ci va à son tour stimuler la libération de cortisol chez l'homme par les glandes surrénales. Les flèches rouges représentent le rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol après sa sécrétion. Les anomalies centrales et périphériques observées chez les patients déprimés sont indiquées par des encadrés. La taille de l'hippocampe est alors diminuée, ainsi que la neurogénèse de cette structure. Cela entraîne une diminution du rétrocontrôle négatif de l'hippocampe sur l'axe HPA qui mène à une hypersécrétion de CRH et de GC, associées respectivement à l'augmentation volumétrique de l'hypophyse et des glandes surrénales (Belmaker and Agam, 2008).

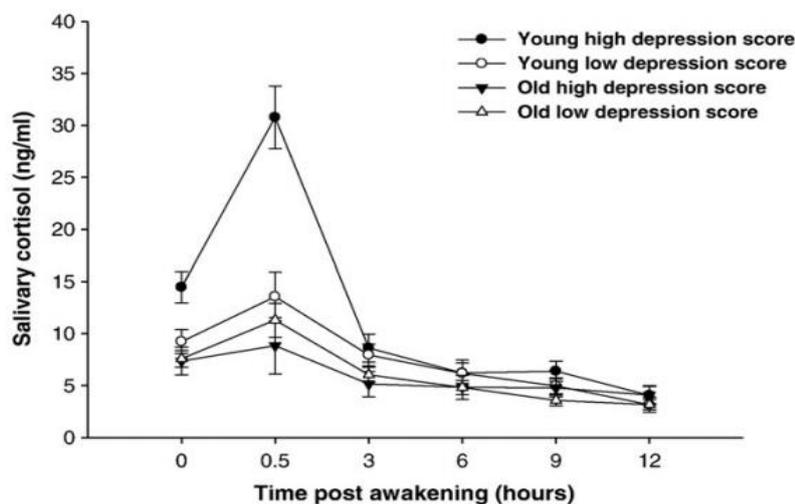
Comme décrit dans le chapitre précédent, le stress entraîne une réaction en chaîne qui aboutit à la libération de monoamine et de GC. Il existe aujourd'hui de nombreux travaux qui démontrent l'importante relation entre l'état de stress et les troubles dépressifs (Katz et al., 1981; Stokes, 1995; Lee et al., 2002; Pittenger and Duman, 2008; Marin et al., 2011). Lorsque

le stress survient de manière trop fréquente, ou bien prolongée, la production excessive de cortisol entraîne souvent l'apparition de troubles dépressifs, associée à des modifications structurales et fonctionnelles de l'axe HPA (Figure 18). Ce phénomène est également appuyé par la grande

prévalence d'épisodes dépressifs chez des patients atteints de la maladie de Cushing, caractérisée par une hypercortisolémie chronique (Burgess et al., 1996; McEwen, 2005). La présence de cortisol en trop grande quantité augmente également le risque de développer, à court ou long terme, des épisodes dépressifs. Des études ont montré que le stress périnatal et à l'adolescence jouait aussi un rôle dans le risque de développer un épisode dépressif à l'âge adulte (Lupien et al., 2009; Koehl et al., 2012; Babenko et al., 2015).

En plus d'avoir la faculté d'être un élément déclencheur de la dépression, la perturbation de l'axe HPA est également un symptôme couramment observé chez des patients souffrant de troubles dépressifs. Ceci se caractérise par des concentrations plasmatiques en cortisol élevées (Burke et al., 2005), des niveaux de cortisol salivaire élevés (figure 19 ; (Heaney et al., 2010)), des niveaux cérébro-spinaux de CRH élevés et une augmentation des ARNm de la CRH dans les régions limbiques (Merali et al., 2004). Des études utilisant la dexaméthasone, corticoïde de synthèse, pour évaluer le rétrocontrôle négatif sur la libération de CRH, ont permis de mettre en évidence une absence de suppression de sécrétion de la CRH dans 50% des cas chez des patients dépressifs. Ceci démontre un trouble important dans le rétrocontrôle, qui ne toucherait que 50% des patients dépressifs. Chez les autres, le rétrocontrôle serait

toujours fonctionnel mais la dérégulation de l'axe HPA serait liée à un autre facteur, entraînant une cortisolémie élevée. De façon intéressante, une rémission de l'épisode dépressif entraînée par un traitement à base d'antidépresseur ou bien de façon spontanée réverse, dans la majorité des cas, les troubles associés au dérèglement



**Figure 19 : Taux de cortisol chez patients dépressifs jeunes et âgés jusqu'à 12h après le réveil**

Le cortisol salivaire est prélevé et dosé à plusieurs moments de la journée chez des patients souffrant de troubles dépressifs (faible ou fort) chez des sujets jeunes et âgés. (Heaney et al., 2010).

de l'axe HPA (Nemeroff, 1996; Carroll et al., 2007). Cependant, certains auteurs affirment que la normalisation de l'axe HPA n'est pas automatique (Bhagwagar et al., 2003) et que le maintien de ces perturbations, après rémission de l'épisode dépressif, est associé à un risque important de rechute et de résistance aux traitements (Holsboer, 2000).

L'implication des monoamines dans la réponse physiologique du stress peut être un lien important entre l'hypothèse monoaminergique de la dépression et celle du dysfonctionnement de l'axe HPA. En effet, il n'est pas impossible que l'action des

antidépresseurs, principalement à action monoaminergique, puisse se faire en agissant également sur la régulation de l'axe HPA (Holsboer, 2000).

c. Hypothèse de la neuroplasticité

Une hypothèse supplémentaire dans la neurobiologie de la dépression est celle de la neuroplasticité. La neuroplasticité désigne la capacité de réorganisation que possède le système nerveux central. Cette réorganisation, à la fois structurelle et fonctionnelle, s'exécute par des processus de neurogénèse, gliogénèse et de synaptogénèse. Ces phénomènes se rencontrent lorsque l'organisme est soumis à des changements endogènes et/ou exogènes. Ils sont possibles par l'action de nombreux facteurs et l'altération du bon fonctionnement de ces facteurs peut entraîner une diminution de plasticité, rendant le système difficilement réorganisable et *in fine*, pouvant amener à l'émergence de troubles dépressifs.

Le phénomène de neurogénèse est un processus long qui comporte de nombreuses étapes clés. La neurogénèse est initiée par une prolifération de cellules souches progénitrices dans la zone sous-granulaire de l'HPC. Les cellules-filles vont alors migrer, puis se différencier en cellules gliales ou en neurones (Duman, 2004). Comme décrit dans la partie 4 de ce chapitre, l'HPC est une structure majoritairement atteinte lors de troubles dépressifs. Des études ont montré que la neurogénèse hippocampique était grandement diminuée chez des patients souffrant de troubles dépressifs (Sahay and Hen, 2008) alors qu'un traitement antidépresseur augmentait cette neurogénèse (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Banasr and Duman, 2007).

Les études sur la neurogénèse se sont particulièrement intéressées au BDNF, largement exprimé dans les structures du système limbique. Ces travaux sont supportés par de nombreuses études précliniques démontrant un lien étroit entre le stress et la réduction de BDNF dans l'HPC. Ce phénomène se retrouve également en cas de dépression majeure, observé en *post-mortem* chez l'Homme (Karege et al., 2005), mais un traitement antidépresseur rétablit des concentrations normales en BDNF (Nestler et al., 2002; Duman and Monteggia, 2006). L'implication du BDNF dans la régulation des troubles dépressifs a ainsi été mise en avant et a été appuyée par des études sur le rongeur qui témoignent d'un effet antidépresseur (Shirayama et al., 2002).

Cependant, de nombreuses études n'ont pas nécessairement retrouvé ce pouvoir antidépresseur du BDNF mais ont pu mettre en avant des effets dépressogènes de ce facteur

neurotrophique (Krishnan and Nestler, 2008). En effet, le stress chronique, modèle prédictif de la dépression majeure, entraîne une augmentation des concentrations du BDNF dans le noyau accumbens (Berton et al., 2006), et cette observation va de pair avec les études démontrant qu'une infusion locale de BDNF dans le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale (VTA) entraîne l'émergence de troubles de type dépressifs (Eisch et al., 2003; Krishnan et al., 2007). Au contraire, une invalidation sélective du gène du BDNF dans ces structures cérébrales présente un effet antidépresseur, ce qui témoigne de leur implication dans la maladie (Berton et al., 2006).

#### d. Hypothèse GABAergique

De plus en plus de travaux démontrent des altérations de la neurotransmission GABAergique chez les patients souffrant de dépression. Des études ont montré des niveaux de GABA réduits dans le plasma (Petty and Schlessler, 1981; Petty and Sherman, 1984) et le liquide céphalorachidien (Gerner and Hare, 1981) de patients déprimés. Tandis que des découvertes initiales étaient controversées, les évaluations plus récentes des déficits GABAergiques dans le cerveau, utilisant la spectroscopie de résonance magnétique, montrent des réductions spectaculaires de GABA dans le cortex occipital (Sanacora et al., 1999; Sanacora et al., 2004), dans le cortex cingulaire antérieur et le cortex préfrontal dorsomédian/dorsolatéral (Hasler et al., 2007; Bhagwagar et al., 2008) de patients dépressifs. Ce phénotype neurochimique est en accord avec une perte sélective d'interneurones GABAergiques observée dans le cortex préfrontal et dans l'amygdale de patients déprimés (Rajkowska et al., 2007) ce qui renforce l'hypothèse d'un déséquilibre de la balance excitation/inhibition. Par ailleurs, de plus en plus d'études suggèrent que l'activité GABAergique, dérégulée en cas de stress chronique, pourrait être à l'origine de la mise en place de pathologie dépressive ou anxio-dépressive (Luscher et al., 2011). L'hypothèse GABAergique semble donc être une piste intéressante dans la compréhension de la symptomatologie de la dépression liée au stress.

#### e. Autres hypothèses

Les hypothèses précédentes ne sont pas les seules à tenter d'expliquer la physiopathologie de la dépression. De nombreuses autres études montrent l'importance de facteurs que nous ne détaillerons pas ici mais qu'il ne faut pas négliger. Nous citerons à titre indicatif les modifications neuroimmunes (Horowitz and Zunszain, 2015), l'altération de la neurotransmission glutamatergique (Hasler et al., 2007; Sanacora et al., 2012), la perturbation

des rythmes circadiens (Lewy et al., 2006; Lewy et al., 2009), les modifications du microbiote (Mayer et al., 2014), la mise en place de mécanisme inflammatoire (Rosenblat et al., 2014), le déséquilibre de la balance monoamine/acétylcholine (Goshen et al., 2008) ou encore des perturbations des fonctions opioïdes (Torregrossa et al., 2006) et des cytokines (Goshen et al., 2008).

## 5. Altérations mnésiques et structurelles de la dépression majeure

Les épisodes de dépression majeure sont souvent associés à des perturbations cognitives, suggérant des modifications structurelles au sein de structures cérébrales importantes dans différents processus mnésiques (Naismith et al., 2012). Les troubles de la mémoire ont rapidement été mis en relation avec les modifications structurelles observées dans l’HPC chez les patients dépressifs (Hickie et al., 2005; Steffens et al., 2011). Les neurosciences et la psychologie s’accordent à dire que la mémoire désigne l’ensemble des processus neurologiques permettant d’acquérir, de stocker et de restituer des informations (Jaffard, 1994). L’ensemble de la communauté scientifique s’accorde sur le fait que la mémoire est un ensemble hétérogène, mettant en jeu diverses structures et systèmes en fonction du type d’information et du contexte dans lequel l’information est encodée.

### a. Les systèmes de mémoire

La mémoire a principalement été divisée en deux grands ensembles, la mémoire à court terme et la mémoire à long terme. Des modèles de mémoire à court terme, comme le modèle de Baddeley et Hitch pour la mémoire de travail (Baddeley and Hitch, 1974) ont alors été développés. Ce système apparaît comme une interface permettant la rétention temporaire d’un nombre limité d’informations et leurs manipulations en vue de l’exécution de tâches cognitives, ou de leur stockage en mémoire à long terme. Ce modèle de mémoire de travail s’articule autour de plusieurs composantes en interaction qui permettent l’intégration d’informations sensorielles visuo-spatiales (par les aires corticales), le maintien temporaire de ces informations et l’orientation attentionnelle. Trois sous-systèmes ont été proposés par Baddeley pour sous-tendre ce fonctionnement :

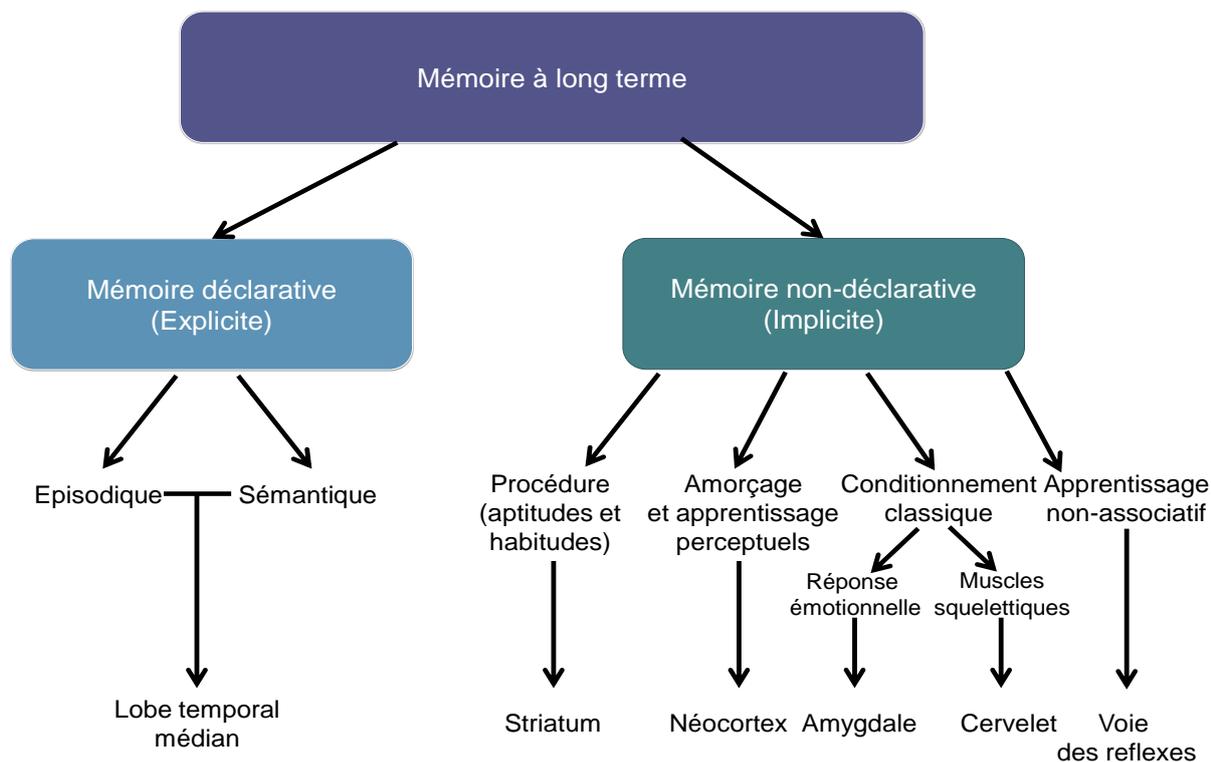
- Le « centre exécutif », permet de gérer les 2 autres sous-systèmes et permet la sélection de stratégies cognitives. Son fonctionnement semble tributaire des lobes frontaux.
- La « boucle phonologique » intègre les informations verbales et auditives

- Le « calepin visuo-spatial » intègre les informations spatiales et motrices.

Ces 3 sous-systèmes sont intimement liés dans le fonctionnement de la mémoire de travail et Baddeley a complété ce modèle avec un « tampon épisodique » qui permet de faire le lien entre la mémoire de travail et la mémoire à long terme. Etant grandement dépendant de l'état de conscience et d'attention du sujet, le fonctionnement de la mémoire de travail dépendrait du cortex préfrontal (Baddeley, 2000; Repovs and Baddeley, 2006). Cependant des études récentes suggèrent que l'HPC pourrait également intervenir dans la mémoire de travail.

Concernant la mémoire à long terme, une grande partie des travaux de classification des systèmes de mémoire a pu être réalisée grâce à des études lésionnelles. Larry Squire propose une classification dichotomique de la mémoire à long à terme (Squire, 1992) qui est aujourd'hui le modèle le plus utilisé. Il oppose ainsi 2 grands systèmes de mémoire à long terme (figure 20) :

- La mémoire déclarative, explicite, accessible à la conscience, fait référence à ce que nous appelons communément « mémoire ». Elle dépend principalement du lobe temporal médian (plus précisément de l'HPC) et permet le stockage et la récupération intentionnelle des faits personnels ou non. Elle regroupe d'une part la mémoire sémantique (celles des faits publics, connaissances au sens large) et d'autre part la mémoire épisodique. La mémoire épisodique intègre, dans sa définition, le contexte spatio-temporel des événements.
- La mémoire non déclarative, implicite, constitue un système très hétérogène qui regroupe différents apprentissages inconscients. Le fait qu'ils ne dépendent pas de l'HPC constitue leur point commun mais ils sont sous-tendus par des processus cognitifs bien différents. Parmi les mémoires implicites, on trouve la mémoire procédurale qui concerne l'apprentissage d'automatismes et ne requiert pas de conscience permanente des gestes à accomplir. Cette forme de mémoire est dépendante du striatum (Squire, 1987)



**Figure 20 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire à long terme**

Cette classification associe chaque type d'opération à une structure cérébrale impliquée dans l'encodage des informations (d'après Squire, 1992, 2004)

### b. Mémoire altérée dans la dépression majeure

La dépression est généralement associée à des troubles de la mémoire déclarative, principalement mis en avant dans des études cliniques chez l'Homme par des exercices de verbalisation (Stromgren, 1977; Ilsley et al., 1995; Fossati et al., 2004). Cependant, les troubles mnésiques ne sont pas retrouvés chez tous les patients souffrant de dépression. Ces troubles sont généralement présents dans les cas les plus sévères, chez les personnes âgées et chez les patients souffrants de troubles psychotiques (Basso and Bornstein, 1999a). Les patients dépressifs montrent des difficultés particulières dans les tâches mnésiques nécessitant un effort, comme l'apprentissage d'une liste et son rappel (Basso and Bornstein, 1999b). De nombreuses études révèlent une diminution dans la capacité à acquérir de nouvelles informations en lien avec l'existence de pensées négatives/pessimistes qui viennent perturber les fonctions mnésiques (Cronholm and Ottosson, 1961; Stromgren, 1977).

Les déficits de mémoire déclarative connaissent aujourd'hui un intérêt grandissant à cause de leur association avec des modifications neurophysiologiques et neuroanatomiques

dans les régions temporales et frontales. Ces régions sont impliquées dans la physiopathologie de la dépression (Soares, 2003), et nous détaillerons cette implication dans la partie suivante (Structures cérébrales altérées dans la dépression majeure). Il a été démontré qu'un lien étroit existe entre le lobe temporal (plus particulièrement **l'HPC**), **la dépression et les troubles de la mémoire spatiale chez l'Homme et l'animal** (Conrad et al., 1996; Kuzis et al., 1997; Dolan, 2002; Song et al., 2006). Ces altérations de la mémoire HPC-dépendante témoignent du rôle important que joue cette structure dans la physiopathologie de la dépression.

De plus, des études ont démontré des perturbations dans les processus d'inhibition chez les patients dépressifs qui entraînent des **troubles de la mémoire de travail** (Chen et al., 2015). En effet, dans une tâche de mémoire de travail, les informations non-pertinentes doivent être inhibées au profit des informations pertinentes qui permettent de réaliser correctement la tâche (Joormann and Gotlib, 2010). Les perturbations de mémoire de travail sont souvent associées à la sévérité de la dépression (Gohier et al., 2009). Les patients souffrant de dépression sont incapables de maintenir des informations neutres en mémoire de travail, révélant ainsi de faibles capacités dans la limitation et l'effacement d'informations non-pertinentes. Ces auteurs proposent également que les déficits de mémoire de travail sont à l'origine des troubles attentionnels retrouvés chez les patients dépressifs.

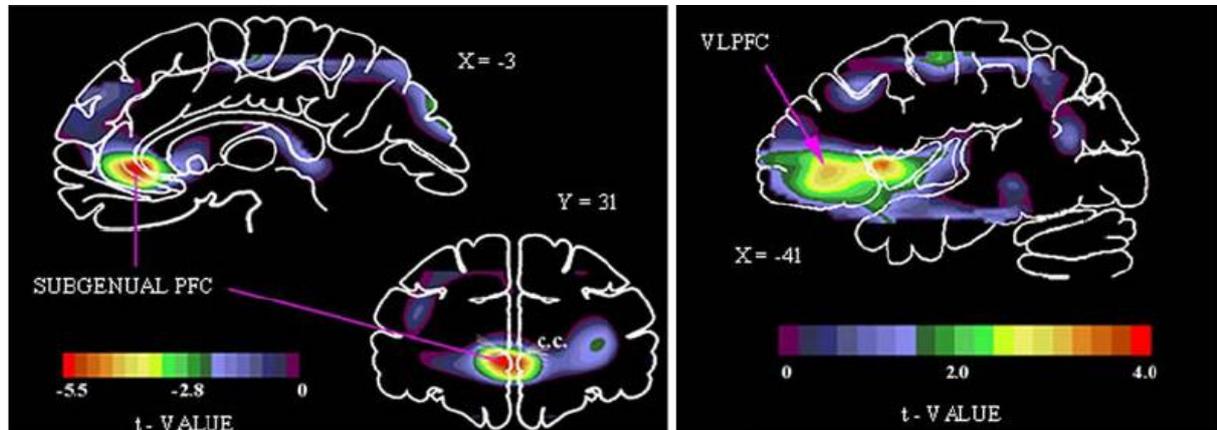
Les atteintes de la mémoire déclarative et de la mémoire de travail ne sont que deux exemples parmi une liste plus importante de troubles mnésiques qu'il est possible de rencontrer dans la littérature. Nous ne détaillerons pas les autres formes de mémoire mais il est important de garder à l'esprit que les multiples altérations, structurelles et fonctionnelles, font de cette pathologie le support de nombreuses perturbations mnésiques, cognitives et comportementales.

### c. Structures cérébrales altérées dans la dépression majeure

Comme décrit précédemment, les troubles dépressifs engendrent de nombreuses modifications dans différentes structures cérébrales. Ces altérations touchent plusieurs types cellulaires (neurones, interneurones, oligodendrocytes et astrocytes) (Aston et al., 2005), des voies de signalisation (glutamate, GABA, BDNF, Facteur de croissance des fibroblastes)(Sequeira et al., 2009; Tripp et al., 2012), des neurotransmetteurs (sérotonine, noradrénaline, SST)(Nemeroff, 2002; Lin and Sibille, 2013) ainsi que des fonctions biologiques (plasticité) (Evans et al., 2004; Sequeira et al., 2009; Guilloux et al., 2012). Compte tenu de la grande symptomatologie de la dépression, les structures cérébrales altérées par des épisodes dépressifs sont relativement nombreuses (Sheline, 2003). Avec les progrès

réalisés en neuroimagerie, les modifications cérébrales chez des patients souffrant de dépression ont pu être caractérisées.

### *Cortex Préfrontal*



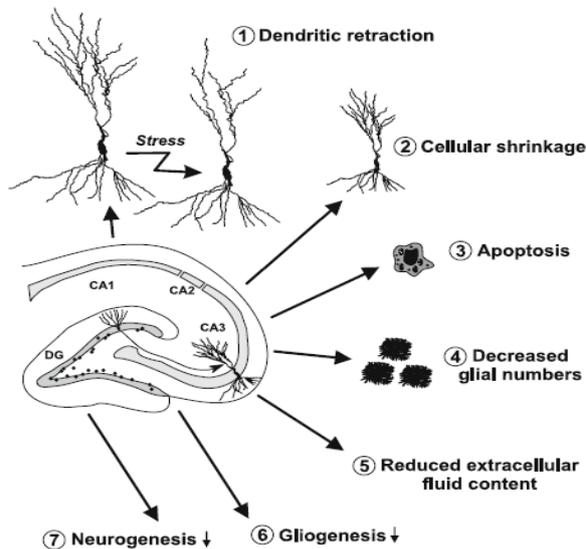
**Figure 21 : Modification de l'activité physiologique en cas de troubles dépressifs dans le cortex préfrontal chez l'Homme**

Diminution d'activité dans la partie subgénérale (à gauche) et augmentation de l'activité dans la partie ventrale ou pré-générale (à droite) (modifié à partir de Drevets et al., 2008)

Des modifications des réseaux cérébraux ont pu être étudiées, en particulier dans le circuit reliant le cortex préfrontal au système limbique. Les cortex préfrontal et orbitofrontal sont en effet plus particulièrement altérés dans la maladie, entraînant une perturbation des systèmes impliqués dans les associations sensorielles (Saleem et al., 2008). En plus de l'implication de ces systèmes dans l'intégration sensorielle, ils codent également les caractéristiques affectives de stimuli comme l'aversion, la récompense et les attributions de valeurs relatives. Le cortex préfrontal jouant également un rôle important dans les fonctions mnésiques, ces modifications structurelles expliquent en partie les troubles rencontrés en cas de dépression majeure (Barch et al., 2003). Des modifications volumétriques dans le cortex préfrontal de patients dépressifs ont également été rapportées dès les stades précoces de la maladie (Drevets and Price, 2005) et sont corroborées avec des réductions de densités neuronale et gliale dans la partie dorsolatérale du cortex préfrontal (Rajkowska et al., 2001). Les variations de volume ne sont pas équivalentes sur l'ensemble du cortex préfrontal. En effet, il convient de distinguer la partie subgénérale du cortex cingulaire antérieur (figure 21), qui voit son volume ainsi que son métabolisme et son afflux sanguin diminuer (Hirayasu et al., 1999; Kegeles et al., 2003) tandis que la partie pré-générale est moins impactée par des

modifications de volume, même si certains auteurs rapportent une augmentation d'activité dans cette région en cas d'épisode dépressif (Mayberg et al., 1999).

## Hippocampe



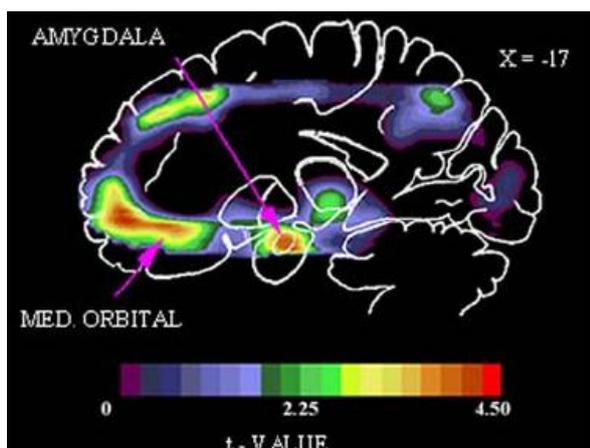
**Figure 22 : Modifications cellulaires engendrées par le stress et la dépression au niveau de l'hippocampe**

Modifications hippocampiques liées à des troubles dépressifs : rétraction dendritique (1), rétrécissement cellulaire (2), apoptose (3), diminution du nombre de cellules gliales (4), diminution du fluide extracellulaire (5), diminution de gliogénèse (6) et diminution de la neurogénèse (7). (D'après Czeh and Lucassen, 2007)

L'implication de l'HPC dans les régulations de l'axe HPA et le lien existant entre perturbation de l'axe HPA et émergence de troubles dépressifs (Sheline, 2000), fait de cette structure un candidat sérieux dans l'étiologie de la dépression. La dérégulation de l'axe HPA engendre un remodelage dendritique (figure 22) des cellules pyramidales de l'HPC (Czeh and Lucassen, 2007). Les projections inhibitrices de l'HPC sur l'hypothalamus étant ainsi diminuées, l'axe HPA voit son inhibition diminuée, entraînant une hypercortisolémie diminuant le volume hippocampique (MacQueen and Frodl, 2011). Les neurogénèse et gliogénèse hippocampiques sont également impactées

en cas de stress chronique ou de syndrome de type dépressif (Banar and Duman, 2007). Toutes ces modifications structurales au sein même de l'HPC expliquent sa perte de volume, estimée entre 8 et 10% (Drevets et al., 2008) et sont la cause de nombreuses perturbations comme le niveau d'anxiété (Rusch et al., 2001) ou les troubles de mémoire déclarative (Burt et al., 1995) associés à la dépression. Des études ont également démontré que des patients en phase de rémission n'avaient plus de diminution du volume hippocampique (Shah et al., 1998). Certaines de ces modifications observées chez des patients ont également été retrouvées sur des modèles animaux (Lee et al., 2009; Yun et al., 2010) même si la neuroimagerie du petit animal reste encore à ses balbutiements. De plus, l'HPC est un régulateur important des fonctions corticales préfrontales (Jay et al., 1995). Un dysfonctionnement hippocampique dans les troubles dépressifs serait donc une des causes des troubles attentionnels et mnésiques observés chez certains patients.

## Amygdale



**Figure 23 : Variation d'activité en cas de troubles dépressifs dans l'amygdale**

Augmentation d'activité dans l'amygdale chez des patients souffrant de troubles dépressifs. (Modifié depuis Drevets et al., 2008)

Des modifications variables ont été rapportées concernant l'amygdale (figure 23). Des études ont identifié aussi bien une augmentation du volume de l'amygdale droite (Bremner et al., 2000), une augmentation bilatérale (Frodl et al., 2002), ou bien une réduction de volume (Sheline et al., 1998). D'autres études ont démontré une corrélation positive importante entre l'afflux sanguin, le métabolisme et la sévérité de l'épisode dépressif (Abercrombie et al., 1998). L'activité anormale de l'amygdale semble liée à la fois à la sévérité de l'épisode dépressif et à la

susceptibilité de récurrence de la maladie (Drevets, 2000). De plus, l'amygdale joue un rôle activateur de l'axe HPA contrairement à l'HPC. Ainsi, une augmentation de l'activité de l'amygdale, associée à une diminution de rétrocontrôle négatif de l'HPC chez des patients dépressifs, est cohérente avec la neurobiologie de la dépression.

Toutes les études sur les modifications fonctionnelles et structurales ne rapportent pas les mêmes résultats mais ce phénomène peut en partie s'expliquer par la très grande diversité clinique des troubles dépressifs et des différences interindividuelles. De nombreuses autres modifications que nous ne détaillerons pas ici ont été rapportées depuis les avancées en neuroimagerie (Tableau 2).

**Tableau 2 : Modifications volumétriques constatées par neuro-imagerie chez des patients dépressifs (D'après Drevets et al., 2008)**

Régions Cérébrales	Volume	Nombre de cellules
Cortex Préfrontal	↓	↓
Cortex Cingulaire Antérieur Subgénéral	↓	↓
Cortex Cingulaire Antérieur Prégénéral	↓	↓
Région Parahippocampique	↓	↓
Hippocampe	↓	↓
Amygdale	↓↑	↓
Striatum	↓	↓
Thalamus Médian	↓	↓

## 6. Modèles animaux de la dépression

L'étude des troubles dépressifs chez l'Homme souffre d'une limite importante liée à l'éthique. L'étude approfondie de la dépression doit donc se faire par le biais de modèles animaux mimant au mieux les troubles de la dépression. Les modèles animaux de la dépression sont évalués en fonction de leur validité étiologique. Pour être considéré comme un comportement de type dépressif, ce comportement doit être déclenché par les mêmes composantes étiologiques que la dépression humaine. Ceci reste un défi difficile car même aujourd'hui, l'étiologie de la dépression chez l'homme n'est pas clairement établie, ce qui rend l'étude de la dépression sur l'animal controversée. Paul Willner définit la validité d'un modèle animal de la dépression (Willner, 1984, 1995) selon 3 critères :

- La validité de construction : l'étiologie de la maladie doit être semblable entre l'Homme et l'animal
- La validité descriptive : les symptômes observés chez l'Homme et l'animal et les modalités de traitement doivent être comparables
- La validité prédictive : les effets d'un antidépresseur connu observés chez l'Homme doivent être retrouvés chez l'animal sans modification ou atténuation.

Malheureusement, aucun des modèles animaux mis au point jusqu'à présent ne remplit complètement ces critères. Certains de ces modèles reflètent une partie de la symptomatologie de la dépression et ont permis la mise au point de tests simples dans le but de développer de nouveaux composés antidépresseurs. Les modèles animaux disponibles aujourd'hui sont très nombreux et concernent plusieurs souches de rongeurs. Ainsi, plusieurs modèles mimant certains symptômes et altérations de la maladie ont été mis au point, dont certains sont présentés ci-dessous.

### a. Induction Génétique

Le génie génétique a rendu possible l'exploration fonctionnelle des conséquences d'une mise sous silence, ou au contraire d'une surexpression de certains gènes impliqués dans la physiopathologie de la dépression. De nombreuses nouvelles lignées mutantes, principalement chez la souris, continuent d'être créées grâce au développement des techniques de séquençage et l'avancée des connaissances sur l'implication des gènes dans la maladie. Les mutations les plus employées confèrent un gain (Knock-In - KI) ou une perte (Knock-Out - KO) de fonction à un ou plusieurs gènes donnés. Les gains de fonction sont

généralement construits par la réplication de la section codante du gène, en plusieurs répliques, ce qui augmente le nombre de transcrits. Les pertes de fonctions sont quant-à-eux construit par l'insertion d'un transgène qui donne une conformation erronée à la protéine finale, la rendant inefficace.

Ainsi, des mutants ayant une invalidation des transporteurs de sérotonine (SERT KO), de transporteur de noradrénaline (NET KO) ou encore de transporteur de dopamine (DAT KO) ont été générés (Perona et al., 2008). Ces inactivations ont permis de mieux comprendre le rôle joué par chaque neurotransmetteur dans la pathologie et d'apporter une piste thérapeutique (Perona et al., 2008; Haenisch et al., 2009). Des mutations invalidant des récepteurs sérotoninergiques sont aussi couramment utilisées comme modèles de dépression. La diminution de densité du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> dans les structures limbiques de patients dépressifs a mené les généticiens à développer des mutants afin de mieux comprendre l'implication de ce récepteur dans les troubles anxio-dépressifs (Toth, 2003). Des constructions génétiques plus complexes, invalidant 2 gènes à la fois ont également été développées afin de permettre une vision globale de l'intervention d'une classe entière de récepteur dans la pathologie, comme par exemple l'invalidation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> /5-HT<sub>1B</sub> (Guilloux et al., 2011).

Depuis quelques années, le développement rapide de technologies de pointe a permis de mettre en place des outils d'activation ou d'invalidation conditionnelle par l'insertion de séquence CRE recombinase dans le génome d'animaux transgénique (Branda and Dymecki, 2004). Ainsi, l'optogénétique, qui permet le contrôle spatial et temporel de l'expression d'un gène en le rendant sensible à une certaine longueur d'onde lumineuse, a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les troubles dépressifs (Steinberg et al., 2015) en ciblant par exemple la contribution des neurones dopaminergiques (Chaudhury et al., 2013) ou encore les circuits préfrontaux (Vialou et al., 2014).

#### b. Induction Expérimentale/Environnementale

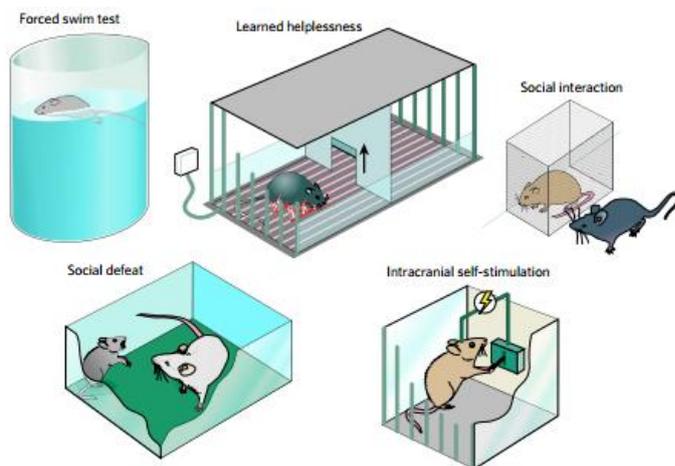
##### *Modèles chirurgicaux et pharmacologiques*

Des modèles chirurgicaux tentant de mimer au mieux la symptomatologie de la dépression existent mais nous ne citerons qu'à titre indicatif la bulbectomie olfactive bilatérale (Hendriksen et al., 2015). Cette lésion entraîne des modifications comportementales accompagnées de modifications neuroimmunes, endocrines et d'altération des systèmes de neurotransmission. Il existe également des modèles pharmacologiques, comme par exemple

les administrations chroniques à base de corticostérone (Darcet et al., 2014), ou encore des administrations de réserpine (O'Neil and Moore, 2003). Pour la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement aux inductions de troubles dépressifs par des modèles basés sur l'hypothèse du dérèglement de l'axe HPA.

Les modèles de dépression induite par l'exposition au stress sont assez répandus dans la communauté scientifique (Gold, 2015). Ces modèles sont basés sur différents types de stress qui peuvent se rapprocher de divers aspects de la pathologie (figure 24). De plus, les différents modèles de dépression induite par le stress semblent avoir une bonne validité étiologique, ainsi qu'une bonne validité de construction et descriptive.

### Résignation Acquise



**Figure 24 : Modèles animaux de la dépression chez le rongeur**

Modèle d'induction et de détection de troubles de type dépressif chez le rongeur par différents tests comportementaux (Krishnan and Nestler, 2008).

La résignation et le sentiment d'impuissance sont des symptômes importants dans la dépression majeure et ont fait l'objet de nombreuses études précliniques. Chez l'Homme, la résignation désigne une inhibition comportementale dans le contrôle de stimuli aversifs (Pryce et al., 2011). La résignation acquise fut le support du premier modèle animal mimant les troubles de patients dépressifs (Seligman et al., 1968). Seligman l'élabora dans un premier temps chez le chien et observa qu'un animal ayant

reçu une série de chocs électriques auxquels il ne peut échapper, ne cherchera que peu à éviter une autre série de chocs même si la possibilité de les éviter lui est permise. Ce modèle valide les 3 critères de Willner et de nombreux concepts de la physiopathologie de la dépression ont été validés par son biais (Vollmayr and Gass, 2013).

### Stress social

Dans un premier temps, l'environnement social peut être considéré comme un facteur de stress. En effet, chez l'Homme, la perte de rang social, de statut social et/ou de contrôle sont des exemples courants des « événements de la vie » qui apportent un risque de dépression (Brown, 1993). A partir de cette observation, les modèles animaux basés sur les

perturbations sociales ont pu voir le jour. Le paradigme du « resident-intruder » (i.e. résident/intrus), spécifique aux rongeurs, est le modèle le plus populaire concernant les inductions de troubles dépressifs par un stress social. En général, un individu mâle (intrus) est introduit dans la cage d'un autre individu mâle (résident). Les animaux entrent généralement en conflit, et si cette situation est maintenue pendant plusieurs jours, on entre dans un phénomène de stress chronique qui engendre des troubles dépressifs (Hollis and Kabbaj, 2014). Ce paradigme engendre des troubles de l'hédonie, des troubles motivationnels (Rygula et al., 2005), un retrait social, une anxiété accrue (Koolhaas et al., 1997; Crawford et al., 2013), des troubles du sommeil et de l'alimentation, le tout associé à des modifications physiologiques, comme une diminution du volume et de la neurogénèse hippocampique (Van Bokhoven et al., 2011).

### *Stress Périnatal*

Les modèles d'induction de troubles dépressifs par l'exposition au stress en début de développement (prénatal ou postnatal) sont basés sur des observations montrant une sensibilité de ces périodes sur le développement futur de pathologies de type dépressives (Lucassen et al., 2013; Suri and Vaidya, 2015). La survenue d'événements négatifs dans ces périodes développementales, comme la perte d'un ou des parents, les abus, la négligence physique et affective entraîne une vulnérabilité dans l'émergence de troubles à l'âge adulte (Heim and Binder, 2012). La séparation maternelle est un des modèles de stress précoce les plus utilisés (Czeh et al., 2015a) et peut engendrer des troubles comportementaux associés à des modifications de réseaux neuronaux (Ishikawa et al., 2015), des troubles mnésiques (Sousa et al., 2014), physiologiques (augmentation des taux de corticostérone (Sousa et al., 2014) ; altération de la transcription des GR et MR (van der Doelen et al., 2014)), des troubles de la neurogénèse hippocampique (Koehl et al., 2012) et des modifications épigénétiques (Wu et al., 2014; Babenko et al., 2015) à court, moyen ou long terme. Un autre modèle de stress post-natal employé consiste à limiter la nidification de la femelle, ce qui résulte en des interactions mère-petits anormales et fragmentés (Naninck et al., 2015) engendrant des perturbations de la neurogénèse hippocampique associés à des fonctions cognitives altérées.

Enfin, de nombreuses études s'intéressent aujourd'hui au stress prénatal et démontrent que ce dernier induit aussi des dérégulations de l'axe HPA, mimant ainsi des modèles de dépression (Louvar et al., 2009). Ce modèle montre une anxiété accrue (Laloux et al., 2012), une activité neuronale plus importante dans l'HPC et le locus cœruleus, une réponse plus

importante et plus durable dans le temps à un stress modéré (Viltart et al., 2006), des perturbations mnésiques et modifications épigénétiques (Benoit et al., 2015).

### *Stress Chronique Léger Imprédictible*

Le stress chronique léger imprédictible (SCLI) est un des modèles les plus robustes et réalistes mimant les symptômes de la dépression (Willner, 2005). Le paradigme du SCLI consiste en l'exposition de l'animal à une série d'éléments stressseurs imprédictibles sur une période allant de plusieurs semaines à plusieurs mois. Le modèle originel mis au point par Katz et Hersh en 1981 comportait l'application de stress d'une intensité relativement importante comme des chocs électriques, des secousses ou encore des bains d'eau froide (Katz and Hersh, 1981). Willner modifiera ce protocole en utilisant des stressseurs d'une intensité plus faible mais sur une durée plus importante, afin de se rapprocher de l'étiologie de la dépression chez l'Homme (Willner et al., 1992b). L'avantage de ce paradigme est qu'il engendre des modifications comportementales, neurochimiques, neuroimmunes et neuroendocrines qui se rapprochent de celles observées dans la dépression chez l'Homme (Wiborg, 2013). Ainsi, la littérature nous rapporte des modifications de la neurogénèse (Tanti and Belzung, 2013), des aversions sociales (Barik et al., 2013) ou une neuroinflammation (Farooq et al., 2012). D'autres études montrent également la mise en place d'une anhédonie (Forbes et al., 1996; Strekalova and Steinbusch, 2010), des troubles de la mémoire (Conrad, 2010; Lee and Goto, 2015) ou encore des diminutions de noradrénaline et de sérotonine dans les structures du système limbique (Vancassel et al., 2008).

Les études ont également montré que la quasi-totalité de ces troubles était atténuée, voire abolie, par un traitement chronique aux antidépresseurs (Gumuslu et al., 2013). Ces observations sont d'une grande importance puisqu'elles témoignent d'une grande similarité entre les troubles présents dans ce modèle animal avec les troubles cliniques les plus couramment rencontrés chez des patients dépressifs. Le SCLI et les paradigmes de stress chronique en général, sont donc les modèles animaux se rapprochant le plus de l'étiologie de la dépression humaine.

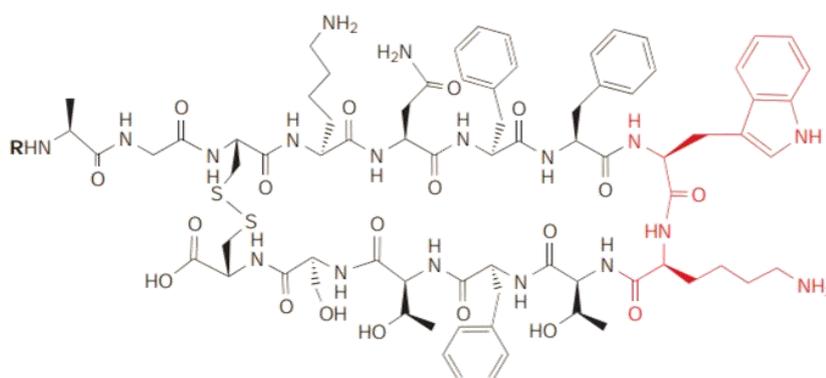
Comme nous l'avons brièvement décrit précédemment, la SST est une neurohormone impliquée dans les régulations de l'axe HPA et son fonctionnement est altéré en cas de dépression majeure. Le lien existant entre le stress, l'émergence de troubles dépressifs et la SST nous a particulièrement intéressés et nous allons développer davantage les fonctionnalités de cette neurohormone dans la partie suivante.



## La Somatostatine

La somatostatine (SST) est un polypeptide découvert par Roger Guillemin en 1972 en tentant de purifier l'hormone de libération de l'hormone de croissance (Brazeau et al., 1973) à partir d'hypothalamus de mouton. Le premier rôle alors attribué à ce peptide fut une inhibition de l'hormone de croissance, ce qui explique son nom de somatostatine du grec *soma* « le corps » et *statikos* « statique ».

### 1. Le Système Somatostatinergique



1 (SRIF-14) R = H

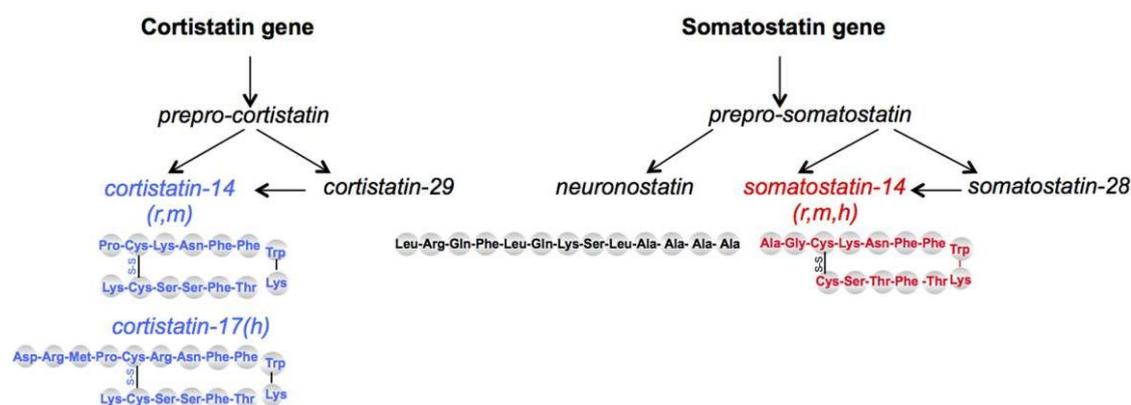
2 (SRIF-28) R = H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-

#### Figure 25 : Structure de la somatostatine

Le radical R peut être remplacé par un atome d'hydrogène (1) pour former la SST14 ou par un radical plus complexe (2) pour former la SST28 (D'après Weckbecker et al., 2003).

#### a. Les cinq peptides

La SST désigne très généralement un peptide de 14 acides aminés (figure 25 ; (Weckbecker et al., 2003)), comme décrit par Brazeau (Brazeau et al., 1973). Cependant, quelques années plus tard, un peptide plus grand en N-terminal, de 28 acides aminés a été découvert dans l'intestin (Pradayrol et al., 1980). Les SST 14 et 28 proviennent toutes deux de la même pro-hormone, la pré-pro-SST (Benoit et al., 1990). Le gène de la pré-pro-SST donne un peptide de 116 acides aminés qui subit plusieurs clivages successifs (Tuboly and Vecsei, 2013) pour aboutir à la pro-SST ainsi que la SST-14 et la SST-28 (figure 26). Ces deux derniers peptides possèdent la même capacité à se fixer aux récepteurs à la SST.



**Figure 26 : Représentation schématique des 5 peptides somatostatinerigiques, du gène à la protéine**

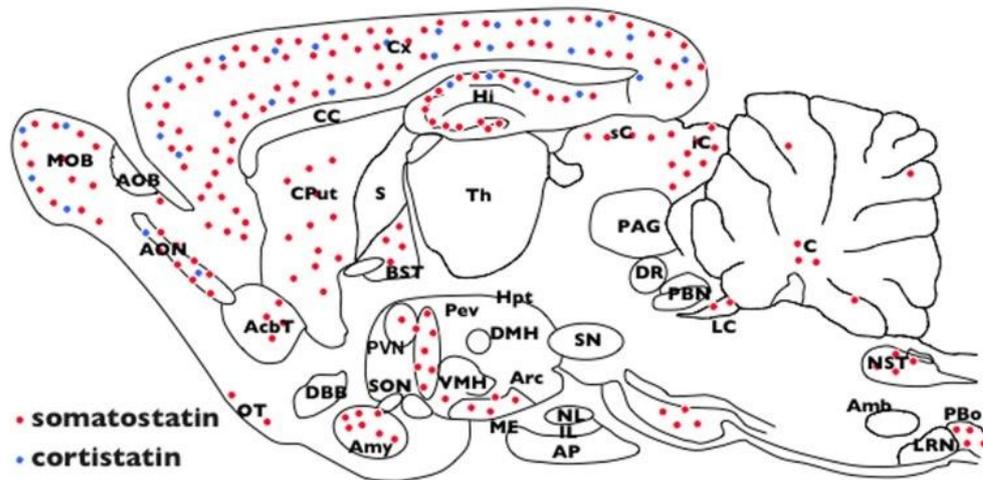
La transcription du gène de la SST permet la synthèse de prépo-SST qui, par clivages successifs, aboutit à la NST, à la SST14 ou à la SST28. La CST 14 et la CST 29 sont obtenues par le même procédé à partir du gène de la CST. (D'après Martel et al., 2012)

De plus, 2 peptides proches de la SST ont également été découverts : la cortistatine (CST) et la neuronostatine (NST). La CST, comme la SST, provient d'un précurseur, la pré-pro-CST qui est clivée en CST-14 (chez le rongeur ; CST-17 chez l'homme) et en CST-29 (de Lecea et al., 1996). La CST, préférentiellement distribuée dans le cortex cérébral et dans l'HPC, joue un rôle dans la régulation du sommeil, les rythmes veille/sommeil, la mémoire et semble avoir une propriété anticonvulsante (de Lecea, 2008). Plus récemment, la NST a été identifiée comme un clivage différentiel à partir de la pré-pro-SST. Principalement trouvée dans le pancréas et le cerveau, et co-exprimée avec la SST (Dun et al., 2010), elle joue un rôle dans des fonctions métaboliques, cardiovasculaires et neuronales que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit.

#### b. Distribution

La SST (14 ou 28) est produite en grande quantité dans les cellules du système nerveux central (Johansson et al., 1984) et du système nerveux périphérique. On les retrouve également dans des cellules endocrines du pancréas (Arimura et al., 1975), de l'intestin (Hokfelt et al., 1975), de la glande thyroïdienne (Aguila et al., 1991a), des reins, de la prostate, du placenta, de la paroi des vaisseaux et des cellules immunitaires (Patel and Reichlin, 1978). La distribution des deux peptides sur toutes ces régions n'est cependant pas égale puisqu'on retrouve principalement de la SST-14 dans le système nerveux (Epelbaum,

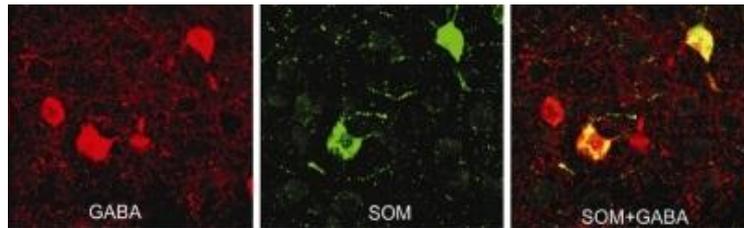
1986) tandis que la SST-28 est prédominante partout ailleurs. Nous nous intéresserons particulièrement à cette distribution dans le système nerveux central pour la suite de ce manuscrit.



**Figure 27 : Représentation schématique de la distribution de la SST et de la CST dans le cerveau de souris**

Les répartitions de la SST (en rouge) et celles de la CST (en bleu) sont identifiées dans différentes structures cérébrales, chez le rongeur : AcbT, noyau accumbens ; Amy, amygdale ; CPut, caudate putamen ; Cx, cortex ; Hi, hippocampe ; Hpt, hypothalamus ; ME, éminence médiane ; MOB, bulbe olfactif ; OT, tubercule olfactif ; PVN, noyau paraventriculaire ; S, septum ; Th, thalamus ; VMH, hypothalamus ventro-médian. (D'après Martel et al., 2012)

La SST (i.e. SST-14) est exprimée de façon ubiquitaire dans le cerveau des mammifères (figure 27). Elle est cependant retrouvée à de très haut niveau de réactivité dans certaines structures cérébrales comme l'hypothalamus, l'amygdale, le striatum, l'HPC, le cortex et les aires sensorielles. On la retrouve co-exprimée dans des neurones à acide gamma-aminobutyrique (GABA ; figure 28), un neurotransmetteur inhibiteur (Gonchar et al., 2007). Cette coexistence de la SST au sein de neurones exprimant un autre neurotransmetteur, associée à ses capacités de modulation au niveau de la transmission synaptique en font un agent de neuromodulation important (Viollet et al., 2008; Lepousez et al., 2010b; Lepousez et al., 2010a).



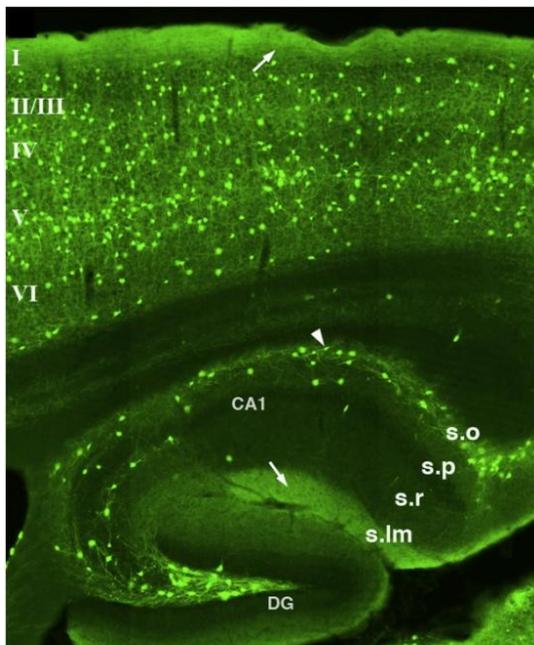
**Figure 28 : Double immuno-marquage de cortex visuel de souris adulte montrant la colocalisation des neurotransmetteurs GABA et SST.**

Neurones GABA en rouge (à gauche) ; Neurones à SST en vert (au milieu) ; colocalisation GABA-SST (à droite) (d'après Gonchar et al., 2007).

Des études immunohistochimiques ont permis de mettre en évidence 2 sous-populations de neurones à SST : les neurones agissant localement sur des microcircuits (interneurones) et les neurones ayant des projections longues sur des structures distantes (Epelbaum et al., 1994).

### c. Les interneurones à Somatostatine : microcircuit

Les interneurones GABAergiques sont classés en fonction de leur morphologie, de leur capacité électrophysiologique et du neuropeptide co-exprimé (SST, neuropeptide Y, cholecystokinine, vasoactive intestinal peptide) ou calciprotéine (calrétinine (CR), calbindine, parvalbumine) (Markram et al., 2004).

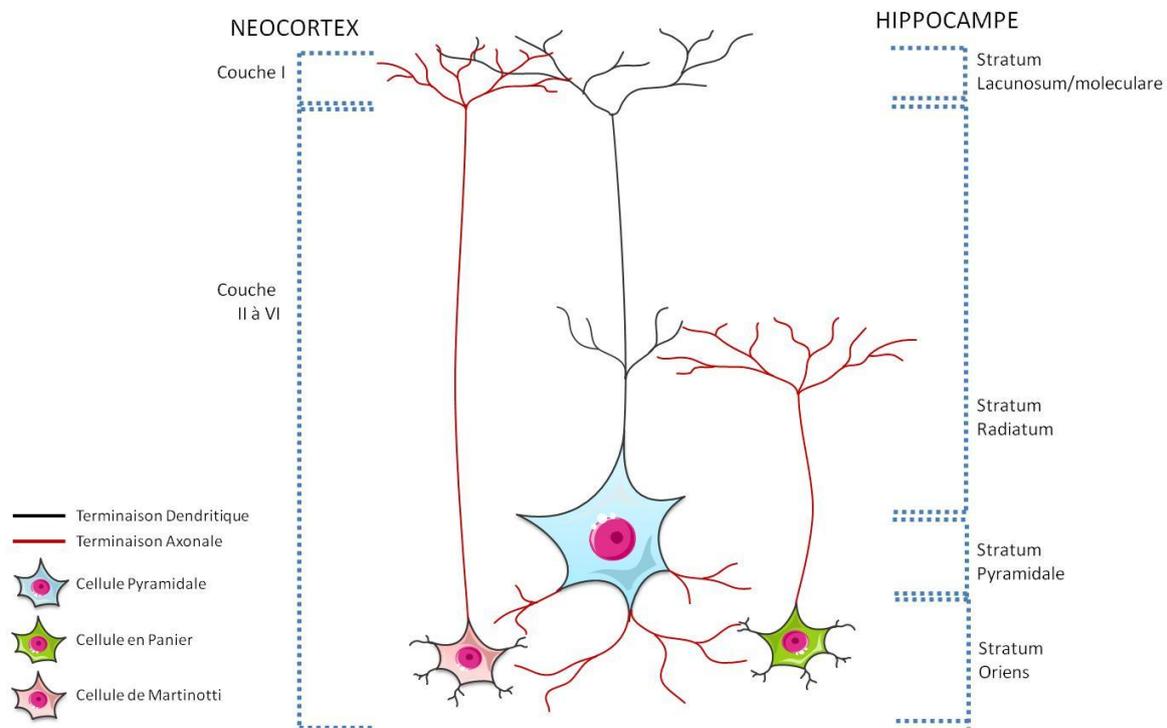


**Figure 29 : Distribution des interneurones à SST dans le cortex et l'hippocampe de souris adulte *SST-Ires-Cre :: RCE-loxP*.**

Les organisations laminaires de l'hippocampe (stratum oriens, pyramidale, radiatum et lacunosum moleculare) et du cortex (couche I à VI) sont indiquées (d'après Taniguchi et al., 2011).

Les principales co-expressions de SST avec une calciprotéine dans les interneurones GABAergiques peuvent varier en fonction de l'espèce, avec une association SST-CR préférentielle chez la souris (Kosaka and Kosaka, 2007) à hauteur de 30-50% dans le cortex et l'HPC (Rudy et al., 2011). On retrouve des interneurones GABA-SST dans l'HPC, le néocortex, l'amygdale, le striatum, le cortex frontal, la rétine et les bulbes olfactifs où ces interneurones innervent des cellules pyramidales excitatrices. La classe d'interneurones SST majoritaire, les cellules de Martinotti, possèdent une arborisation axonale ascendante qui cible les dendrites distales des neurones pyramidaux excitateurs (Kawaguchi and Kondo, 2002; Viollet et al., 2008). Les corps cellulaires de ces

interneurones corticaux et hippocampiques se situent dans les couches II et VI (pour le cortex) et dans le stratum oriens (pour l'HPC) (figure 29 ; (Taniguchi et al., 2011)). Ils innervent alors les terminaisons dendritiques localisées dans la couche I du cortex cérébral et dans le stratum lacunosum/moleculare de l'HPC (figure 30).



**Figure 30 : Schéma d'innervation des interneurones à SST sur les cellules pyramidales de l'hippocampe et du néocortex (B)**

Les cellules de Martinotti (en rose) et les cellules en panier (en vert) innervent les cellules pyramidales (en bleue) à différents niveaux. (Adapté de Taniguchi et al., 2011 et Viollet et al., 2008).

La seconde classe d'interneurones GABA-SST majoritairement présente, appelés les cellules en panier, se retrouvent également dans le néocortex et l'HPC. Les corps cellulaires se situent dans les couches IV-VI (cortex) et dans le stratum oriens (HPC). Les axones de ces cellules en panier innervent les cellules pyramidales dans les mêmes couches cellulaires que leur propre corps cellulaire, ou dans une zone proche (couche III-IV ou stratum radiatum pour le cortex et l'HPC, respectivement) (Viollet et al., 2008). Cette localisation, très rapprochée d'un neurone excitateur, permet aux interneurones GABA-SST d'exercer des régulations localisées et intégratives des neurones qui leurs sont proches et ainsi de moduler l'influx neuronal.

d. Les neurones à Somatostatine : projections longues

Comme mentionné plus haut, en plus des microcircuits SSTergiques présents dans le système nerveux central, il existe également des neurones SSTergiques possédant des projections longues (Melzer et al., 2012). De la même façon que les cellules pyramidales glutamatergiques, les projections longues des neurones à SST assurent une connexion inhibitrice sur de nombreuses régions cérébrales comme le néocortex, l'éminence médiane, l'habenula, le striatum, l'aire préoptique médiane ou l'HPC (Viollet et al., 2008). L'origine de ces projections, ainsi que les cibles, sont variées. Elles peuvent provenir de, ou viser, **l'HPC** (Gulyas et al., 2003; Jinno et al., 2007), le cortex (Tomioka et al., 2005; Gonchar et al., 2007), ou encore **l'amygdale** (Sosulina et al., 2006; McDonald et al., 2012).

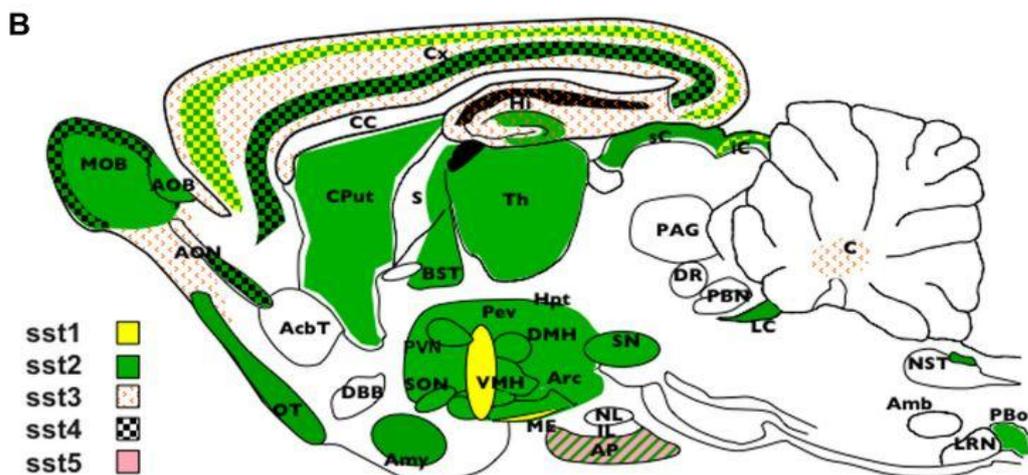
Parmi ces nombreuses projections existantes, il est intéressant de noter celles reliant l'hypothalamus, depuis le PVN, à l'éminence médiane, lien entre l'hypothalamus et l'hypophyse, structures clés de **l'axe HPA**. Des projections longues depuis le PVN innervent également **l'HPC**, laissant supposer une implication de ces neurones GABA-SST à projection longue dans la régulation de l'axe HPA. Une autre structure importante dans notre cas est l'amygdale, dont 30% des neurones à projection longue sont SSTergiques et innervent de nombreuses régions comme le néocortex, le BNST ou encore les noyaux amygdaliens (McDonald et al., 2012).

Pour finir, les projections en provenance du raphé, centre sérotoninergique, (Beitz et al., 1983; Araneda et al., 1999) et du locus cœruleus, centre noradrénergique, contiennent toutes deux de la SST. Cette information prend toute son importance aux regards de l'implication de ces monoamines à la fois dans la réponse au stress et dans l'émergence de troubles liés à un syndrome dépressif. Très récemment, Adori et al. (Adori et al., 2015) ont démontré l'importance des récepteurs à la SST (plus précisément les récepteurs de type 2) dans le maintien des projections noradrénergiques du locus cœruleus. Ces données nous laissent entrevoir l'importance potentielle du réseau SSTergique dans l'émergence de troubles neuronaux, physiologiques et comportementaux en lien avec le stress et la dépression.

## 2. Les récepteurs

### a. Identification et localisation cérébrales

La SST se fixe à 5 récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés à une protéine G. L'existence de ces récepteurs a été mise en avant dans les années 80 par des techniques d'autoradiographies qui ont permis d'identifier deux familles de récepteurs en fonction de leur affinité pour l'octréotide, un agoniste SSTergique peptidique de synthèse (Reubi and Maurer, 1985). Les familles SRIF-1, à haute affinité pour l'octréotide et SRIF-2, à basse affinité, étaient ainsi découvertes. C'est seulement au début des années 90 que les techniques de biologie moléculaire et de clonage ont permis d'identifier les différents sous-types de récepteurs connus à ce jour et de distinguer leur distribution au sein du système nerveux central. Les récepteurs à la SST ont alors été classés en 5 sous-types : sst1-sst5 (avec un variant sst2 A et B). Ils sont tous issus de gènes différents, mise à part les variants d'épissage sst2 A et B (Vanetti et al., 1993; Baumeister and Meyerhof, 2000; Kraus et al., 2000). Ces 5 sous-types de récepteurs sont eux même différenciés en 2 sous-familles en fonction de leur structure et de leurs capacités pharmacologiques. En effet on distingue les sst2, sst3 et sst5 faisant partie de la famille SRIF-1 et les sst1 et sst4 dans la famille SRIF-2 (Siehl et al., 2008).

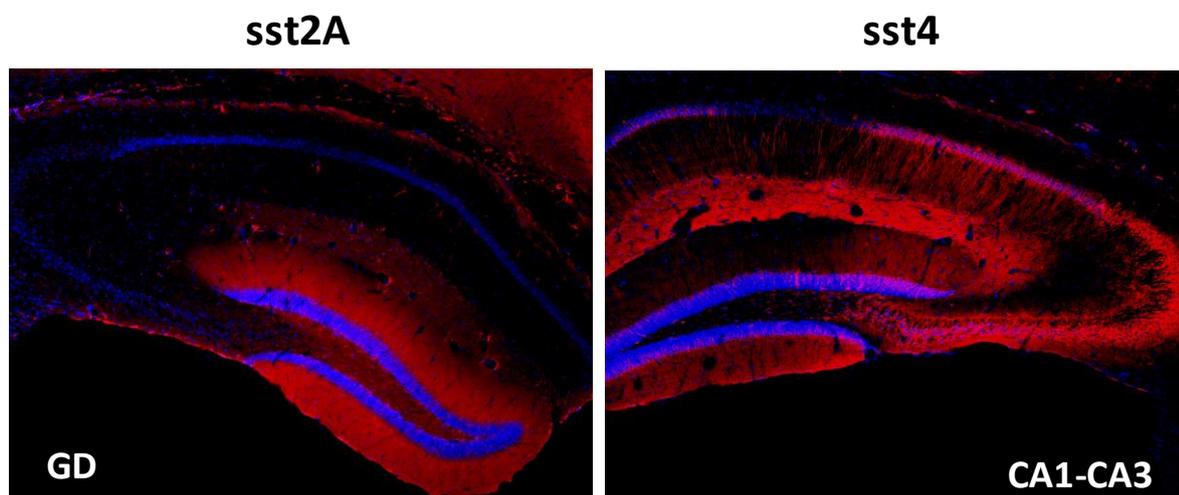


**Figure 31 : Représentation schématique de la répartition des récepteurs à la SST**

Les 5 sous-types de récepteurs se répartissent de manière différente sur l'ensemble du cerveau chez le rongeur. L'hippocampe possède des récepteurs sst2-sst3 et sst4, répartis sur différentes couches cellulaires ; (D'après Martel et al., 2012).

De par la très large distribution des neurones à la SST, il semblait évident de rencontrer une répartition de ses récepteurs sur une grande quantité de structures cérébrales. Des techniques d'autoradiographie ont révélé une densité élevée des sites de liaison de la SST au niveau des couches profondes (V et VI) des cortex cérébraux, au niveau de l'HPC (CA1 et DG), de l'amygdale, des tubercules olfactifs, du septum latéral et de l'habénula. Des marquages de densité plus modérée ont également été révélés dans le CA3 hippocampique, l'hypothalamus et le striatum (Katayama et al., 1990; Hoyer et al., 1994). La répartition de chaque récepteur n'est pas égale dans toutes les structures. Par exemple le **sst2 se retrouve majoritairement sur de nombreuses structures comme l'HPC et l'amygdale** (Videau et al., 2003) tandis que le sst5 semble plus cantonné dans l'hypophyse (figure 31).

L'HPC est ainsi une structure dans laquelle la SST semble avoir une grande importance aux vues de son expression et de la quantité de récepteurs qui y sont présents. De façon intéressante, leur distribution n'est cependant pas homogène au sein même de cette structure (Gastambide et al., 2010). Ainsi, le récepteur sst2 est très présent dans la couche moléculaire du GD de l'HPC dorsal mais absent du CA1 (figure 32). Au contraire, le récepteur sst4 est quant à lui présent dans le stratum radiatum du CA1 de l'HPC dorsal mais est peu présent dans le GD.

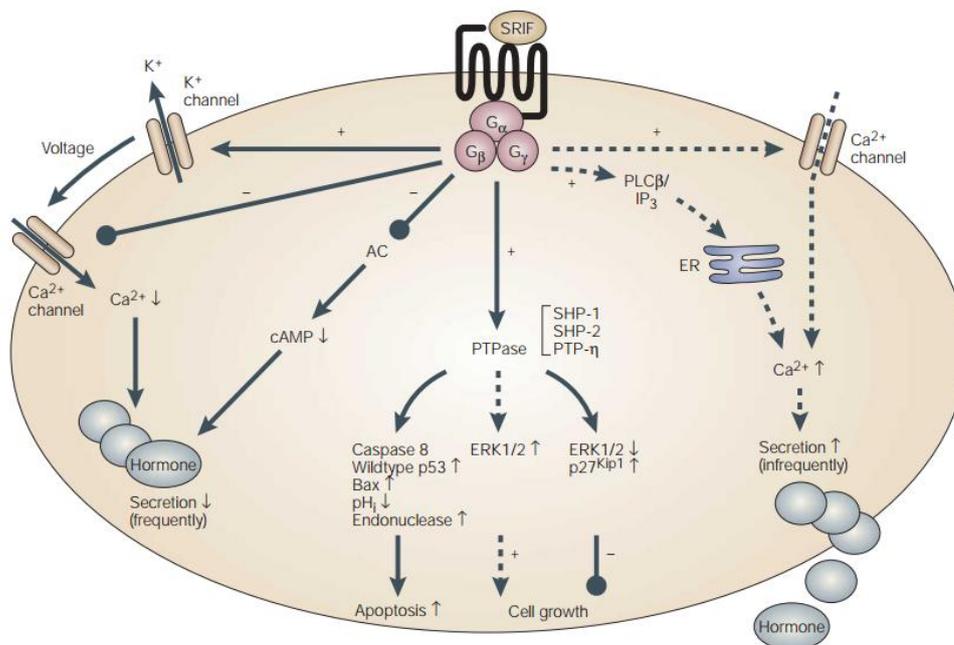


**Figure 32 : Localisation des récepteurs sst2 (à gauche) et sst4 (à droite) par marquage immunofluorescent dans l'hippocampe de souris**

Les récepteurs marqués apparaissent en rouge sur chaque figure, tandis que les corps cellulaires des neurones pyramidaux apparaissent en bleu (d'après Gastambide et al., 2010).

b. Mode d'action des récepteurs à la SST

L'ensemble des récepteurs à la SST fonctionne par le couplage à une protéine G. Le récepteur possède 7 domaines transmembranaires, en contact avec une partie extracellulaire qui reçoit le ligand (la SST) et une partie intracellulaire, en contact avec la protéine G qui permet la transduction du signal.



**Figure 33 : Cascade de signalisation engendrée par la fixation de SST sur son récepteur**

Dans la plupart des cellules, la SST inhibe l'action la sécrétion d'hormone, modifie les conductances calciques et potassiques et intervient sur la régulation de diverses cascades de signalisation. La SST joue également un rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire et de l'apoptose. Dans de très rare cas, elle permet également une activation de la prolifération cellulaire. (Weckbecker et al., 2003)

La signalisation des récepteurs est complexe et met en place des stimulations auto-, para- ou endo-crine (Patel, 1999). La liste des protéines intervenant dans la signalisation SSTergique est grande et certainement incomplète. L'activation du récepteur, par la fixation du ligand, va induire un changement de sa conformation qui conduit à la libération des sous-unités  $G_{\alpha}$  et  $G_{\beta/\gamma}$ . Ces sous-unités vont alors permettre l'activation ou l'inhibition de différentes cascades de signalisation via un large champ de protéines effectrices (adénylate cyclase, mitogen-activated protein kinase : MAP-kinase). La transduction du signal SSTergique entraîne une baisse d'activité de l'adénylate cyclase, ce qui témoigne d'une diminution d'AMPc disponible dans la cellule (Bruns et al., 1996) entraînant par la suite des perturbations transcriptionnelles dans des voies de signalisation (Tentler et al., 1997). La

transduction du signal SSTergique entraîne également des modifications intracellulaires calciques et potassiques (figure 33) qui amènent à une hyperpolarisation de la membrane (Patel, 1999).

Dans leur ensemble, les récepteurs SSTergiques présentent de nombreux modes de fonctionnement possible, pouvant aller de l'induction de prolifération cellulaire à l'inhibition de cette prolifération (Mascardo et al., 1984) voire l'induction d'apoptose (Srikant, 1995). L'ensemble des données de la littérature conforte l'idée que la neurotransmission SSTergique reste complexe. La grande répartition de ce système au sein de structures cérébrales impliquées dans diverses fonctions laisse supposer l'implication de la SST dans la régulation de fonctions cognitives et émotionnelles variées.

### 3. Fonctions Biologiques de la Somatostatine

Dans la plupart des cas, la SST inhibe la sécrétion d'hormones ainsi que leurs fonctions en quelques secondes, voire quelques minutes (Bruns et al., 2002). Par exemple, l'hormone de croissance est ainsi bloquée au niveau de sa libération mais pas de sa synthèse (Gillies, 1997). Elle intervient également au niveau intestinal et pancréatique dans la régulation des sécrétions d'insuline (Hauge-Evans et al., 2015), de glucagon (Elliott et al., 2015) ou encore de ghréline (Shimada et al., 2003). La SST cérébrale participe également à la régulation des comportements alimentaires puisqu'elle induit des altérations comportementales concernant la prise alimentaire, que ce soit en l'augmentant ou en la diminuant (Feifel and Vaccarino, 1994; Stengel et al., 2015).

Les fonctions sensorielles sont également régulées par la SST. En effet, on retrouve une expression SSTergique dans la rétine (Hildebrand and Snutch, 2015) dont de multiples fonctions sur la physiologie de l'œil sont supposées, avec un rôle protecteur de l'homéostasie oculaire. Les fonctions olfactives sont également modulées par le système SSTergique. Les neurones à SST sont alors étroitement liés aux cellules mitrales, piliers des informations olfactives dans les bulbes olfactifs. Un blocage des récepteurs sst2 dans cette région, génétiquement ou pharmacologiquement, induit des altérations des performances de discrimination olfactive (Lepousez et al., 2010a).

La SST voit sa concentration diminuer avec l'âge (Hayashi et al., 1997; McKinney et al., 2015) et augmenter avec l'enrichissement de l'environnement (Nilsson et al., 1993) ce qui laisse supposer une implication cognitive de la SST. En effet, le système SSTergique

intervient également dans les fonctions cognitives, mnésiques et particulièrement dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, soit en perturbant soit en améliorant les compétences mnésiques (Guillou et al., 1994; Lamirault et al., 2001). La déplétion de SST par la cystéamine entraîne un déficit d'acquisition et de consolidation de la trace mnésique (Haroutunian et al., 1987) mais peut également faciliter l'apprentissage de tâche indépendante de l'HPC (Guillou et al., 1999). La SST hippocampique a par la suite été très étudiée pour l'implication majeure de l'HPC dans la mémoire. Des études sur les implications spécifiques des récepteurs ont permis de mettre en avant diverses implications comme celle des récepteurs sst3 (Einstein et al., 2010) ou encore des récepteurs sst4 (Gastambide et al., 2009; Sandoval et al., 2011). Ainsi, Gastambide et al., ont d'abord montré l'implication des récepteurs sst4 de l'HPC dans la sélection d'une stratégie d'apprentissage dans une tâche en piscine de Morris. L'activation sélective des récepteurs sst4 oriente alors de manière dose-dépendante la stratégie spatiale associative complexe, HPC dépendante, vers une stratégie associative simple et striato-dépendante. Par la suite, ces auteurs ont démontré que ce phénomène de changement de stratégie induit par les récepteurs sst4 n'était possible qu'en présence de récepteurs sst2. Ceci suggère alors une possible interaction des 2 récepteurs, appuyée par des études sur la transmission glutamatergique (Moneta et al., 2002), mais qui n'est toujours pas clairement identifiée (Gastambide et al., 2010).

La SST intervient également dans la régulation de nombreux autres fonctions physiologiques (locomotion, respiration, rythme cardiaque) ou pathologies (maladie d'Alzheimer, Parkinson, Schizophrénie) que nous ne détaillerons pas ici.

#### 4. Stress, Dépression et Somatostatine

La SST et ses récepteurs sont très exprimés dans des structures telles que l'amygdale, l'HPC (Hannon et al., 2002) ou encore l'hypothalamus. Il n'est alors pas étonnant de retrouver une implication du système SSTergique dans la régulation des troubles liés au stress, comme l'anxiété et la dépression.

Ainsi, il a été démontré que l'exposition à un nouvel environnement entraîne une augmentation des ARN messagers de la SST dans l'hypothalamus et une augmentation de la protéine dans l'éminence médiane (Arancibia et al., 1984; Arancibia et al., 2000). Cette libération, au niveau de l'hypothalamus, permet d'inhiber la libération hypothalamique de CRH (Aguila et al., 1991b) ce qui démontre une implication directe de la SST dans la

régulation de l'axe HPA. Des études antérieures avaient déjà démontré qu'une infusion intracérébro-ventriculaire (i.c.v.) de SST-28 bloquait la libération d'ACTH en réponse à un stress aigu (Brown et al., 1984), mais aucun lien entre la SST-14 endogène et l'axe HPA n'avait alors été mis en avant. De plus, des animaux n'exprimant pas la SST (SST-KO) présentent des taux plasmatiques de corticostérone plus élevés que leurs homologues WT (Zeyda et al., 2001; Lin and Sibille, 2015a). L'ensemble de ces données vient donc appuyer le rôle de la SST dans les régulations de l'axe HPA.

Aujourd'hui, l'implication de la SST dans la régulation des troubles liés au stress n'est pas limitée à une action hypothalamo-hypophysaire (Stengel et al., 2013). Son effet anxiolytique a par ailleurs été démontré par Engin et al. (Engin et al., 2008), par des infusions i.c.v., avec des effets anxiolytiques équivalents à un anxiolytique reconnu : le Diazépam®. Ce rôle majeur de la SST dans la régulation des troubles anxieux semble intimement lié à l'interaction existante entre la SST et le GABA, puisqu'une inhibition des récepteurs GABA empêche l'effet anxiolytique de la SST de s'exprimer. Très rapidement, ces mêmes auteurs démontrèrent que la transduction du signal par la SST, à visée anxiolytique, se faisait via les récepteurs sst2. Des animaux ainsi traités par des infusions i.c.v. d'agonistes sélectifs des récepteurs sst2 exprimaient moins de comportements anxieux que des animaux traités avec des agonistes sélectifs des autres SSTR (Engin and Treit, 2009).

Engin et al., ont également démontré que l'effet anxiolytique véhiculé par les récepteurs sst2, était possible par l'action des récepteurs sst2 amygdaliens et septaux, puisqu'un antagoniste sélectif de ces récepteurs bloque l'effet anxiolytique de la SST (Yeung and Treit, 2012). Cette observation est corrélée avec des études montrant que l'exposition à un nouvel environnement entraîne l'action des neurones SST intra-amygdaliens (BLA) (Butler et al., 2012). **Cependant, aucune implication hippocampique n'a été mise en évidence concernant la régulation des troubles anxieux ou dépressifs par la SST.** De façon intéressante Arancibia et al., ont d'ailleurs démontré par une technique de microdialyse intra-hippocampique, qu'il existait une élévation des taux de SST dans l'HPC, aussi bien après l'application d'un stress que d'un traitement aigu à la dexaméthasone (Arancibia et al., 2001).

Les concentrations élevées en corticostérone chez des animaux SST-KO sont également associées à une « émotionnalité » comportementale accrue ainsi qu'une diminution d'expression des gènes codant pour le BDNF, la cortistatine ou encore la GAD67 (enzyme

décarboxylant le glutamate en GABA), différentes modifications qui corrélaient avec les caractéristiques comportementales, neuroendocrines et moléculaires observées chez des patients souffrant de dépression (Lin and Sibille, 2015a).

Ces informations vont de pair avec les travaux d'Engin et al., qui mettent également en avant un effet antidépresseur de la SST (Engin et al., 2008), modulé par les SSTR2 et SSTR3. Des études cliniques ont par la suite permis de voir une diminution de SST exprimée dans le Cortex Préfrontal Dorsolatéral (Sibille et al., 2011) le cortex cingulaire (Tripp et al., 2011; Tripp et al., 2012) ou encore dans l'amygdale (Guilloux et al., 2012) chez des patients souffrant de dépression majeure. Ces régions, très impactées dans les troubles dépressifs, sont aussi le théâtre d'une diminution de peptide colocalisant avec la SST, à savoir la CST et le neuropeptide Y. Tous trois sont des marqueurs de neurones GABAergiques qui ciblent des neurones pyramidaux, essentiels dans l'intégration d'informations sensorielles (Viollet et al., 2008). De nombreuses études axées sur les diminutions de marqueurs associés à la SST et colocalisés avec le GABA suggèrent que cette sous-population de neurones GABAergique est particulièrement vulnérable face à la dépression. (Lin and Sibille, 2013).

## Objectif de l'étude

La dépression majeure est un trouble psychiatrique qui touche, en France, 12,5 millions de personnes entre 15 et 75 ans. Il s'agit d'une pathologie dont l'origine est multifactorielle et qui présente de très nombreux symptômes cliniques. L'occurrence de la maladie est cependant intimement liée au dérèglement de l'axe HPA qui est supposé être le premier facteur d'émergence de troubles dépressifs (Katz et al., 1981). Depuis de nombreuses années, les études sur la pathogénicité du stress dans la dépression ont mené la communauté scientifique à s'intéresser à des classes d'âges particulièrement sensibles au stress, à savoir les périodes de développement cérébrales (périnataux et adolescence ; (Sternberg and Ridgway, 2003 ; Bourke and Neigh, 2011)) et de neurodégénérescence (sénescence ; (Toth et al., 2008b)). Cependant, la charge allostatique mis en place au fil d'expositions répétées au stress et du vieillissement normal (McEwen, 2003) laisse entrevoir l'existence d'une dynamique dans les phénomènes de résistance à l'installation de troubles chez le sujet adulte.

Dans un premier temps, une étude comportementale exploitant diverses analyses émotionnelles, cognitives et somatiques a été développée afin de vérifier si **l'exposition à un stress chronique chez la souris adulte entraînait une émergence différentielle de troubles en fonction d'un gradient d'âge adulte**. Dans cette partie, les évaluations réalisées ont permis de vérifier la mise en place de troubles de type dépressif, de type anxieux, de troubles cognitifs, somatiques et d'anhédonie sur 5 classes d'âges de souris adultes. Ces expériences ont alors eu pour but d'analyser les capacités de **résistance** d'animaux adultes concernant les diverses atteintes liées à l'exposition au stress chronique.

Les troubles dépressifs sont aujourd'hui reconnus pour leur fort potentiel de rechute (Frank and Thase, 1999) ainsi que la sensibilité mise en place après un premier épisode (Burcusa and Iacono, 2007). Les effets à long terme du stress sur l'émergence de troubles de type dépressif sont aujourd'hui très documentés, principalement sur l'induction périnatale et les répercussions chez l'adulte : ce sont les « effets programmés » du stress. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à la persistance de troubles établis à l'âge adulte, chez le sujet âgé. La deuxième partie de ce manuscrit a donc eu pour but de **vérifier la persistance des troubles établis à l'âge adulte chez le sujet âgé d'un point de vue comportemental et épigénétique**. Cette deuxième partie a alors permis d'évaluer les capacités de **résilience** des animaux adultes, vis-à-vis des troubles établis par le stress chronique.

La physiopathologie de la dépression majeure reste cependant assez mal connue, ce qui peut expliquer les difficultés rencontrées concernant l'inefficacité de traitements chez certains patients. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la dépression peut permettre la mise en place future de nouveaux composés pharmaceutiques, à visée plus spécifique. Ces derniers pourront élargir l'éventail de traitements déjà existant. Basée sur le constat d'une libération de SST dans l'HPC en réponse à un stress (Arancibia et al., 2001) et d'une diminution de SST chez les patients dépressifs, l'objectif de la troisième partie de cette thèse est **de vérifier l'hypothèse selon laquelle la SST hippocampique régule l'axe HPA et de déterminer quels récepteurs hippocampiques participeraient à cette régulation**. Les régulations de l'axe HPA par la SST et ses récepteurs hippocampiques ont été évaluées par une technique de microdialyse inverse qui a permis l'infusion de composés pharmacologiques directement dans l'HPC et la collecte de LCR afin de doser la CORT. Une approche comportementale a été développée afin de déterminer quels récepteurs hippocampiques pourraient moduler les troubles anxieux et dépressif. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre III, sous la forme d'une publication :

**Thomas D. Prévôt**, François Gastambide, Cécile Viollet, Christophe Tronche, Nadia Henkous, Guillaume Martel, Jacques Epelbaum, Daniel Béracochéa and Jean-Louis Guillou, (2015) Roles of hippocampal somatostatin receptor subtypes in stress, anxiety and depression-like behavior, *Biological Psychiatry*, soumis.

L'implication de la SST dans les régulations de l'axe HPA et dans les troubles anxieux et dépressifs est maintenant démontrée. Ces régulations semblent être en partie médiées par le récepteur 2. Sur ce constat, nous avons souhaité tester l'hypothèse selon laquelle **la régulation SSTergique médiée par ce récepteur pourrait participer dans la mise en place de phénomène de résistance aux effets délétères du stress**. Une absence de ces récepteurs entraînerait alors des perturbations basales (déjà démontrées) qui seraient alors aggravées par une exposition au stress chronique. Pour tester cette hypothèse, nous avons employé le protocole de SCLI du chapitre I à des animaux sst2KO âgés de 12 mois. Nous avons choisi cet âge car il semble correspondre à un âge charnière dans la mise en place de sensibilités liées au stress chronique.



## MATERIELS ET METHODES

---

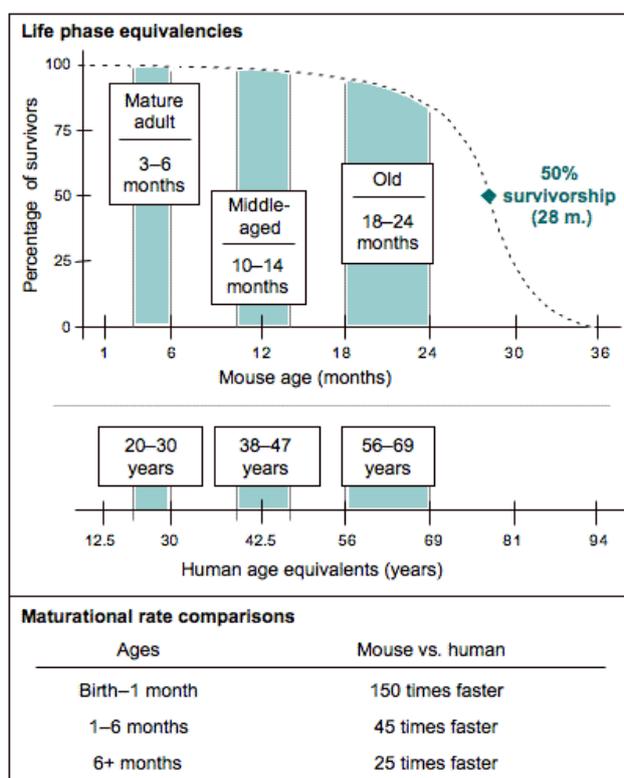


## Modèles animaux

L'ensemble de cette étude a été réalisé en accord avec le décret du 1<sup>er</sup> Février 2013 transposant la Directive Européenne 2010/63UE pour l'utilisation d'animaux à des fins de recherches scientifiques et l'approbation du comité d'éthique de Bordeaux (saisine 5012098-A).

### 1. Lignées

Les expériences ont été réalisées avec des souris mâles C57BL/6 By JICO (Janvier, France) âgés de 8 semaines à leur arrivée au laboratoire. Ces animaux sont issus d'une lignée



**Figure 34 :** Représentation schématique de l'équivalence en âge entre la souris C57BL/6J et l'Homme

Le pourcentage de survie par rapport à l'âge chez la souris est présenté (en haut) avec les équivalences estimées chez l'Homme. Le ratio de maturité entre la souris et l'Homme est également présenté (en bas), montrant ainsi des vitesses de maturation supérieures chez la souris. (The Jackson Laboratory, d'après (Flurkey et al., 2007).

consanguine, particulièrement reconnue pour ses capacités comportementales et cognitives. De plus, cette souche est la première dont le génome ait été entièrement séquencé, ce qui fait d'elle une souche très employée en matière de mutagenèse. L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a été effectué avec des animaux adultes, âgé de 3 à 20 mois (figure 34).

Des souris knockout pour le gène codant les récepteurs 2 et 4 à la somatostatine (*sst2*<sup>-/-</sup> et *sst4*<sup>-/-</sup>) ont également été utilisées dans l'étude concernant l'implication de la somatostatine dans les régulations liées aux troubles anxio-dépressifs. Ces dernières sont obtenues par reproduction et élevage dans le laboratoire de sujets hétérozygotes (+/-) ayant été régulièrement recroisés avec des souris C57BL/6 sur 13 générations. Les animaux *sst2*<sup>-/-</sup> ont été originellement

générés par recombinaison d'une cassette néomycine avec le gène *sst2* entier chez des souris

de fond génétique hybride 129SV x C57BL/6 (Zheng et al., 1997). Les animaux *sst4*<sup>-/-</sup> ont quant à eux été générés par l'insertion d'un fragment LacZ dans la séquence codante pour le récepteur. L'étude portant sur les animaux génétiquement modifiés pour le *sst4* a été possible grâce à une collaboration avec Jacques Epelbaum et Cécile Viollet du Centre de Psychiatrie et Neurosciences (INSERM/Université Paris Descartes). Les génotypages, concernant les animaux *sst2*, sont réalisés à partir de prélèvements sanguins caudaux et sont effectués par la méthode de « Polymérase Chain Réaction » (PCR).

### 2. Hébergement

Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux sont maintenus en stabulation collectivement, par cage de 20 animaux, dans l'animalerie avec eau et nourriture *ad libitum*. L'environnement de stabulation est placé sous température ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) et hygrométrie contrôlées, avec un cycle nyctéméral non inversé de 12h/12h (7h-19h ON). Préalablement aux expériences, les animaux appartenant aux groupes non stressés sont manipulés quotidiennement afin qu'ils soient familiarisés avec l'expérimentateur et habitués aux manipulations expérimentales. Cela permet d'éviter l'apparition de biais expérimentaux liés à une anxiété vis-à-vis de l'expérimentateur (Ghosal et al., 2015).

En fonction de l'attribution des groupes expérimentaux, les animaux sont maintenus en cage collective de 5 individus ou en cage individuelle. Le maintien en cage collective est utilisé exclusivement pour les animaux non-stressés du protocole de stress chronique, afin que l'isolement social prolongé ne biaise pas l'état émotionnel de l'animal. En effet, la souris est un rongeur grégaire qui apprécie la présence de ses congénères. Afin d'identifier les animaux groupés en cages collectives, un marquage dans le pavillon de l'oreille est réalisé grâce à un poinçon, en suivant un plan d'identification défini. Pour les autres expériences (groupe stressé du protocole de stress chronique et expériences nécessitant une chirurgie stéréotaxique), les animaux sont isolés en cages individuelles, afin d'éviter les interactions entre congénères.

### 3. Sevrage et Génotypage

Les animaux transgéniques pour le récepteur *sst2* issus de l'élevage au laboratoire sont sevrés de la mère à l'âge de  $30\pm 2$  jours, puis génotypés par une méthode de PCR à partir d'un prélèvement sanguin réalisé au bout de la queue de l'animal âgé d'environ 5 à 6 semaines. Une goutte de sang est déposée sur du papier CloneSaver FTA (GE Health Care®, USA)

avant d'être séchée au minimum 48h à température ambiante. Le papier est par la suite prélevé avec un emporte-pièce Harris Micro-Punch 1.22mm (Whatman®, UK). Les fragments sont lysés et purifiés avec un solvant FTA Purification Reagent (GE Health Care®, UK) avant d'être exposés à un mix contenant les amorces du fragment à amplifier (Tableau 3), les radicaux libres et la Taq Polymérase (Invitrogen™, Fisher®, France).

**Tableau 3 : Descriptif des amorces utilisées en PCR pour le génotypage des souris transgéniques**

NOM	Séquence (5'-3')	Taille (en nucléotides)	PM (g/mol)	Tm (°C)
<b>PGKAS</b>	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG	21	6598.2	71
<b>Pro 2_5</b>	CTC ACT GAA CAG CTA GCC C	19	5718.8	70
<b>SST2IAS</b>	CCC ATT CAA CTG CTC AGA GC	20	6023.0	70

Les échantillons suivent ensuite un protocole d'amplification de l'ADN en Thermocycleur qui s'initialise par la dénaturation de l'ADN pendant 2 minutes à 94°C suivi de 35 cycles dont les caractéristiques sont les suivantes : 30 secondes à 94°C, puis 30 secondes à 60°C et enfin 30 secondes à 72°C.



**Figure 35 : Identification des génotypes rencontrés chez les animaux transgéniques pour le récepteur SST2**

L'ADN est amplifié par PCR, avant d'être exposé à un champ électrique permettant l'identification des séquences en fonction de leur poids en paire de bases : sst2+/+ (WT) ; sst2+/- (Hétérozygote) ; sst2-/- (sst2KO).

Les produits de PCR sont ensuite complétés d'un marqueur de charge puis sont séparés par une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans un tampon (TAE 1X dilué à partir de TAE50X, VWR, Belgique). Sous l'effet du champ électrique (110V, 170mA), les fragments amplifiés chargés négativement migrent vers l'anode et se séparent en

fonction de leur poids moléculaire. La coloration au Bromure d'Ethidium permet de visualiser l'avancement de chaque bande sur un lecteur de gel à UV (figure 35). L'insertion de la cassette néomycine dans la partie codante pour le récepteur sst2 donne naissance à des

fragments répliqués plus long que l'allèle sauvage. De cette façon, la bande composée des fragments d'ADN répliqué est plus lourde et migre moins loin dans le gel d'électrophorèse permettant ainsi l'identification des animaux homozygotes (*sst2*<sup>+/+</sup> et *sst2*<sup>-/-</sup>) et des animaux hétérozygotes (*sst2*<sup>+/-</sup>)

#### 4. Stress Chronique

Le protocole de stress chronique léger imprédictible (SCLI) utilisé est celui mis au point par Alexandre SURGET et Catherine BELZUNG, publié dans *Experimental Animal Models in Neurobehavioral Research* en 2009. Il se déroule sur 6 semaines pendant lesquelles les animaux sont soumis à une succession d'événements stressant qui ont lieu de façon imprédictible, à raison de 2 à 3 événements par jour. Les perturbations appliquées sont d'une intensité faible et sans privation alimentaire ou dipsique, l'intérêt du protocole étant la répétition des événements faibles, de façon imprédictible, pour satisfaire au mieux les critères de validités de Willner (Willner, 1984, 1995). Les événements se produisant au cours de ces 6 semaines sont les suivants et l'enchaînement est détaillé dans le tableau 4 :

- Stress social : les animaux de 2 cages voisines sont inversés afin qu'un animal se retrouve dans la cage d'un inconnu, ce qui générera un stress social.
- Retrait de litière : la litière de la cage est retirée, laissant ainsi l'animal sur le plexiglas de la cage.
- Litière humide : la litière est imbibée d'eau
- Contention : l'animal est placé dans un tube de 11cm de long pour 2,5cm de diamètre percé de trous afin qu'il puisse respirer.
- Changement de litière : la litière souillée est retirée pour être remplacée par de la litière propre, sans odeur.
- Inclinaison : La cage est inclinée à 45°
- Jour / Nuit : Alternance du cycle jour/nuit sur une certaine période.
- Bain : la litière est retirée de la cage pour laisser place à environ 2cm d'eau au fond de la cage, laissant l'animal ainsi baigner dans l'eau.
- Cris de rapaces : les animaux sont exposés à un enregistrement de cris de rapaces.
- Fèces de rat : une dose de litière souillée d'urine et de fèces de rat est étalée dans la cage de l'animal.

Tableau 4 : Détails du protocole de stress chronique léger imprédictible appliqué sur 6 semaines

	LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI	SAMEDI	DIMANCHE
<b>Semaine 1</b>	Etat du pelage, pesée 10h Stress social 12h Stress social 15h-17h Retrait litière	9h Stress Social 15h-16h Contention	10h30-11h30 3 changements de litière 15h Stress social	12h Stress social 14h-15h30 Litière humide	9h30-11h Inclinaison 14h Stress social	8h Inversion du cycle jour/nuit	
<b>Semaine 2</b>	8h – Fin d'inversion du cycle jour/nuit Etat du pelage, pesée 12h-13h Contention 14h-15h30 Inclinaison	9h30-12h30 Retrait litière 11h Stress social 15h-16h30 Inclinaison	10h-11h 2 changements de litière 18h Stress social	12h Stress social 15h-17h Contention 19h-20h jour	8h-9h nuit 10h-13h litière humide 15h Stress social	9h30-11h30 jour/nuit toutes les 30 min 15h-17h nuit 4h-6h jour	9h30-11h30 jour/nuit toutes les 30 min 15h-17h nuit 4h-6h jour
<b>Semaine 3</b>	Etat du pelage, pesée 15h-16h30 retrait litière	11h-14h Inclinaison + retrait litière 15h-15h15 Bain	8h-10h Contention 14h30-17h30 Stress social	8h30-11h30 Litière humide 10h Stress social 14h-14h20 Fèces de rat 17h-18h nuit	9h-9h30 nuit 10h Changement litière 14h30-17h30 Retrait litière Après 20h Inversion du cycle jour/nuit	Inversion du cycle jour/nuit	Inversion du cycle jour/nuit
<b>Semaine 4</b>	Etat du pelage, pesée 15h-18h Litière humide 16h30 Stress social	10h30-12h Contention 14h30-15h30 & 17h-18h Contention	9h & 12h Stress social 16h Changement de litière 15h-18h Jour/nuit toutes les 30 min	9h& 9h30 Stress social 14h30-17h30 Litière humide	10h-11h 3 Changements de litière 14h30-14h45 Bain	9h-11h jour Après 20h inversion du cycle	8h Fin d'inversion 15h15-19h15 Jour/nuit toutes les 30 min
<b>Semaine 5</b>	Etat du pelage, pesée 14h30-18h30 Litière humide	10h-13h inclinaison 15h Stress social 17h-19h Jour toutes les 30 min	8h-9h & 10h-11h Contention 16h-17h30 Retrait litière	10h30-11h Fèces de rat 14h30-17h Retrait litière 16h & 17h30 Stress social 17h-18h jour	9h Stress social 10h-10h15 Bain 15h-16h 2 changements de litière	9h30 4 alternances jour/nuit toutes les 30 min 15h-17h nuit 4h-6h jour	9h30 4 alternances jour/nuit toutes les 30 min 15h-17h nuit 4h-6h jour
<b>Semaine 6</b>	Etat du pelage, pesée 4h-6h nuit 16h-16h20 Cris de rapaces	10h30-11h30 Contention 16h-18h30 Retrait litière + inclinaison	11h & 13h Stress social 15h-15h15 Bain	10h-13h Litière humide 15h30-16h30 3 Changements de litière	Prélèvements sanguins	Evaluation Comportementale	Evaluation Comportementale
<b>Semaine 7</b>	Evaluation Comportementale	Evaluation Comportementale	Evaluation Comportementale	Evaluation Comportementale	Evaluation Comportementale		

## Evaluations Physiques et Comportementales

### 1. Evaluations somatiques

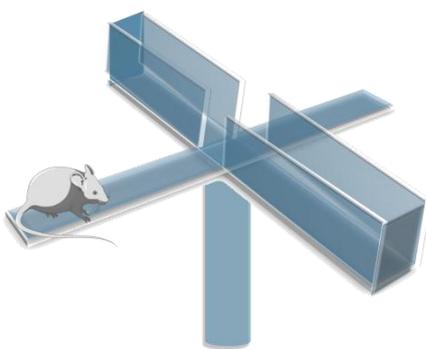
Plusieurs altérations physiques peuvent être évaluées pour témoigner d'une atteinte de type dépressive chez l'animal. Ces altérations sont souvent observées au cours d'un protocole chronique inducteur de troubles dépressifs, comme le SCLI. Un paramètre facilement mesurable est l'évolution du poids de l'animal au cours du protocole. Pendant l'application du protocole de stress chronique, les animaux de chaque groupe sont pesés chaque semaine pour suivre leur évolution pondérale et s'assurer de leur bon état de santé.

Un autre paramètre mesurable est l'état du pelage de l'animal. Le stress peut entraîner une diminution des comportements autocentrés (toilettage) et ainsi entraîner une détérioration progressive de l'état global du pelage. La mesure est réalisée une fois par semaine, sur 7 parties du corps de l'animal : la tête, le cou, le dos, la queue, le ventre, les pattes avant et arrière. Un score de 0 (bon état) ou 1 (état détérioré) est attribué sur chaque partie pour témoigner de la détérioration progressive du pelage, marqueur d'induction de troubles dépressifs (Ducottet et al., 2003; Detanico et al., 2009). La première mesure réalisée prend la valeur 0 et sert de référence pour évaluer l'évolution des détériorations au fil des semaines.

### 2. Evaluations émotionnelles

#### a. Evaluation de l'état d'Anxiété

#### *Le Labyrinthe en Croix Surélevé*



**Figure 36 : Représentation schématique du labyrinthe en croix surélevé**

L'animal est libre d'explorer le labyrinthe pendant 8 minutes

Afin d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux, nous utilisons un test comportemental exploitant le paradoxe existant chez la souris, qui la pousse à se réfugier dans les recoins sombres mais également à explorer un environnement nouveau (Lister, 1987). Pour se faire, nous utilisons un labyrinthe en croix en PVC, surélevé à 60cm du sol (Elevated Plus Maze : E.P.M.), composé de 2 bras ouverts opposés de 30cm de long pour 7cm de large

et de 2 bras fermés opposés, de la même taille que les bras ouverts, comportant une paroi de 17cm de haut (figure 36). Le labyrinthe est situé dans une pièce insonorisée et l'éclairage, aversif pour les rongeurs, a été fixé à 70 Lux au centre de l'appareil. Les animaux sont placés au centre dans un cylindre de PVC pendant 20 secondes avant le début de l'acquisition. Durant la séance de 8 minutes, l'animal est suivi par un système de vidéotracking (ViewPoint®, France). La détection de l'animal est réglée de sorte qu'il soit considéré comme entré ou sorti d'un bras lorsque les pattes postérieures sont engagées au delà de la limite séparative avec la zone centrale. L'appareil est nettoyé à l'alcool 70° avant et après chaque passage afin d'éliminer les odeurs de congénères pouvant perturber la réalisation de la tâche.

Les paramètres mesurés dans ce test font référence au taux d'exploration de l'animal dans l'appareil. Le taux d'exploration des bras ouverts relativement à celui des bras fermés révèle le niveau d'anxiété de l'animal (Lister, 1987). Ainsi, nous avons exploité le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts relativement au temps passé dans les bras fermés, ainsi que le nombre d'entrées dans ces mêmes bras :

$$(\% \text{ Temps Bras Ouverts} = \frac{\text{Temps Bras Ouverts}}{(\text{Temps Bras Ouverts} + \text{Temps Bras Fermés})} \times 100)$$

$$(\% \text{ Entrées Bras Ouverts} = \frac{\text{Entrées Bras Ouverts}}{(\text{Entrées Bras Ouverts} + \text{Entrées Bras Fermés})} \times 100)$$

D'autres paramètres sont enregistrés pour affiner l'analyse comportementale : la latence d'entrée dans un bras ouvert, le nombre total d'entrées dans les bras (indice d'activité) et le nombre de visites aux extrémités des bras ouverts. Le test en EPM pour évaluer l'état de type anxieux chez le rongeur témoigne d'une bonne validité prédictive et descriptive.

### *Exploration libre*

Le test d'exploration libre est réalisé pour évaluer l'appréhension d'un nouvel environnement selon le protocole proposé par Strekalova en 2004. L'animal est placé dans une cage similaire à sa cage habituelle, dont le fond est rempli de litière fraîche. L'expérience se déroule le matin, dans une pièce calme éclairée à 70 Lux. Le taux d'exploration verticale est considéré comme un indicateur d'anxiété. Le nombre de redressement ainsi que la latence de premier redressement sont quantifiés visuellement pendant 5 minutes.

### *Open Field*

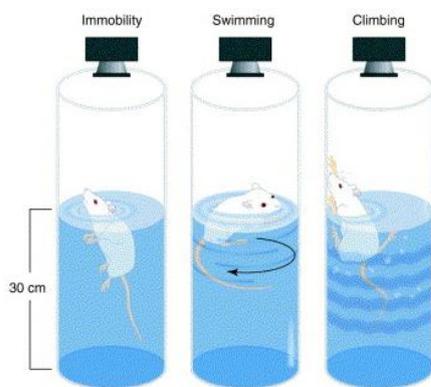
L'open field (O.F.) est une arène circulaire de 1m de diamètre, entourée d'une paroi opaque de 25cm de hauteur en plexiglas. Une lampe à 2m au dessus de l'arène permet un

éclairage homogène de 70lux. Les animaux sont placés face à la paroi et sont laissés libres d'explorer l'arène pendant 5 minutes. La surface de l'arène est divisée virtuellement en un anneau périphérique de 12cm, et une zone centrale. L'exploration des animaux est alors quantifiée par un système de vidéotracking qui permet de relever le temps passé dans la zone centrale, ainsi que le nombre d'entrées et la latence d'entrée au centre.

b. Evaluation de l'état de type-dépressif

**Test de Désespoir Comportemental ou Nage Forcée de Porsolt**

Le test de désespoir comportemental ou nage forcée de Porsolt (N.F.P.) est un test couramment utilisé afin d'évaluer les comportements de types dépressifs chez l'animal (Porsolt, 1979), notamment dans l'élaboration de produits pharmaceutiques à visée antidépressive. Sa très grande répartition dans la communauté scientifique est en partie due à sa facilité de mise en place et à sa grande stabilité à détecter les effets antidépresseurs, ou au contraire dépressogènes de molécules ou de procédures (Borsini and Meli, 1988). Il répond très bien aux critères de validité prédictive malgré une validité descriptive discutable selon les critères énoncés par Willner en 1984.



**Figure 37 : Modélisation du test de la nage forcée de Porsolt**

Les 3 comportements que peut exercer l'animal sont représentés, à savoir l'immobilité, la nage ou l'escalade (D'après Cryan et al., 2002).

Le test consiste à laisser l'animal dans une cuve cylindrique en verre de 15 cm de diamètre remplie de 30 cm d'eau à  $25\pm 1^\circ\text{C}$  sur une hauteur de 20 cm. L'animal reste ainsi pendant 6 minutes durant lesquelles il peut nager, tenter d'escalader la paroi ou bien rester immobile (figure 37). Un animal résigné, faisant preuve d'un *désespoir comportemental* (i.e. ayant un comportement proche de celui observé chez l'Homme dépressif) passera davantage de temps immobile qu'un animal témoin. L'animal est ensuite retiré du cylindre, séché avec une serviette puis placé sous une lampe chauffante jusqu'à récupération.

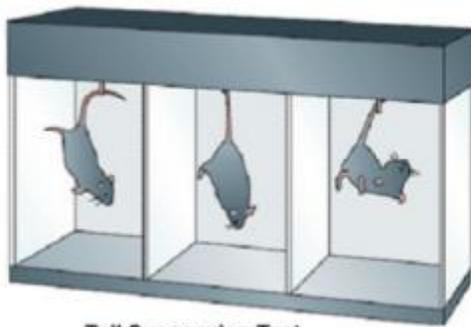
Pour l'analyse des réponses comportementales, les données de temps passé sont traitées différemment en fonction de l'effet que l'on cherche à démontrer. En effet, pour démontrer un effet dépressogène, l'analyse des temps passés est focalisée sur les 4 premières minutes (la réponse comportementale d'immobilisation arrivant plus rapidement chez les animaux du groupe expérimentaux que chez les animaux témoins).

Au contraire, pour démontrer un effet antidépresseur, l'analyse se focalise sur les 4 dernières minutes pour montrer une plus grande résistance de l'animal traité avec le composé antidépresseur. De plus, ce test a permis de mettre en évidence une dissociation des effets des agents antidépresseurs en montrant que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (ISRS) diminuent l'immobilité au profit de la nage (exemple : fluoxetine) tandis que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline (ISRN) réduisent l'immobilité au profit de l'escalade (ex : la reboxetine) (Cryan et al., 2002).

Dans nos conditions expérimentales, nous avons analysé le temps passé immobile, le temps passé à nager et le temps passé à escalader les parois sur les 4 premières minutes pour attester d'un effet dépressogène du stress chronique (Chapitre I, II et IV) et sur les 4 dernières minutes pour démontrer un effet antidépresseur des composés SSTergiques (Chapitre III). En plus des temps passés pour chaque comportement, nous avons également mesuré la latence d'immobilisation.

#### *Test de Suspension par la queue*

Autre test couramment utilisé dans l'évaluation de troubles dépressifs ou d'efficacité d'action d'agents antidépresseurs : le test de suspension par la queue (figure 38), ou *Tail-Suspension Test (T.S.T.)* consiste à fixer



Tail Suspension Test

**Figure 38 : Modélisation du test de suspension par la queue**

L'animal est suspendu par la queue pendant 5 minutes et son comportement (mobile et immobile) est quantifié. (D'après Krishnan and Nestler, 2011).

*Suspension Test (T.S.T.)* consiste à fixer l'animal par la queue via un ruban adhésif (Sader®), tête en bas à 35cm du sol pendant 5 minutes (Steru et al., 1985). La queue est préalablement passée dans un cylindre de PVC afin d'empêcher l'animal de s'y agripper pour essayer de fuir par le haut de l'installation. Le temps passé à se débattre est comptabilisé pendant 5 minutes, ainsi que la latence d'immobilisation et l'ensemble du test est enregistré grâce à un logiciel de vidéo-tracking.

Ce test mesure donc le désespoir comportemental d'un animal face à une situation critique menaçant la survie, comme le N.F.P. Des données comparatives entre les deux tests ont permis de révéler qu'ils ne présentent pas la même sensibilité face à un traitement d'antidépresseurs, laissant suggérer que les supports neurobiologiques mise en place dans ces

tests présentent quelques disparités (Bai et al., 2001). Tout comme la FST, le TST présente une bonne validité prédictive.

### *Evaluation de l'anhédonie : consommation de saccharose*

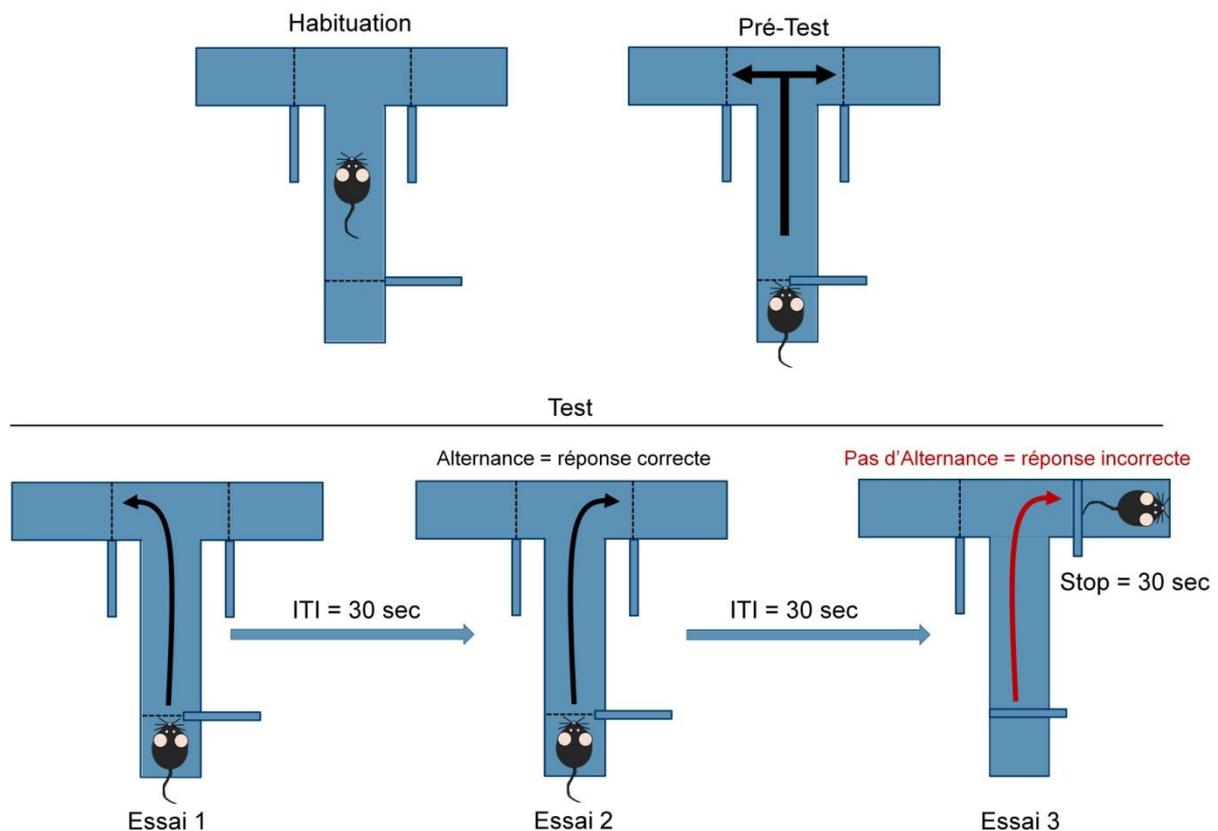
Chez l'Homme, l'anhédonie, ou absence de recherche de stimulus plaisant, est un des principaux déterminants de la dépression majeure (Willner et al., 1992b). En laboratoire, l'anhédonie est principalement évaluée par le biais d'un test de préférence au saccharose. Comme l'Homme, le rongeur tend à avoir une consommation préférentiellement tournée vers des produits ayant un goût sucré. L'anhédonie chez l'animal est mesurée afin de contrôler l'efficacité du protocole de stress chronique. L'animal est pré-exposé pendant 48h, à 2 biberons, l'un contenant une solution de saccharose à 1%, l'autre contenant uniquement de l'eau du robinet. L'emplacement des biberons est par la suite inversé afin d'éviter tous biais de latéralisation de la part de l'animal. 48h après la fin de la pré-exposition, 2 pipettes graduées sont placées aux emplacements occupés précédemment par les biberons. La solution de saccharose est préparée 24h à l'avance afin que la concentration soit stabilisée et que la température de la solution soit égale à la température ambiante. Il en est de même pour l'eau du robinet qui est maintenue à température ambiante avant d'être présentée aux animaux. Les animaux ont alors un accès libre aux 2 pipettes pendant 48h. Deux mesures des niveaux sont réalisées afin de quantifier la consommation de chaque solution. La première mesure est réalisée à 24h, à la suite de laquelle l'emplacement des pipettes est inversé afin de s'affranchir d'un effet de latéralisation puis une seconde mesure est réalisée à 48h, c'est-à-dire à la fin de l'expérience. Le pourcentage de préférence est alors calculé selon la formule suivante :

$$\text{Préférence Saccharose} = \frac{V(\text{Solution Saccharose})}{V(\text{Solution Saccharose})+V(\text{Solution Eau})} \times 100$$

Ce test présente une bonne validité prédictive car l'anhédonie est réversée par un traitement à long terme aux antidépresseurs, mais pas par un traitement aigu (Willner et al., 1987).

### 3. Evaluations Cognitives

#### *Mémoire de travail : alternance spontanée en T-Maze*



**Figure 39 : Représentation des différentes phases du protocole d'alternance dans le labyrinthe en T**

Pendant l'habituation, l'animal est libre d'explorer pendant 10 minutes, sur 2 jours consécutifs. Le troisième jour, l'entraînement permet de familiariser l'animal avec la tâche d'alternance et le système d'ouverture/fermeture des portes. Enfin, le quatrième jour, l'animal est maintenu 30 secondes dans le compartiment de départ, puis est laissé libre de choisir un des 2 bras avant d'être maintenu 30 secondes dans le compartiment d'arrivée avant un nouvel essai.

L'alternance spontanée en T-maze permet d'évaluer la mémoire de travail spatiale en s'affranchissant de la privation alimentaire chez l'animal (Lalonde et al., 1986). Ce test repose sur la tendance naturelle à alterner entre les explorations de différents sites, ce qui de fait, nécessite la mémorisation des lieux et actions réalisées au fur et à mesure des essais exploratoires. Dans un labyrinthe en T, ceci se traduit par une alternance entre les visites des bras gauche et droit. Le dispositif utilisé est un labyrinthe en forme de T en PVC, constitué d'une zone de départ à la base du T (14x10x20cm), d'un couloir (45x10x20cm) menant à 2 bras opposés (la barre du T) constituant les bras d'arrivée (29x10x20cm). Des portes coulissantes permettent de confiner l'animal afin de contrôler le départ de l'exploration et le temps d'exposition dans les bras visités. Le protocole utilisé (Beracochea and Jaffard, 1990)

se déroule en 3 phases (figure 39) : une phase d'habituation, une phase d'entraînement et une phase de test.

### Habituation

L'animal est laissé libre dans l'appareil pendant 10 minutes par jour, 2 jours consécutifs. Il est alors totalement libre d'explorer son environnement afin de se familiariser avec l'appareil et ainsi éviter toute réaction de néophobie lors de la phase d'évaluation.

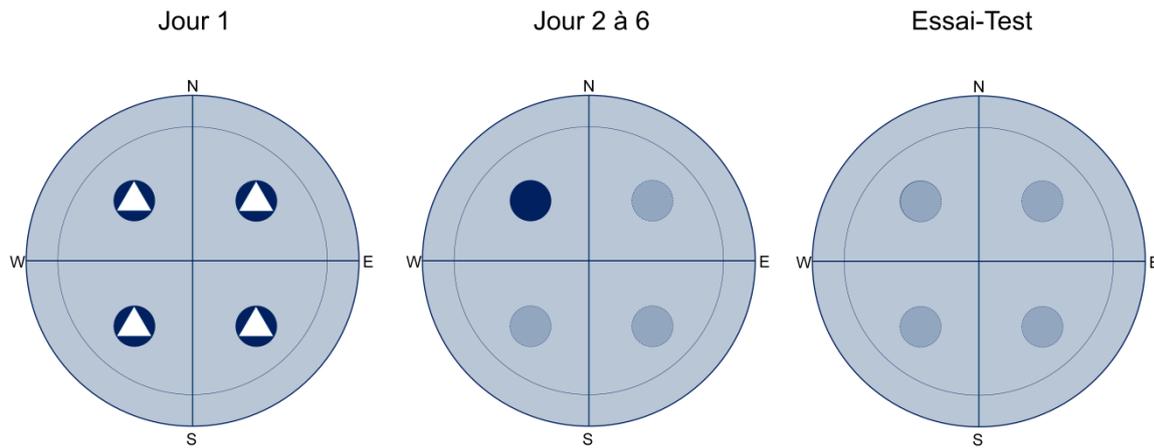
### Entraînement

Par la suite, il est soumis à une épreuve d'entraînement (pré-test), qui consiste à placer l'animal dans le compartiment de départ pendant 30 secondes entre chaque essai (intervalle inter-essai : ITI), ouvrir la porte, puis le laisser choisir entre le bras droit ou le bras gauche du T. Une fois le choix réalisé, la porte de chaque bras est fermée, et l'animal est maintenu dans ce bras pendant 30 secondes. Ceci constitue une séquence comportementale complète du protocole d'alternance spontanée (figure 43). La séquence précédente est répétée 7 fois afin que l'animal s'habitue à l'ouverture et la fermeture des portes. L'appareil est nettoyé à l'alcool 70° avant et après chaque passage afin d'éliminer les odeurs de congénères pouvant perturber la réalisation de la tâche.

### Test

Le jour du test, la séquence est répétée 8 fois. Sept essais sont réalisés avec un ITI de 30 sec comme dans la phase d'entraînement. Enfin, un 8<sup>ème</sup> et dernier essai est réalisé avec un ITI de 5 sec. Ceci a pour but de déterminer si un défaut d'alternance dans l'épreuve résulte d'un déficit d'attention, d'encodage et/ou de la motivation à alterner. Ainsi, les animaux qui n'alternent pas à cet essai sont retirés de l'analyse afin que le déficit potentiel soit sélectivement attribuable à un oubli lié au temps écoulé entre deux actions (déficit mnésique). La performance mnésique de l'animal est donc mesurée par le nombre d'alternances faites par l'animal au fil des 7 essais de la phase de test comprenant un ITI de 30 sec.

La répétition des essais entraînant une charge mnésique importante, l'animal doit être capable de limiter le stockage d'informations superflues afin d'avoir une alternance sans charge d'interférence. Cette capacité à mémoriser les choix fait précédemment est calculée par le pourcentage d'alternance globale sur la phase de test. Afin de s'affranchir d'éventuels biais expérimentaux liés à des troubles motivationnels, les animaux n'ayant pas alternés correctement au 8<sup>ème</sup> essai ont été retirés de l'analyse.

*Apprentissage en Piscine de Morris*

**Figure 40 : Schéma du protocole en piscine de Morris avec les zones virtuelles dessinées via le logiciel de tracking**

Les Zones NW, NE, SW et SE correspondent aux emplacements possibles de la plateforme le premier jour d'apprentissage avec l'indice (rond bleu et triangle blanc). Du jour 2 au jour 6, la plateforme est située dans la zone NW (en bleu foncé) sans indice pour l'apprentissage spatial. Pour le probe-test, aucune plateforme n'est présente dans la piscine. La bande circulaire périphérique délimite la zone de thigmotaxie (comportement au cours duquel l'animal anxieux n'explore pas son environnement mais se cantonne à la périphérie).

Ce test permet d'évaluer les capacités d'apprentissage chez la souris grâce à une piscine de Morris (Morris, 1984). Poussé par l'aversion causée par l'eau, l'animal doit trouver et monter le plus rapidement possible sur la plateforme pour assurer sa survie. Le test utilisé est constitué de 2 phases permettant respectivement d'évaluer la capacité d'acquérir une association simple et la capacité d'acquérir une carte spatiale de l'environnement. L'apprentissage réalisé lors de la première phase est dépendant du striatum alors que celui de la deuxième dépend de l'HPC (Martel et al., 2007). Le dispositif utilisé est un bassin circulaire de 1,5m de diamètre dont l'eau est teintée en blanc afin que le logiciel de tracking (logiciel ViewPoint<sup>®</sup>, France) puisse suivre le parcours de la souris. La surface de l'eau est artificiellement divisée en quadrants, avec au centre d'une de ces quatre zones une plateforme circulaire de 13cm de diamètre invisible pour l'animal (positionnée 1cm sous la surface). Des signaux spatiaux (affiches, meubles, etc.) autour de la piscine permettent à la souris d'apprendre à se repérer. L'expérience s'étale sur 6 jours (figure 40), à raison de 6 essais par jour. Chaque essai dure au maximum 90 secondes. Si au terme de délai, l'animal n'a pas rejoint la plateforme, celui-ci est gentiment guidé à la main jusqu'à la plateforme. A la suite de chaque essai, l'animal reste 20 secondes sur la plateforme avant d'être séché et maintenu dans une enceinte chauffée à 32°C jusqu'au prochain essai. L'ITI est d'environ 10-15 minutes afin de permettre aux animaux d'avoir un temps de repos suffisant pour récupérer de l'effort

fourni. La vitesse de l'animal, le temps passé et la distance totale parcourue dans l'eau sont mesurés.

#### Apprentissage associatif simple (stimulus-réponse)

L'apprentissage est réalisé grâce à un indice positionné sur la plateforme. Il s'agit d'un cylindre en polystyrène blanc de 5cm de diamètre et 10cm de hauteur tacheté de points noirs, monté sur une tige en métal noir de 7cm. A chaque essai, la plateforme ainsi signalée est changée de cadran de manière aléatoire de sorte que la position spatiale de la plateforme ne puisse guider l'animal. Le point de départ est également changé de sorte que ni l'orientation ni sa distance de la plateforme relativement au point de départ ne puisse guider l'animal. Ainsi, seule l'association de l'indice à la réponse de monter sur la plateforme permet à l'animal de pouvoir réaliser l'épreuve.

#### Apprentissage spatial (association stimulus-stimulus)

Les 5 jours suivants, la plateforme est positionnée dans le cadran NW, (sans indice) et l'animal doit alors utiliser les indices distaux de la pièce pour retrouver la plateforme. Le point de départ varie d'un essai à un autre. Ainsi seule une représentation (carte cognitive) de la position spatiale de la plateforme dans l'environnement permet de guider l'animal pour pouvoir se réfugier rapidement.

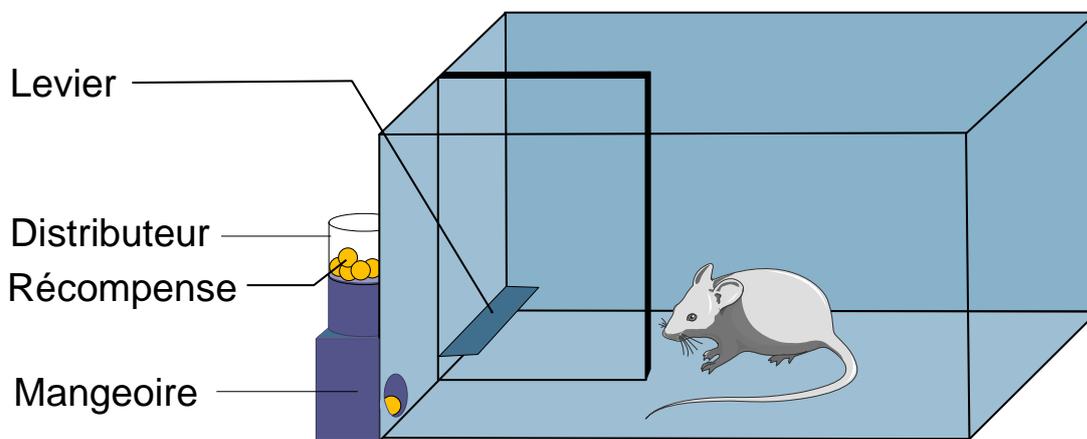
#### Rappel

Enfin, 1h après le dernier essai du dernier jour, une tâche de rappel qui permet de vérifier la précision de la carte spatiale acquise par l'animal et la persévérance de celui-ci à chercher la plateforme à l'emplacement correct est réalisée. Pour cela, la plateforme est retirée et l'animal est placé au centre de la piscine pour un essai-test de 90sec. Le temps passé dans le cadran ainsi que le nombre de croisements de la zone où la plateforme était positionnée sont mesurés.

#### *Conditionnement Opérant*

Le conditionnement opérant est un apprentissage qui consiste à associer un appui sur un levier à l'obtention d'une récompense basée sur la capacité des animaux à associer leurs actions et leurs conséquences. Dans un premier temps, il s'agit d'un apprentissage dirigé vers un but impliquant une représentation de la récompense. Cette phase implique alors le PFC (Naneix et al., 2009). Par contre, rapidement, lorsque l'association est acquise, l'action devient une habitude qui s'exécute de manière automatique, sous la dépendance du striatum, indépendamment de la représentation du but (Yin et al., 2005).

Afin de créer une motivation chez l'animal, ces derniers sont soumis à une privation alimentaire les menant à une perte de poids à hauteur de 18% en 2 jours. Pendant la privation, les animaux sont pré-exposés à une pincée de graine de millet (Priméal Bio, France) qui constituera leur récompense dans la tâche de conditionnement opérant. L'appareil est une boîte compartimentée de 14x15x20cm (figure 41) divisée par une cloison partielle (6cm) séparant un compartiment comprenant une mangeoire d'un compartiment adjacent comprenant un levier commandant la distribution de récompenses dans la mangeoire. Des cellules photosensibles permettent de détecter l'activité de l'animal à proximité du levier, de la mangeoire et la consommation des graines. L'appareil est nettoyé à l'alcool 70° avant et après chaque passage afin d'éliminer les odeurs de congénères pouvant perturber la réalisation de la tâche.



**Figure 41 : Schéma de l'appareil de conditionnement opérant**

L'appareil se compose d'une boîte rectangulaire dans laquelle se trouve un levier activant la distribution d'une récompense dans la mangeoire. Le levier et la mangeoire sont séparés par une paroi opaque obligeant l'animal à faire le tour entre l'appui sur le levier et la récupération de la récompense.

Le protocole utilisé est celui initialement décrit par Destrade et Cardo (Destrade and Cardo, 1974; Jaffard et al., 1974) comprenant une séance d'acquisition partielle et une séance de rétention de 45 minutes, 24h après.

### Acquisition

Le premier jour, les animaux sont placés dans la boîte et ont la possibilité d'obtenir 15 graines en appuyant sur le levier. Un appui permet de délivrer une seule graine de millet. La commande du levier devient inactive tant que l'animal n'a pas consommé la graine distribuée. Ainsi, l'animal doit alterner entre le compartiment levier et le compartiment mangeoire pour

appuyer et consommer. Le temps mis pour réaliser cette tâche est un indicateur de l'acquisition de l'association levier-nourriture et de la procédure motrice acquise.

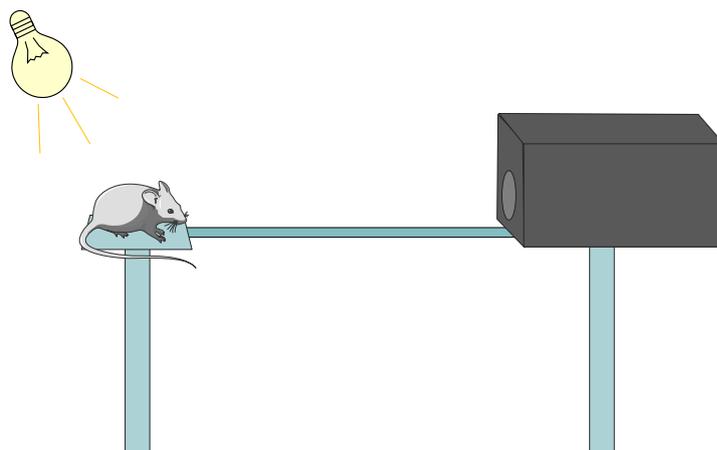
### Rétention

Le deuxième jour, les animaux sont replacés dans la boîte et disposent de 45 minutes pour exprimer la réponse opérante acquise afin de consommer un maximum de graine. Le nombre d'appuis renforcés (consommations) réalisés est comptabilisé pour évaluer la maîtrise de la tâche. D'autres paramètres comme le nombre d'appuis superflus (autres que ceux strictement nécessaires) ou le nombre d'alternances superflues ainsi que l'activité globale de l'animal dans la boîte sont également comptabilisés afin d'affiner l'analyse des résultats.

## 4. Activité locomotrice

### *Beam Walking test*

Durant le Beam Walking Test (BWT), les animaux sont placés à l'extrémité d'une barre de 1m de long, à 80cm au dessus du sol (figure 42). La plateforme de départ est étroite



**Figure 42 : Schéma de l'appareil du Beam Walking test.**

L'animal est placé sur une plateforme éclairée, reliée à une boîte sombre, accessible par une barre de taille et de section variable

(3x4cm) et exposée à une lumière intense (120 lux) pour encourager l'animal à traverser la barre jusqu'à la deuxième plateforme composée d'une boîte noire. Le temps pour traverser la barre et le nombre d'hésitations (arrêt ou ralentissement) sont enregistrés et quantifiés par un système de vidéotracking. Les animaux suivent une habitude pendant 3 jours, à raison de 3 essais par jour, avec des barres de sections de différentes

tailles, augmentant la difficulté de la tâche : carrée de 10 mm, ronde de 15mm et carré de 8mm. Une pause est permise à l'animal si ce dernier tombe de la barre ou s'il ne traverse pas dans les 2 minutes suivant le début de l'exercice. Le jour suivant la troisième habitude, les animaux sont testés sur les 3 barres présentées pendant l'habitude, ainsi que sur une barre supplémentaire ronde de 10mm. La phase de test consiste alors à passer chaque animal 2 fois sur chaque barre.

## Microdialyse Intrahippocampique

### 1. Chirurgie Stéréotaxique

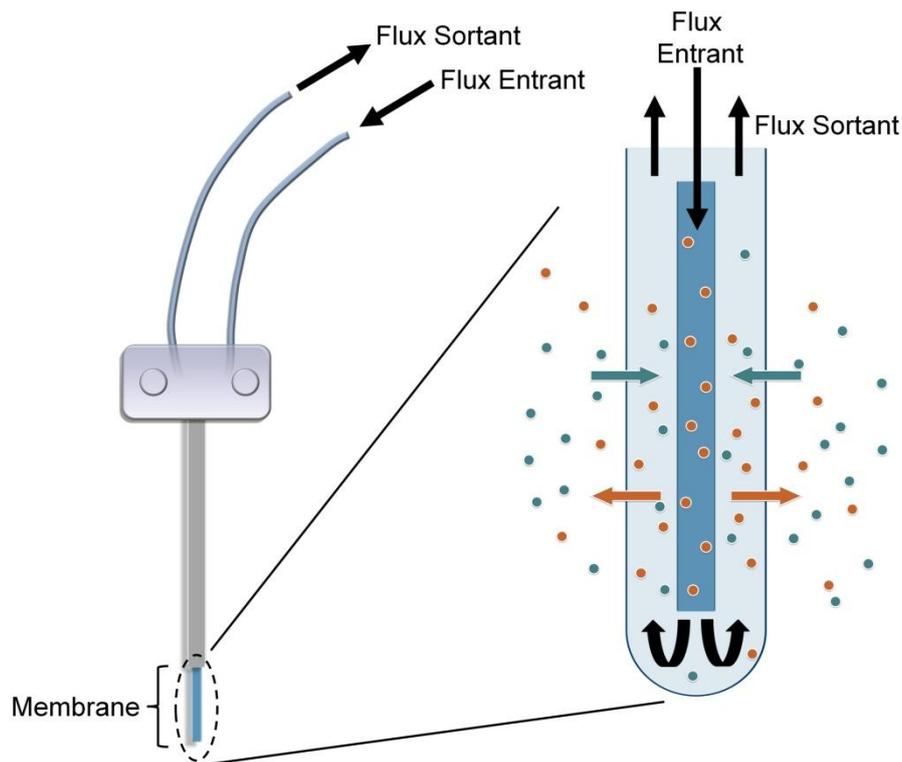
Les animaux sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine (100mg/kg, Virbac, France) et xylazine (6mg/kg, Rompun Bayer, Allemagne). L'animal est par la suite placé et maintenu sur un cadre stéréotaxique. Le dessus du crâne de l'animal est alors tondu, et une solution de Lidocaïne (Xylocaïne) est appliquée localement avant que le crâne de l'animal ne soit incisé. Des guides-sondes (CMA/7 ; CMA Microdialysis) pour la microdialyse sont implantés unilatéralement à partir du bregma selon l'atlas de Paxinos et Franklin (2004). L'implantation est faite à l'aplomb de l'HPC à droite ou à gauche (défini aléatoirement) selon les coordonnées AP : -2,2mm ; L :  $\pm 1,35$ mm ; V : 1mm de sorte que la sonde dépasse du guide d'1mm et baigne l'HPC dorsal. Le guide-sonde est ensuite maintenu par du ciment dentaire (PalavitG, Promodentaire) et tenu par 3 vis (inox ; pied de vis :  $\varnothing = 0,5$ mm ; longueur = 1mm ; FOM2000) insérées dans le crâne.

Pour l'étude comportementale, des guides-canules (L 8mm,  $\varnothing$  250microns) sont implantés selon la même procédure. Suite à la chirurgie, deux sutures sont réalisées à l'avant et à l'arrière de l'orifice créé par le montage. Les animaux reçoivent également une injection sous cutanée d'antalgique (6mg/kg, Carprieve) et sont placés près d'une source de chaleur jusqu'à leur réveil. Ils bénéficient par la suite d'une période de récupération de 8 jours pendant laquelle ils sont contrôlés quotidiennement afin de vérifier leur bon rétablissement.

### 2. Microdialyse intra-hippocampique chez la souris vigile

La microdialyse intracérébrale permet le prélèvement de molécules de petite taille (<7kD) présentes dans le LCR composant le milieu extracellulaire cérébral afin d'être quantifiées (figure 43). Ce prélèvement repose sur le principe de la diffusion passive de molécules au travers d'une membrane poreuse en fonction de leurs gradients de concentration et de leurs poids moléculaires. Chez la souris, la corticostérone cérébrale peut être ainsi prélevée et dosée avec une résolution temporelle de 15 minutes. La sonde de microdialyse (CMA7, CMA Microdialysis AB, Suède, cut-off 7kDa) est constituée d'un cathéter d'entrée dans lequel est injecté à débit constant du LCR artificiel (solution tampon phosphate Dulbecco, Sigma France), qui aboutit à une membrane semi-perméable (diamètre externe :

0,24mm) où s'effectue la diffusion du milieu le plus concentré (cérébrale) vers le milieu le moins concentré (l'intérieur de la sonde). Ce dialysat chargé de corticostérone hippocampique ressort de la sonde par le cathéter de sortie pour être récolté dans des tubes eppendorf® dans un carrousel collecteur automatique réfrigéré à 4°C pour une meilleure conservation des échantillons. Des échantillons de volume constant peuvent être régulièrement prélevés tout au long de l'expérience grâce à la rotation automatique du carrousel.



**Figure 43 : Schématisation du fonctionnement de la microdialyse / microdialyse inverse**

Le flux entrant, chargé en molécules pharmacologiques injectables (Rond orange), diffuse avec le milieu extracellulaire par osmolarité. La molécule pharmacologique passe ainsi dans le milieu extracellulaire (Flèches orange). Au contraire, les molécules du milieu extracellulaire (Ronds vert) diffusent à l'intérieur de la sonde et sont ainsi collectées (Flèches verte).

L'expérience a lieu dans une enceinte circulaire, en Plexiglas, d'un diamètre de 40cm et d'une hauteur de 36cm (CMA/120 ; CMA Microdialysis). La base des enceintes (Ø 20cm) est équipée d'un plancher métallique connecté à un générateur de chocs électriques permettant de générer un stress aigu chez l'animal.

### 3. Traitement pharmacologique

Les traitements appliqués dans l'expérience de microdialyse (chapitre III) sont effectués par microdialyse inverse. L'HPC est perfusé avec du LCR artificiel contenant ou non un agoniste SSTergique. Les composés SSTergiques (tableau 5) sont préparés à la concentration de 5nmol/15µl, dose choisie sur la base des effets anxiolytiques préalablement observés avec des agonistes *sst<sub>2</sub>* (Engin and Treit, 2009; Gastambide et al., 2010). Ils sont solubilisés dans du LCR de synthèse (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, composition en g/L: CaCl<sub>2</sub>, 0,133; MgCl<sub>2</sub>, 0,1; KCl, 0,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2; NaCl 8,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,15; pH entre 7,1-7,5 ; SIGMA Aldrich, UK) contenant 10% de Diméthyle Sulfoxyde (DMSO). Des aliquots sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Les traitements appliqués dans l'étude de pharmacologie comportementale sont effectués par l'introduction d'une canule d'injection reliée par un cathéter à une seringue Hamilton de 1µl et montée sur un perfuseur permettant de délivrer 0,5µl/5min. Les agonistes sont préparés à la concentration de 5nmol/0,5µl et solubilisés dans du LCR contenant 50% de DMSO.

**Tableau 5 : Analogues et agonistes somatostatinerigiques utilisés**

Produit	Agoniste / Sélectivité	Poids Moléculaire	Fournisseur
SMS 201-995 Octréotide	Sst 2,3,5	1019,24	TOCRIS, FRANCE
RC160 Vapréotide	SST analogue	1131,37	TOCRIS, FRANCE
L-797,591	sst1	607,82	RAHWAY, NJ, USA
L-054,064	sst2	539,71	TOCRIS, FRANCE
L-796,778	sst3	585,7	RAHWAY, NJ, USA
L-803,087	sst4	599,56	TOCRIS, FRANCE

## Immunohistochimie et Biologie Moléculaire

### 1. Prélèvements de sang et de tissus



**Figure 44 : Schéma de prélèvement sous mandibulaire chez la souris vigile**

Les vaisseaux sanguins sont indiqués en bleu. La zone de prélèvement correspond au point rouge.

<https://www.usherbrooke.ca/medecine/fileadmin/sites/medecine/documents/Animalerie/Formation-pratique.pdf>

Les prélèvements de sang ont été réalisés selon 2 techniques différentes en fonctions du stade de l'expérimentation. Lors des prélèvements réalisés en cours d'expérimentation, le sang a été prélevé sur animal vigile au niveau de la veine sous-mandibulaire (figure 44). L'animal est tenu par une contention serrée qui permet de piquer à l'aide d'une aiguille, la veine sous mandibulaire pour récupérer 3 à 4 gouttes de sang (environ 400µl). En fin d'expérimentation, le sang a été prélevé au moment du sacrifice des animaux par décapitation. Dans les 2 cas, le sang est collecté dans un tube préalablement hépariné à 10% (EDTA tétrasodium, Fluka Sigma Aldrich, France). Les

échantillons recueillis ont été immédiatement réfrigérés à +4°C puis centrifugés à 3500rpm (1800G) pendant 10 min à +4°C, et le surnageant a ensuite été stocké à -80°C jusqu'au dosage de la concentration de corticostérone.

Pour les prélèvements de tissus cérébraux, les animaux sont anesthésiés avec 0,5ml de penthobarbital sodique (Ceva, France) et immédiatement décapités afin de prélever leur sang et leur cerveau. Le cerveau est prélevé sur glace réfrigérée à l'azote liquide. Une moitié de l'encéphale, coupée dans un axe antéropostérieur, est immédiatement conservée dans un bain d'isopentane (2-methylbutane, Fluka, Sigma Aldrich, France) et réservée au congélateur à -80°C pendant 45 minutes. Après 45 minutes, l'isopentane est retiré et le demi-cerveau ainsi congelé est maintenu au congélateur à -80°C jusqu'à de futures analyses.

L'autre moitié de l'encéphale est disséquée afin d'extraire différentes structures (cortex frontal, cortex occipital, HPCs dorsal et ventral, striatum et bulbes olfactifs) qui pourront être analysées *a posteriori*. Les structures sont identifiées et immédiatement congelées par un bain d'azote liquide avant d'être maintenues à -80°C jusqu'à analyse.

## 2. Contrôles histologiques



**Figure 45 : Implantation unilatérale d'une sonde de microdialyse dans le CA1**

Coupe coronale de cerveau de souris de 60µm colorée à la thionine.

A l'issue des études de microdialyse, les animaux ont été sacrifiés par une injection de 0,5ml de pentobarbital sodique et ont été immédiatement décapités. Les têtes ont été placées dans une solution de formol (10%) pendant 15 jours, puis disséquées afin de prélever le cerveau fixé. Les cerveaux ont ensuite été post-fixés dans une solution cryo-protectrice contenant 10 % de formol et 30% de saccharose pendant 48h puis coupés au microtome à congélation afin d'obtenir des coupes de 60µm colorées à la

thionine puis montées entre lames et lamelles. Enfin, elles ont été visualisées au microscope optique afin d'identifier le site d'implantation. Seuls les animaux dont les cerveaux présentaient une implantation correcte dans l'HPC telle que présentée dans la figure 45 ont été considérés pour les analyses statistiques.

## 3. Immunohistochimie

### a. Préparation des coupes de cerveau au Cryostat

Les demi-cerveaux prélevés et conservés à -80°C sont sortis du congélateur et stabulés dans l'enceinte du cryostat à -30°C pendant 30 minutes. Après fixation sur la platine par application de Tissu-Tek® (Sakura, Pays-Bas), les cerveaux sont coupés selon l'axe sagittal à une épaisseur de 14µm. Les coupes ainsi réalisées sont montées immédiatement sur lame avant d'être conservées à -80°C jusqu'à la réalisation d'une expérience de marquage immunohistochimique.

### b. Immunohistochimie

Les lames conservées à -80°C sont sorties à température ambiante 30 minutes avant le début du protocole de marquage. Les lames sont alors placées dans une cuve permettant de réaliser les différents bains nécessaires au protocole de marquage. Les coupes sont exposées à

un bain de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes à 4°C afin de réaliser une fixation des tissus. Elles sont ensuite rincées au tampon Tris (TB : 0.1M, pH 7.4) puis traitées avec une solution de TBS (TB 0.1M + 9g/l de NaCl) contenant 1% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 10% de méthanol afin d'inhiber les peroxydases endogènes et perméabiliser les cellules. Les sites non-spécifiques sont bloqués grâce à une solution de saturation (0,05% Tween 20 et 8% sérum normal de chèvre dans du TBS 0,1 M) incubée 1h à 4°C. Les lames sont ensuite mises en contact avec l'anticorps primaire (tableau 6), dilué dans la solution de saturation pendant 18h à température ambiante. Le lendemain, les lames sont incubées en présence de l'anticorps secondaire au 1/2000 avant d'être incubées avec le complexe Avidine-Biotine (1/400 dans du TBS 0.1M, Vectastatin Elite Kit, Vector Laboratories). Suite à cette dernière incubation, les lames sont exposées à un bain de TB 0.1M contenant de la diaminobenzidine (0.05%) peroxydée et 0.02% d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permettant ainsi la révélation de l'activité peroxydasique. La révélation est ensuite arrêtée par plusieurs bains au TB 0.1M avant de laisser les lames séchées sous aspiration pendant 24h. Les coupes sont ensuite déshydratées par deux bains de toluène avant d'être incluses entre lame et lamelle par une résine (Eukitt®).

**Tableau 6 : Anticorps utilisés dans l'étude des modifications épigénétiques**

<b>Anticorps</b>	<b>Espèce</b>	<b>Dilution</b>	<b>Fournisseur</b>
Ac Primaire-H3K27me3 polyclonal	Lapin	1/1500	Millipore
Ac Secondaire – Anti lapin biotinylé	Chèvre	1/2000	Jackson ImmunoResearch

c. Comptage de noyaux immuno-positifs

La quantification des noyaux marqués positivement se fait à l'aveugle via un système d'analyse d'images couplé à un microscope sous un grossissement X10 (Biocom Visiolab 2000, V4.50). Les noyaux immunopositifs de chaque structure ainsi observées sont quantifiés selon 6 à 8 répliques, moyennés avant d'être analysés. Les données obtenues sont exprimées en nombre de noyaux immunopositifs par mm<sup>2</sup>. Les noyaux immunopositifs dans différentes régions cérébrales tel l'HPC dorsal et ventral, l'amygdale et le cortex préfrontal, pour leur implication dans les troubles associés au stress chronique ainsi que dans le striatum.

#### 4. Quantification de la corticostérone par ELISA

Le dosage de la corticostérone présente dans les échantillons de microdialyse et dans les prélèvements plasmatiques est réalisé par ELISA (KitArbor Assay®) dont le principe est une réaction immunologique permettant de révéler la présence d'une protéine particulière. L'anticorps est couplé à une enzyme qui, en présence du substrat, produit un composé coloré dont la densité optique est mesurée. Les échantillons et une gamme standard de concentration connue de corticostérone sont déposés sur une plaque de 96 puits et la réaction est initiée par l'ajout du réactif puis stoppée après 30 minutes d'incubation par une solution stop. Les mesures de densités optiques se font par un lecteur de plaques (VICTOR®, Perkin-Elmer) à la longueur d'onde de 450nm, qui calcule la concentration en corticostérone des échantillons relativement à la gamme standard. La sensibilité du test est déterminée à 18,6pg/ml avec une limite de détection à 16,9pg/ml.

## Analyses Statistiques

Afin d'évaluer les variations des paramètres étudiés dans les différents tests, un z-score a été calculé selon la formule suivante :

$$z = \frac{\text{Valeur Observée} - \text{Moyenne du groupe référent}}{\text{Déviation Standard du groupe référent}}$$

Il permet en effet de quantifier les variations sur les paramètres étudiés par rapport à la moyenne et à la déviation standard d'un groupe référent. Un facteur -1 est appliqué lorsque le sens de variation du paramètre varie de manière opposé à l'amplitude du symptôme qu'il mesure. Ces z-scores ont par la suite été globalisés par catégories de troubles d'après la méthode employée par Guilloux et al., (2011), à savoir les troubles de type anxieux, les troubles de type dépressif, les troubles somatiques, les troubles cognitifs et l'anhédonie. Cette globalisation en catégorie a permis l'analyse de corrélations entre les troubles, afin d'établir les relations existantes dans l'émergence de troubles par un protocole de SCLI. Cependant, les z-scores ne disposent pas de bornes dans leur répartition ce qui peut donner artificiellement un poids important à certains paramètres lorsque le groupe référent présente une déviation standard faible. Afin de permettre une représentation bornée des troubles étudiés, nous avons utilisé une normalisation par une méthode de « feature rescaling » conduisant à l'obtention d'un index d'amplitude des troubles variant entre 0 et 1. Afin d'améliorer les représentations

graphiques de ces index, nous avons appliqué un coefficient de 4, augmentant ainsi l'échelle de répartition. Ainsi, 2 formules ont été employées afin d'obtenir cet index, en fonction du sens de variation du paramètre indexé :

Si le paramètre augmentant témoigne d'une augmentation de l'atteinte :

$$Index = \frac{\text{Valeur observée} - \min(\text{échantillon})}{(\max(\text{échantillon}) - (\min(\text{échantillon})))} \times 4$$

Si le paramètre augmentant témoigne d'une diminution de l'atteinte :

$$Index = \left( 1 - \frac{\text{Valeur observée} - \min(\text{échantillon})}{(\max(\text{échantillon}) - (\min(\text{échantillon})))} \right) \times 4$$

Cet index a ainsi permis de redistribuer l'ensemble des valeurs brutes intrinsèques à chaque paramètre de chaque test sur une échelle de 0 à 4. Les index de chaque paramètre ont par la suite pu être moyennés par catégorie de troubles (anxieux, dépressif ...) afin de comparer les impacts du stress et du vieillissement entre ces catégories.

L'ensemble des données (valeurs brutes, index et *z*-score) a été analysé via un logiciel d'analyses statistiques (StatView®) par des ANOVAs ayant pour facteurs *l'âge au moment du SCLI* et la condition de *SCLI*. Lorsque des effets montrent une significativité globale ( $p < 0.05$ ), l'analyse est affinée par des tests *post-hoc* (test F de Sheffe) afin d'identifier l'origine de la significativité. Pour certains tests, nous avons également utilisé un test *t* de Student pour comparer les performances moyennes par rapport au hasard.

Les significativités présentées dans les résultats de ce manuscrit sont établie à  $p < 0.05$  avec des notifications graphiques distinctes en fonction des paramètres comparés : Effet du SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; Effet de l'âge : \$ $p < 0.05$  ; \$\$ $p < 0.01$  ; \$\$\$ $p < 0.001$ , et effet du génotype : # $p < 0.05$  ; ## $p < 0.01$  ; ### $p < 0.001$ .





## RESULTATS EXPERIMENTAUX

---



**Chapitre I : L'émergence des troubles  
associés au stress chronique est dépendante  
de l'âge du sujet**



## Introduction

Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, la réponse de stress de l'organisme a principalement une visée adaptative (Selye, 1973) et permet de faire face aux menaces. L'activation de l'axe HPA entraîne alors la libération de GC qui exercent alors de nombreuses fonctions aux niveaux périphérique et central afin de mobiliser les ressources nécessaires pour retourner à un équilibre homéostatique. Ce phénomène est particulièrement vrai lors d'un stress aigu, ponctuel. Cependant, le stress, s'il est répété, peut mener à l'épuisement de l'organisme et par la suite à l'émergence de diverses pathologies comme des troubles anxio-dépressifs (Katz et al., 1981).

Depuis de nombreuses années, les travaux sur le stress chronique ont permis de mettre en évidence la prévalence de troubles, principalement dépressifs, chez le rongeur. Ces troubles ont été mis en avant chez certains modèles, avec des variantes en fonction de la souche utilisée (Gilad et al., 1993; Pothion et al., 2004). De plus, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact du stress chronique à différentes époques de la vie : période néonatale (Sternberg and Ridgway, 2003; Toth et al., 2008a), adolescence (Sterlemann et al., 2008; Bourke and Neigh, 2011) âge adulte ou période âgée en comparant entre certaines de ces tranches d'âges (Toth et al., 2008b). L'indentification de structures cérébrales sensibles, comme l'amygdale ou l'HPC, dans les troubles de l'anxiété et la dépression a progressivement poussé la communauté scientifique à s'intéresser aux périodes critiques de développement et de dégénérescence de ces structures (figure 46; Lupien et al., 2009). De plus en plus d'auteurs s'intéressent au stress chronique et à son impact sur le développement des individus à des âges très jeunes (Liu et al., 1997; Meaney, 2001) ou bien, à son impact sur le vieillissement chez des sujets âgés (Landfield et al., 1981; Landfield et al., 2007). Ainsi, l'étude du stress chronique chez l'adulte a progressivement été délaissée ou alors cantonnée à des classes d'âge adulte relativement jeunes (Zisook et al., 2007). Ceci a très certainement été amplifié par les études montrant que le rat adulte exposé à un stress chronique serait, partiellement voire totalement résilient trois semaines après l'arrêt du stress, tant sur le plan symptomatologique que sur le plan neurobiologique (Taliaz et al., 2011; McEwen and Morrison, 2013).



gradient d'âge adulte. Nous avons utilisé 5 tranches d'âges adultes successives situées entre 4 et 14 mois et analysé les troubles somatiques, les troubles hédoniques, les troubles de type dépressifs, les troubles de type anxieux et les troubles cognitifs ainsi que les dérégulations de l'axe HPA en sortie de protocole de stress chronique. **Ces travaux sont les premiers à utiliser une telle chronologie permettant la comparaison directe de la sensibilité au stress chronique chez la souris adulte.** Nous avons également testés des animaux âgés de 18-20 mois afin de déterminer l'impact d'un stress chronique chez le sujet âgé et de comparer le profil comportemental d'animaux âgés avec ceux d'animaux adultes.

## Méthodologie

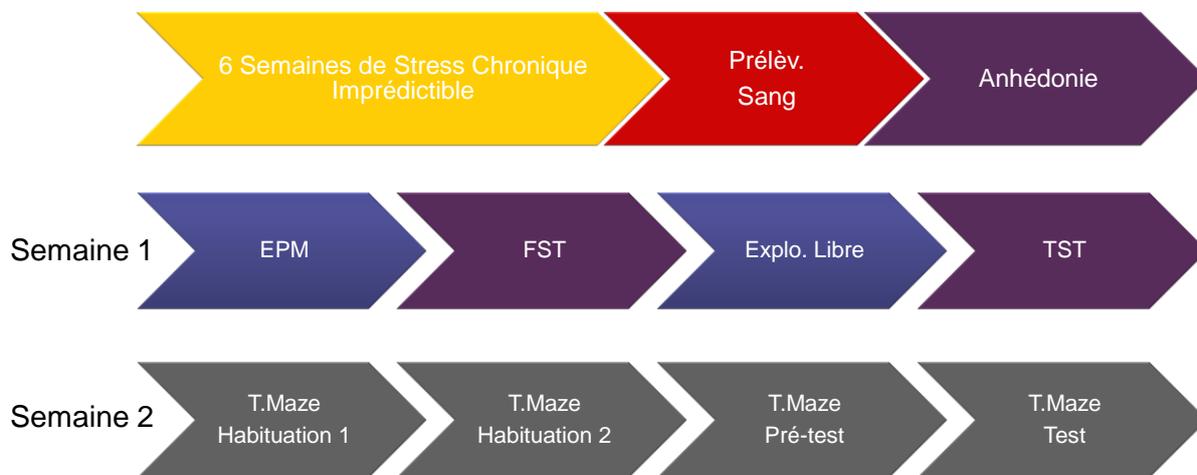
L'ensemble de l'étude a été réalisé sur des souris C57BL/6 provenant du même lot divisé en 6 classes d'âge dont les détails sont donnés dans le tableau 7. L'âge présenté est celui des animaux entre le début du protocole de stress chronique léger imprédictible (SCLI) et la fin des études comportementales, correspondant à 2 mois complets (6 semaines de SCLI + 2 semaines d'évaluations).

**Tableau 7 : Répartition des animaux dans les groupes expérimentaux**

Age	4-6 mois		6-8 mois		8-10 mois		10-12 mois		12-14 mois		18-20 mois	
Condition	Ctrl	SCLI	Ctrl	SCLI	Ctrl	SCLI	Ctrl	SCLI	Ctrl	SCLI	Ctrl	SCLI
Nombre	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10	16	7

Chaque classe d'âge a été divisée en 2 conditions, une condition *contrôle* (Ctrl dans le tableau) et une condition *SCLI* (stressée par le protocole de SCLI). Les animaux du groupe *contrôle* ont été groupés par cages de 5 individus, stabulés et élevés dans les conditions standard de l'animalerie. Afin d'identifier chaque animal, un marquage auriculaire a été réalisé à l'aide d'un poinçon. Les animaux du groupe *SCLI* ont été placés en cage individuelle et stabulés dans une pièce isolée afin que le stress généré ne puisse interférer avec les conditions d'élevage des animaux du groupe *contrôle*. Les animaux *SCLI* de chaque classe d'âge ont alors suivi le protocole de stress chronique pendant 6 semaines tandis que leurs homologues *contrôles* sont restés en stabulation à l'animalerie. Durant le protocole, les animaux ont été hebdomadairement pesés et leur pelage a été évalué selon les critères décrits

dans le « Matériel et Méthodes » de ce manuscrit. La figure 47 précise la chronologie des tests qui ont eu lieu après la fin du protocole de SCLI, pour toutes les classes d'âge.



**Figure 47 : Chronologie expérimentale du SCLI et des évaluations réalisées**

Les prélèvements de sang destinés aux dosages de la CORT ont été réalisés le jour suivant la fin du protocole de SCLI, entre 8h et 10h. Le test d'anhédonie a ensuite été réalisé sur 48h puis les animaux ont été successivement évalués à raison d'un test comportemental par jour dans l'ordre suivant : EPM : Elevated Plus Maze ; FST : Forced swim test ; Exploration libre ; TST : Tail Suspension et T-maze.

L'ensemble des paramètres mesurés sont résumés dans le Tableau 8. Afin de réaliser des analyses de corrélations entre les différents symptômes étudiés, les paramètres présentés ci-dessous ont été normalisés selon le calcul d'un  $z$ -score. Ceci permet d'identifier la variation d'un paramètre par rapport à un groupe référent (ici les animaux contrôles de 6 mois). Enfin, pour permettre une représentation bornée des différents symptômes engendrés par le stress chronique, un index d'amplitude allant de 0 à 4 (dont le détail est donné dans la partie « Matériels et Méthodes » de ce manuscrit) a été calculé.

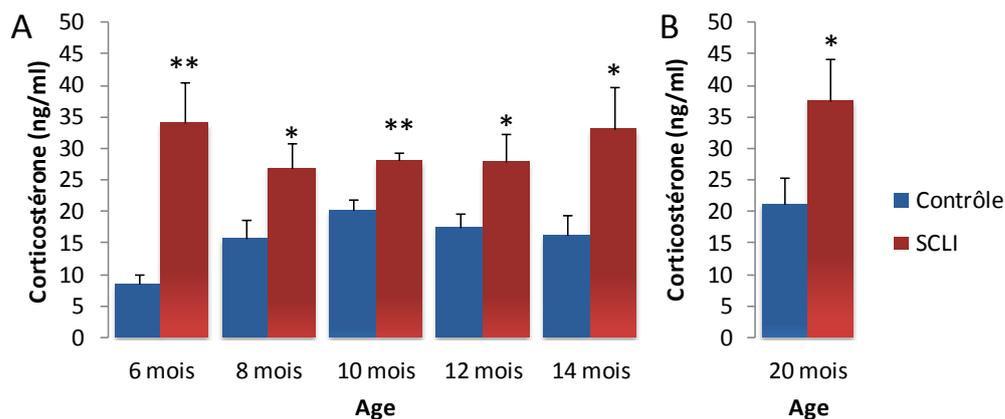
Tableau 8 : Paramètres mesurés dans chacun des tests réalisés

Catégorie de Troubles	Test	Paramètres
<b>Troubles Somatiques</b>	Etat du pelage	Score des 7 parties du corps en semaine 7
<b>Troubles Dépressifs</b>	FST	Latence d'immobilisation
		Immobilité (%)
	TST	Latence d'immobilisation
		Immobilité (%)
<b>Troubles Anxieux</b>	EPM	Temps dans les bras ouverts (%)
		Entrées dans les bras ouverts (%)
	Exploration Libre	Latence de 1 <sup>ier</sup> redressement
		Nombre total de redressements
<b>Troubles Cognitifs</b>	T-Maze	Alternance globale
<b>Anhédonie</b>	Préférence au Sucre	Préférence au sucre (%)

## Résultats expérimentaux

### 1. Effets du SCLI à différents âges adultes et chez le sujet âgé.

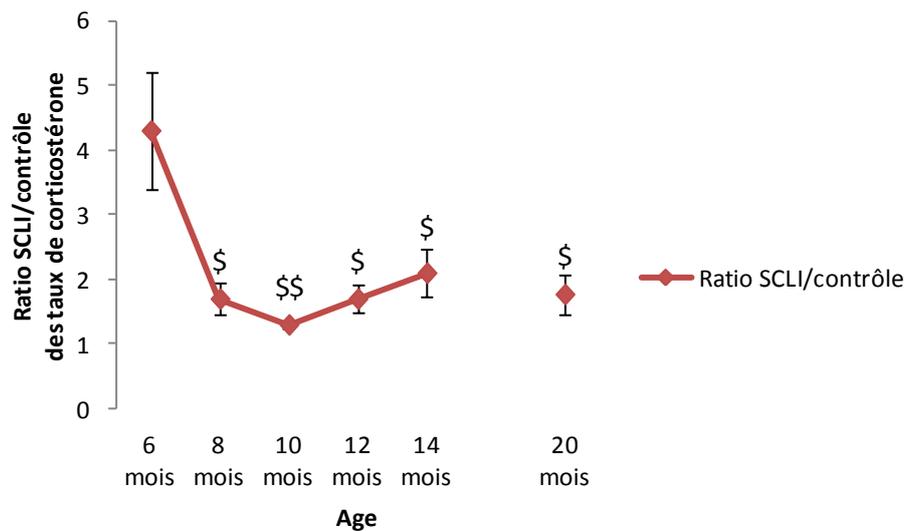
#### a. Taux de corticostérone plasmatiques



**Figure 48 : Concentration basale de corticostérone plasmatique en fonction de l'âge des animaux et de leur condition de SCLI**

La concentration en CORT en ng/ml est obtenue à partir de prélèvements sanguin sous-mandibulaires sur animal vigile chez des animaux adultes (A) et âgés (B). Le SCLI entraîne une élévation des taux de CORT chez toutes les classes d'âge évaluées ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$

Les dosages de CORT réalisés au terme du SCLI chez les sujets adultes (figure 48A) ont permis de mettre en évidence une élévation significative de la concentration plasmatique (ANOVA, effet SCLI :  $F_{(1;88)}=33,096$  ;  $p < 0,0001$  ; test de Scheffe  $p < 0,0489$ ) quel que soit l'âge auquel les animaux ont été exposés au stress (ANOVA, effet de l'âge  $F_{(4;88)}=0,291$  ;  $p=0,8832$  ; interaction entre les facteurs :  $F_{(4;88)}=1,56$  ;  $p=0,19$ ). Cette augmentation a également été observée chez le sujet âgé ( $p=0,0427$ ). Ces données témoignent d'une élévation significative des taux de CORT chez tous les groupes d'animaux ayant suivi le SCLI, aussi bien chez la souris adulte qu'âgée.



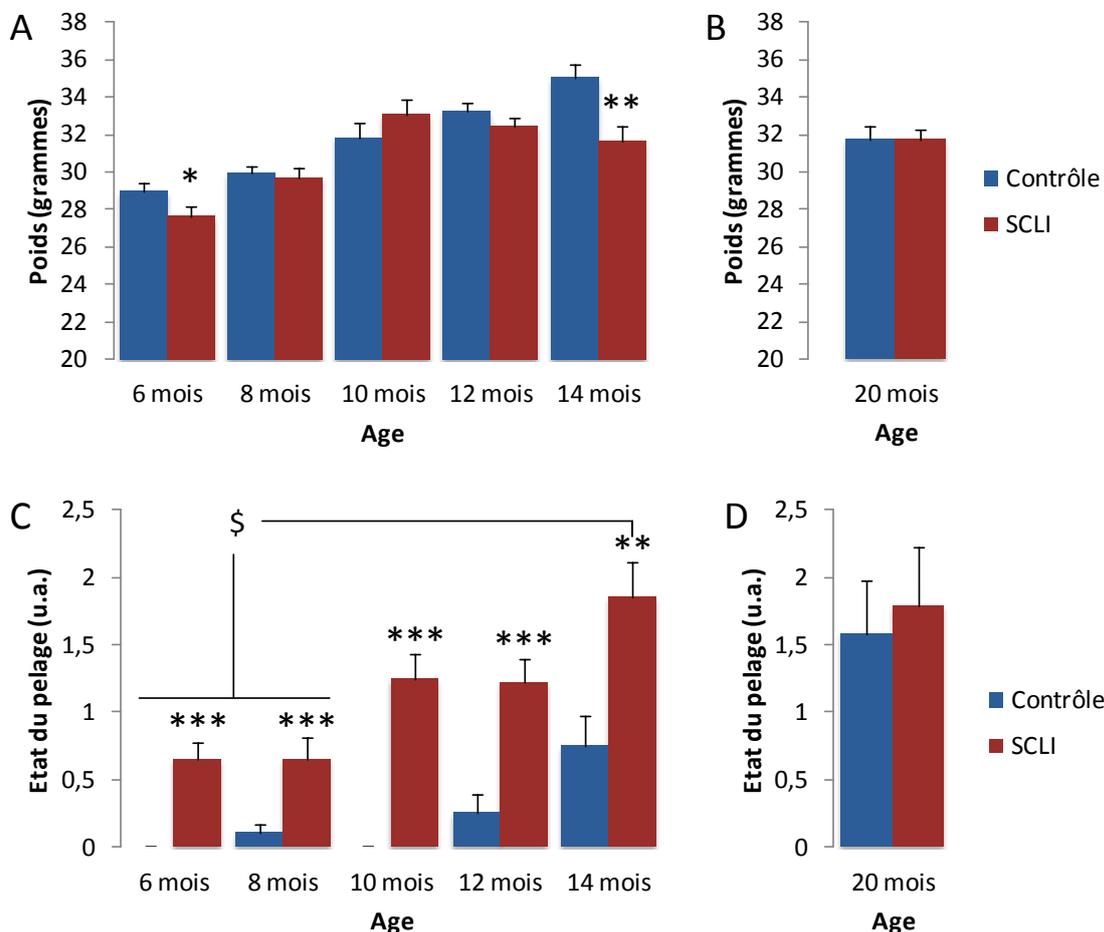
**Figure 49 : Ratio des taux de corticostérone en réponse à un SCLI en fonction de l'âge chez la souris adulte et âgée**

Le ratio est calculé pour chaque animal SCLI par rapport à la moyenne des animaux *contrôles* correspondant à sa tranche d'âge. L'élévation des taux de CORT en réponse au SCLI est plus importante chez les jeunes adultes que chez les autres classes d'âge ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet âge, par rapport aux animaux de 6 mois : \$ $p < 0.05$  ; \$\$ $p < 0.001$ .

L'analyse du ratio des taux de CORT des animaux stressés relativement à leurs contrôles de même âge (figure 49) indique un effet *âge* ( $p=0,0005$ ) qui se traduit par un ratio significativement plus élevé chez les animaux adultes de 6 mois par rapport à toutes les classes d'âge ( $p < 0,048$ ). Ceci suggère une plus grande sensibilité au stress chronique chez les animaux adultes jeunes (6 mois) qui diminue avec l'âge jusqu'à un ratio minimal chez les animaux âgés de 10 mois. Cependant, la sensibilité tend à réapparaître chez l'adulte vieillissant (différence entre 10 mois et 14 mois :  $p=0,06$ ).

b. Evaluations somatiques

*Evaluation pondérale*



**Figure 50 : Variations somatiques observables après un protocole de SCLI sur le poids et l'état du pelage chez des souris adultes et des souris âgées**

Le poids présenté (A-B), ainsi que l'état du pelage(C-D) sont ceux observés en sortie de protocole de SCLI. Le SCLI entraîne une perte de poids chez les adultes les plus jeunes et chez les adultes les plus âgés ainsi qu'une détérioration du pelage chez toutes les classes d'âge. Le poids est exprimé en grammes et l'état du pelage en unité arbitraire. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet du SCLI : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; Effet âge : \$ $p < 0,05$ .

Les analyses réalisées sur le poids des souris adultes (Figure 50A) montrent qu'il existe une différence en fonction de la condition de SCLI ( $F_{(1;88)}=4,868$  ;  $p=0,03$ ) et en fonction de l'âge ( $F_{(4;88)}=24,985$  ;  $p < 0,0001$ ). Cette dernière est due principalement à une augmentation croissante du poids de l'animal avec l'âge, quelle que soit la condition de SCLI. Cependant une interaction âge x SCLI indique que chaque classe d'âge ne répond pas de la même façon au SCLI ( $F_{(4;88)}=4,146$  ;  $p=0,004$ ). Les poids moyens sont significativement plus

faibles chez les animaux adultes les plus jeunes (6 mois) et chez les plus âgés (14 mois) suite au SCLI comparativement à leurs *contrôles* de même âge ( $p=0,05$  et  $p=0,0074$  respectivement). Aucune différence significative n'émerge sur les classes d'âge intermédiaires. Chez les animaux âgés de 20 mois, l'évaluation du poids n'indique aucune différence significative entre les conditions de SCLI ( $p=0,99$ ).

### **Evaluation du pelage**

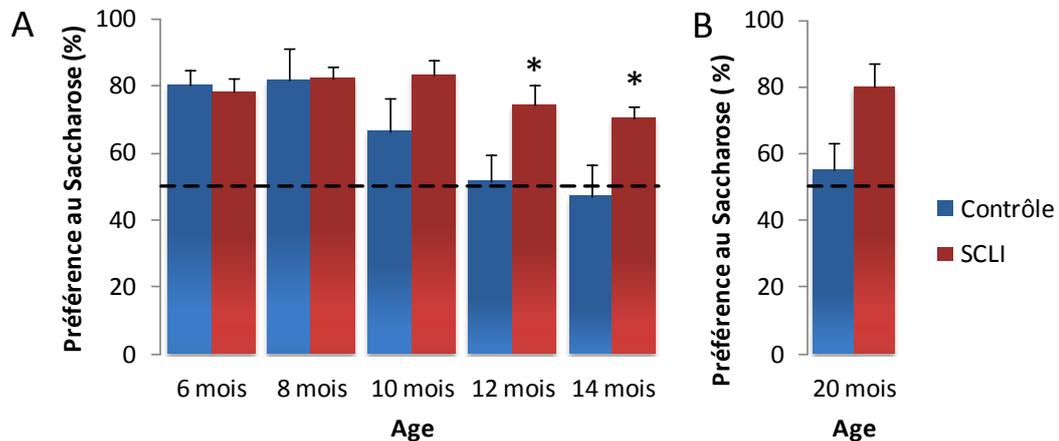
La figure 50C montre une altération du pelage après les 6 semaines de SCLI sur les 5 classes d'âge adulte. Les analyses indiquent un effet significatif du facteur *âge* et du facteur SCLI ( $F_{(4;88)}=12,775$  ;  $p<0,0001$  et  $F_{(1;88)}=8,459$  ;  $p<0,0001$  respectivement) sans interaction des deux facteurs ( $F_{(4;88)}=1,79$  ;  $p=0,13$ ). Ainsi, l'exposition au SCLI altère significativement l'état du pelage chez toutes les classes d'âges ( $p<0,01$ ). Toutefois, l'impact est significativement plus important chez les animaux âgés de 14 mois comparativement aux animaux de 6 et 8 mois ( $p<0,016$ ). Chez des animaux âgés de 20 mois, aucune différence n'est rencontrée en fonction du SCLI ( $p=0,7407$ ). Ainsi ces données suggèrent que l'atteinte somatique liée au stress chronique est caractérisable uniquement chez les animaux adultes en raison des dégradations qui s'installent avec l'âge chez les sujets n'ayant pas été stressés.

#### c. Evaluations des troubles de type dépressif

### **Préférence au saccharose**

L'anhédonie fait partie des symptômes constants chez les patients dépressifs et constitue un des marqueurs de dépression retrouvés dans les modèles animaux. Nous avons alors testé cette symptomatologie à l'issue des 6 semaines de SCLI via le test de préférence au saccharose (figure 51). L'ANOVA à 2 facteurs, menée sur les préférences de souris adultes, révèle un impact du SCLI ( $F_{(1;88)}=8,312$  ;  $p=0,005$ ) et un effet âge ( $F_{(4;88)}=4,683$  ;  $p<0,0018$ ) sans interaction entre les facteurs ( $F_{(1;88)}=1,68$  ;  $p=0,16$ ). Toutefois, l'analyse *a posteriori* par des tests de Scheffe indique des différences significatives uniquement entre des animaux adultes stressés de 12 et 14 mois et leurs contrôles ( $p=0,0388$  et  $p=0,0279$  respectivement). Contrairement à notre hypothèse, les résultats révèlent le maintien d'une préférence pour le saccharose chez les animaux exposés au SCLI tandis que cette préférence s'estompe avec l'âge chez les animaux *contrôles*. De plus, des tests de comparaison au hasard (*t* de Student) indiquent des préférences pour le saccharose non significativement différentes du hasard (50%) chez les animaux *contrôles* de 12 et de 14 mois ( $t(9)=0,198$  ;  $p=0,8473$  et  $t(8)=-0,294$  ;  $p=0,7763$  respectivement). Par ailleurs, l'analyse de la quantité totale des boissons

consommées ne montre aucun effet des facteurs *âge* et *SCLI* (respectivement,  $F_{(1;88)}=0,18$  ;  $p=0,8929$  et  $F_{(4;88)}=1,165$  ;  $p=0,3317$ ), indiquant que les effets observés relèvent bien de modifications qualitatives d'ordre hédonique et non pas de modifications quantitatives du comportement dipsique.

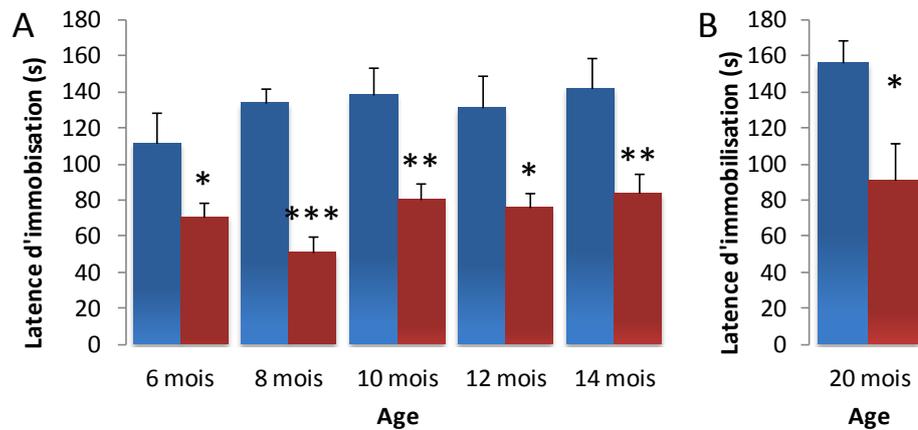


**Figure 51 : Consommation préférentielle de saccharose suite à un stress chronique en fonction de l'âge chez des souris adultes et âgées**

La préférence pour le saccharose chez des souris adultes (A) et des souris âgées (B) est exprimée en pourcentage. Le SCLI entraîne un maintien des préférences pour le saccharose malgré une diminution observable chez les *contrôles* après l'âge de 10 mois ; Hasard à 50% ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; effet *SCLI* : \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

Chez les sujets âgés, aucune différence significative n'émerge entre les groupes ( $p=0,075$ ). Par contre, les animaux *SCLI* présentent une réelle préférence pour le saccharose comparativement au hasard (50%) alors que la préférence des animaux *contrôles* n'est pas significative (respectivement,  $t(6)=4,501$  ;  $p=0,0041$ ) et  $t(15)=0,630$  ;  $p=0,5383$ ). Aucune différence concernant le volume consommé n'est également retrouvée chez l'animal âgé ( $p=0,9423$ ).

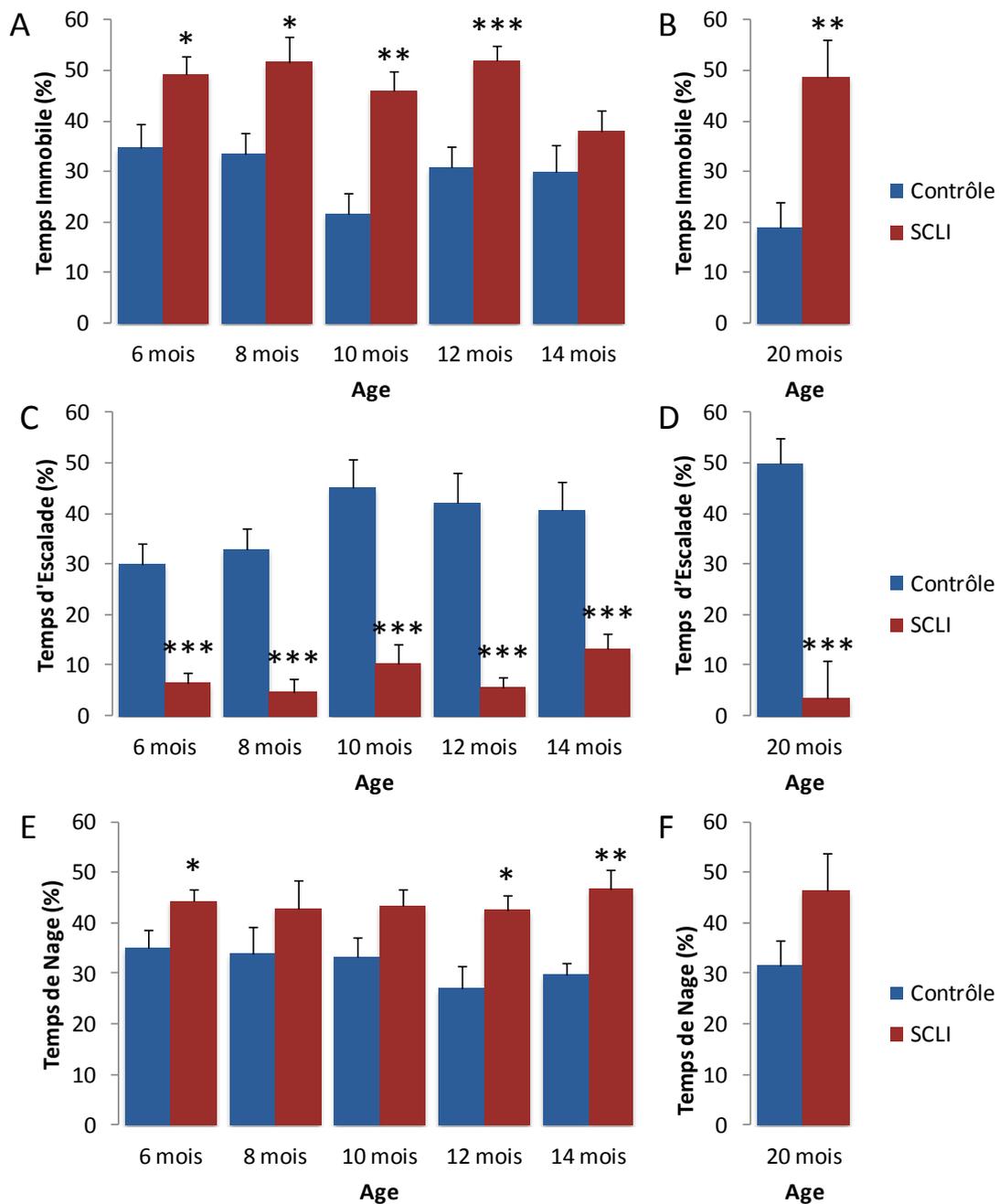
### Nage forcée de Porsolt



**Figure 52 : Latence d'immobilisation dans le test de Nage Forcée de Porsolt chez des animaux adultes et âgés**

Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié en aveugle. La latence d'immobilisation est exprimée en secondes dans le test chez des souris adultes (A) et chez des souris âgées (B). Le SCLI entraîne une diminution de la latence d'immobilisation chez toutes les classes d'âge ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$ .

L'analyse des latences pour s'immobiliser dans le test de FST chez des animaux adultes (figure 52A) montre un effet significatif du SCLI ( $F_{(1;88)}=53,961$  ;  $p < 0,0001$ ) sans effet du facteur âge ( $F_{(4;88)}=1,181$  ;  $p=0,3246$ ) ni de l'interaction des facteurs ( $p=0,58$ ). L'analyse *a posteriori* par le test de Scheffe indique que tous les animaux adultes SCLI, quel que soit l'âge, s'immobilisent plus rapidement que des animaux *contrôles* ( $p < 0,045$ ). Cette observation est reproduite chez les animaux âgés (figure 52B) qui s'immobilisent plus rapidement lorsqu'ils ont été stressés ( $p=0,0107$ ).



**Figure 53 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris adulte et âgée dans un test de Nage Forcée de Porsolt**

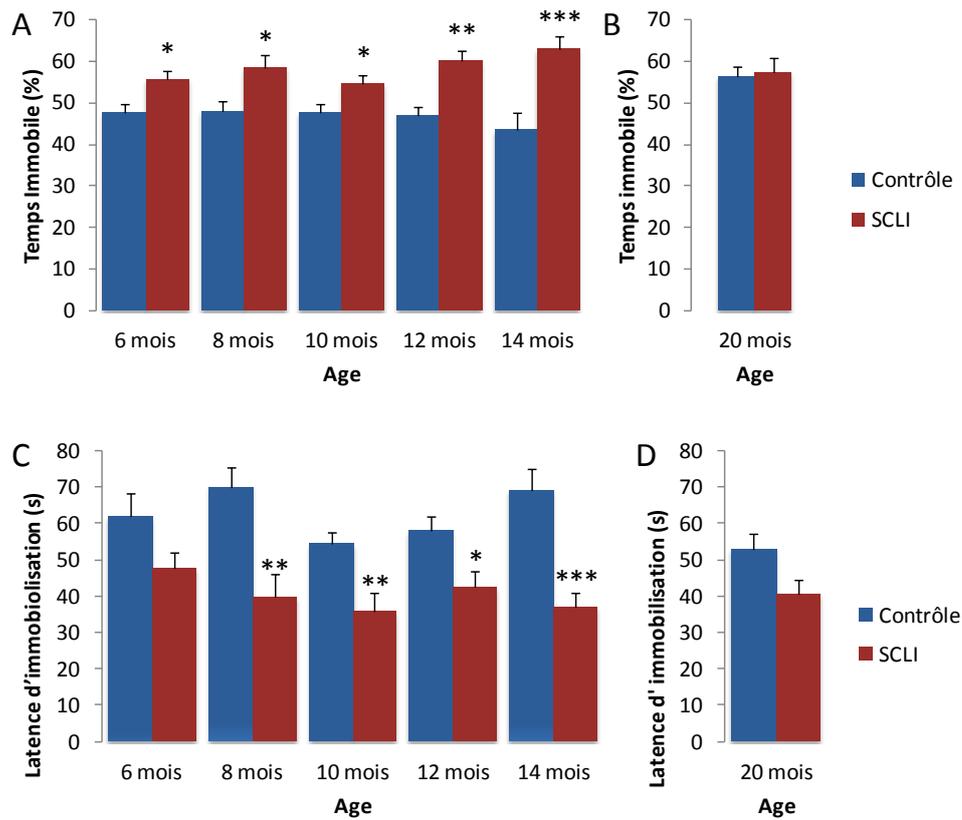
Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié en aveugle. Le SCLI entraîne une augmentation du pourcentage de temps passé immobile (A-B) associée à une diminution de l'escalade des parois (C-D) et une augmentation du temps passé à nager (E-F) sur les 4 premières minutes du test, chez des souris adultes et chez des souris âgées. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

L'ANOVA réalisée sur le pourcentage d'immobilité chez les souris adultes (Figure 53A) montre un effet *SCLI* significatif ( $F_{(1;88)}=38,81$  ;  $p<0,0001$ ) sans effet *âge* ( $F_{(4;88)}=2,079$ ;  $p=0,0903$ ) ni d'interaction des facteurs ( $F_{(4;88)}=1$  ;  $p=0,39$ ). Les comparaisons *a posteriori* par un test F de Scheffe indique une différence significative pour toutes les classes d'âge ( $p<0,0233$ ) sauf pour les animaux de 14 mois ( $p=0,2503$ ). Par contre, l'effet du *SCLI* observé chez des animaux de 20 mois est également significatif ( $p=0,0037$ ).

L'augmentation de l'immobilité s'accompagne d'une diminution marquée du temps passé à escalader la paroi (Adultes :  $F_{(1;88)}=128,178$  ;  $p<0,0001$  ; Scheffe :  $p<0,0004$  ; Agés :  $p<0,0001$ ) et ceci, indépendamment de l'âge des sujets ( $F_{(4;88)}=2,3$ ;  $p=0,09$ ). Au contraire, le temps passé à nager est globalement accru par le *SCLI* ( $F_{(1;88)}=23,501$  ;  $p<0,0001$ ), sans effet de l'âge ni d'interaction entre les facteurs (âge :  $F_{(4;88)}=0,4$ ;  $p=0,78$  ; interaction :  $F_{(4;88)}=0,45$ ;  $p=0,76$ ), même s'il s'avère significativement plus élevé uniquement chez les adultes les plus jeunes (6 mois) et les adultes les plus âgés (12 et 14 mois ; Scheffe :  $p<0,0403$ ) . Enfin, l'effet *SCLI* sur le pourcentage de temps passé à nager n'est pas retrouvé chez des animaux âgés de 20 mois ( $p=0,09$ ). Globalement, ces résultats indiquent que le *SCLI* produit des comportements de type dépressif quel que soit l'âge des animaux.

### ***Suspension par la queue***

Concernant le TST, l'ANOVA menée sur le pourcentage de temps en immobilité chez les souris adultes (figure 54 A) indique un effet *SCLI* significatif ( $F_{(1;88)}=50,026$  ;  $p<0,0001$ ), sans distinction selon l'âge ( $F_{(4;88)}=0,398$  ;  $p=0,8095$ ) ni interaction entre les facteurs ( $F_{(4;88)}=4,8$ ;  $p=0,12$ ). Les tests F de Scheffe confirment que le *SCLI* augmente l'immobilité chez toutes les classes d'âge adulte évaluées ( $p<0,0355$ ). La latence d'immobilisation (figure 54C) varie également significativement selon la condition de *SCLI* ( $F_{(1;88)}=50,173$  ;  $p<0,0001$ ) indépendamment de l'âge ( $F_{(4;88)}=1,404$  ;  $p=0,2394$ ) et de l'interaction des facteurs ( $F_{(4;88)}=1,4$ ;  $p=0,22$ ) chez l'adulte. La diminution de la latence d'immobilisation chez les animaux stressés est significative chez toutes les classes d'âge ( $p<0,0188$ ) sauf chez les animaux adultes de 6 mois ( $p=0,0816$ ). En revanche, aucun effet n'est observé chez les animaux âgés dans ce test (Immobilité :  $p=0,81$  et Latence :  $p=0,122$ ) en raison de l'augmentation de l'immobilité des contrôles âgés. Ces données confirment l'émergence de troubles de type dépressif induits par six semaines de stress chronique chez l'animal adulte, mais pas chez l'animal âgé.

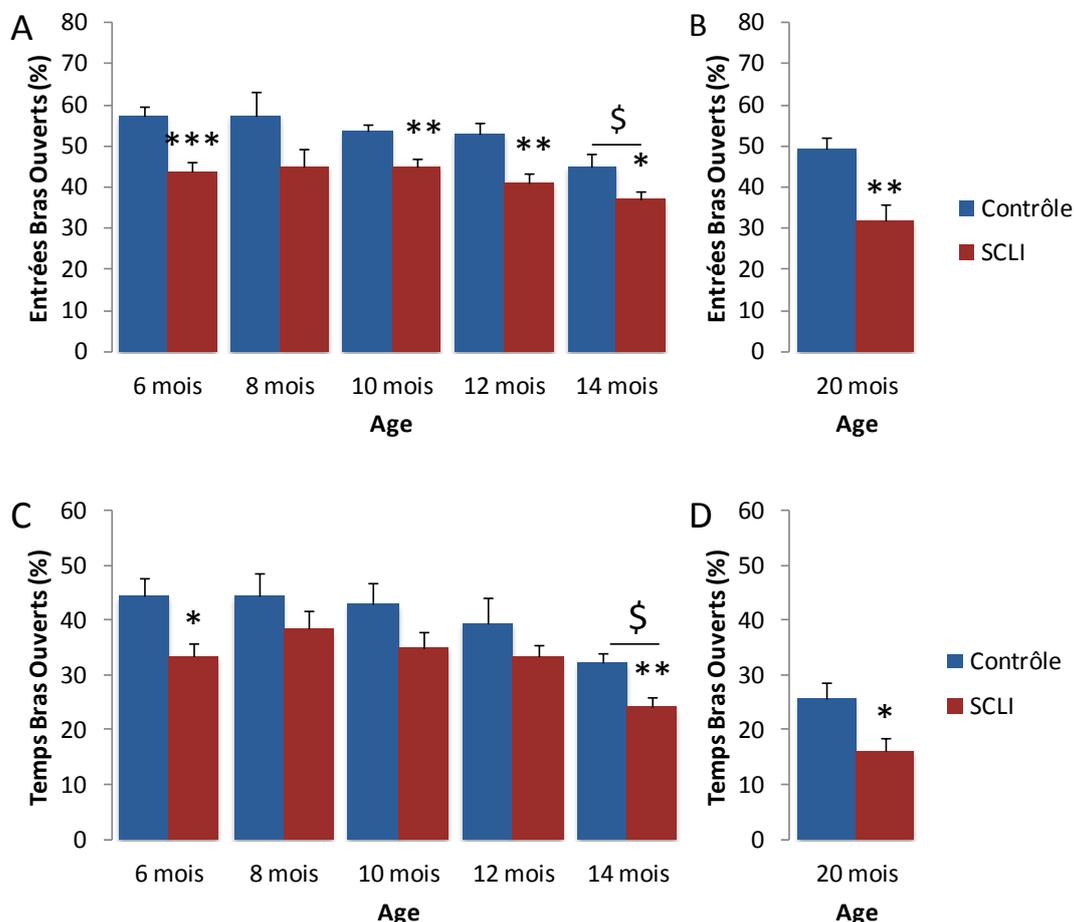


**Figure 54 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris adulte et la souris âgée dans un test de Tail suspension-test**

Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié à l'aveugle. Le SCLI entraîne une augmentation du temps passé immobile (A-B) ainsi qu'une diminution de la latence d'immobilisation (C-D) principalement chez des souris adultes. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$ .

d. Evaluations des troubles de type anxieux

*Labyrinthe en Croix Surélevé*



**Figure 55 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris adulte et la souris âgée dans un test de Labyrinthe en Croix Surélevé**

Le comportement des animaux a été enregistré par un système de vidéotracking. Le SCLI entraîne une diminution du pourcentage d'entrées dans les bras ouverts (par rapport aux bras fermés) chez des souris adultes (A) et âgées (B). Il entraîne également une diminution du pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (par rapport aux bras fermés) chez des souris adultes (C) et des souris âgées (D). Moyenne  $\pm$  s.e.m.; Effet *SCLI*: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; Effet *âge* comparativement aux animaux de 6 mois: \$ $p < 0,05$

La figure 55 montre les principaux résultats obtenus concernant le test en EPM sur les pourcentages d'entrées (A-B) et de temps passé (C-D) dans les bras ouverts, comparativement aux bras fermés. L'ANOVA menée sur le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts chez des souris adultes indique des effets significatifs du *SCLI* ( $F_{(1;88)}=30,170$ ;  $p < 0,0001$ ) et de l'âge ( $F_{(4;88)}=3,409$ ;  $p = 0,0122$ ) sans interaction ( $p = 0,86$ ). En effet, l'impact du *SCLI* est significatif sur toutes les classes d'âge ( $p < 0,042$ ) sauf chez les animaux de 8 mois ( $p = 0,1110$ ).

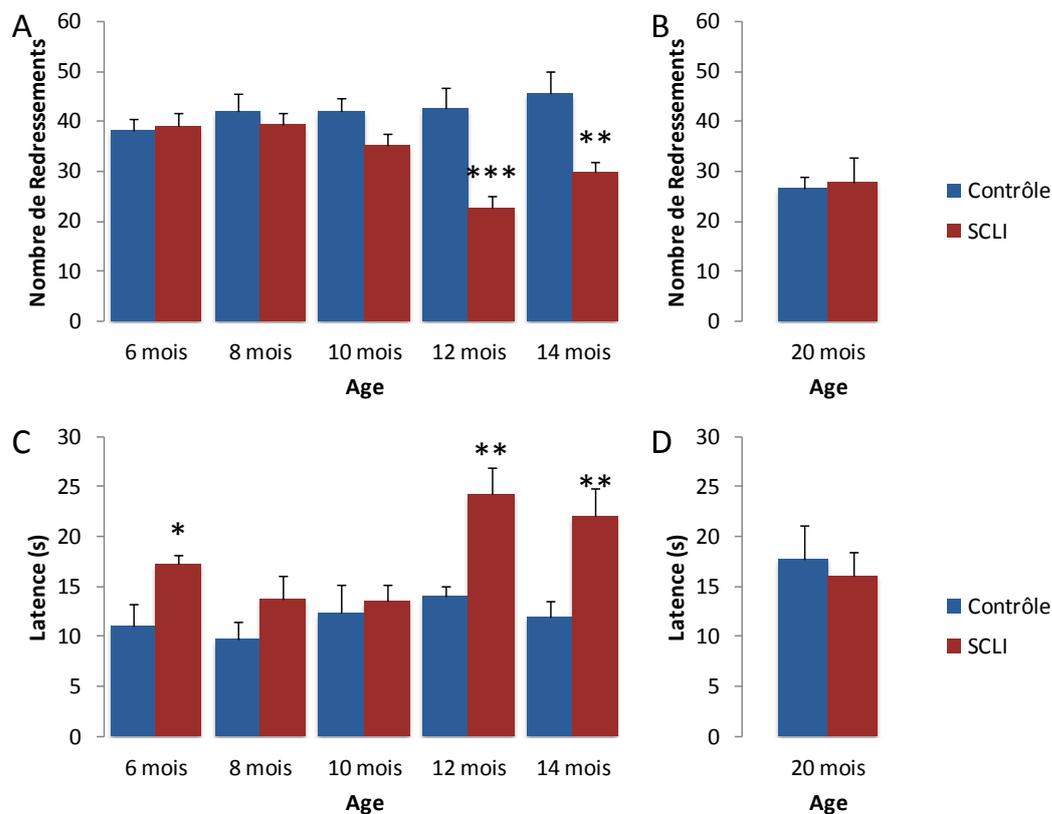
A 20 mois, le SCLI a également un effet sur le nombre d'entrée dans les bras ouverts ( $p=0,0012$ ). L'effet de l'âge chez les animaux adultes est lié à la diminution du pourcentage d'entrées dans les bras ouverts de la part des animaux de 14 mois comparativement aux animaux de 6 et 8 mois ( $p<0,05$ ).

L'ANOVA portant sur le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts chez des souris adultes (figure 55C) indique également un effet *SCLI* ( $F_{(1;88)}=14,849$  ;  $p=0,0002$ ) ainsi qu'un effet de l'âge ( $F_{(4;88)}=5,11$  ;  $p<0,0009$ ) sans interaction entre les facteurs ( $p=0,91$ ). Par contre, l'effet du *SCLI*, analysé *a posteriori*, montre que seuls les animaux *SCLI* de 6 mois et de 14 mois présentent une diminution significative du pourcentage de temps passé dans les bras ouverts comparativement à leurs homologues *contrôles* ( $p=0,0434$  et  $p=0,0071$  respectivement). A 20 mois, le SCLI a également un effet sur le temps passé dans les bras ouverts ( $p=0,03$ ). L'effet âge révélé par les tests *a posteriori* (test F de Scheffe) indique qu'il est attribuable à une diminution significative du pourcentage de temps passé dans les bras ouverts chez les animaux adultes de 14 mois comparativement aux autres classes d'âge ( $p<0,0253$  sauf pour animaux de 12 mois :  $p=0,1263$ ).

Ces résultats indiquent que parallèlement à une augmentation de l'anxiété avec l'âge, l'impact du SCLI est plus marqué chez les adultes les plus jeunes et les adultes les plus âgés et persiste chez les animaux âgés.

### **Exploration libre**

Le test d'exploration libre a permis de compléter les données récoltées concernant l'évaluation des troubles de types anxieux chez la souris. L'ANOVA menée sur le nombre de redressements effectués pendant le test chez la souris adulte (Figure 56A) montre un effet *SCLI* ( $F_{(1;88)}=21,854$  ;  $p<0,0001$ ), accompagné d'une interaction âge x *SCLI* significative ( $F_{(4;88)}=4,157$  ;  $p=0,0039$ ). Ainsi, l'effet du SCLI n'est significatif qu'à partir de 12 mois. ( $p<0,0038$ ). Chez des animaux âgés de 20 mois (figure 56B), il n'y a pas d'effet *SCLI* ( $p=0,78$ ) sur le nombre de redressements en raison de la diminution des redressements chez les sujets âgés.



**Figure 56 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris adulte et la souris âgée dans un test d'Exploration libre**

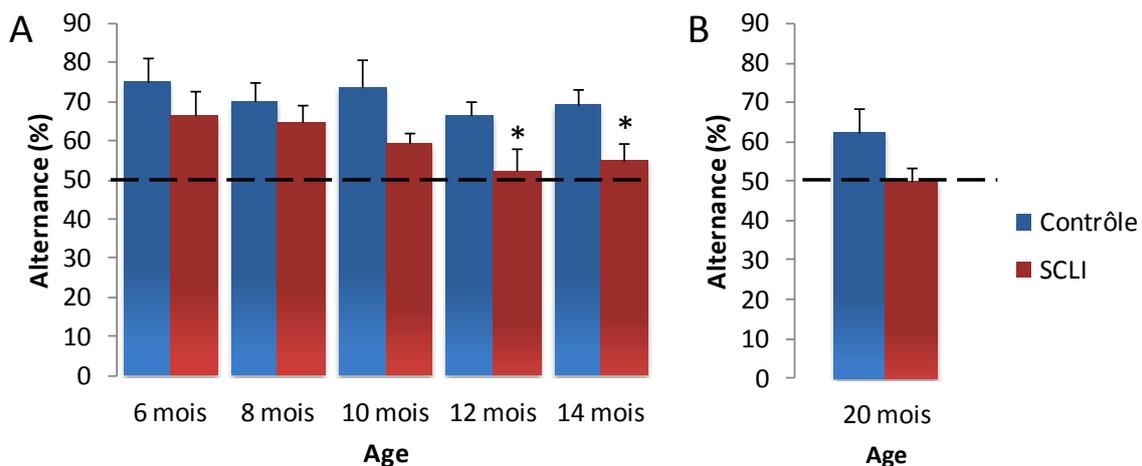
Le SCLI entraîne une diminution du nombre de redressement chez les animaux adultes stressés après l'âge de 10 mois (A) associée à une augmentation de la latence de redressement chez ces mêmes animaux (C). Aucun effet n'est révélé chez les animaux âgés concernant le nombre de redressement (B) et la latence (D). Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$ .

L'analyse réalisée sur la latence d'exploration chez les souris adultes (Figure 56C) indique un effet SCLI ( $F_{(1;88)}=22,916$  ;  $p < 0,0001$ ) ainsi qu'un effet de l'âge ( $F_{(4;88)}=4,148$  ;  $p=0,004$ ). Le stress chronique entraîne une augmentation de la latence de redressement chez les animaux adultes les plus jeunes (6 mois) et les plus âgés (12 et 14 mois ( $p < 0,0185$ )). Avec l'âge, la latence de redressement tend également à augmenter même si des analyses *a posteriori* n'ont pas permis d'identifier de différence significative. A l'âge de 20 mois, le SCLI ne montre aucun effet sur la latence de redressement ( $p=0,8$ ).

Globalement, ces résultats confirment l'induction de troubles anxieux chez les souris adultes les plus jeunes et les plus âgés, ainsi qu'une augmentation de l'état anxieux avec l'âge.

e. Evaluations cognitives

Les performances de mémoire de travail spatiale ont été évaluées par un test d'alternance en T-maze. Les pourcentages d'alternance mesurés lors du test avec des ITI de 30sec sont présentés dans la figure 57. Il est important de noter qu'aucune différence significative n'a été révélée au 8<sup>ème</sup> essai, avec l'ITI de 5 sec (ANOVA :  $F_{(1;88)}=0,559$  ;  $p=0,4565$  et  $F_{(4;88)}=1,11$  ;  $p=0,3569$ ). Les animaux n'alternant pas au 8<sup>ème</sup> essai (environ 15% de l'effectif total) ont tout de même été retirés de l'analyse pour ce test. L'ANOVA à 2 facteurs réalisée sur le pourcentage d'alternance montre un impact du *SCLI* ( $F_{(1;71)}=11,954$  ;  $p=0,0009$ ) sans effet de l'âge ( $F_{(4;71)}=1,5$  ;  $p=0,2$ ) ni d'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;71)}=0,35$  ;  $p=0,84$ ). Cependant, une différence significative se retrouve uniquement chez les animaux adultes de 12 et 14 mois qui alternent globalement moins que leurs homologues contrôles ( $p<0,0468$ ). L'étude des performances des animaux âgés de 20 mois ne montre aucun effet du *SCLI* ( $p=0,1774$ ).



**Figure 57 : Evaluation comportementale des troubles de mémoire de travail chez la souris adulte et la souris âgée dans un test d'alternance spontanée en T-maze**

Les performances d'alternance dans un test d'alternance en T-maze ont été quantifiées avec un ITI de 30 secondes chez des souris adultes (A) et chez des souris âgées (B). Le *SCLI* entraîne une altération des performances chez les animaux stressés après l'âge de 10 mois. Le hasard est symbolisé par une ligne en pointillés à 50%. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

De plus, les scores des animaux *SCLI* adultes de 12 et 14 mois sont les seuls à ne pas être significativement différents du hasard ( $t(7)=0,35$  ;  $p=0,7318$  et  $t(6)=1$  ;  $p=0,3559$  respectivement). Il en est de même avec les performances des animaux âgés de 20 mois, *contrôles* et *SCLI* ( $t(10)=1,86$  ;  $p=0,8$  et  $t(6)=0$  ;  $p=0,99$ ). Ainsi, l'atteinte de la mémoire de

travail suite à un SCLI est effective uniquement chez les adultes les plus âgés (12 et 14 mois) et chez les animaux âgés malgré une altération déjà présente chez les animaux âgés *contrôles*.

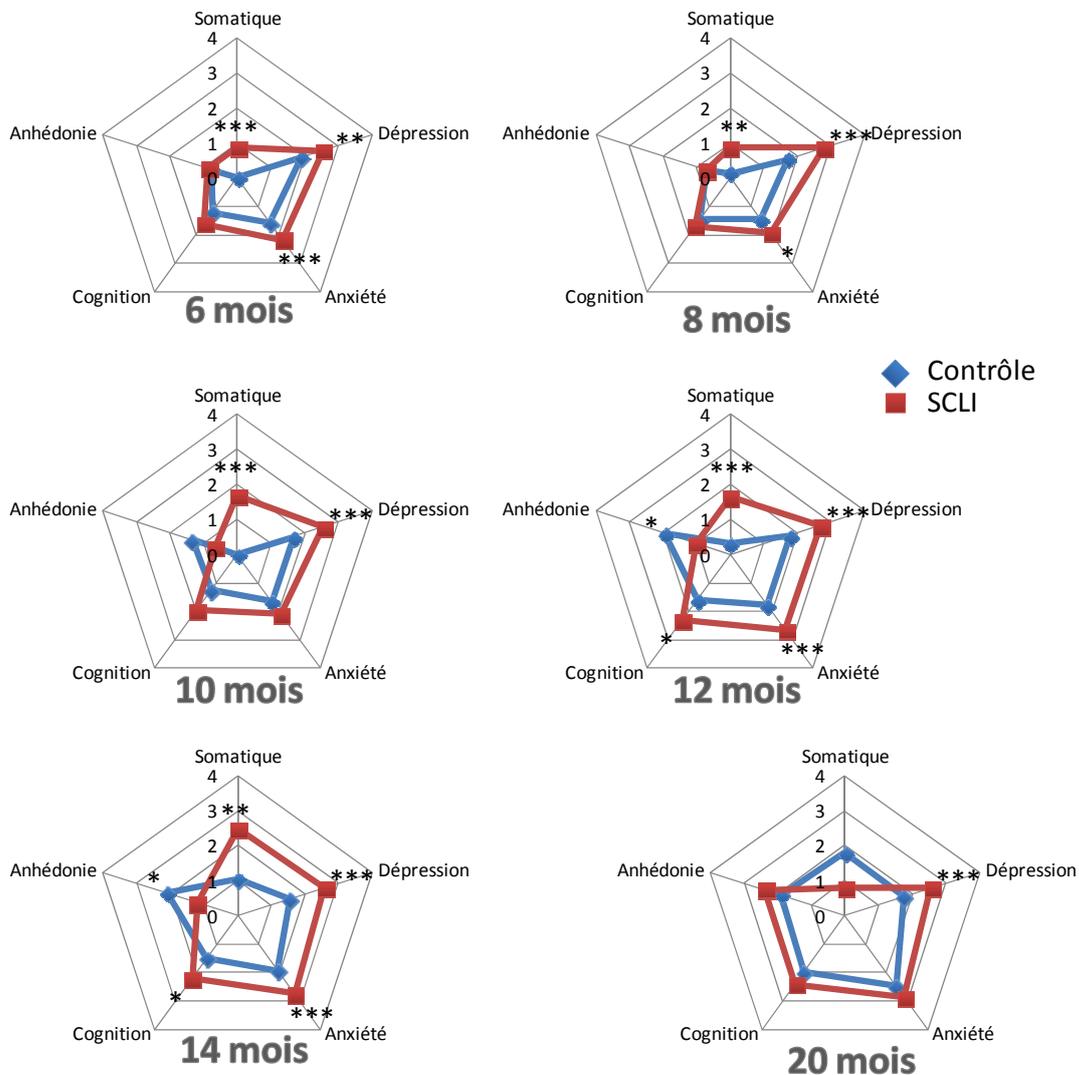
## 2. Synthèse des Résultats

La figure 58 présente une synthèse des différents déficits caractérisés selon les cinq classes de troubles liés au stress chronique (à savoir les détériorations somatiques, les troubles de type dépressif, les troubles de type anxieux, les troubles cognitifs et l'anhédonie). L'index moyen calculé à partir de chacun des paramètres mesurés dans les différents tests permet de comparer l'émergence et l'amplitude de chacun des symptômes.

### a. Une émergence hiérarchique des troubles induits par le SCLI selon l'âge

L'atteinte somatique liée au SCLI chez les 5 classes d'âges adultes (6, 8, 10, 12 et 14 mois ;  $F_{(1;88)}=83,459$  ;  $p<0,0001$ ) est constante et son amplitude est augmentée avec l'âge ( $F_{(4;88)}=12,775$  ;  $p<0,0001$ ). Les troubles de type dépressif liés au SCLI sont également présents sur toutes les classes d'âges adultes (ANOVA :  $F_{(1;88)}=20,467$  ;  $p<0,0001$  ; test de Scheffe :  $p<0,0036$ ). En revanche, les troubles de type anxieux émergent chez l'adulte de façon plus sporadique. Les analyses menées sur ces index montrent un effet du SCLI ( $F_{(1;88)}=65,559$  ;  $p<0,0001$ ) ainsi que de l'âge ( $F_{(4;88)}=8,823$  ;  $p<0,0001$ ) sans interaction entre les facteurs ( $F_{(4;88)}=1,2$  ;  $p=0,3$ ). Cependant, l'effet du SCLI se manifeste principalement chez les animaux adultes les plus jeunes (6 et 8 mois ;  $p=0,0003$  et  $p=0,0208$  respectivement) et chez les adultes les plus âgés (12 et 14 mois ;  $p=0,0003$  et  $p<0,0001$  respectivement). La cognition est aussi impactée selon le SCLI ( $F_{(1;71)}=12,538$  ;  $p=0,0007$ ) sans effet âge ou d'interaction ( $p>0,18$ ), mais ce déficit n'apparaît que tardivement puisqu'une diminution des performances émerge uniquement chez les souris adultes les plus âgées ( $p=0,0398$  et  $p=0,0283$  pour les animaux de 12 et 14 mois respectivement). Enfin, l'ANOVA menée sur les préférences pour le saccharose montre un effet du SCLI ( $F_{(1;88)}=8,311$  ;  $p=0,005$ ) ainsi qu'un effet de l'âge ( $F_{(4;88)}=4,683$  ;  $p<0,0018$ ). Cependant et contrairement aux résultats attendus, les animaux SCLI maintiennent une préférence élevée pour le saccharose alors qu'une anhédonie s'installe avec l'âge chez les *contrôles*. Chez les animaux âgés (20 mois) le SCLI n'a permis d'induire que des troubles de type dépressif ( $p=0,0009$ ), les autres symptômes mesurés ne montrant pas de différence significative entre les groupes expérimentaux

(Anhédonie :  $p=0,0675$  ; Cognition :  $p=0,2839$  ; Somatique :  $p=0,5157$ ) si ce n'est une tendance sur les troubles de types anxieux ( $p=0,0523$ ).



**Figure 58 : Représentation des profils comportementaux de souris adultes et âgées en fonction de l'âge d'exposition au SCLI**

Chaque pentagramme illustre les index d'amplitude moyen de chaque symptôme d'une classe d'âge différente, avec les animaux *contrôles* (en bleu) et les animaux *SCLI* (en rouge). Les troubles somatiques, de type dépressif, de type anxieux, de la cognition et l'anhédonie sont présentés selon un index de 0 à 4, 0 signifiant « pas d'atteinte » et 4 « très atteint ». Cette représentation permet d'identifier l'émergence différentielle des effets du SCLI en fonction de l'âge d'exposition ; Moyenne par catégorie ; Effet *SCLI* : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Tableau 9 : Corrélations entre les différents troubles observés chez le sujet adulte

		Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte (Z-Score)											
		Corticotérorone		Somatique		Anxiété		Dépression		Anhédonie		Cognition	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p		
Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte (Z-Score)	Corticotérorone	0,29	0,0040	0,31	0,0025	0,28	0,0062	-0,02	0,8717	0,14	0,1677		
	Somatique			0,40	0,0001	0,40	0,0001	-0,03	0,754	0,14	0,1899		
	Anxiété					0,45	0,0001	-0,12	0,2694	0,17	0,113		
	Dépression							-0,38	0,0002	0,22	0,0323		
	Anhédonie									-0,03	0,8051		
	Cognition												

Le tableau 9 indique les corrélations retrouvées entre les différentes catégories de symptômes présents chez l'adulte. Le calcul des z-scores a permis de synthétiser les différents paramètres d'un test en une seule composante, elle-même regroupée avec la composante d'un autre test pour former une catégorie de symptômes. De façon intéressante, la corticotéroronémie à l'âge adulte, les troubles anxieux, les troubles dépressifs et l'atteinte somatique sont tous corrélés entre eux. De cette façon, nous pouvons surtout voir que la CORT est un marqueur de l'atteinte anxio-dépressif chez le sujet adulte. Cependant, cette dernière ne corrèle pas avec les troubles cognitifs, ni avec l'anhédonie. Nous remarquons également que l'anhédonie est corrélée négativement avec les troubles de type dépressif, suggérant ainsi que l'atteinte dépressive augmente la préférence pour le saccharose.

Tableau 10 : Corrélations entre les différents troubles observés chez le sujet âgé

		Amplitude normalisée du trouble chez l'agé (Z-Score)											
		Corticotérorone		Somatique		Anxiété		Dépression		Anhédonie		Cognition	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p		
Amplitude normalisée du trouble chez l'agé (Z-Score)	Corticotérorone	0,37	0,2389	0,18	0,5777	0,51	0,0952	-0,52	0,0858	0,62	0,0295		
	Somatique			0,41	0,1973	0,09	0,7788	0,12	0,7177	0,45	0,1413		
	Anxiété					0,43	0,1613	-0,26	0,4251	0,32	0,3203		
	Dépression							-0,37	0,2501	0,67	0,0153		
	Anhédonie									-0,01	0,969		
	Cognition												

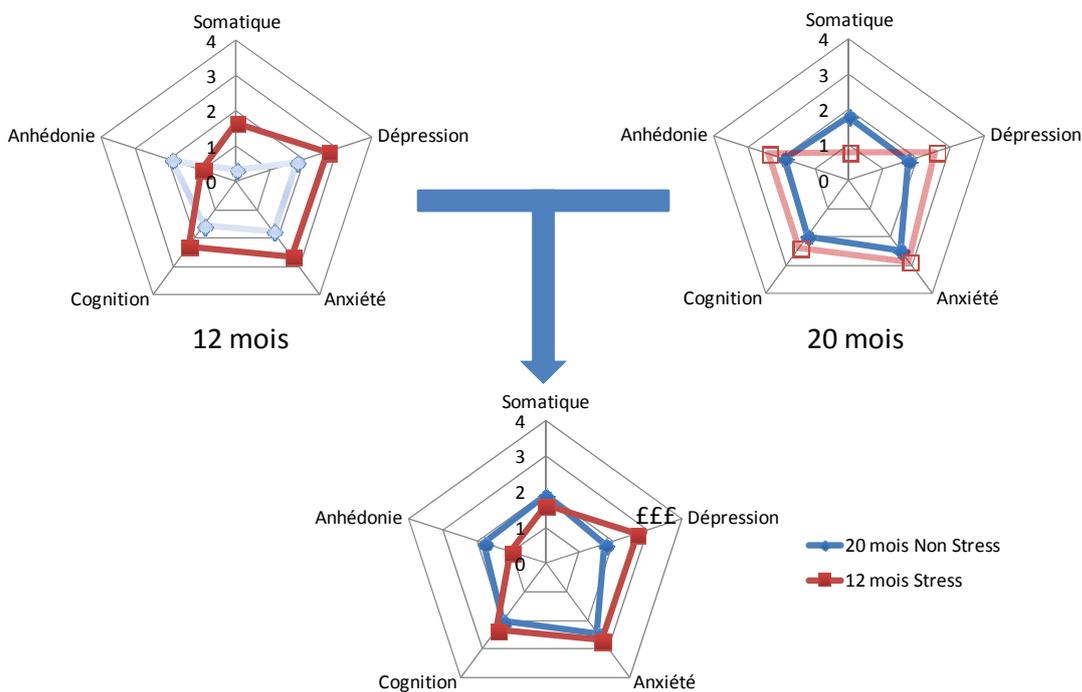
Chez les animaux âgés (20 mois), aucune corrélation entre les paramètres émotionnels n'a été retrouvée. Cependant, une corrélation entre les taux de CORT et les troubles cognitifs est apparue, alors que la corticotéroronémie corrélait avec les troubles émotionnels chez l'adulte.

Globalement, l'impact d'un stress chronique s'amplifie avec l'âge mais les différents troubles induits s'installent de manière différentielle selon l'âge d'exposition : les troubles somatiques et les troubles dépressifs sont constants et les troubles anxieux émergent chez les adultes les plus jeunes et les plus âgés alors que les troubles cognitifs n'apparaissent que chez les plus âgés.

Chez la souris âgée de 20 mois, seuls des troubles de type dépressif et une tendance aux troubles de types anxieux se surajoutent aux déficits liés à l'âge. Ainsi les effets du vieillissement viennent masquer les effets produits par un stress chronique. Ceci suggère une certaine similitude entre les effets produits par le stress chronique et ceux liés au vieillissement.

b. Stress chronique chez l'adulte : modèle de vieillissement accéléré

La figure 59 montre la comparaison réalisée entre des animaux adultes de 12 mois ayant suivi le SCLI et des animaux âgés de 20 mois *contrôles*.



**Figure 59 : Comparaison de profils comportementaux issus de 2 classes d'âge différentes.**

Comparaison entre des animaux *SCLI* de 12 mois (à gauche) et des animaux *contrôles* de 20 mois (à droite). La comparaison des profils est présentée sur le pentagramme du bas. Moyennes par catégorie de troubles ; Différence entre les groupes : £££ $p < 0.001$

Les comparaisons ont montré que le profil des animaux *SCLI* de 12 mois et celui des animaux âgés (*contrôle*) étaient les plus proches. L'analyse de ces données indiquent que les profils comportementaux de ces 2 groupes sont similaires concernant les troubles de type anxieux ( $p=0,2449$ ), les troubles cognitifs ( $p=0,4591$ ), l'atteinte somatique ( $p=0,6063$ ) et l'anhédonie ( $p=0,1087$ ). Seuls les comportements de type dépressif des animaux *SCLI* du groupe *12 mois* témoignent d'une atteinte plus marquée que celle mesurée chez les animaux *contrôles* âgés de *20 mois* ( $p<0,0001$ ).

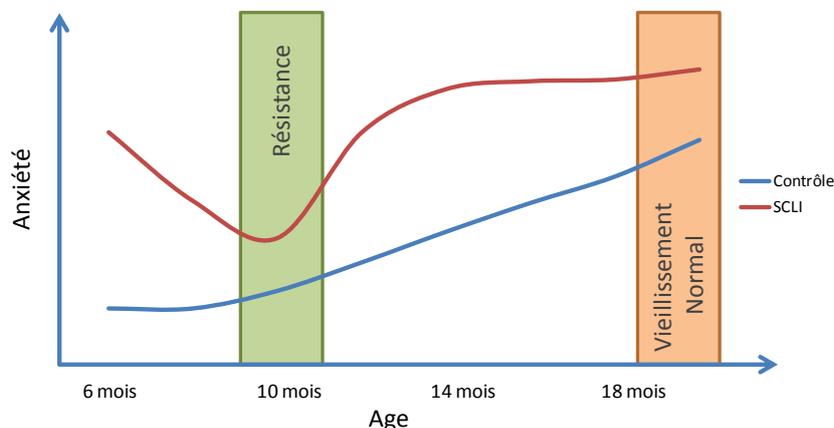
Ainsi, hormis des symptômes de dépression plus marqués, un épisode de stress chronique survenant chez l'adulte de 12 mois reproduit un profil comportemental similaire à celui de sujets âgés de 20 mois ayant suivi un vieillissement normal, sans perturbation particulière.

## Discussion

Cette première étude avait pour but d'identifier les différences d'émergence des symptômes liés au stress chronique chez la souris adulte. Les résultats ont indiqué que l'exposition à un SCLI chez la souris adulte conduisait à une augmentation de l'activité de l'axe HPA et à l'induction de différents symptômes selon l'âge du sujet. Malgré une variabilité d'émergence, certains troubles ont été observés chez toutes les classes d'âge évaluées. L'induction de troubles somatiques et de troubles dépressifs apparaissent de manière constante avec l'âge. En revanche, les troubles anxieux et cognitifs apparaissent de manière différentielle selon l'âge d'exposition au stress chronique.

Tout d'abord, tous les animaux exposés au SCLI ont présenté une élévation des concentrations de CORT. Ces résultats sont concordants avec les travaux de la littérature qui ont démontré l'augmentation des taux de CORT lors d'un stress chronique chez de nombreuses espèces ou souches d'animaux différentes (Pitman et al., 1988; Vogel and Jensh, 1988; Shanks et al., 1990; Yalcin et al., 2008), un effet qui constitue un des principes du modèle d'induction de troubles dépressifs par une dérégulation de l'axe HPA (Checkley, 1996). De façon intéressante, nous avons également pu constater une diminution de la sensibilité de l'axe HPA en réponse au SCLI avec l'âge avançant, de manière cohérente avec des résultats antérieurs (Rich and Romero, 2005).

Ensuite, la détérioration de l'état du pelage par le stress chronique est apparue chez toutes les classes d'âge adulte étudiées. Cette détérioration peut résulter de dérégulations physiologiques induites par le stress (Weiss, 1970; Higgins and Endler, 1995). Le toilettage est une composante comportementale importante chez le rongeur qui est perturbée lors d'états



**Figure 60 : Schéma hypothétique de l'évolution des troubles de l'anxiété liés au stress chronique en fonction de l'âge**

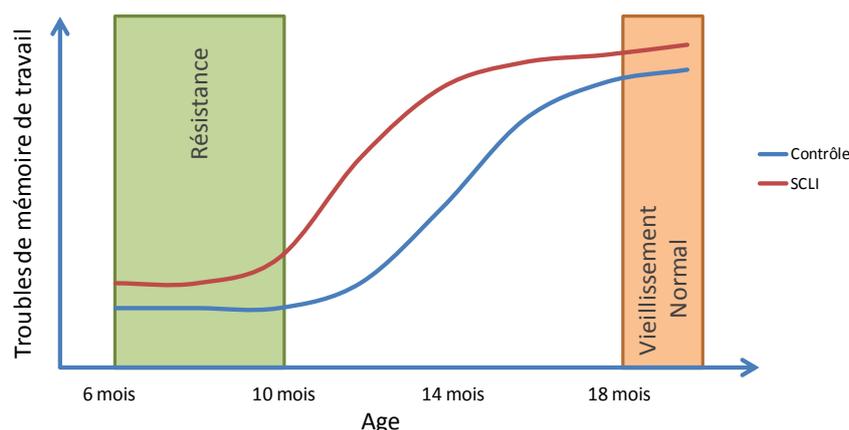
Sur la base des résultats de cette étude, l'évolution des troubles de l'anxiété en fonction de l'âge est présenté chez des animaux contrôle (bleu) et des animaux stressés (rouge). Une phase de résistance (zone verte) au stress chronique semble se mettre en place aux alentours de 10 mois tandis qu'une vulnérabilité naturelle, liée à un phénomène de vieillissement normal, s'initie à partir de 12 mois et atteint son maximum à l'âge de 20 mois (zone orange).

de stress chronique (Spruijt et al., 1992; Mineur et al., 2003; Kalueff and Tuohimaa, 2004). La détérioration du pelage peut donc résulter d'une absence de toilettage reflétant une altération plus générale liée à l'état de stress chronique (Ducottet et al., 2003) et à la dépression. Le désespoir comportemental conduirait alors l'animal à ne plus réaliser de soins autocentrés entraînant ainsi la dégradation progressive de son pelage. Cette interprétation est cohérente avec la cooccurrence de l'atteinte somatique et de l'atteinte de type dépressive que nous avons constatée (Yalcin et al., 2008). Les deux tests de dépression utilisés (FST et TST) témoignent de l'installation d'un désespoir comportemental induit par le stress chez toutes les classes d'âges. Les effets antidépresseurs d'inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine interviennent respectivement sur l'escalade et sur la nage dans un test de FST. Ces comportements locomoteurs, assimilables à un débatement de l'animal dans le test, se retrouvent modifiés chez nos animaux stressés chroniquement, ce qui suggère une modification de la neuromodulation noradrénergique et sérotoninergique chez ces animaux, quel que soit leur âge.

En revanche, les troubles anxieux n'apparaissent pas à chaque âge (figure 60). L'induction d'un profil anxieux par le stress chronique émerge chez les adultes les plus jeunes et les plus âgés. En effet, l'anxiété en lien avec l'exposition au stress chronique disparaît à

l'âge de 10 mois. Ceci suggère l'existence d'une période de **résistance** aux alentours de cet âge adulte. L'induction de troubles dépressifs sans atteinte de l'anxiété lors d'un stress chronique est cohérent avec des travaux antérieurs (Mineur et al., 2006), certains auteurs rapportant même une diminution de l'état anxieux après l'exposition à un stress chronique (Rossler et al., 2000). Par ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence de troubles anxieux majeur chez les animaux âgés de 20 mois ayant suivi le protocole de SCLI comparativement à des animaux de même âge *contrôles*. Cependant, ceci peut en partie être expliqué par l'augmentation de l'anxiété chez les animaux âgés (Beekman et al., 1998) qui viendrait alors masquer l'impact potentiel du SCLI.

Les troubles de la mémoire de travail se distinguent également par une émergence différentielle en fonction de l'âge d'exposition au stress chronique. En effet, des animaux *SCLI* adulte de 6 à 10 mois ne témoignent d'aucune perturbation concernant la mémoire de



travail. Cette atteinte n'apparaît qu'à partir de l'âge de 12 mois chez des animaux exposés au SCLI, un âge où les animaux *contrôles* montrent toujours de bonnes performances.

**Figure 61 : Schéma hypothétique de l'émergence des troubles de mémoire de travail liés au stress chronique en fonction de l'âge**

L'évolution des troubles de la mémoire de travail en fonction de l'âge est présentée chez des animaux contrôles (bleu) et des animaux stressés (rouge). Une phase de résistance au stress chronique semble être présente jusqu'à 10 mois (zone verte). Une atteinte naturelle, liée à un phénomène de vieillissement normal, apparaît par la suite entre 12 et 14 mois, et se manifeste principalement à 20 mois (zone orange).

L'absence de déficit chez les animaux stressés plus jeunes pourrait résulter de la facilité du test

d'alternance spontanée utilisé, du fait d'ITI relativement courts (30 secondes). Un déficit de mémoire de travail aurait pu être révélé par des ITI plus longs. En effet, des travaux réalisés dans notre équipe ont montré une altération de la mémoire de travail chez des animaux *SCLI* adultes de 10 mois, lors d'une tâche d'alternance avec un ITI de 90 secondes. Le schéma hypothétique présenté dans la figure 61 présente donc des limites inhérentes au protocole employé. A un âge plus avancé (i.e. 20 mois), les performances des animaux *SCLI* sont

perturbées. Cependant, les animaux du groupe *contrôle* présentent des performances également altérées, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature montrant que le vieillissement altère la mémoire de travail (Salthouse, 1990). De plus, les performances de mémoire de travail, évaluées dans un test d'alternance séquentielle en T-maze avec des intervalles courts, sont tributaires en grande partie de l'activité du cortex préfrontal (Goldman-Rakic, 1995), activité impactée tant par le vieillissement normal (McEvoy et al., 2001; Rypma et al., 2001; Vandesquille et al., 2013) que par la dépression majeure (Drevets and Price, 2005). Il est donc tout à fait possible que les altérations liées au vieillissement viennent masquer celles produites par le stress chronique lorsque le stress survient après l'âge de 12 mois.

Enfin, contrairement aux résultats de la littérature (Willner et al., 1992a; Strekalova et al., 2004; Willner, 2005), nous n'avons pas pu constater d'anhédonie induite par l'exposition au SCLI. Les animaux âgés de 6 à 10 mois, quel que soit leur groupe d'appartenance ont tous présenté une préférence pour le saccharose. Une telle observation a déjà été rapportée dans des études démontrant la surconsommation de solutions à fort caractère renforçant et énergétiques chez des sujets stressés (Torres and Nowson, 2007) pouvant expliquer les cas d'obésité liés au stress (Dallman et al., 2003). Si tel est le cas, l'évaluation réalisée dans notre étude n'a pas permis d'évaluer l'anhédonie. D'autres auteurs proposent de substituer ce test par l'utilisation de situations opérantes (nécessitant un effort) pour consommer un aliment appéte (Isingrini et al., 2010). De façon surprenante, les animaux de nos groupes *contrôles* de 12 et 14 mois n'ont pas présenté de préférence pour le saccharose (consommation au hasard : 50%). Il semblerait qu'une anhédonie se soit alors développée avec le vieillissement comme l'a récemment rapporté Malatynska et al., (2012). Si une anhédonie se met en place avec le vieillissement et que le stress chronique entraîne une élévation des consommations de produits renforçants, il est peut-être envisageable d'imaginer qu'un système de compensation se mette en place chez ces animaux pour contrebalancer les effets délétères du stress.

Pour finir, la correspondance des déficits évalués chez les animaux adultes stressés et les animaux âgés *contrôles* suggère qu'un vieillissement accéléré pourrait être induit par l'exposition au stress chronique. Ce phénomène a déjà été proposé à différents niveaux : cellulaire (Kerr et al., 1991; Wolkowitz et al., 2010), immunitaire (Bauer, 2008), ou encore neurodégénératif (Sapolsky, 1999). Le stress chronique pourrait alors être employé afin de mimer certaines modifications émergentes par le vieillissement et servir ainsi de modèle de

vieillessement accéléré. Cependant, les corrélations et la mise en relations des différents troubles présentent des disparités entre les animaux adultes de 12 mois et les animaux âgés. Ce modèle de « vieillissement accéléré » est alors restrictif à un modèle purement symptomatologique.

En résumé, les résultats de ce premier chapitre ont permis de répondre à l'hypothèse suggérant qu'il existe un gradient d'émergence des symptômes liés à un stress chronique. En effet, malgré l'émergence constante de certains troubles comme les troubles de type dépressifs, les altérations somatiques et l'hypercorticostéronémie, certains symptômes apparaissent de manière plus sporadique. C'est principalement le cas des troubles anxieux qui sont présents chez des adultes jeunes et chez des adultes d'âge avancé, et des troubles cognitifs qui n'émergent qu'au-delà de 12 mois. La comparaison des symptômes de sujets adultes stressés et de sujets âgés a également permis de mettre en évidence une concordance de profils comportementaux qui confortent l'hypothèse selon laquelle le stress chronique chez l'adulte précipite l'émergence de troubles normalement liés au vieillissement.



**Chapitre II : Le Stress Chronique rencontré à  
l'âge adulte entraine des perturbations  
comportementales à long terme et influence  
les mécanismes épigénétiques**



## Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons pu montrer que le stress chronique rencontré à l'âge adulte entraînait l'émergence de différents troubles liés à la dépression, immédiatement après sa survenue mais que cette émergence était fortement dépendante de l'âge des individus. Le fort risque de rechute (Frank and Thase, 1999) et la sensibilité mise en place après un premier épisode dépressif (Burcusa and Iacono, 2007) laissent alors entrevoir une possible persistance de ces troubles à long terme, voire leur récurrence.

La persistance à long terme ou la récurrence de troubles liés à un stress chez l'enfant a été démontrée à la fois chez l'Homme (Hammar et al., 2003b) et chez l'animal, tant au niveau comportemental (Maccari et al., 2003; Sterlemann et al., 2008; Weinstock, 2008) que neurobiologique (Onishchenko et al., 2008). Aujourd'hui, de nombreuses études montrent l'importance que le stress peut avoir lorsque qu'il a lieu chez des sujets très jeunes (Bourke and Neigh, 2012) ou adolescents (Sterlemann et al., 2008; Bourke and Neigh, 2011). Ainsi, des études ont démontré que des troubles anxio-dépressifs chez l'adulte pouvaient être la conséquence d'un stress subi pendant l'enfance (Kalinichev et al., 2002a; Kalinichev et al., 2002b; Putnam, 2003) ou l'adolescence (Kandel and Davies, 1986; Pine et al., 1999). Au plan neurobiologique, ceci se traduit par des altérations de la neurogénèse (Lajud and Torner, 2015), des modifications d'activité de l'axe HPA (Clarke et al., 1994; Maccari et al., 2003) ou encore des modifications épigénétiques durables (Benoit et al., 2015). Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la persistance à long terme de troubles liés au stress chez l'adulte et aux conséquences que cela peut avoir chez le sujet âgé. Nous avons alors fait l'hypothèse selon laquelle **le stress chronique chez la souris adulte entraîne des troubles persistants et/ou récurrents à long terme chez le sujet âgé.**

Des marques épigénétiques sur des gènes sont également présentes chez l'animal souffrant de troubles de type dépressif et sont associées à une modification ciblée et durable de certains comportements. Ces changements qui affectent l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN sont principalement impliqués dans la plasticité neuronale et interfèrent avec le fonctionnement des systèmes régulant la réponse au stress (McEwen et al., 2012). Des études ont ainsi démontré qu'une augmentation des niveaux de méthylation dans la région promotrice du gène codant pour les récepteurs GR dans l'HPC de rats dont les soins maternels ont été limités participaient à l'émergence de troubles de type dépressif

(Meaney, 2001; McGowan et al., 2011). En gardant à l'esprit le caractère durable de ces modifications de méthylation qui ont pour conséquence une baisse de l'expression du GR qui se maintient dans le temps, ces marques épigénétiques apparaissent comme de bons candidats dans la compréhension de l'émergence de troubles liés au SCLI et à la dépression. Nous avons alors initié une étude, présentée dans ce chapitre mais qui reste encore à un stade préliminaire, basée sur l'hypothèse selon laquelle, **il existe des marques épigénétiques liées au stress chronique subi à l'âge adulte et associées à la persistance de troubles comportementaux chez le sujet âgé.**

Afin de répondre à ces deux hypothèses, nous avons à nouveau testé les animaux ayant subi ou non un stress chronique à différentes périodes de leur vie d'adulte (Chapitre I) lorsque ces derniers avaient atteint l'âge de 18 mois. Les perturbations à long terme engendrées par le stress chronique ont alors été évaluées concernant les atteintes émotionnelles persistantes (ou récurrentes) ainsi que les troubles de la mémoire spatiale (HPC dépendante) ou de la mémoire associative (striatum dépendante). Et pour terminer, une expérience préliminaire visait à déterminer l'existence de marques de répression transcriptionnelle à long-terme après un protocole de SCLI à l'âge adulte.

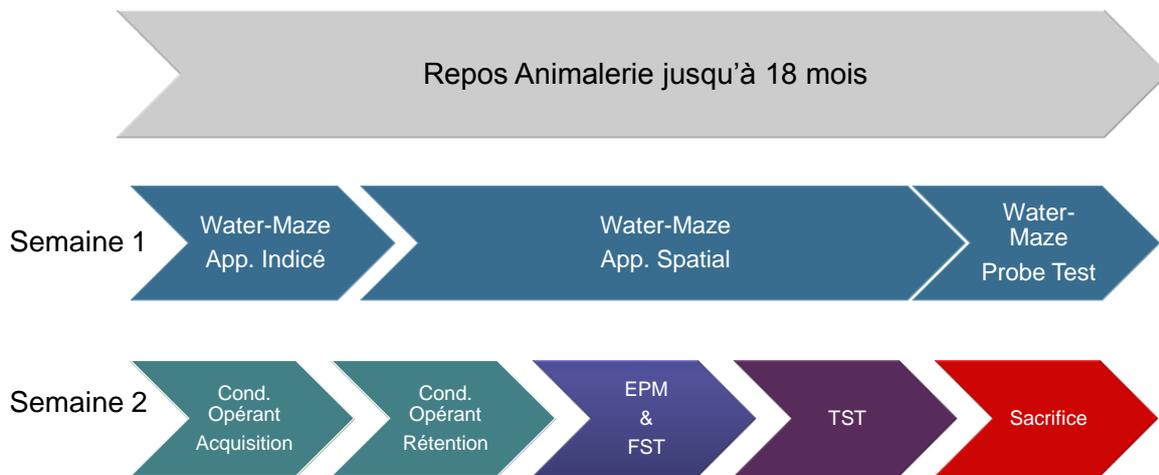
## Méthodologie

**Tableau 11 : Répartition des animaux pour l'étude comportementale en fonction de l'âge auquel est survenu le stress chronique**

Age au stress	4-6 mois		6-8 mois		8-10 mois		10-12 mois		12-14 mois	
Condition	NS	SCLI	NS	SCLI	NS	SCLI	NS	SCLI	NS	SCLI
Nombre	10	9	8	10	10	10	10	9	9	10

Dans ce second chapitre, nous avons travaillé avec les mêmes animaux que précédemment (excepté le groupe de 18-20 mois) qui ont atteint l'âge de 18 mois. Suite au protocole de SCLI et à l'évaluation comportementale, présentée dans le premier chapitre, toutes les souris ont été maintenues et élevées dans les conditions standards de l'animalerie. Le tableau 11 indique les effectifs des différents groupes d'animaux âgés de 18 mois en fonction de leur âge au moment du SCLI. Nous avons évalué le statut cognitif et l'état émotionnel chez ces sujets âgés par une série de tests comportementaux dont la chronologie est présentée par la figure 62. Suite à ces évaluations comportementales, les animaux ont été

sacrifiés afin de réaliser une analyse des modifications épigénétiques. Au moment du sacrifice, le sang des animaux a été prélevé afin de réaliser un dosage de la CORT plasmatique par une technique ELISA.



**Figure 62 : Chronologie expérimentale des évaluations réalisées à long terme**

Durant la semaine 1, l'apprentissage indicé en Water-Maze s'est déroulé sur 1 jour, l'apprentissage spatial sur 5 jours et l'essai test a eu lieu 1 heure après la fin de l'apprentissage spatial. Chaque flèche de la semaine 2 correspond à une journée : E.P.M. : Elevated Plus Maze ; FST : Nage Forcée de Porsolt ; T.S.T. : Tail Suspension Test. Le sacrifice a été réalisé le lendemain des dernières évaluations comportementales, entre 8h et 12h.

Les paramètres comportementaux ont par la suite été normalisés par le calcul d'un z-score (comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes » de ce manuscrit. Cette normalisation a permis de réaliser une étude de corrélation entre les différents symptômes présents chez les sujets âgés.

Les modifications de la triméthylation de l'Histone H3 en lysine 27 (H3K27Me3) à long terme, engendrées par un SCLI, ont ainsi pu être mises en évidence. L'étude de ces modifications étant encore à un stade préliminaire, les effectifs présentés (Tableau 12) sont plus faibles que ceux de l'étude comportementale. Les résultats immunohistochimiques présentés dans ce manuscrit sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux mesures réalisées sur des cerveaux d'animaux de 18 mois naïfs (n'ayant été soumis à aucune expérimentation ou manipulation autres que celles nécessaires à leur élevage).

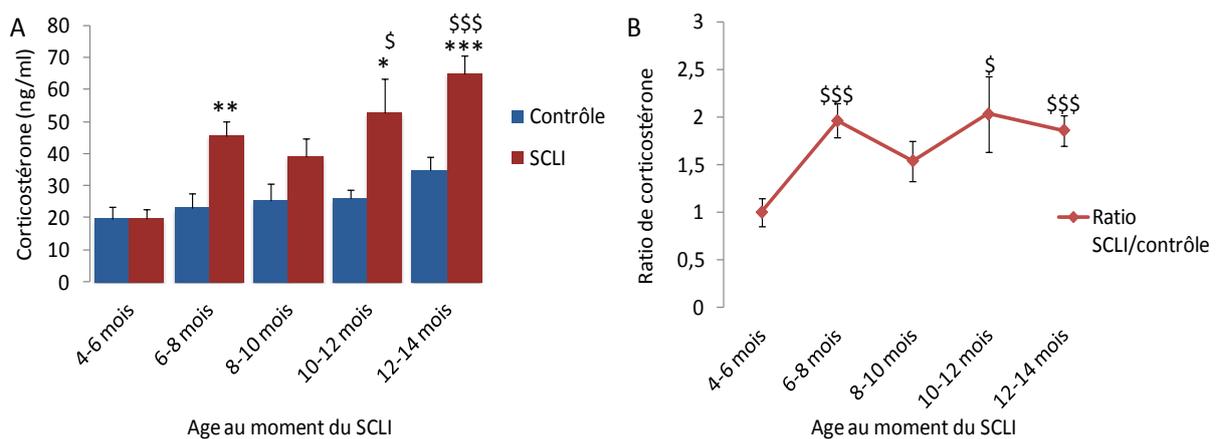
**Tableau 12 : Répartition des animaux pour l'étude épigénétique en fonction de l'âge auquel est survenu le stress chronique**

Age au stress	18 mois	4-6 mois		6-8 mois		8-10 mois		10-12 mois	
Condition	Naïfs	NS	SCLI	NS	SCLI	NS	SCLI	NS	SCLI
Nombre	2	6	3	3	4	2	4	3	5

## Résultats expérimentaux

### 1. Le SCLI chez l'adulte entraîne une persistance de troubles émotionnels chez le sujet âgé.

#### a. Dosage de corticostérone



**Figure 63 : Activité basale de l'axe HPA sur la corticostérone plasmatique chez des animaux âgés de 18 mois en fonction de leur condition de SCLI et de leur âge au moment du SCLI**

Le SCLI survenu à l'âge entraîne une augmentation des taux de CORT à long terme chez le sujet âgé. A : Concentrations plasmatiques en ng/ml chez des animaux âgés en fonction du SCLI et de l'âge auquel le SCLI est survenu ; B : Ratio des taux de corticostérone d'animaux SCLI relativement aux animaux contrôles de la même tranche d'âge ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; effet SCLI : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; effet âge au moment du SCLI par rapport au groupe 4-6 mois : \$ $p < 0,05$  ; \$\$ $p < 0,01$  ; \$\$\$ $p < 0,001$ .

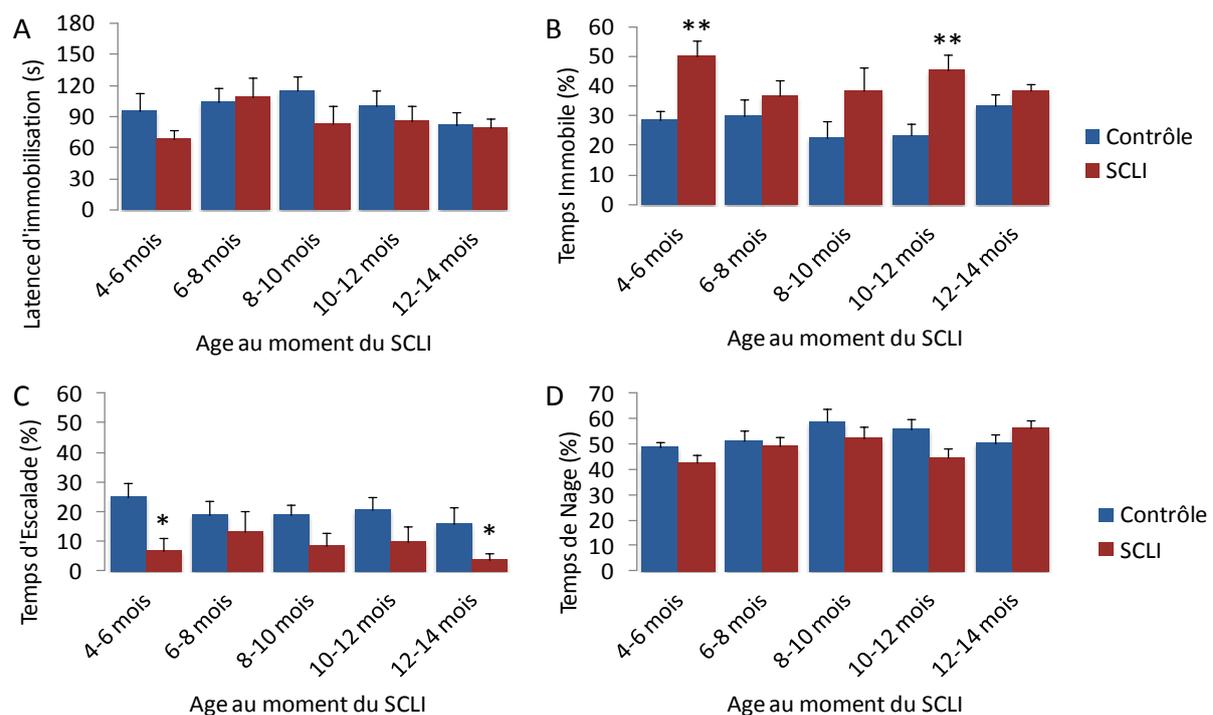
La figure 63A montre les concentrations plasmatiques en CORT chez les animaux âgés de 18 mois en fonction de l'âge auquel le SCLI est survenu. Les analyses réalisées sur ces données témoignent d'un impact à la fois du SCLI (ANOVA :  $F_{(1;85)}=30,537$  ;  $p < 0,0001$ ), de l'âge au moment du SCLI (ANOVA :  $F_{(4;85)}=8,536$  ;  $p < 0,0001$ ) et d'une interaction entre les facteurs (ANOVA :  $F_{(4;85)}=2,5$  ;  $p=0,04$ ). Des tests F de Scheffe indiquent que l'effet du SCLI est principalement dû à des taux de CORT supérieurs chez les animaux exposés au

stress à l'âge de 6-8 mois, 10-12 mois et 12-14 mois ( $p < 0,019$ ). L'effet de l'âge au moment du SCLI est quant à lui dû à des concentrations de CORT significativement plus élevées chez les animaux ayant suivi le protocole de stress à 10-12 mois ( $p = 0,018$ ) et à 12-14 mois ( $p = 0,0003$ ) comparativement aux adultes stressés à 4-6 mois. L'évaluation des ratios (figure 63B) de concentration de CORT chez les animaux SCLI par rapport à leurs contrôles respectifs indique un effet de l'âge ( $F_{(4;43)} = 3,04$  ;  $p = 0,02$ ). La comparaison des moyennes *a posteriori* indique des différences significatives entre le groupe d'animaux stressés à 4-6 mois et les groupes stressés à 6-8 mois ( $p = 0,001$ ), 10-12 ( $p = 0,029$ ) et 12-14 mois ( $p = 0,001$ ).

Ces données indiquent un maintien à long terme, chez le sujet âgé de 18 mois, d'un taux de CORT basale élevé chez les animaux ayant suivi le SCLI à partir de l'âge de 6 mois.

### b. Evaluations des troubles de type dépressif

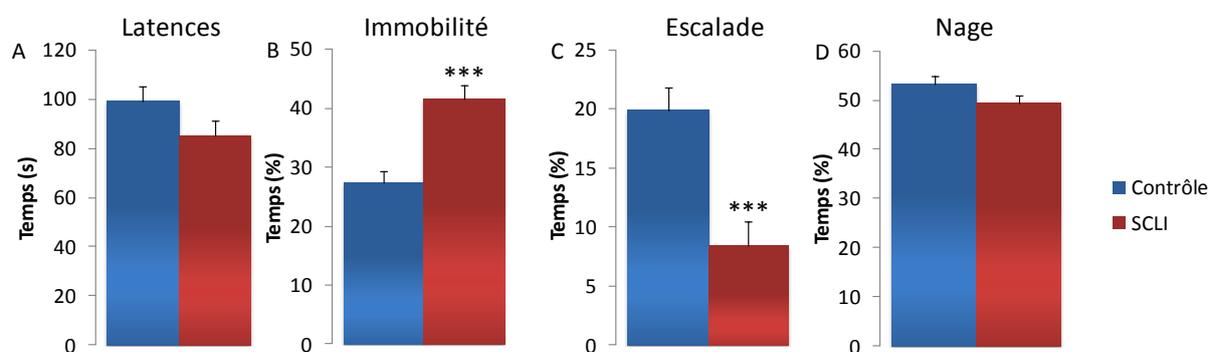
#### Nage Forcée de Porsolt



**Figure 64 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris âgée en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI dans un test de Nage Forcée de Porsolt**

Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié à l'aveugle sur plusieurs paramètres, puis exprimé en pourcentage de temps sur les 4 premières minutes du test. A : Latence d'immobilisation en secondes dans le test ; B : Temps Immobile ; C : Temps d'Escalade, D : Temps de Nage, Le SCLI survenu chez l'adulte entraîne des répercussions à long terme de type dépressif chez le sujet ayant été stressé jeune adulte ou adulte d'âge avancé ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$

L'ANOVA menée sur la latence d'immobilisation (figure 64A) ne révèle aucun effet significatif provenant du *SCLI*, ni de l'âge au moment du *SCLI* ou de l'interaction entre ces 2 facteurs ( $F_{(1;83)}=2,378$  ;  $p=0,1268$  ;  $F_{(4;83)}=1,198$  ;  $p=0,3177$  et  $F_{(4;83)}=0,64$  ;  $p=0,63$  respectivement). Le pourcentage de temps passé immobile (figure 64B) sur les 4 premières minutes du test montre cependant un effet significatif du *SCLI* (ANOVA :  $F_{(1;83)}=21,35$  ;  $p<0,0001$ ) mais pas de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;83)}=0,907$  ;  $p=0,4638$ ), ni d'interaction entre ces facteurs ( $F_{(4;83)}=1,3$  ;  $p=0,26$ ). Cette significativité liée au *SCLI* se caractérise par un temps immobile significativement supérieur chez les animaux *SCLI* ayant suivi le protocole de stress aux âges de 4-6 mois et 10-12 mois (F de Scheffe :  $p=0,0021$  et  $p=0,0031$  respectivement) comparativement à leurs homologues *contrôles*. Les résultats concernant le temps passé à escalader la paroi (figure 64C) présentent également un effet *SCLI* ( $F_{(1;83)}=14,54$  ;  $p=0,0003$ ) mais sans effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;83)}=0,619$  ;  $p=0,6501$ ) ni d'interaction entre les deux facteurs ( $F_{(4;83)}=0,41$  ;  $p=0,79$ ). Cet effet *SCLI* se traduit par des temps à escalader la paroi globalement réduits de manière significative chez les animaux âgés de 4-6 mois (Scheffe :  $p=0,0152$ ) et 12-14 mois (Scheffe :  $p=0,049$ ). Pour terminer, le pourcentage de temps passé à nager ne présente pas d'effet *SCLI*, ni d'effet de l'âge au moment du *SCLI* et de l'interaction des facteurs (ANOVA :  $F_{(1;83)}=2,018$  ;  $p=0,0993$  ,  $F_{(4;83)}=2,846$  ;  $p=0,0954$  et  $F_{(4;83)}=1,5$  ;  $p=0,19$  respectivement).

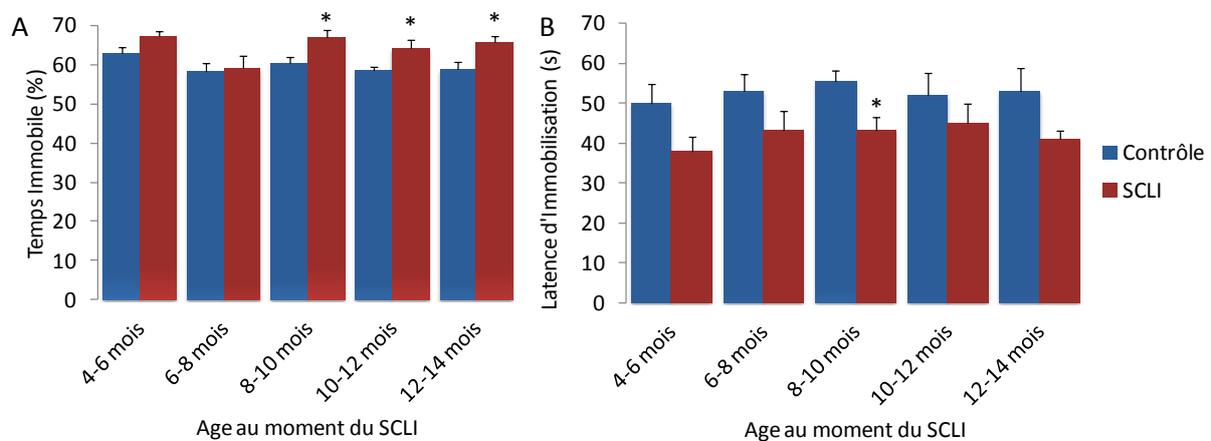


**Figure 65 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés dans le test de Nage Forcée de Porsolt chez la souris âgée**

Les résultats présentés dans cette figure illustrent les effets globaux du SCLI, sans tenir compte de l'âge auquel les animaux ont subi le SCLI. A : Latence d'immobilisation en secondes dans le test ; B : Temps Immobile ; C : Temps d'Escalade, D : Temps de Nage, en pourcentage sur les 4 premières minutes du test. Le SCLI survenu chez l'adulte influence donc principalement l'immobilité et l'escalade chez les sujets âgés : Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$

Globalement, le stress chronique chez l'adulte entraîne des perturbations de l'état de type dépressif chez le sujet âgé indépendamment de l'âge d'occurrence du stress (figure 65). Quelques divergences comportementales en fonction de l'âge adulte auquel les animaux ont suivi le protocole de SCLI sont tout de même présentes. En effet, l'immobilité et le renoncement au comportement de fuite persistent essentiellement chez les sujets âgés ayant été stressés sur une période d'âge adulte jeune ou d'âge adulte avancé.

### Tail suspension test

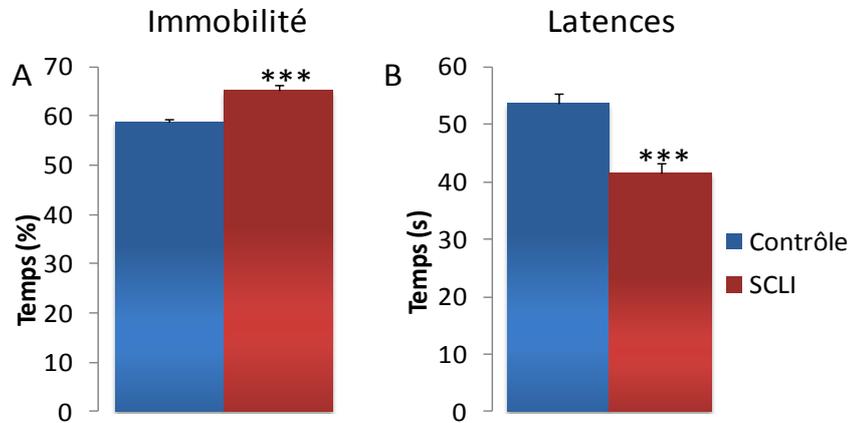


**Figure 66 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris âgée en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI dans un test de TST**

Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié à l'aveugle chez des souris âgées de 18 mois ayant été stressées durant leur vie d'adulte. A : Temps immobile (en pourcentage) pendant le test ; B : Latence d'immobilisation (en secondes) dans le test. Le SCLI survenu à l'âge adulte entraîne le maintien de troubles de type dépressif lorsqu'il a eu lieu après l'âge de 8 mois. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p < 0.05$

La figure 66 montre les résultats concernant le pourcentage de temps passé immobile (A) et la latence d'immobilisation (B) dans le TST chez des animaux âgés de 18 mois, ayant suivi un protocole de SCLI à différents âges adultes. Les analyses du temps passé immobile montrent un effet significatif du *SCLI* ( $F_{(1;85)}=15,369$  ;  $p=0,0002$ ) ainsi qu'un effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;85)}=2,876$  ;  $p=0,0276$ ) sans interaction des facteurs ( $F_{(4;85)}=0,71$  ;  $p=0,58$ ). L'effet du *SCLI* est en réalité le reflet d'une immobilité accrue chez les animaux ayant suivi le SCLI entre 8 et 14 mois ( $p < 0,04$ ). Malgré un effet de l'âge au moment du *SCLI*, aucune significativité n'est finalement révélée par les analyses *post-hoc*. L'ANOVA menée sur les latences indique un effet du *SCLI* ( $F_{(1;85)}= 14,162$  ;  $p=0,0003$ ) mais pas d'effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;85)}=0,448$ ;  $p=0,7748$ ) ni d'interaction ( $F_{(4;85)}=0,09$  ;  $p=0,98$ ). Malgré

un effet global du *SCLI*, seul les animaux ayant suivi le protocole à l'âge de 8-10 mois présente une latence d'immobilisation plus faible que leurs homologues *contrôles* (Scheffe :  $p=0,011$ ).



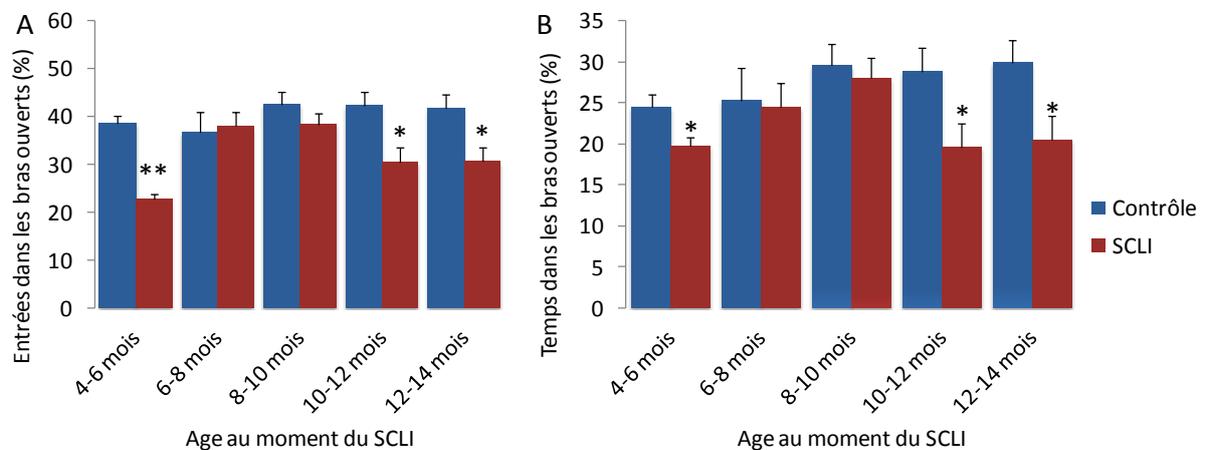
**Figure 67 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés lors d'un test de TST chez la souris âgée**

Les résultats présentés dans cette figure illustrent l'effet global du SCLI, sans tenir compte de l'âge auquel les animaux ont subi le SCLI. A : Temps immobile (en pourcentage) pendant le test ; B : Latence d'immobilisation (en secondes) dans le test. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \*\*\* $p<0.001$

Globalement, les résultats obtenus dans ce test confirment la persistance de troubles dépressifs chez le sujet âgé ayant été stressé à l'âge adulte (figure 67), avec, cependant, une persistance plus marquée lorsque le stress chronique a été subi à partir de l'âge de 8 mois.

c. Evaluation des troubles de type anxieux

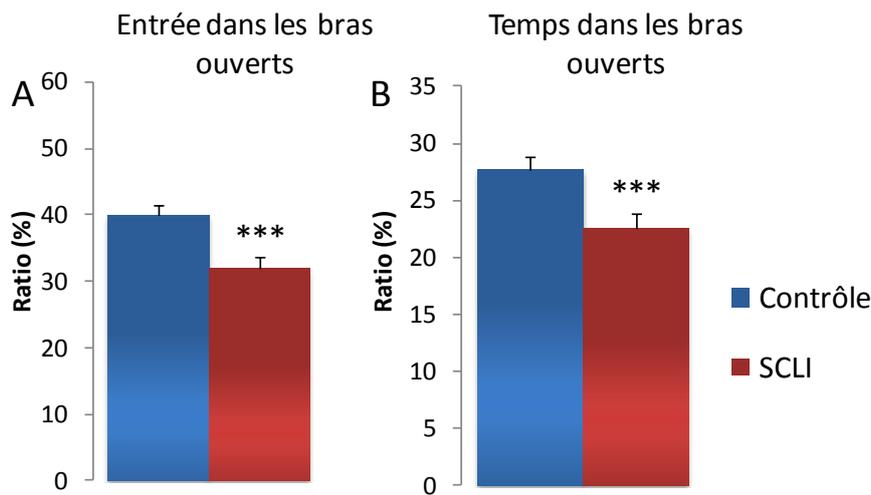
Labyrinthe en croix surélevé



**Figure 68 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris âgée dans un Labyrinthe en Croix Surélevé**

Le comportement des animaux a été enregistré par un système de vidéotracking permettant la récupération de plusieurs paramètres : A : Ratio du nombre d'entrées dans les bras ouverts par rapport aux bras fermés (en pourcentage). B : Ratio du temps passé dans les bras ouverts par rapport aux bras fermés (en pourcentage). Le SCLI survenu à l'âge adulte entraîne des comportements de type anxieux chez les animaux ayant été stressés jeunes adultes et adultes d'âge avancé : Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$

Les résultats obtenus en EPM (figure 68) montrent un effet *SCLI* significatif sur le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts (ANOVA :  $F_{(1;84)}=13,229$  ;  $p=0,0005$ ) sans effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;84)}=1,87$  ;  $p=0,12$ ) ni de l'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;84)}=1,72$  ;  $p=0,15$ ). Les analyses *post-hoc* révèlent que cela est dû à la diminution du taux d'entrées dans les bras ouverts de la part des animaux ayant suivi le *SCLI* aux âges de 4-6, 10-12 et 12-14 mois comparativement aux animaux *contrôles* du même groupe ( $p < 0,048$ ). Le temps passé dans les bras ouverts présente également un effet *SCLI* (ANOVA :  $F_{(1;84)}=8,935$  ;  $p=0,0037$ ) sans effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;84)}=1,62$  ;  $p=0,17$ ) ni d'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;84)}=1,13$  ;  $p=0,34$ ). Cet effet est également dû à une diminution significative du temps passé dans les bras ouverts de la part des animaux ayant suivi le *SCLI* à l'âge de 4-6, 10-12 et 12-14 mois ( $p < 0,0354$ ).



**Figure 69 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés dans un test en Labyrinthe en Croix Surélevé chez la souris âgée**

Les résultats présentés dans cette figure illustrent l'effet global du SCLI, sans tenir compte de l'âge auquel les animaux ont subi le SCLI. A : Ratio du nombre d'entrées dans les bras ouverts par rapport aux bras fermés (en pourcentage). B : Ratio du temps passé dans les bras ouverts par rapport aux bras fermés (en pourcentage). Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI \*\*\* $p < 0.001$

Globalement, les résultats de ce test indiquent la persistance de troubles de type anxieux chez des animaux ayant suivi le SCLI à l'âge adulte (figure 69), avec des effets plus marqués chez les animaux ayant suivi le SCLI à des âges adultes jeunes (4-6 mois) et à des âges adultes plus avancés (10-12 et 12-14 mois).

#### d. Conclusion

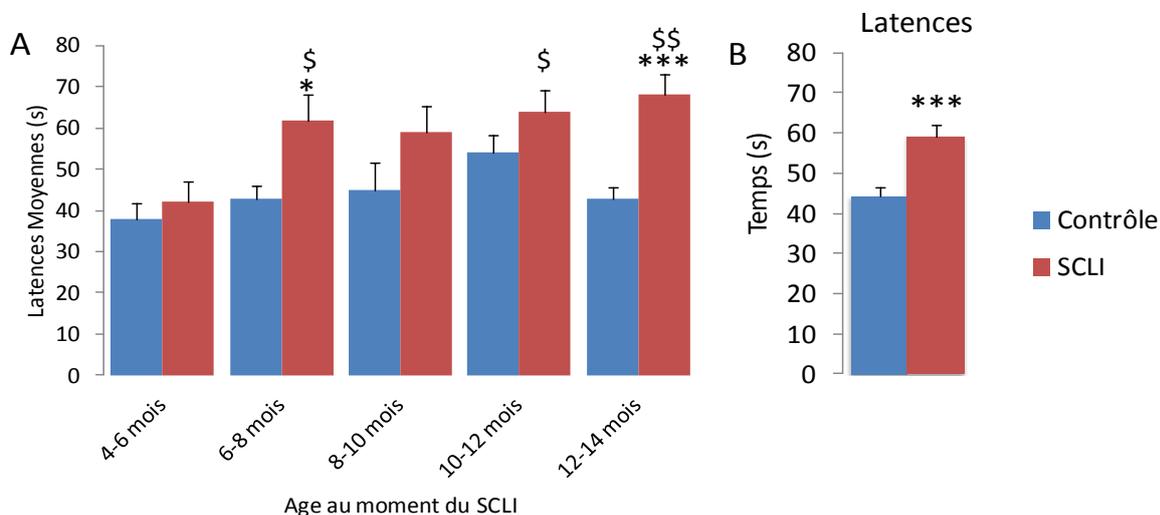
Dans cette première partie, nous avons pu constater que le SCLI subi à l'âge adulte avait des répercussions à long terme sur l'état émotionnel des sujets âgés. Les troubles de type anxio-dépressif sont plus particulièrement présents chez les animaux ayant suivi le SCLI jeunes (4-6 mois) et chez les animaux l'ayant suivi plus tardivement (10-12 et 12-14 mois). L'augmentation de concentration de CORT plasmatique persiste également mais ne suit pas le même modèle puisqu'elle est présente chez tous les sujets âgés ayant été stressés à partir de 6-8 mois.

## 2. Le SCLI chez l'adulte altère l'acquisition d'une carte spatiale et affecte la mémoire associative

### a. Evaluations mnésiques en piscine de Morris

#### Apprentissage associatif

L'ANOVA conduite sur les latences indique un effet significatif de la mesure répétée ( $F_{(5;405)}=19.58$  ;  $p<0,0001$ ) témoignant d'un apprentissage au fil des essais. En revanche, l'ANOVA réalisée sur les latences moyennes pour rejoindre la plateforme (figure 70) indique un effet *SCLI* et un effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(1;81)}=19,75$  ;  $p<0,0001$  et  $F_{(4;81)}=3,684$  ;  $p=0,0083$  respectivement) sans interaction des deux facteurs ( $F_{(4;84)}=1,1$  ;  $p=0,35$ ). L'effet *SCLI* est dû à des latences pour rejoindre la plateforme significativement plus longues chez les animaux ayant suivi le *SCLI* à l'âge de 6-8 mois et 12-14 mois comparativement à leurs homologues *contrôles* (Scheffe :  $p= 0,03$  et  $p=0,0008$  respectivement). L'effet de l'âge au moment du *SCLI* est quant à lui attribuable aux latences plus longues chez les animaux ayant été stressés à 6-8 mois, 10-12 et 12-14 mois ( $p<0,032$ ) comparativement aux animaux stressés à 4-6 mois. Globalement, le *SCLI* perturbe donc l'apprentissage associatif en water-maze (figure 70B).



**Figure 70 : Latences moyennes à rejoindre la plateforme sur les 6 essais de l'apprentissage indicé chez des animaux âgés de 18 mois, en fonction leur condition de SCLI et de l'âge d'occurrence du SCLI**

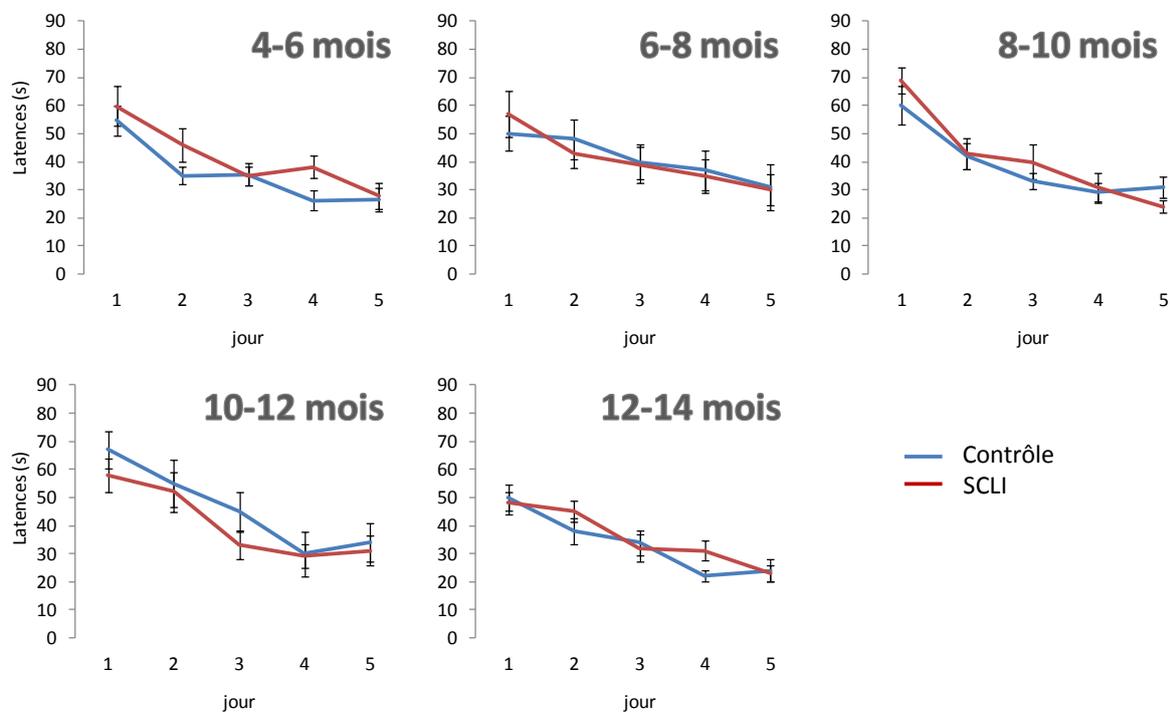
A : Latences moyennes à rejoindre la plateforme chez les 5

classes d'âges stressées ; B : Effet global du SCLI, indépendamment de l'âge d'occurrence du SCLI. Le SCLI à l'âge adulte entraîne des perturbations de l'apprentissage associatif en water-maze chez les sujets âgés lorsqu'il est survenu après l'âge de 6 mois. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p<0.05$  ; \*\* $p<0.01$  ; \*\*\* $p<0.001$  ; effet de l'âge au moment du *SCLI* \$ $p<0.05$  ; \$\$ $p<0.01$ .

Les vitesses de nage ont également été analysées (données non illustrées). Aucun effet significatif n'émerge concernant le facteur *SCLI* (ANOVA :  $F_{(1;81)}=1,28$  ;  $p=0,2611$ ). Seul un effet significatif apparaît pour le facteur *âge au moment du SCLI* (ANOVA :  $F_{(4;81)}=2,65$  ;  $p=0,038$ ). Cet effet est dû à des vitesses moyennes plus élevées chez les animaux du groupe d'âge 12-14 mois mais ceci qu'ils aient été stressés ou non.

L'ensemble de ces données indique une atteinte de l'apprentissage associatif chez des animaux âgés ayant subi un SCLI à l'âge adulte, avec des altérations plus importante lorsque les animaux ont été stressés après l'âge de 6 mois et plus particulièrement, à un âge adulte avancé.

### Apprentissage spatial

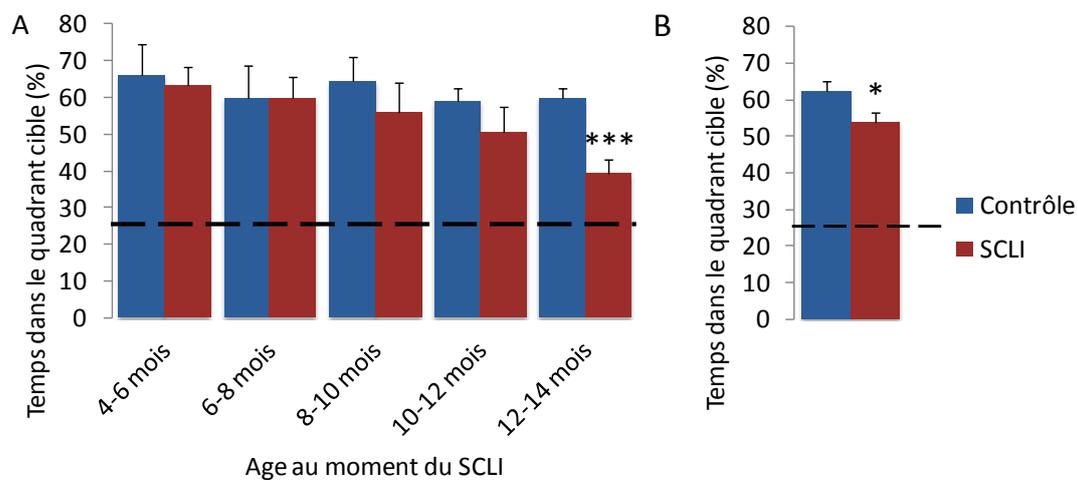


**Figure 71 : Acquisition de l'information spatiale au cours des 5 jours d'apprentissage chez des animaux âgés de 18 mois ayant suivi un protocole de SCLI à différents âges adultes**

Les latences moyennes des 6 essais réalisés au cours d'une journée sont présentées en fonction de la condition de SCLI et de l'âge d'occurrence du SCLI. Les animaux parviennent à retrouver la plateforme de plus en plus rapidement au fil des jours d'acquisition, ce qui témoigne d'un apprentissage correct de la tâche. Les latences moyennes sont exprimées en secondes  $\pm$  s.e.m.

L'analyse en mesures répétées des latences moyennes de l'apprentissage spatial indique un effet *séance* ( $F_{(4;324)}=64,076$  ;  $p<0,0001$ ) qui se traduit par une diminution significative ( $p<0,0001$ ) des latences au fur et à mesure des jours d'apprentissage (figure 71).

Par contre, l'ANOVA sur les latences moyennes ne rapporte aucun effet du *SCLI* ( $F_{(1;81)}=0,563$  ;  $p=0,47$ ) ni de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;81)}=1,7$  ;  $p=0,14$ ) ou d'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;81)}=0,80$  ;  $p=0,52$ ). Les vitesses de nage ont également été analysées. Un effet de l'âge au moment du *SCLI* émerge de cette analyse (ANOVA :  $F_{(4;81)}=4,026$  ;  $p=0,005$ ) sans effet du *SCLI* ( $F_{(1;81)}=0,44$  ;  $p=0,5$ ) ni interaction entre les facteurs ( $F_{(4;81)}=1,06$  ;  $p=0,3$ ). Cet effet de l'âge au moment du *SCLI* se caractérise par des vitesses de nage inférieures chez les animaux du groupe 4-6 mois, et ce dès le deuxième jour d'apprentissage (Scheffe  $p<0,05$ ).

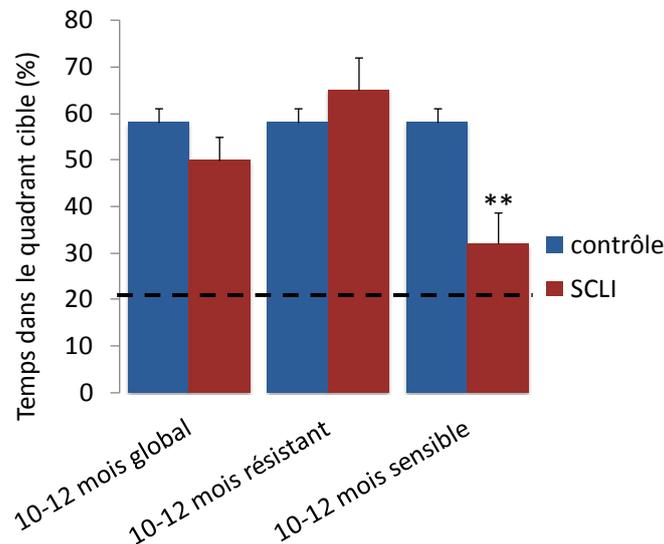


**Figure 72 : Evaluation de la précision mnésique d'information spatiale**

Les animaux âgés ayant suivi le SCLI sur différentes classes d'âge ont réalisé un essai-test 1h après la fin de l'acquisition spatiale afin d'évaluer la précision de l'information acquise. Cette évaluation a consisté en la quantification du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible sur les 30 premières secondes de l'essai-test en fonction de l'âge au moment du SCLI (A) et d'un point de vue global (B). Le SCLI chez l'adulte entraîne des perturbations à long terme lorsqu'il a eu lieu à 12-14 mois. Le hasard à 25% est représenté par la ligne en pointillés. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

La figure 72 montre les résultats obtenus pendant l'essai-test et l'ANOVA menée sur ces données indique un effet significatif du *SCLI* ( $F_{(1;81)}=3,986$  ;  $p=0,0492$ ) mais pas d'effet de l'âge au moment du *SCLI* ( $F_{(4;81)}=1,62$  ;  $p=0,17$ ) ni d'interaction des facteurs ( $F_{(4;81)}=0,68$  ;  $p=0,60$ ). L'effet *SCLI* est dû à une diminution du temps passé dans le quadrant cible chez des animaux ayant suivi le SCLI à l'âge de 12-14 mois comparativement à leurs homologues *contrôles* ( $p=0,0006$ ). Par ailleurs, une analyse plus détaillée sur le groupe de 10-12 mois, montre une variabilité importante dans les effets induits par un stress chronique chez l'adulte (figure 73). En effet, l'effectif des animaux ayant été stressés à 10-12 mois peut être scindé en deux sous-populations en fonction de leurs performances à l'essai-test. Une sous-

population présente une bonne cartographie spatiale (effet SCLI :  $F_{(1;12)}=1,3$  ;  $p=0,27$ ), et l'autre présente une cartographie altérée (effet SCLI :  $F_{(1;11)}=16,5$  ;  $p=0,0018$ ), semblable aux animaux ayant été stressés à 12-14 mois.



**Figure 73: Identification de 2 sous-populations chez des animaux âgés ayant été stressés à 10-12 mois**

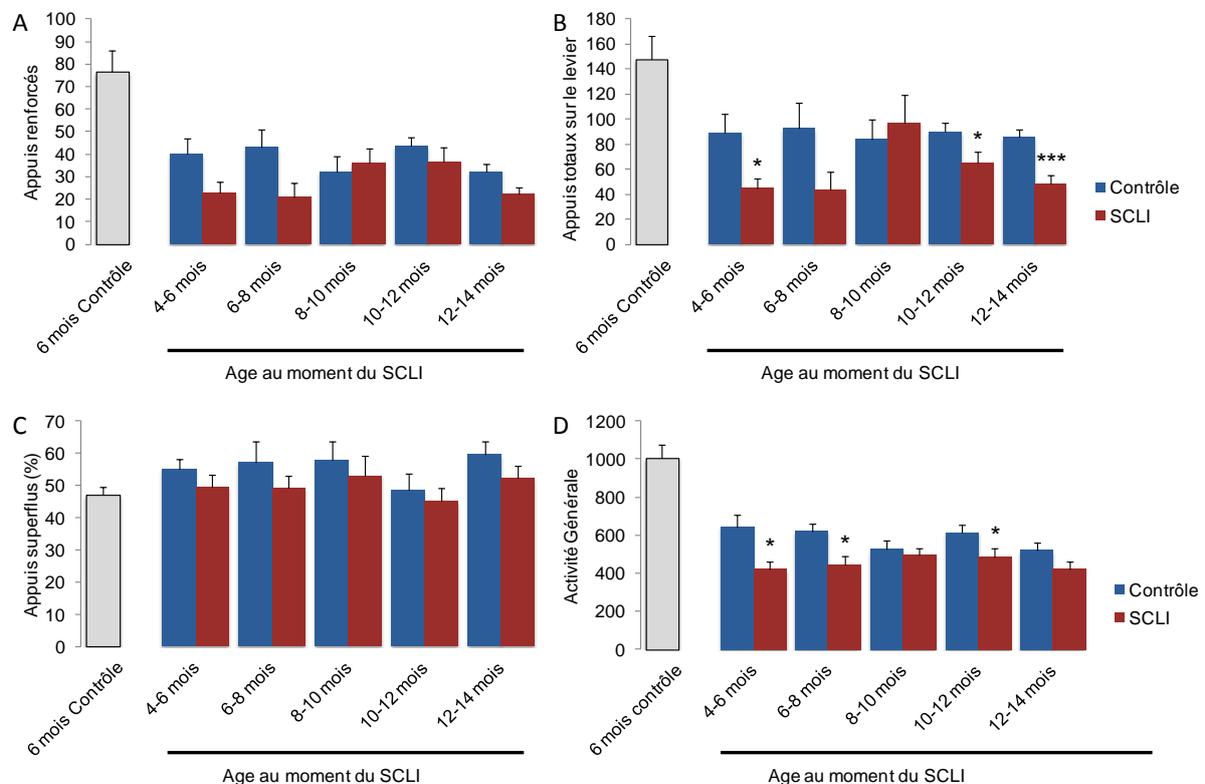
Parmi les animaux exposés au SCLI à 10-12 mois, une population résistante au SCLI est présente (N=5) ainsi qu'une population sensible au SCLI (N=4). Le hasard à 25% est représenté par la ligne en pointillés. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \*\* $p<0.01$

Globalement, l'acquisition d'informations spatiales chez le sujet âgé n'est pas affectée par l'exposition à un stress chronique à l'âge adulte. La connaissance spatiale acquise s'avère toutefois moins précise lorsque les animaux ont été stressés à un âge adulte avancé (à partir 10 mois).

b. Evaluation de la mémoire associative dans une tâche de conditionnement opérant

Le premier jour de l'apprentissage, la latence pour réaliser une série de 15 appuis renforcés à été quantifiée pour attester de la performance d'acquisition des animaux. L'ANOVA menée sur ces données ne révèle aucune différence sur les facteurs étudiés (SCLI :  $F_{(1;82)}=1,9$  ;  $p=0,16$  ; âge au moment du SCLI :  $F_{(4;82)}=2,2$  ;  $p=0,07$  ; interaction :  $F_{(4;82)}=0,49$  ;  $p=0,74$ ). L'activité générale de l'animal dans l'appareil n'a pas non plus démontré d'effet en fonction des 2 facteurs étudiés (SCLI :  $F_{(1;82)}=0,10$  ;  $p=0,74$  ; âge au moment du SCLI :  $F_{(4;82)}=0,605$  ;  $p=0,66$  ; interaction :  $F_{(4;82)}=0,25$  ;  $p=0,90$ ). Ces résultats (non illustrés

graphiquement) suggèrent qu'il n'y a pas de différences entre les différents groupes expérimentaux concernant l'acquisition de l'association levier-nourriture.

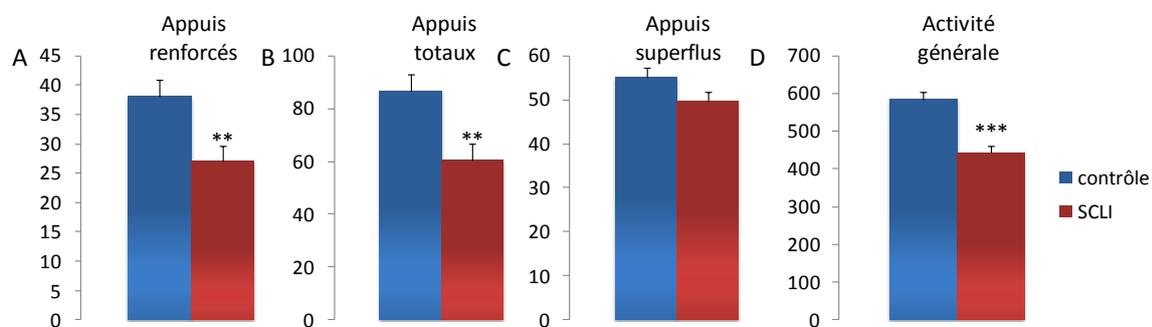


**Figure 74 : Réponses comportementales obtenues en rétention du conditionnement opérant en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI**

Un groupe complémentaire composé d'animaux âgés de 6 mois, non stressés, a également été évalué afin d'attester des modifications engendrées par le vieillissement sur les différents paramètres exploités. A : Appuis renforcés, permettant l'obtention d'une récompense ; B : Appuis totaux sur le levier (renforçant et non-renforçant) ; C : Appuis superflus ; D : Activité générale dans l'appareil (en u.a.). Le SCLI semble altérer les performances de mémoire associative chez des animaux âgés ayant été stressés jeunes adultes et adultes d'âge avancé. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Le deuxième jour, la rétention de la tâche a été évaluée et la figure 74 présente les résultats obtenus. Par ailleurs, les performances mesurées lors d'une expérience indépendante chez des animaux naïfs jeunes sont présentées à titre indicatif. Relativement à ce groupe, les résultats montrent une forte altération des performances chez l'ensemble des animaux âgés testés ( $p < 0,05$  sur les appuis renforcés, les appuis totaux et l'activité générale). L'ANOVA menée sur le nombre d'appuis renforcés (figure 74A) indique un effet SCLI significatif ( $F_{(1;82)}=7,9$  ;  $p=0,006$ ) sans effet de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(4;82)}=1,308$  ;  $p=0,2739$ ) ni d'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;82)}=1,34$  ;  $p=0,25$ ). Les analyses *post-hoc* indiquent un

effet global du SCLI ( $p=0,0073$ ) mais pas de différence particulière pour chacune des classes d'âge ( $p>0,05$ ). Les analyses menées sur les appuis totaux (figure 74B) montrent également un impact du SCLI ( $F_{(1;82)}=10,729$  ;  $p=0,0015$ ) sans effet de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(4;82)}=1,16$  ;  $p=0,33$ ) ni de l'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;82)}=1,7$  ;  $p=0,15$ ). Les tests de Scheffe ont néanmoins permis d'identifier plusieurs classes d'âge dont les groupes SCLI réalisent significativement moins d'appuis que les contrôles : 4-6 mois ( $p=0,021$ ) ; 10-12 mois ( $p=0,047$ ) et 12-14 ( $p=0,001$ ). Par contre, l'analyse du taux d'appuis superflus (figure 74C) ne révèle aucun effet significatif du SCLI ( $F_{(1;82)}=3,825$  ;  $p=0,0593$ ) ni de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(4;82)}=1,206$  ;  $p=0,3147$ ) ou de l'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;82)}=0,07$  ;  $p=0,99$ ), indiquant que la diminution des appuis totaux est liée à la diminution d'appuis opérants. L'analyse de l'activité générale (figure 74D), quant à elle, indique un effet significatif du SCLI ( $F_{(1;82)}=22,98$  ;  $p<0,0001$ ) mais pas de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(4;82)}=0,751$  ;  $p=0,56$ ) ni d'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;82)}=1,3$  ;  $p=0,26$ ). Les analyses *post-hoc* menées sur l'effet du SCLI indiquent une baisse d'activité significative chez les animaux ayant suivi le SCLI aux âges de 4-6 mois ( $p=0,014$ ), 6-8 mois ( $p=0,015$ ) et 10-12 mois ( $p=0,0162$ ). Les effets SCLI détectés sur l'ensemble des paramètres sont résumés dans la figure 75.



**Figure 75 : Effet global du SCLI sur les paramètres mesurés dans un apprentissage de conditionnement opérant**

Les résultats présentés dans cette figure illustrent les effets globaux du SCLI, sans tenir compte de l'âge auquel les animaux ont subi le SCLI A : Appuis renforcés, permettant l'obtention d'une récompense ; B : Appuis totaux sur le levier (renforçant et non-renforçant) ; C : Appuis superflus ; D : Activité générale dans l'appareil (en u.a.) ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \*\* $p<0.01$  ; \*\*\* $p<0.001$

Globalement, ces données indiquent l'altération des capacités d'apprentissage associatif chez des animaux âgés et confirment des altérations plus marquées chez ceux ayant

subi un protocole de SCLI à l'âge adulte. Cependant, cette atteinte est associée à une activité générale diminuée.

a. Conclusion

Dans cette deuxième partie, nous avons pu mettre en évidence que les performances d'apprentissage et de mémoire des animaux âgés étaient impactées par l'exposition à un stress chronique à l'âge adulte. Toutefois, l'impact varie de manière différentielle en fonction de l'âge d'occurrence du SCLI et du type d'informations acquises. Malgré l'absence d'effet pendant l'acquisition, la précision de la connaissance spatiale acquise est altérée chez les animaux ayant subi le SCLI à un âge adulte avancé. En revanche, les capacités d'apprentissage associatif simple (Stimulus-Réponse) sont globalement affectées chez tous les sujets ayant été stressés. Toutefois, les animaux sont davantage déficitaires dans l'apprentissage associatif réalisé dans le water maze lorsqu'ils ont été stressés à un âge adulte avancé alors que dans le test de conditionnement opérant, les sujets ayant été stressés à l'âge de 4-6 mois présentent des déficits plus marqués que ceux stressés à des âges plus avancés.

Corrélations entre les troubles chez les sujets âgés

L'ensemble des paramètres évalués a été normalisé par le calcul d'un z-score, permettant une analyse de corrélations. Les résultats sont résumés dans le tableau 13. Chez les sujets âgés, on retrouve une forte corrélation entre les troubles anxieux et dépressifs. Par contre, l'analyse indique principalement des corrélations de la corticostéronémie et de l'état anxieux avec troubles de l'apprentissage alors que chez les sujets adultes (Cf. chapitre I), la corticostéronémie et était fortement corrélée avec l'ensemble des troubles émotionnels mais pas avec les troubles cognitifs.

Tableau 13 : Corrélations entre les différents troubles observés chez le sujet âgé

		Amplitude normalisée du trouble chez l'agé (Z-Score)									
		Corticostérone		Anxiété		Dépression		Apprentissage STR-dépendant		Apprentissage HPC-dépendant	
		r	p	r	p	r	p	r	p		
Amplitude normalisée du trouble chez l'agé (Z-Score)	Corticostérone	0,0760	0,4733	0,1870	0,0739	0,4520	0,0001	0,2090	0,0450		
	Anxiété			0,421	0,0001	0,228	0,0283	-0,04	0,708		
	Dépression					0,17	0,1057	0,05	0,64		
	Apprentissage STR-dépendant							0,03	0,7801		
	Apprentissage HPC-dépendant										

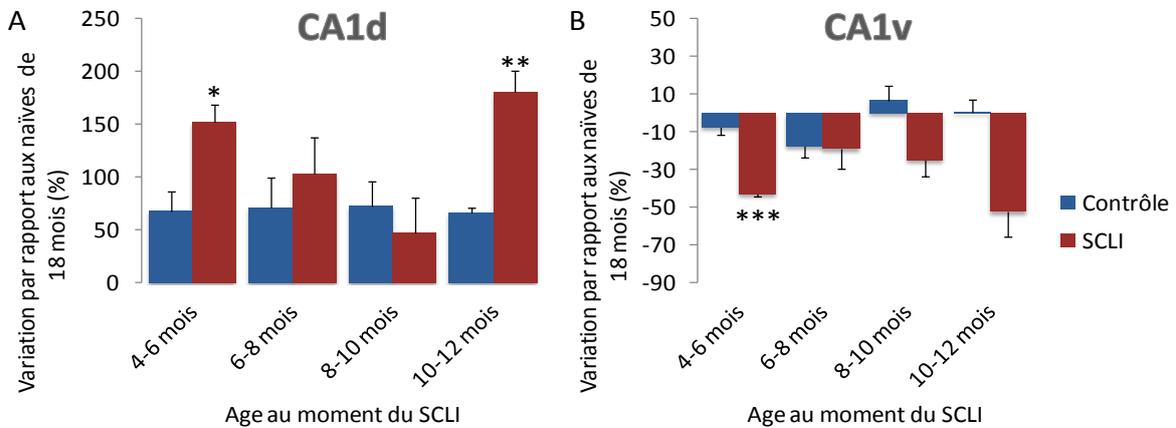
Corrélation entre les troubles chez le sujet adulte et ceux retrouvés chez le sujet âgé

La confrontation des z-scores des troubles mesurés chez les sujets âgés avec ceux initialement identifiés à l'âge adulte est résumée dans le tableau 14. Les résultats montrent pour l'essentiel que la corticostéronémie, les troubles somatiques et les troubles anxio-dépressifs chez l'adulte sont fortement corrélés avec ceux déterminés chez le sujet âgé. De plus, l'ensemble de ces indicateurs corrèle aussi avec l'amplitude des troubles d'apprentissage associatif striatum-dépendant. En revanche, aucune corrélation n'apparaît avec l'amplitude de la détérioration de l'apprentissage spatial hippocampe dépendant.

**Tableau 14 : Corrélations entre les troubles observés chez le sujet âgé et ceux observés chez le sujet adulte**

		Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte (Z-Score)											
		Corticostérone		Somatique		Anxiété		Dépression		Anhédonie		Cognition	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Amplitude normalisée du trouble chez l'âgé (Z-Score)	Corticostérone	0,24	0,0239	0,50	0,0001	0,39	0,0001	0,39	0,0001	-0,09	0,4139	0,12	0,2438
	Anxiété	0,308	0,0027	0,28	0,0074	0,31	0,0025	0,34	0,0007	-0,25	0,0184	-0,01	0,9153
	Dépression	0,32	0,0163	0,35	0,0005	0,36	0,0005	0,50	0,0001	-0,22	0,0319	-0,04	0,6755
	Apprentissage STR-dépendant	0,134	0,0018	0,37	0,0002	0,23	0,0276	0,38	0,0002	-0,04	0,7261	-0,18	0,0825
	Apprentissage HPC-dépendant	0,421	0,2035	0,25	0,0174	0,13	0,2041	0,12	0,2602	-0,06	0,5478	0,01	0,99

3. Le SCLI rencontré à l'âge adulte entraine des modifications épigénétiques durables en fonction de l'âge du sujet (résultats préliminaires)

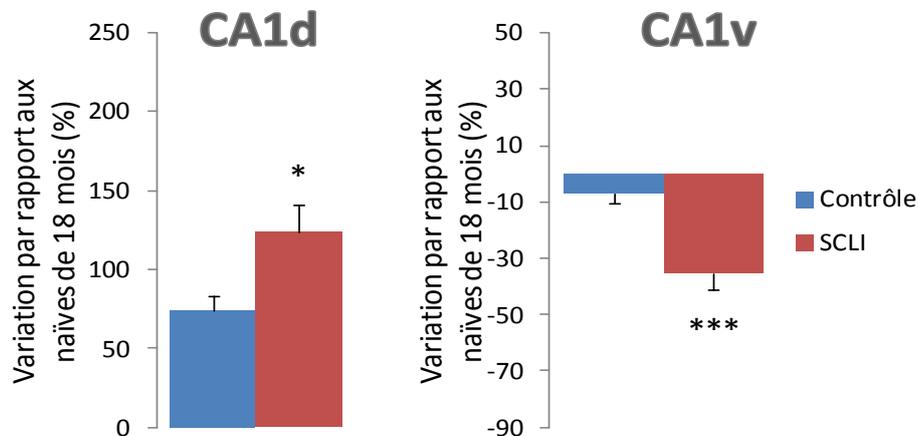


**Figure 76 : Modifications épigénétiques de la triméthylation d'H3K27 dans l'hippocampe dorsal et l'hippocampe ventral, en fonction de l'âge exposition au SCLI**

Les données sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux animaux naïfs âgés de 18 mois, dans le CA1 dorsal (A) et dans le CA1 ventral (B) et révèlent une augmentation d'H3K27me3 dans le CA1 dorsal chez des animaux âgés ayant suivi un SCLI entre 4-6 mois ou 10-12 mois, associée à une diminution de cette marque répressive dans le CA1 ventral. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

La figure 76 présente les résultats obtenus concernant les changements de la marque répressive H3K27 triméthylée, dans le CA1 dorsal (A) et dans le CA1 ventral (B) de l'HPC. L'ANOVA menée sur les données du CA1 dorsal montre un effet du SCLI ( $F_{(1;24)}=7,54$  ;  $p=0,0112$ ) sans effet de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(3;24)}=1,95$  ;  $p=0,14$ ) ni d'interaction des facteurs ( $F_{(3;24)}=2,39$  ;  $p=0,095$ ). Cet effet est en réalité dû à une triméthylation plus importante chez les animaux ayant suivi le SCLI aux âges de 4-6 mois ( $p=0,014$ ) et 10-12 mois ( $p=0,005$ ), tandis que les âges intermédiaires ne sont pas impactés ( $p > 0,5$ ). Comparativement aux animaux naïfs âgés de 18 mois ( $0 \pm 6,85$ ), les animaux *contrôles* ne présentent pas de différence significative ( $p > 0,47$ ), ce qui témoigne de l'effet spécifique du SCLI sur les niveaux de triméthylation de H3K27 dans le CA1 dorsal. Concernant les changements de H3K27 triméthylée dans le CA1 ventral, une diminution liée au SCLI (ANOVA :  $F_{(1;22)}=19,53$  ;  $p=0,0002$ ) a pu être constatée sans effet de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(3;23)}=1,15$  ;  $p=0,34$ ) ni interaction des facteurs ( $F_{(3;23)}=2,61$  ;  $p=0,07$ ). Cette significativité est le reflet d'une diminution de triméthylation chez les animaux ayant été stressés à l'âge de 4-6 mois ( $p=0,0005$ ). Comparativement aux animaux naïfs âgés de 18 mois ( $0 \pm 7,002$ ), les animaux *contrôles* ne présentent pas différence significative ( $p > 0,1$ ). Ainsi,

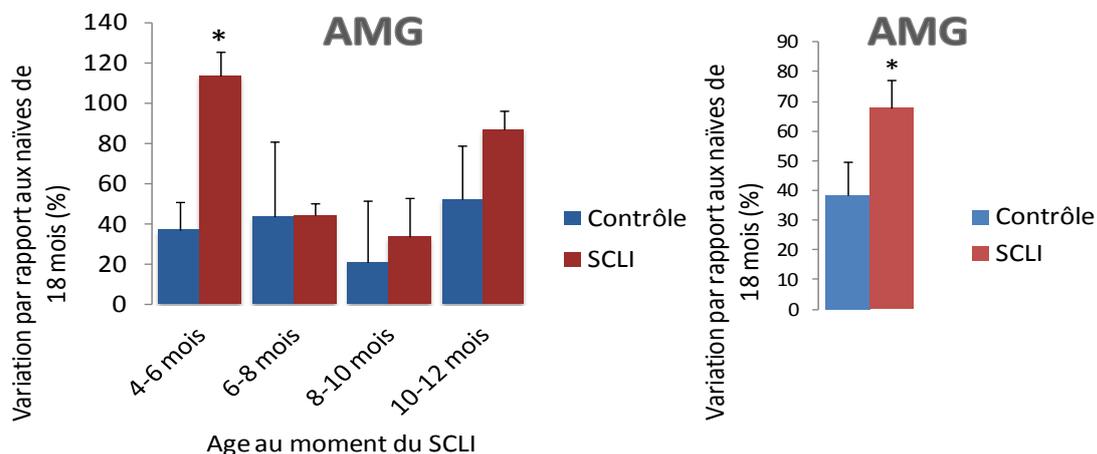
ces données immunohistochimiques suggèrent à la fois une inversion de la balance CA1d/CA1v avec le vieillissement normal et un impact du SCLI différentiel en fonction de l'âge d'exposition au SCLI.



**Figure 77 : Effet global du SCLI sur les modifications de la triméthylation d'H3K27 dans l'hippocampe dorsal (A) et l'hippocampe ventral (B), indépendamment de l'âge d'exposition au SCLI**

Les données sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux animaux naïfs âgés de 18 mois. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\*\* $p < 0.001$ .

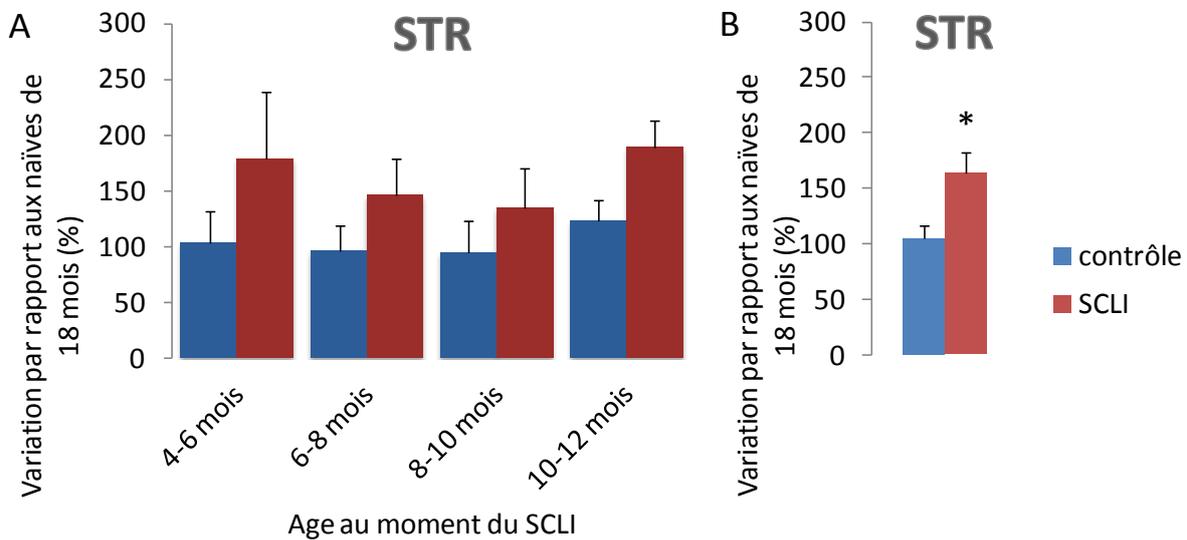
Globalement, le stress chronique entraîne une augmentation de la triméthylation d'H3K27 dans le CA1 dorsal et, au contraire, d'une diminution de cette triméthylation dans le CA1 ventral (figure 77).



**Figure 78 : Modifications épigénétiques de la triméthylation de l'histone H3, lysine 27 dans l'amygdale en fonction de l'âge d'exposition au SCLI**

A : Variation de la marque répressive d'H3K27me3 en fonction de l'âge d'exposition au SCLI. B : effet global du SCLI sur la triméthylation, toutes classes d'âge confondues. Les données sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux animaux naïfs âgés de 18 mois et montrent une augmentation de la marque répressive sur H3K27me3 dans l'amygdale chez des animaux âgés stressés entre l'âge de 4 et 6 mois. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$

L'ANOVA menée sur les données concernant l'amygdale (figure 78) ne démontre pas d'effet de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(1;20)}=2,6$  ;  $p=0,07$ ) ni d'interaction entre les facteurs ( $F_{(4;20)}=1,63$  ;  $p=0,21$ ). Cependant un effet du SCLI ( $F_{(1;20)}=2,65$  ;  $p=0,032$ ) est à prendre en compte et se caractérise par une triméthylation plus importante chez les animaux âgés ayant suivi le SCLI à 4-6 mois ( $p=0,012$ ). En revanche, en regardant les variations par rapport aux animaux naïfs âgés de 18 mois, il est possible de constater que les variations des groupes *contrôles* de tous les âges ne diffèrent pas ( $F_{(4;10)}=0,506$  ;  $p=0,732$ ) avec les naïfs contrairement aux groupes SCLI ( $F_{(4;13)}=3,76$  ;  $p=0,03$ ).



**Figure 79 : Modifications épigénétiques de la triméthylation de l'histone H3, lysine 27 dans le striatum**

A : Variation de la marque répressive d'H3K27me3 en fonction de l'âge d'exposition au SCLI. B : effet global du SCLI sur la triméthylation dans le striatum, toutes classes d'âge confondues. Les données sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux animaux naïfs âgés de 18 mois Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p<0,05$

Concernant l'analyse de la marque répressive dans le striatum (figure 79), un effet significatif du SCLI a été révélée par une analyse ANOVA ( $F_{(1;22)}=8,28$  ;  $p=0,04$ ) sans effet de l'âge au moment du SCLI ( $F_{(3;22)}=0,52$  ;  $p=0,67$ ) ni de l'interaction des facteurs ( $F_{(4;22)}=0,96$  ;  $p=0,96$ ). Une analyse *post-hoc* par un test de Scheffe n'a pas permis d'identifier cette significativité.

Corrélation entre les modifications épigénétiques et l'amplitude des troubles générés

Tableau 15 : Corrélations entre les troubles observés et la triméthylation d'H3K27 chez le sujet âgé

		Amplitude normalisée du trouble chez l'âge (Z-Score)									
		Corticotérorone		Anxiété		Dépression		Apprentissage STR-dépendant		Apprentissage HPC-dépendant	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Triméthylation	H3K27 CA1d	0,05	0,8256	<b>0,47</b>	<b>0,0156</b>	0,05	0,8294	<b>0,40</b>	<b>0,0413</b>	-0,10	0,6370
	H3K27 CA1v	-0,32	0,1074	-0,11	0,5920	-0,20	0,3413	<b>-0,54</b>	<b>0,0040</b>	0,01	0,9813
	H3K27 AMG	0,18	0,3861	<b>0,48</b>	<b>0,0132</b>	0,02	0,9163	0,19	0,3666	-0,16	0,4493
	H3K27 STR	0,17	0,4208	0,20	0,3208	0,27	0,1898	<b>0,38</b>	<b>0,0578</b>	-0,08	0,6970

L'analyse des corrélations entre des marques épigénétiques et l'amplitude des différents troubles détectés chez les sujets âgés est résumée dans le tableau 15. Seuls l'anxiété et les troubles de l'apprentissage associatif sont corrélés avec la modification des marques épigénétiques. De manière intéressante, une corrélation de la méthylation d'H3K27 avec l'anxiété est détectée dans l'amygdale et l'hippocampe dorsal alors qu'avec l'apprentissage associatif, une corrélation est détectée uniquement dans l'hippocampe dorsal et ventral. Par

Tableau 16 : Corrélations entre les troubles observés chez le sujet adulte et la triméthylation d'H3K27 mesurée chez le sujet âgé

		Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte (Z-Score)											
		Corticotérorone		Somatique		Anxiété		Dépression		Anhédonie		Cognition	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Triméthylation	H3K27 CA1d	0,31	0,1226	0,30	0,1379	<b>0,43</b>	<b>0,0267</b>	0,30	0,1432	0,12	0,5559	0,05	0,8300
	H3K27 CA1v	<b>-0,46</b>	<b>0,0185</b>	-0,34	0,0907	<b>-0,58</b>	<b>0,0016</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,0296</b>	0,08	0,7001	-0,21	0,2970
	H3K27 AMG	<b>0,55</b>	<b>0,0032</b>	0,27	0,1819	0,37	0,0635	0,29	0,1600	0,16	0,4326	0,06	0,7756
	H3K27 STR	0,11	0,6020	<b>0,46</b>	<b>0,0162</b>	0,15	0,4720	0,23	0,2589	-0,16	0,4299	-0,17	0,4138

contre, aucune corrélation de la triméthylation d'H3K27 avec la corticotéroronémie n'a été mise en évidence chez l'animal âgé.

L'analyse des corrélations entre la triméthylation d'H3K27 et l'amplitude des différents troubles initialement mesurés à l'issu du SCLI chez les sujets adultes est résumée dans le Tableau 16. Elle révèle une corrélation significative entre la méthylation d'H3K27 et la corticotéroronémie sélectivement dans l'amygdale et dans l'hippocampe ventral. La méthylation d'H3K27 corréle également avec l'anxiété dans l'hippocampe et plus particulièrement sa partie ventrale. Enfin, la corrélation avec la dépression est sélectivement associée à l'hippocampe ventral.

## Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons pu mettre en évidence des modifications épigénétiques chez le sujet âgé dépendant de l'âge auquel ce dernier a été stressé. Dans l'hippocampe, la répression de l'expression génique dans le CA1d est augmentée au profit du CA1v uniquement chez des animaux stressés jeunes adultes (4-6 mois) ou adulte mature (10-12 mois). Ceci suggère donc un impact du SCLI différentiel en fonction de l'âge d'exposition au stress. Dans l'amygdale, la répression de l'expression génique chez le sujet âgé est augmentée par le stress chronique uniquement lorsque ce dernier est apparu chez le jeune adulte (4-6 mois). Enfin, la répression dans le striatum semble avoir lieu chez toutes les classes d'âge évaluées. De manière générale, les marques de triméthylation d'H3K27 apparaissent dans des structures spécifiques et corrént de manière cohérente avec les troubles observés chez les sujets âgés et plus particulièrement, avec ceux initialement présents à l'âge adulte.

## Discussion

Ce second chapitre avait pour but de vérifier deux hypothèses selon lesquelles 1) le stress chronique rencontré à l'âge adulte entraîne des perturbations à long terme chez le sujet âgé et 2) entraîne des modifications épigénétiques durables sur différentes structures associées à la persistance des troubles comportementaux. Globalement, les troubles liés au stress chronique chez l'adulte persistent chez le sujet âgé indépendamment de l'âge d'exposition. Cependant, l'amplitude des déficits varie selon l'âge de l'exposition et la nature du trouble. L'amplitude des troubles émotionnels et la détérioration des capacités d'apprentissage associatif (dépendantes du striatum) sont plus marquées chez les sujets ayant été exposés au stress lorsqu'ils étaient jeunes adultes ou adultes d'âge avancé. Par contre, l'altération cognitive dépendante de l'hippocampe (spatiale) apparaît sélectivement chez les sujets ayant été exposés au stress à des stades plus tardifs de leur vie d'adulte.

L'état dépressif évalué dans le FST et le TST chez les animaux ayant vécu le protocole de stress à l'âge adulte s'est maintenu chez le sujet âgé. Toutefois, les résultats des tests de FST et de TST varient quelque peu. Dans le FST, les troubles dépressifs sont plus marqués chez les animaux ayant subi le stress chronique à 4-6, 10-12, et 12-14 mois alors que dans le TST, les altérations ont été essentiellement détectées chez les animaux ayant suivi le SCLI après l'âge de 8-10 mois. Ces deux tests sont considérés comme complémentaires chez la

souris (Bai et al., 2001) mais possèdent des supports neurobiologiques au moins en partie distincts (Castagne et al., 2011) pouvant expliquer la variabilité des effets détectés. Par ailleurs, l'immobilité dans le FST observée chez le sujet âgé est associée à une augmentation du renoncement au comportement de fuite (escalade) comme précédemment observé à l'issue du protocole de stress chronique chez l'adulte (Cf. chapitre I). Ceci suggère la possibilité d'une perturbation du système noradrénergique installée chez l'adulte et persistante chez le sujet âgé.

Alors que la dépression générée par le stress chronique était un des symptômes constants chez l'adulte stressé, elle est retrouvée de manière plus ou moins marquée chez le sujet âgé selon l'âge auquel le stress a été subi. Les troubles de type dépressif et les troubles de type anxieux ont été essentiellement retrouvés sur les sujets âgés ayant été stressés à 4-6, 10-12 et 12-14 mois, c'est-à-dire chez les animaux ayant présentés des troubles de type anxieux marqués à l'âge adulte. Les analyses de corrélation indiquent que les niveaux d'anxiété et de dépression chez l'adulte sont corrélés avec l'amplitude du trouble dépressif retrouvé chez le sujet âgé. L'amplitude de l'état anxieux généré par le stress chez l'adulte apparaît donc comme un élément critique pour la persistance ou la rémission des troubles anxio-dépressifs à long terme. Ceci est en accord avec les travaux montrant que la rémission d'une dépression dépend de la sévérité des premiers troubles pathologiques (Ramana et al., 1995; Eaton et al., 2008). **Nos résultats indiquent que la rémission serait plus favorable lorsque la dépression liée à un stress chronique a lieu chez des adultes d'âge intermédiaire, soit 8-12 mois chez la souris, 35-45 ans chez l'humain** (Flurkey et al., 2001).

Dans ce deuxième chapitre, nous nous sommes également intéressés aux altérations mnésiques à long terme que pouvait entraîner le SCLI chez l'adulte. L'analyse des troubles de l'apprentissage associatif en piscine de Morris ou en conditionnement opérant a permis de mettre en avant de moins bonnes performances chez les sujets ayant été stressés. En effet, la plupart des animaux ayant suivi le SCLI sont moins performants que des animaux *contrôles*, mis à part ceux ayant suivi le SCLI à l'âge de 8-10 mois. Cependant, l'altération des performances s'accompagnent d'une diminution générale de l'activité des animaux dans les épreuves. Il est donc difficile de statuer sur une réelle altération du traitement ou de la mémorisation de l'information et il est plus probable que **l'atteinte de la performance ne soit pas purement d'origine cognitive au sens propre du terme mais résulte d'atteintes sensori-motrices liées au vieillissement qui seraient exacerbées par l'exposition au stress.**

L'apprentissage spatial en piscine de Morris a permis de mettre en évidence l'émergence tardive d'atteintes cognitives liées au stress chronique. En effet, les performances d'acquisition spatiale sont très similaires dans l'ensemble de nos groupes expérimentaux mais la précision des informations spatiales acquises est variable en fonction de l'âge d'exposition au SCLI. Les animaux présentent des troubles de mémoire spatiale lorsqu'ils ont suivi le SCLI entre 12 et 14 mois. De plus, une divergence de population a été détectée au sein du groupe ayant suivi le protocole de stress chronique entre 10 et 12 mois. En effet, environ 50% de cette population présente des performances comparables aux animaux *contrôles* tandis que l'autre moitié présente une atteinte de la performance spatiale comparable à celle des animaux ayant suivi le SCLI entre 12 et 14 mois. Ces résultats indiquent qu'**une sensibilité cognitive particulière se met en place aux alentours de 10 mois**. En appuis avec les conclusions d'études réalisées chez le rat montrant l'installation de troubles de la mémoire spatiale accompagnés de troubles de type motivationnel après un stress chronique (Kleen et al., 2006), nos résultats confortent l'idée que **des troubles cognitifs accompagnent les troubles émotionnels générés par le stress**. Ils sont également cohérent avec des altérations cognitives dans des tâches complexes (nécessitant un effort) chez les patients souffrant de troubles dépressifs (Hammar et al., 2003a), altérations cognitives qui persistent même après la rémission des symptômes dépressifs (Hammar et al., 2003b).

L'implication de l'HPC dans les processus de mémoire spatiale et les régulations émotionnelles font de cette structure un élément intéressant dans la recherche de supports expliquant les altérations comportementales observées. Nous avons alors pu constater une élévation de la tri-méthylation d'H3K27 dans l'HPC dorsal lorsque le stress chronique a eu lieu entre 4 et 6 mois et entre 10 et 12 mois. Au contraire, une diminution de tri-méthylation a pu être observée sur ces mêmes tranches d'âges dans l'HPC ventral. Ces modifications de répression indiquent une modification de la balance des activités « HPC dorsal / HPC ventral » qui se maintient à long terme, en réponse au SCLI. De façon intéressante, cette réorganisation émerge sur les mêmes tranches d'âges présentant des troubles émotionnels marqués. Il semblerait donc que les modifications de la triméthylation sur H3K27 ciblent des régions promotrices de gènes clés dans la régulation des troubles émotionnels en favorisant la mise en place de réseaux dépendant de l'HPC ventral. Ceci est cohérent avec l'implication préférentielle de l'HPC ventral dans la régulation émotionnelle (Bannerman et al., 2003; Fanselow and Dong, 2010). En effet, des études lésionnelles ont montré qu'une ablation de la partie ventrale de l'HPC induisait, chez le rat, une diminution des comportements de type

anxieux (Bannerman et al., 2003) sans altération des performances spatiales. Les performances spatiales étant majoritairement tributaires de l’HPC dorsal et non du ventral (Moser et al., 1993), les modifications que nous avons pu observer dans cette structure ne semblent pas cibler les régions impliquées dans les processus cognitifs HPC-dépendants. En effet, les animaux ayant suivi le SLCI entre 4 et 6 mois ne présentent aucune altération de mémoire spatiale malgré l’augmentation des marques de répression géniques trouvée dans l’HPC dorsal de ces animaux. Curieusement, ce sont les performances dans les apprentissages striatum-dépendants qui s’avèrent corrélées tant avec l’augmentation dans l’hippocampe dorsal qu’avec la diminution dans l’hippocampe ventral des marques de répressions géniques. Il est alors possible que ces modifications hippocampiques affectent des mécanismes impliqués dans les interactions entre les systèmes de mémoire striatum-dépendant et hippocampe-dépendant (Martel et al., 2007; Lee et al., 2008). En appui de cette possibilité, nous avons montré que l’inhibition des histones deacétylases hippocampiques modifie l’utilisation de ces deux systèmes de mémoire chez la souris jeune mais pas chez la souris âgés ((Dagnas et al., 2013) ; voir annexe). Les niveaux de triméthylation dans le striatum ont présenté une élévation générale en réponse au stress. Cependant, là encore, il est difficile de trancher entre une répression génique striatale en relation avec les troubles d’apprentissage associatif ou avec l’altération sensori-motrice. La corrélation de la triméthylation d’H3K27 avec l’amplitude des troubles somatiques sélectivement dans le striatum appuie cette dernière possibilité.

L’étude des modifications de la répression épigénétique dans l’amygdale a également montré des résultats intéressants. En effet, une hyper triméthylation a été retrouvée dans cette structure lorsque les animaux ont été stressés entre 4 et 6 mois uniquement. De plus, la forte corrélation entre la triméthylation d’H3K27 chez les sujets âgés et les taux de CORT mesurés chez l’adulte suggèrent que l’exposition au stress chronique modifie durablement l’activité amygdalienne. Ces résultats peuvent s’expliquer par une sensibilité au stress accrue de cette structure dont le développement est très long et s’étend de la naissance au début de la période adulte (Lupien et al., 2009). Ainsi, l’amygdale des jeunes adultes serait plus vulnérable et la persistance des modifications épigénétiques induites par un stress expliquerait la présence à long terme de troubles anxio-dépressifs chez ces animaux (Davis, 1992).

Enfin, de façon intéressante, nos résultats montrent que les troubles chez le sujet âgé ne sont pas corrélés avec les taux de CORT plasmatique détectés à ce stade de la vie. Par contre, la corticostéronémie initialement mesurée à l’issue du stress chez l’adulte corrèle très

bien avec la persistance des troubles retrouvés chez le sujet âgé. Ceci est en accord avec l'idée que la dérégulation de l'axe HPA est un marqueur de la pathogénicité du stress chronique (Katz et al., 1981) et nos résultats soulignent son importance dans la persistance des différents troubles à long terme. Cependant, des résultats basés sur les effets immédiats de l'hypercorticotéronémie ont suggéré l'insuffisance de ce facteur endocrinien pour expliquer les différentes atteintes comportementales (Lin and Sibille, 2015a). En effet, même si l'hypercorticotéronémie ou la dérégulation des récepteurs GR (Holsboer, 2000; Pariante and Lightman, 2008) contribuent à l'installation des troubles comportementaux dans la dépression majeure, il est plus que probable que d'autres facteurs comme les modifications de transcription génomique (Alfonso et al., 2006; Krishnan and Nestler, 2008), voire la neurodégénérescence (Swaab et al., 2005; Banasr et al., 2011) ou la gliodégénérescence (Smialowska et al., 2013) interviennent et expliquent la persistance et/ou la récurrence des symptômes générées par le stress chronique. De plus, nos résultats démontrent que la persistance des effets d'un stress chronique n'est pas uniquement en relation avec la récurrence de l'épisode stressant. De manière intéressante, des symptômes marqués et des modifications de marques épigénétiques répressives ont été retrouvés à très long terme, jusqu'à 12 mois après l'exposition au stress soit une trentaine d'années à l'échelle humaine, laissant supposer des modifications extrêmement bien conservées.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats ont permis de montrer que **le stress chronique chez l'adulte induit des perturbations à long terme dépendant de l'atteinte initialement mise en place chez le sujet adulte**. En effet, les troubles anxio-dépressifs ont été retrouvés chez des animaux stressés jeunes adultes et adultes d'âge avancé. La sensibilité au stress concernant l'atteinte cognitive se met quant à elle en place aux alentours de 10 mois et les effets d'un stress au-delà de cet âge se répercutent sur les capacités de mémoire spatiale chez le sujet âgé. Enfin, les modifications épigénétiques sur H3K27 sont également dépendantes de l'âge auquel les animaux ont été stressés et semblent corrélées à certains symptômes chez le sujet âgé. Ces modifications transcriptionnelles ne sont qu'un exemple des modifications induites par le stress et il a été démontré que les altérations de la transcription génomique affectent sélectivement les cellules à **somatostatine** dans le cortex cingulaire (Lin and Sibille, 2015a). Notre intérêt s'est alors tourné vers ce neuropeptide et nous avons développé l'analyse du rôle de la somatostatine dans l'hippocampe, une structure critique dans la régulation du stress et des troubles émotionnels.



**Chapitre III : Implication de la Somatostatine  
hippocampique dans la régulation de l'axe  
HPA et des comportements de type anxieux  
et dépressifs**



## Introduction

Le stress joue un rôle important dans la pathogénèse de troubles psychiatriques comme la dépression majeure (Pittenger and Duman, 2008; McEwen et al., 2015a). En réponse à une situation potentiellement menaçante, l'activation de l'axe HPA va alors permettre la libération de GC au niveau des glandes surrénales. Ces derniers auront une action à la fois périphérique et centrale en se fixant sur des récepteurs MR et GR. L'HPC possède une grande concentration de ces récepteurs et joue un rôle important dans le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA (McEwen et al., 1968; Herman et al., 2005; McEwen et al., 2015b).

Les GC et les dysfonctionnements de l'axe HPA sont aujourd'hui reconnus pour être impliqués dans les effets délétères du stress. Des niveaux élevés de GC contribuent à la mise en place du dysfonctionnement hippocampique et peuvent mener à l'atrophie de cette structure comme dans les cas de dépression majeure (Sheline, 1996; Huang et al., 2013) ou la maladie de Cushing (Toffanin et al., 2011). L'importance de l'HPC a également été mise en avant par des études sur l'ablation de l'HPC dorsal et du fornix qui entraîne des perturbations dans les rythmes journaliers corticostéroïdiens et une élévation des niveaux de base de cette hormone chez le rongeur (Fendler et al., 1961; Fischette et al., 1980). Au niveau hippocampique, les MR et les GR sont principalement exprimés dans les cellules pyramidales, orientant les études concernant les effets des GC sur ces neurones (Karst et al., 2005; Joels et al., 2007; Joels, 2008a) alors que le système GABAergique reste peu exploré. Le stress impacte également le système GABAergique hippocampique en affectant l'intégrité des neurones à parvalbumine (Hu et al., 2010) et plus particulièrement, les neurones co-exprimant la SST (Czeh et al., 2015b). Des études antérieures ont aussi démontré des **libérations de SST dans l'HPC en réponse à un stress aigu** ou à une injection de dexaméthasone chez l'animal (Arancibia et al., 2001), suggérant un rôle de la SST dans le rétrocontrôle négatif de l'HPC sur l'axe HPA.

Cinq récepteurs à la SST ont été identifiés (sst1-5) et appartiennent tous à la famille des récepteurs couplés à une protéine G. Le développement d'analogues SST (Weckbecker et al., 2003; Hannon et al., 2004), associé à la mise à disposition de modèles transgéniques (Zeyda and Hochgeschwender, 2008), a permis de mieux comprendre le rôle de chaque sous-type de récepteurs dans les fonctions cérébrales et les troubles tels que l'anxiété et la dépression (Viollet et al., 2000; Engin et al., 2008; Engin and Treit, 2009; Epelbaum et al.,

2009). Des études récentes ont permis de mettre en avant le rôle de la SST au niveau frontal et cingulaire dans la régulation de « l'émotionnalité » chez la souris (Soumier and Sibille, 2014; Lin and Sibille, 2015a, b) et ont démontré que les effets anxiolytiques de la SST sont médiés par les récepteurs sst2 de l'amygdale et du septum chez le rat (Yeung et al., 2011; Yeung and Treit, 2012). Quatre récepteurs sont présents au niveau hippocampique et **cette étude vise à identifier particulièrement quels récepteurs hippocampiques interviennent dans la réponse au stress et « l'émotionnalité » chez la souris.**

Pour cela, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'implication des récepteurs à la SST présent dans l'HPC sur l'inhibition de l'axe HPA. Nous avons alors employés une technique de micro-injections intra-hippocampiques d'agonistes sélectifs afin de voir l'effet de l'activation sélective d'un sous type de récepteur sur les concentrations plasmatiques en CORT, en réponse à un stress aigu. Suite à cette première étude, nous avons réalisé une expérience de microdialyse inverse intra-hippocampique afin de mesurer l'effet de la SST et de ses agonistes dans cette structure. Enfin, des groupes indépendants d'animaux ont suivi des protocoles d'évaluations comportementales afin d'attester de « l'émotionnalité » des animaux suivant un traitement aigu d'analogues ou d'agonistes SSTergiques. Pour terminer, nous avons vérifié l'importance des récepteurs sst2 et sst4 sur les régulations de l'axe HPA et de l'état anxio-dépressif chez des animaux génétiquement modifiés, ne présentant pas les récepteurs sst2 ou sst4.

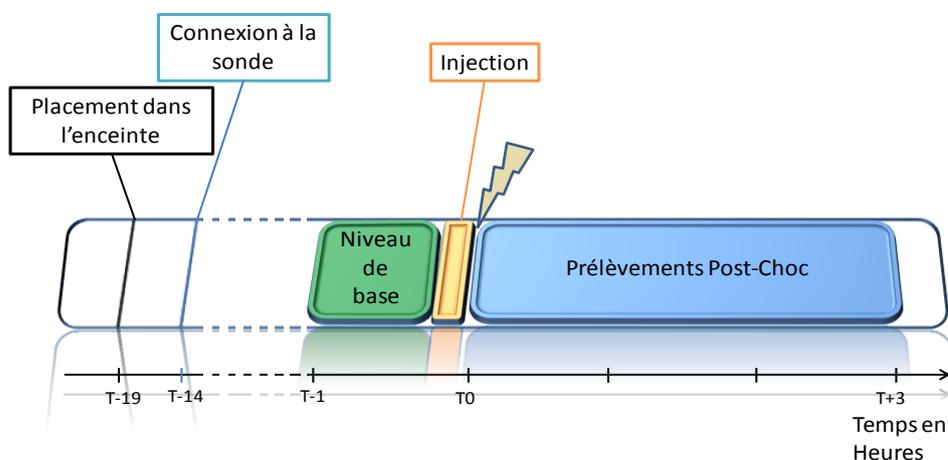
## Méthodologie

Dans ce troisième chapitre, nous avons utilisé 3 lignées d'animaux différentes ayant chacune un fond génétique C57Bl/6 by Jico. Des animaux C57Bl/6 ont permis de mettre en évidence l'efficacité des traitements d'analogues SSTergiques et d'agonistes sélectifs sur les concentrations plasmatiques et hippocampiques en CORT. Des animaux transgéniques, n'exprimant pas le récepteur sst2 ou le récepteurs sst4 (et leurs homologues WT) ont également été utilisés dans la dernière partie de ce chapitre.

Afin de réaliser les injections intra-hippocampiques, les animaux ont été implantés unilatéralement avec un guide-canule (ou un guide-sonde pour la microdialyse) selon les coordonnées suivantes : AP : -2,2mm ; L :  $\pm 1,35$ mm ; V : -1mm à partir du bregma. Les prélèvements de dialysats par microdialyse ont eu lieu entre 8h30 et 12h30, de manière à

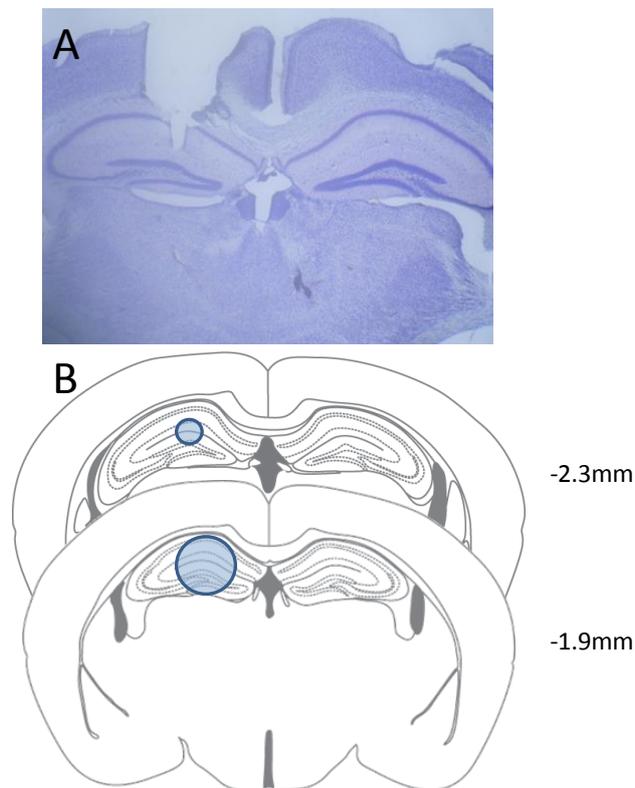
limiter les effets liés aux variations circadiennes des taux de CORT. L'animal est introduit dans l'enceinte la veille de l'expérience afin de se familiariser avec l'environnement et le dispositif. Pendant l'habituation, l'animal a accès à de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Après 4h passées dans l'enceinte, l'animal est connecté à la sonde de microdialyse (CMA/7 ; CMA Microdialysis ; Ø= 0.24mm ; longueur=1 mm) comportant un cathéter d'entrée relié à une pompe de perfusion (CMA, Microdialysis AB) et un cathéter de sortie relié à un carrousel collecteur. Ainsi connecté, l'HPC est perfusé avec une solution saline tamponnée (Dulbecco, Sigma France) à un débit de 0,2µl/min jusqu'au lendemain pour la phase de test. Une heure et demie avant les premiers prélèvements, le débit de perfusion est augmenté à 1µL/min de manière à recueillir 15µL tous les quarts d'heure. Cela permet d'avoir un volume suffisamment important pour doser la CORT *a posteriori*. La procédure suivante décrit le déroulement des prélèvements (figure 80), l'administration du choc étant le point 0 :

- 4 prélèvements pour la détermination du niveau basal en CORT
- l'application de 3 chocs électriques (0,9mA ; 1sec) pour générer une réponse de stress
- Et 12 prélèvements pour la détermination du niveau de CORT en réponse à l'application du choc



**Figure 80 : Déroulement du protocole de microdialyse**

L'animal est placé dans l'enceinte et connecté à la sonde la veille de l'expérience avec un débit de 0,2µl/min. Avant le prélèvement du niveau de base, le débit de perfusion est passé à 1µl/min afin d'équilibrer le système. Les prélèvements du niveau de base ont lieu pendant 1 heure (zone verte) et sont suivis de l'infusion de solution SSTergique ou de LCR pendant 15 minutes (zone jaune). Tout de suite après la fin de l'infusion, le choc électrique à 0,9mA est appliqué (éclair), à raison de 3 chocs répartis sur 1 minute. Pour finir, les prélèvements post-choc se déroulent pendant 3 heures (zone bleue).



**Figure 81 : Zone d'implantation des guide-canule dans l'hippocampe de souris**

A : contrôle histologique de la bonne implantation de la sonde dans l'hippocampe dorsal. B : Zone d'infusion et de prélèvement du dialysat (ronds bleus).

Une fois l'expérience terminée, les sondes sont retirées de l'animal, puis ce dernier est replacé dans sa cage habituelle avant de retourner en animalerie jusqu'à la vérification du bon emplacement de la sonde par des contrôles histologiques (figure 81).

Concernant l'étude comportementale, les animaux sont injectés 15 minutes avant l'évaluation avec une dose de 5nmol/0,5µl, basée sur des études précédentes (Gastambide et al., 2010). Les animaux ont alors été testés en EPM, en FST, en OF ou en BWT 15 minutes plus tard. Concernant ce dernier, les animaux sont injectés le jour de la phase test.

## Résultats et conclusion

1. Nos résultats ont permis de mettre en évidence **un rôle de la SST hippocampique et de ses récepteurs sst2 et sst4 dans la régulation de l'axe HPA**. En effet, un traitement aigu à base de RC160 ou d'octréotide (analogues SSTergiques), ainsi que d'agonistes spécifiques aux récepteurs sst2 ou sst4, a permis de diminuer les concentrations plasmatiques et hippocampiques en réponse à un stress aigu, associé à une diminution d'activité locomotrice dans l'enceinte de microdialyse.

2. Par la suite, nous avons pu montrer que malgré une similarité d'action physiologique sur l'inhibition de l'axe HPA, les récepteurs sst2 et sst4 hippocampiques démontraient des divergences d'effets comportementaux. Nous avons ainsi pu mettre en

évidence **une régulation des comportements de type dépressif préférentiellement par le récepteur sst4 et une régulation des comportements de type dépressif et anxieux par le récepteur sst2.**

3. Enfin, corroborant nos conclusions à partir de l'étude pharmacologique, **les animaux sst2KO présentent des comportements de type anxieux exacerbés contrairement aux sst4KO. Cette anxiété accrue chez des animaux sst2KO est également accompagnée de niveaux de CORT basaux plus importants, qui ne sont pas retrouvés chez des animaux sst4KO.**

**Dans leur ensemble, nos résultats apportent une spécification du rôle de la SST hippocampique sur la régulation de l'axe HPA et de l'implication différentielle de ses récepteurs hippocampiques dans l'expression d'effets anxiolytiques et antidépresseurs.** L'élévation de CORT plasmatique et cérébrale observée est en accord avec des analyses précédentes exploitant le même protocole (Rohrer et al., 1998; Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010a). Nous avons pu observer une diminution de la réactivité de l'axe HPA en réponse à un stress aigu par le RC160 et l'octréotide, ainsi que par des agonistes sélectifs des récepteurs sst2 et sst4. Cette diminution se retrouve aussi bien au niveau plasmatique qu'au niveau hippocampique. En accord avec les travaux d'Arancibia et al., en 2001, démontrant une libération hippocampique de SST en réponse à un stress aigu, les effets inhibiteurs de la SST sont détectables 15 minutes après l'infusion, témoignant d'une action rapide de la SST sur l'axe HPA. Les agonistes sélectifs des récepteurs sst2 et sst4 ont démontré des effets plus importants que les analogues à la SST (RC160 et ocréotide), ce qui peut être expliqué par une stabilité plus grande et une demi-vie plus importante de ces agonistes par rapport à des analogues peptidiques (Rohrer et al., 1998; Yang et al., 1998).

Les animaux ont réagi à l'application du stress par une augmentation d'activité semblable chez tous les groupes expérimentaux, ce qui laisse suggérer que les infusions SSTergique n'ont pas d'effet sur les perceptions sensorielles. Nous avons également pu constater une diminution d'activité importante après le stress (i.e. après le pic d'activité lié à l'application du stress) chez les animaux recevant les agonistes sst2 et sst4 et cet effet est également maintenu tout au long de l'expérience. Cela témoignerait donc d'une bonne adaptation de l'animal dans ce nouvel environnement. De plus, les deux agonistes ont présenté un effet sur l'immobilité dans le test de FST mais ont également produit des effets comportementaux différents. Cette dernière observation suppose alors que ces deux agonistes

puissent sous-tendre des mécanismes de régulations différents. En effet, l'agoniste sst2 diminue l'immobilité au profit de la nage, sans impacter l'escalade des parois. Ce profil comportemental a déjà été rencontré avec des traitements jouant sur l'activité sérotoninergique. De tels effets ont également été documentés avec des injections i.c.v de SST ou d'agoniste sst2 chez le rat (Engin et al., 2008; Engin and Treit, 2009). Au contraire, l'infusion d'agoniste sst4 a permis une diminution de l'immobilité mais au profit de l'escalade, sans impacter la nage. Ce profil-ci est quant à lui typique des réponses comportementales observées lors de traitements agissant sur le système noradrénergique (Detke et al., 1995; Reneric et al., 2001; Cryan and Mombereau, 2004). De manière intéressante, les injections intra-hippocampique d'agonistes sst2, mais pas de sst4, ont produit des effets anxiolytiques dans l'EPM et l'OF. Ces dernières données appuient également notre hypothèse suggérant une action différentielle des récepteurs sst2 et sst4 hippocampique dans la régulation des troubles émotionnels.

En accord avec nos données pharmacologiques, les animaux n'exprimant pas de récepteur sst2 ont démontré une perturbation de l'état de type anxieux associé à une élévation basale de CORT plasmatique et hippocampique. Cette augmentation corrèle les données de la littérature qui avaient déjà démontré une libération accrue d'ACTH chez cette souche mutante (Viollet et al., 2000). L'ensemble de ces effets, à la fois sur l'anxiété et les niveaux de CORT, n'a cependant pas été mis en avant chez des animaux sst4KO. D'un point de vue comportemental, les résultats obtenus ont également corroboré notre étude pharmacologique. En effet, les animaux sst2KO ont présenté une immobilité accrue accompagnée d'une diminution de la nage tandis que les animaux sst4KO ont présenté cette même augmentation d'immobilité mais au détriment de l'escalade et non de la nage.

**Ces données appuient une nouvelle fois notre hypothèse suggérant une mécanistique différente mise en place par les deux sous-types de récepteurs, leur permettant ainsi une régulation différentielle des troubles de type anxieux et des troubles de types dépressifs chez la souris.**

Manuscript Number:

Title: Roles of hippocampal somatostatin receptor subtypes in stress response and emotionality

Article Type: Archival Report

Keywords: anxiety; depression; stress; sst2; sst4; corticosterone

Corresponding Author: Prof. Jean Louis Guillou,

Corresponding Author's Institution: Université de Bordeaux

First Author: Thomas D Prévôt, PhD student

Order of Authors: Thomas D Prévôt, PhD student; François Gastambide, PhD; Cécile Viollet, DR; Christophe Tronche, PhD; Nadia Henkous; Guillaume Martel, PhD; Jacques Epelbaum, DR; Daniel béracochéa, DR; Jean Louis Guillou

Abstract: Background

Stress plays an important role in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders. The hippocampus exerts an inhibitory feedback on stress but the mechanisms involved remain unclear. GABAergic functions and the integrity of somatostatin-expressing cells recently appeared as key elements. We investigated the role of hippocampal somatostatin receptor subtypes in both stress response and behavioral emotionality of the mouse.

Methods

C57BL/6, wild type and sst2 or sst4 knockout mice were used. Inhibitory effects of hippocampal infusions of somatostatin agonists on stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) activity were tested by monitoring peripheral blood and local hippocampus corticosterone levels, the later by using microdialysis. Anxiolytic and antidepressant-like effects were determined in the elevated-plus maze, open field, forced swimming and a stress-sensitive beam walking test.

Results

Somatostatin analogues, selective sst2 and sst4, but not sst1 or sst3 receptor agonists produced rapid and sustained inhibition of HPA axis. sst2 agonists selectively produced anxiolytic-like behaviors whereas both sst2 and sst4 agonists had antidepressant-like effects reproducing, remarkably, the behavioral profiles of antidepressants with serotonergic and noradrenergic activity respectively. Consistent with these findings, high corticosterone levels and anxiety were found in sst2KO mice and depressive behaviors observed in both sst2KO and sst4KO strains.

Conclusion

Both hippocampal sst2 and sst4 receptors selectively inhibit stress-induced HPA axis activation but mediate anxiolytic and antidepressive effects through distinct mechanisms. Such results are to be accounted for the use and the development of somatostatin receptor agents in the treatment of hypercortisolism (Cushing's disease) and stress-related neuropsychiatric disorders.

## **Roles of hippocampal somatostatin receptor subtypes in stress response and emotionality**

**Thomas D. Prévôt<sup>1,2</sup>, François Gastambide<sup>3</sup>, Cécile Viollet<sup>4,5</sup>, Christophe Tronche<sup>1,2</sup>, Nadia Henkous<sup>1,2</sup>, Guillaume Martel<sup>4,5</sup>, Jacques Epelbaum<sup>4,5</sup>, Daniel Béracochéa<sup>1,2</sup> and Jean-Louis Guillou<sup>1,2</sup>**

1 Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

2 Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5287, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

3 Lilly Research Laboratories, Eli Lilly & Co. Ltd, Erl Wood Manor, Windlesham, UK

4 Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006, Paris, France

5 Inserm, UMR 894, Center for Psychiatry & Neuroscience, 75014, Paris, France

Corresponding author:

Jean-Louis Guillou

Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

e-mail: jean-louis.guillou@u-bordeaux.fr

Tel 33 (0) 5 4000 8921

Fax 33(0) 5 4000 8743

Short title: hippocampal sst receptors and emotionality (42 characters)

6 Key words: anxiety – depression – stress – sst<sub>2</sub> – sst<sub>4</sub> – corticosterone

Number of words:

Abstract : 246

Article body : 3960

Number of Figures: 7

Number of Tables: 0

Supplemental information: 0

## **Abstract.**

### **Background**

Stress plays an important role in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders. The hippocampus exerts an inhibitory feedback on stress but the mechanisms involved remain unclear. GABAergic functions and the integrity of somatostatin-expressing cells recently appeared as key elements. We investigated the role of hippocampal somatostatin receptor subtypes in both stress response and behavioral emotionality of the mouse.

### **Methods**

C57BL/6, wild type and *sst*<sub>2</sub> or *sst*<sub>4</sub> knockout mice were used. Inhibitory effects of hippocampal infusions of somatostatin agonists on stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) activity were tested by monitoring peripheral blood and local hippocampus corticosterone levels, the later by using microdialysis. Anxiolytic and antidepressant-like effects were determined in the elevated-plus maze, open field, forced swimming and a stress-sensitive beam walking test.

### **Results**

Hippocampal injections of somatostatin analogues, selective *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>4</sub>, but not *sst*<sub>1</sub> or *sst*<sub>3</sub> receptor agonists produced rapid and sustained inhibition of HPA axis. *sst*<sub>2</sub> agonists selectively produced anxiolytic-like behaviors whereas both *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>4</sub> agonists had antidepressant-like effects reproducing, remarkably, the behavioral profiles of antidepressants with serotonergic and noradrenergic activity respectively. Consistent with these findings, high corticosterone levels and anxiety were found in *sst*<sub>2</sub>KO mice and depressive behaviors observed in both *sst*<sub>2</sub>KO and *sst*<sub>4</sub>KO strains.

### **Conclusion**

Both hippocampal sst<sub>2</sub> and sst<sub>4</sub> receptors selectively inhibit stress-induced HPA axis activation but mediate anxiolytic and antidepressive effects through distinct mechanisms. Such results are to be accounted for the use and the development of somatostatin receptor agents in the treatment of hypercortisolism (Cushing's disease) and stress-related neuropsychiatric disorders.

### **Introduction**

Stress plays an important role in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders such as major depression (1-3) and, possibly, of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (4-6). Stress activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) leading to release glucocorticoids from adrenal glands into the blood. Because of their liposolubility, glucocorticoids reach the brain by crossing the blood-brain barrier and bind to glucocorticoid and mineralocorticoid receptors (7). The hippocampus contains the highest concentration of glucocorticoid receptors and plays a key role for negative feed-back regulations on the HPA axis (8-10). Glucocorticoid secretions and HPA dysfunction are involved in the deleterious effects of stress. High glucocorticoid levels contribute to hippocampal dysfunction and may lead to hippocampal atrophy as observed in major depression or Cushing's disease (11-14). Ablation of the dorsal hippocampus or lateral fornix disrupts the diurnal corticosteroid rhythm and elevates resting corticosteroids in rodents (15, 16). Although diverse trans-synaptic influences from the hippocampus to corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nuclei (PVN) involve glutamatergic projections on GABA neurons in the peri-PVN region and the anterior bed nucleus of the stria terminalis (17-19), intrinsic hippocampal mechanisms involved in stress regulation remain unclear. As mineralocorticoid and glucocorticoid receptors are predominantly

expressed in principal cells, previous studies concerning corticosteroid effects on neuronal activity in the hippocampus focused mainly on these neurons (20-22) whereas GABAergic networks remained relatively unexplored. However, chronic stress also impairs GABAergic functions in the hippocampus by affecting the integrity of parvalbumin-expressing neurons (23) and more particularly, somatostatin (SOM)-expressing cells (24). In vivo, rapid SOM release occurs in the dorsal dentate gyrus when acute stress or dexamethasone is applied to animals (25), suggesting a role for SOM in the hippocampal regulatory feedback on stress. In addition, mice lacking SOM (SOMKO) exhibit elevated behavioral emotionality, high basal plasma corticosterone (CORT) levels and reduced gene expression of BDNF, Cortistatin and GAD67, together recapitulating behavioral, neuroendocrine and molecular features of human depression (3).

Five somatostatin receptor subtypes have been described, *sst*<sub>1</sub>, *sst*<sub>2</sub>, *sst*<sub>3</sub>, *sst*<sub>4</sub>, and *sst*<sub>5</sub>. All belong to the G-protein-coupled receptor family and also bind cortistatin with high affinity (26, 27). The development of selective SOM analogues (28, 29) together with the availability of genetically modified animal models (30) contributed to a better understanding of the individual *sst* receptor characteristics and their roles in brain functions and disorders including anxiety and depression (31-34). Recent studies identified a causal role for frontal and cingular SOM cells in modulating behavioral emotionality in mice (3, 35, 36) and showed that SOM anxiolytic effects are mediated by *sst*<sub>2</sub> receptors contained in the amygdala and the septum of the rat brain (37, 38). All receptor subtypes but *sst*<sub>5</sub> are present in the hippocampus and SOM modulates learning and memory formation through *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>4</sub> receptors selectively (39-41). The present study investigates the role of hippocampal SOM and its *sst* receptors in stress response and emotionality, an issue that remained unexplored.

## **Materials / subjects and Methods**

### **Experimental goals**

The aims of the present study were first to determine if and which of the four sst receptor subtypes ( $sst_{1-4}$ ) expressed in the hippocampus inhibit stress-induced activation of the HPA axis and then, to investigate whether such inhibitory control would have any anxiolytic or antidepressant properties. Intrahippocampal injections of sst selective agonists for each receptor subtype were given prior a stress event (inescapable foot-shocks) and plasma CORT elevation was measured. Microdialysis experiments were then conducted to assess the hippocampal CORT feedback level, dynamically. Inhibitory effects of clinically-relevant SOM analogues (RC160 and octreotide) and of two critical receptor-selective agonists ( $sst_2$  and  $sst_4$ ) were tested. Then, independent groups of mice received the sst agonists intrahippocampally and anxiety-like or depressive-like behaviors were assessed. Finally, further hippocampal microdialysis assays and emotional evaluations were conducted in  $sst_2$  or  $sst_4$  knockout mice.

### **Animals**

C57Bl/6 by Jico mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).  $sst_2$  knockout ( $sst_2KO$ ) strain was originally generated by Zheng et al. (42).  $sst_4$  knockout ( $sst_4KO$ ) mice were produced by integration (knockin) of LacZ gene into the *sstr4* gene (43). All mouse lines were backcrossed to the C57BL/6J background (N > 11). KO and wild-type male littermates were obtained by intercrossing heterozygous +/- mice. All mice were bred in an animal room equipped with an artificial 12h light/dark cycle (from 7:00 AM on). Animals were

4-8 month old at the beginning of the experiments. All experiments were conducted between 7h30 and 12h and in compliance with Animal Care and Use Committee (Bordeaux) and approved under the number 5012098-A.

## **Surgery**

Mice were anesthetized with a ketamine (1mg/kg body weight)-xylazine (10mg/kg body weight) mix and placed on a stereotaxic frame. A microdialysis guide-cannulae (CMA/7 microdialysis probe, CMA microdialysis, Sweden) was implanted at the following coordinates from the bregma (44): AP: -2.2mm; L:  $\pm$ 1.35mm; V: 1mm. The laterality of the implantation was randomized between right and left side of the brain. Guide cannulae were fixed to the skull with dental cement (Palavit G, Promodentaire) and 3 screws (stainless steel,  $\emptyset$  0.5mm, L=1mm; FOM2000). For behavioral experiments, mice were implanted at the same coordinates with stainless steel guide-cannulae (Le Guellec tubular components, France). Sterile stylets were inserted in the cannulae to maintain patency. Mice were allowed to recover from surgery for 1 week before experiments.

## **Drugs**

Somatostatin analogues (RC160 and octreotide, TOCRIS, France), as well as selective agonists for sst<sub>1</sub> (L-797,591 Rahway, NJ, USA) sst<sub>2</sub> (L-054,264, TOCRIS, France), sst<sub>3</sub> (L-796,778 Rahway, NJ, USA) or sst<sub>4</sub> (L-803,087, TOCRIS, France) were all used at the dose of 5nmol. For microdialysis experiments, all drugs were diluted in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 10% of dimethylsulfoxide and were delivered into the hippocampus via the microdialysis probe within 15 min. For other experiments, the drugs were prepared at the

concentration of 5nmol/0.5 $\mu$ l based on previous experiments (39) and were delivered into the hippocampus within 5 minutes in freely-moving animals as previously described (45). Injections were given 15 min before testing sessions.

### **Microdialysis**

Microdialysis was performed in freely moving animals to measure CORT levels in the dorsal hippocampus 1h before and 3h after acute stress as previously described (46). The experiment was conducted by squad of 2 animals belonging to controls or experimental groups respectively. The day before the experiment, animals were individually placed in a 30cm-diameter chamber made of clear plexiglass walls and equipped with a grid floor. Animals had *ad lib* access to their habitual chow and water. A microdialysis probe (CMA/7 membrane length 1mm;  $\varnothing$ =0.24mm; CMA Microdialysis, Sweden) was inserted into the guide-cannulae in the dorsal hippocampus. The membrane was 1mm longer than the guide-cannulae to be directly in contact with the hippocampal tissue. Probe was continuously perfused with sterile, filtered Dulbecco's solution (mock CSF, Sigma, France) at a rate of 0.1 $\mu$ l/min for fluid equilibration during 1 night. After the equilibration phase, baseline dialysates were collected every 15 min with a flow rate of 1 $\mu$ l/min during 1h. After baseline establishment, three inescapable foot-shocks (0.9mA; 1sec) were applied from the grid floor within 1 min to provide stress. For pharmacological experiments, the perfusion was switched to another syringe containing the drug or the vehicle for 15 min after baseline. At the end of the injection, syringes were switched back to perfuse aCSF and the stress procedure was applied. The dialysates were collected every 15 min during 3h after stress. Samples were stored at -80°C until free CORT determination.

### **Plasma corticosterone collection**

Mice received an intrahippocampal injection of either one sst agonist or aCSF solution in their home-cage. Fifteen minutes after the injection, 3 foot-shocks were delivered as described above and 15 minutes later blood was collected from the retro-orbital vessel under anaesthesia (isofluran) by a capillary tube. After centrifugation at 3500 r.p.m. for 10 min, the supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until ELISA assay. An enzyme immunoassay commercial kit (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, MI) was used to measure plasma or hippocampal CORT concentrations as previously described (46, 47). The sensitivity of the ELISA assay is 18.6 pg/ml. Baseline sample concentration was more than 10-fold above the sensitivity threshold. Data are expressed in pg/ml/15min for CSF and in ng/ml for plasma.

### **Behavior**

#### **Motion recording during intrahippocampal microdialysis**

Each mouse was video recorded and its activity was quantified by videotracking (Viewpoint, Champagne au Mont d'Or, France). Three displacement thresholds were determined from pilot trials to quantify resting or very small motions, small motions and large motions respectively as function of pixels displacement/16ms. Changes of movement types were counted as a motion unit and analyzed per period of 15 minutes to assess the evolution of the activity from the baseline to the end of the post-stress evaluation.

#### **Elevated Plus-Maze**

The elevated plus-maze apparatus was composed of grey polyvinylcarbonate and consisted of four arms surrounding a central platform. Each arm was 30cm long,

7cm wide, and 60cm above the ground. The four arms joined at the center on a 7cm square platform. Two opposite arms of the plus maze ("closed arms") were bordered by 24cm-high sidewalls opened on the top, and the two other arms ("open arms") did not have sidewalls. Light intensity in the open arms was 70 lux. At the beginning of each test, the mouse was placed in the center of the maze in a cylinder (7cm in diameter, 17cm high) for 30 sec. Then, the cylinder was removed and the animal was allowed to explore all arms of the maze freely for 8 min. An entry was counted when the mouse entered an arm with all 4 feet. The number of entries, times in open and closed arms, latencies to entry and explorations of open arms extremities were measured.

### **Open-Field**

The open-field was a white circular arena (1m diameter) surrounded by a 25 cm-high wall made of opaque plexiglass. One lamp, 2 meters above the apparatus, provided 70 lux of illumination distributed equally over the entire surface of the apparatus. Animals were placed into the open-field facing to the wall and were allowed to freely explore the apparatus for 5 min. The floor was virtually divided into a periphery annulus 12cm wide and a central zone. Exploration parameters were quantified by videotracking (Viewpoint, Champagne au Mont d'Or, France).

### **Forced Swim Test**

Mice were placed into a glass cylinder (diameter 15cm, height 29cm) containing 20cm of water at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . The protocol used is that initially described by Porsolt et al. (48) in which the animal is maintained in water during 6 min. The time respectively spent in swimming, climbing the wall of the glass cylinder or immobility was analyzed during the first four minutes or during the last four

minutes of the test depending on whether depressive-like behaviors (knockout mice experiments) or antidepressant effects (pharmacology experiments) were expected.

### **Stress-sensitive Beam Walking Test**

Mice were placed at the extremity of a 1-meter long beam, 80cm high from the floor. The start platform was narrow (3x4 cm) and exposed to intense light (120 lux) to encourage the animal to walk through the beam to reach the dark compartment. The time to cross the beam and the number of hesitations (stop or slowing down) were recorded and quantified by the videotrack system. Animals were first trained for 3 days (3 trials/day) with beams of different shapes and sizes with increasing difficulty: square-beam (10mm, S10), round-beam (15mm, R15), square-beam (8mm, S8). A cut-off was applied if the mouse fell down from the beam or did not cross the beam in 2-min time. All mice successfully crossed all beams by the end of the training with average crossing time of  $10.26 \pm 0.6$  sec,  $10.84 \pm 4.3$  sec and  $11.1 \pm 1.3$  sec for S10, R15 and S8 respectively. The next day, mice were injected with  $sst_2$  or  $sst_4$  agonists or aCSF 15 minutes before receiving a foot-shock stress as described above. Fifteen minutes later, mice were tested on the beams experienced during training and an additional round-beam (10 mm) was introduced. Results are the mean of two successive trials for each beam.

### **Histology**

At the end of the experiments, mice were anesthetized with 27mg/0.5ml of Sodium Pentobarbital and quickly decapitated. Entire heads were immersed in a solution of 10% formaldehyde at 4°C for two weeks. The brain was removed

from the skull and was then cryoprotected in a 10% formaldehyde/30% saccharose solution during two days and quickly frozen in cold isopentane. Frozen brains were coronally sectioned into slices (60 $\mu$ m thickness). A cresyl violet stain was used to check the exactness of the microdialysis probes or cannulae implantation.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using the Statview 5.0 software (Statistical Analysis System Institute Inc, NC, USA). The data were analyzed using ANOVA to determine main factor effects and followed by appropriate post-hoc tests. Mean group comparisons were performed using Student's t-tests.

### **Results**

Plasma CORT levels increased by 4-fold following stress exposure relative to baseline/non-stressed conditions (Figure 1). CORT levels was lower following intrahippocampal injections of L-054,264 ( $t(11)=3.98$ ;  $P=0.002$ ) or L-803,087 ( $t(9)=2.94$ ;  $P=0.016$ ) but not of L-797,591 or L-796-778 agonists relative to stressed controls, indicating that hippocampal  $sst_2$  and  $sst_4$ , but not  $sst_1$  or  $sst_3$  receptors, contribute to inhibit stress-induced activation of the HPA axis.

Hippocampal CORT concentrations sampled by microdialysis rose within one hour following stress onset in control mice (Figures 2-3) and progressively returned to baseline levels within the next two hours. SOM analogues RC160 and octreotide, known to target  $sst_{2-3-5}$  receptor subtypes attenuated stress-induced increase in hippocampal CORT levels (Figure 2; Treatment effects  $F_s \geq 4.10$ ;  $P_s \leq 0.05$  for both analogues). The non-peptidic agonists L-054,264 and L-803,087 (Figure 3) targeting  $sst_2$  and  $sst_4$  respectively, fully blocked the

elevation of CORT levels in the hippocampus following acute stress (treatment effects:  $F_{s} \geq 7.61$ ;  $P_{s} \leq 0.01$  for both agonists). Inhibitory effects started immediately after infusion ( $P_{s} \leq 0.01$  for both agonists) and lasted for at least 3 hours post stress onset ( $P_{s} \leq 0.05$  for both agonists). As indicated on Figure 3B, stress induced a transient peak of hyperactivity in all groups. But then, locomotor activity levels recovered and were lower in mice infused with either the  $sst_2$  or  $sst_4$  agonist relative to controls (treatment effects:  $F_{s} \geq 6.18$ ;  $P_{s} \leq 0.02$  for both agonists), indicating that both  $sst_2$  and  $sst_4$  hippocampal receptors attenuate stress-induced reactivity. However, further behavioral investigations revealed that each of these agonists alleviates stress-induced emotional responses differently (Figure 4). L-054,264 selectively reduced anxiety-like behaviors as assessed by exploration levels of open places either in the elevated plus-maze ( $P \leq 0.009$  for both entries and time in open arms) or in the open-field ( $P = 0.01$ ). In the elevated plus-maze, L-054,264 also shortened the latency to enter an open arm ( $P = 0.001$ ) and increased the number of explorations to the open arm extremities ( $P = 0.02$ ). Both L-054,264 and L-803,087 modified behaviors in the forced swim test but the latter increased the attempts to escape by trying to climb on the wall of the glass cylinder ( $P = 0.04$ ) whereas the former increased the time spent in swimming ( $P = 0.02$ ). Finally, only L-803,087 altered performance in the beam walking test. The  $sst_4$  agonist prevented both stress-induced hesitations ( $P = 0.007$ , data not shown) and increases in time ( $P < 0.01$ ) to cross the beams as a function of difficulty and novelty, further highlighting that hippocampal  $sst_2$  and  $sst_4$  receptors control different emotional behaviors.

Consistent with such findings, behaviors of  $sst_2$ KO and  $sst_4$ KO mice in the elevated plus-maze and in the forced swim test were altered in an opposite manner (Figure 5). Relative to wild type littermates,  $sst_2$ KO mice displayed

increased latency to enter an open arm ( $P=0.04$ ), lower exploration time in open arms ( $P=0.001$ ) and lower access to open arm extremities ( $P=0.003$ ) whereas no significant effect was detected between  $sst_4$ KO and wild type. In the forced swim test, both  $sst_2$ KO and  $sst_4$ KO mice displayed increased immobility relative to their wild type littermates ( $P=0.001$  and  $P=0.004$ , respectively). However, swimming decreased selectively in  $sst_2$ KO mice ( $P=0.002$ ) whereas climbing decreased selectively in  $sst_4$ KO mice ( $P=0.02$ ) indicating that active behaviors are qualitatively altered depending on genotypes.

Basal levels of plasma CORT were significantly higher in  $sst_2$ KO mice ( $P=0.04$ ) than in WT littermates and consistently, basal CORT levels in hippocampal dialysates were also higher in  $sst_2$ KO mice (Figure 6). A significant genotype effect was observed both before ( $F(1,16)=9.91$ ;  $P=0.006$ ) and after stress exposure ( $F(1,16)=6.86$ ;  $P=0.019$ ). The time lag to produce a significant increase (45 min,  $P=0.009$ ) was shorter and the maximal ( $P=0.02$ ) and recovery ( $P=0.01$ ) levels of CORT concentrations were significantly higher in  $sst_2$ KO than in WT, indicating that the HPA axis is constitutively up-regulated and is more reactive to stress in the absence of  $sst_2$  receptors. No change in CORT levels was observed in  $sst_4$ KO mice (data not shown,  $F(1,18)=0.07$ ;  $P=0.78$ ).

Finally, and to further investigate the inhibitory control induced by  $sst_4$  receptor activation, intrahippocampal injections of L-803,087 were tested in  $sst_2$ KO mice (Figure 7). L-803,087 lowered stress-induced elevation of hippocampal CORT levels in  $sst_2$ KO mice ( $F(1,12)=5.76$ ;  $P=0.03$ ), thus confirming that hippocampal  $sst_4$  receptors contribute to the inhibition of the HPA axis. However, the inhibitory effect of L-803,087 occurred only lately (+1h30) whereas it occurred immediately after stress onset in experiments with C57BL/6 mice (see Figure 3), indicating that the presence of hippocampal  $sst_2$  receptors is

required for the fast-acting inhibition of the HPA axis by somatostatinergic neurotransmission.

## **Discussion**

The hippocampus is important for episodic and spatial memory but is now also recognized for its role in mood regulation (2, 10). Hippocampal regulation on the HPA axis appears to be critically involved in the generation of psychiatric and neurocognitive symptoms subsequent to chronic stress exposure (49-51) but also, following acute exposure to psychogenic stressors (52) or acute therapy with high-dose of corticoids (53). Dysregulations of the HPA axis may promote stress-related illnesses such as depression, generalized anxiety, post-traumatic stress disorders and memory deficits (54, 55). There is evidence that stress and glucocorticoids negatively impact hippocampal neuroplasticity including neurogenesis, neuronal and glial survivals in relationship with depression (1, 56-59). Many studies also linked depression to an increase in the excitatory-inhibitory ratio (60, 61) which may be attributed to a loss of GABAergic neurons. Parvalbumin and SOM subpopulations of GABAergic neurons in all hippocampal subfields and in both the dorsal and ventral parts are particularly vulnerable to chronic stress exposure (24). We observed herein a causal inhibitory effect of RC160, octreotide as well as selective  $sst_2$  or  $sst_4$  receptor agonists on acute stress response, as measured by alterations in both plasma and hippocampal CORT levels. Such findings support the critical role played by SOM neurotransmission in the inhibitory hippocampal feedback on the HPA axis. The levels and the time course of stress-induced increase in hippocampal CORT were comparable to previous experiments using the same protocol (47, 62, 63). Consistent with the finding that acute stress or dexamethasone produces rapid

SOM release in the hippocampus (25), SOM inhibitory effects were detectable within 15 minutes after infusion, indicating that activation of the hippocampal somatostatinergic network by glucocorticoids controls the stress response rapidly.  $sst_2$  and  $sst_4$  receptor agonists produced stronger effects than RC160 and octreotide in agreement with better stability and longer half-life than peptidergic analogues (64, 65). Mice reacted to footshocks by expressing a transient peak of locomotor activity which was comparable in all groups, indicating that  $sst$  agonists did not alter sensorial perception thresholds. Both  $sst_2$  and  $sst_4$  receptor agonists reduced locomotor activity, an inhibitory effect which occurred rapidly and persisted all along the entire experiment. The time course of the decreased activity in mice infused with  $sst_2$  or  $sst_4$  agonist rather indicates a better adaptation (habituation) to the aversive context than motor deficiencies. Accordingly, L-054,264 had no effect and L-803,087 improved performance in the beam walking test. Both agonists also had similar inhibitory effects on immobility in the forced swim test. Interestingly, in this latter test, they produced different active behaviors, implying that distinct mechanisms underlie their behavioral effects. The  $sst_2$  receptor agonist increased swimming behavior without affecting climbing behavior, a type of behavioral pattern which is characteristic of serotonergic activity. In sharp contrast, the  $sst_4$  receptor agonist increased climbing behavior without affecting swimming as produced by antidepressants with noradrenergic activity (66-68). The behavioral profile produced by L-054,264 (decreased immobility/increased swimming) was similar to that previously observed in rats which received intracerebroventricular injections of SOM (32) or L-779,976, another  $sst_2$  selective agonist (33). In addition, the hippocampal injection of  $sst_2$ , but not the  $sst_4$  agonist, also produced anxiolytic-like behavior in elevated plus-maze and open field testing,

corroborating the idea that hippocampal  $sst_2$  and  $sst_4$  regulate different emotional responses.

Consistent with the pharmacological results,  $sst_2$ KO, but not  $sst_4$ KO mice displayed increased anxiety-like behaviors as initially observed in the  $sst_2$ KO strain (31). CORT levels were also constitutively higher in  $sst_2$ KO mice in agreement with the increased ACTH release previously described in these mice (31) and the increased basal level of CORT reported in SOMKO mice (3), an effect which was not detected in  $sst_4$ KO mice. In addition, increased immobility in the forced swim test associated with decreased swimming in  $sst_2$ KO mice whereas climbing was decreased in  $sst_4$ KO mice corroborate the idea that  $sst_2$  and  $sst_4$  regulate emotionality by different mechanisms and may interact with serotonergic and noradrenergic systems respectively. Notwithstanding, selective and global axonal degeneration of noradrenergic projections was recently identified in  $sst_2$ KO mice suggesting that  $sst_2$  is critically involved in the maintenance and integrity of the noradrenergic system, a widespread brain network of fundamental importance for the regulation of arousal, stress, emotions and memory functions (69).

We previously showed that injections of a  $sst_4$  agonist in the dorsal hippocampus have detrimental effects on spatial learning but promote the use of the striatal-dependent memory system (40). In a similar way, stress promotes a shift from flexible cognitive to rather rigid habit memory systems to rescue task performance (70, 71). Together with the present results, this suggests that dorsal hippocampal  $sst_4$  receptors control both emotional and cognitive responses to cope with stressful situations. However, previous results showed that the functionality of hippocampal  $sst_4$  receptors is lost in case of blockade or absence of  $sst_2$ . L-803,087-mediated increase in glutamatergic excitability and

bursting frequency in hippocampal CA1 as well as L-803,087-mediated shift toward the use of the striatal memory system are blocked by  $sst_2$  antagonists or  $sst_2$  gene deletion (39, 72, 73). In line with these results we show here that, in the absence of  $sst_2$  receptors,  $sst_4$ -mediated inhibition on the HPA axis is lost during induction of the stress response. How  $sst_2$  and  $sst_4$  receptors cooperate remains unclear but, based on immunohistochemistry detections (39), binding experiments (31, 74) as well as mRNA mapping (75) in the mouse brain, the non overlapping distribution of  $sst_2$  and  $sst_4$  respectively found in the dentate gyrus and in the CA1 subfield suggests that interactions between these sst receptor functions occur indirectly and that dentate gyrus and CA1 cooperate to control the HPA axis activity. The non-overlapping distribution may also account for the differential effects of  $sst_2$  and  $sst_4$  on anxiety-like and depressive-like behaviors. This is in line with a recent study which demonstrated that optogenetic control of granule cells activity in the dorsal dentate gyrus selectively results in a dramatic increase in exploratory behavior in novel environments while affecting the ventral dentate gyrus causes an equally robust decrease in anxiety-related behavior (76). Insofar as the role of the CA1 subfield in emotions remains unclear, the present results suggest that dentate gyrus  $sst_2$  and CA1  $sst_4$  receptors conjointly control behavior in response to glucocorticoids by providing anti-anxiety and antidepressant effects.

In conclusion, SOM is a key regulator of the HPA axis activity not only at the pituitary level but also at the brain level. The results of this study provide evidence that besides cortical, hypothalamic, amygdalar and septal involvements, hippocampal SOM neurotransmission critically controls both HPA function and emotionality through  $sst_2$  and  $sst_4$  receptors. This must be taken into account for the development and management of multiselective sst receptor

ligands such as pasireotide which is currently used to control hypercortisolism in the Cushing's disease, a syndrome which most often, is also associated with anxiety, irritability, depression and memory troubles (77, 78).

## **Acknowledgements**

This study were supported by the Région Aquitaine and by the Programme Interdisciplinaire du CNRS "Longévit  et Vieillissement". We thank the CPN and the INCIA small animal facility staffs for technical assistance and animal care. We thank Una Avdic (Erasmus fellow), Marie Mennesson and Bertrand Beauchoux for their assistance during experiments.

## **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interests or conflict of interest in relation to the work described.

## **REFERENCES**

1. Pittenger C, Duman RS (2008): Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 33:88-109.
2. McEwen BS, Gray JD, Nasca C (2015): 60 years of neuroendocrinology: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *J Endocrinol*. 226:T67-83.
3. Lin LC, Sibille E (2015): Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Molecular Psychiatry*. 20:377-387.
4. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009): Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 10:434-445.
5. Pardon MC, Rattray I (2008): What do we know about the long-term consequences of stress on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders? *Neurosci Biobehav Rev*. 32:1103-1120.

6. Elgh E, Astot AL, Fagerlund M, Eriksson S, Olsson T, Nasman B (2006): Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*. 59:155-161.
7. Herman JP, Cullinan WE (1997): Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 20:78-84.
8. McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS (1968): Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*. 220:911-&.
9. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005): Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 29:1201-1213.
10. McEwen BS, Nasca C, Gray JD (2015): Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*.
11. Huang Y, Coupland NJ, Lebel RM, Carter R, Seres P, Wilman AH, et al. (2013): Structural Changes in Hippocampal Subfields in Major Depressive Disorder: A High-Field Magnetic Resonance Imaging Study. *Biological Psychiatry*. 74:62-68.
12. Sheline YI (1996): Hippocampal atrophy in major depression: A result of depression-induced neurotoxicity? *Molecular Psychiatry*. 1:298-299.
13. Andela CD, van Haalen FM, Ragnarsson O, Papakokkinou E, Johannsson G, Santos A, et al. (2015): MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. *European Journal of Endocrinology*. 173:R1-R14.
14. Toffanin T, Nifosi F, Follador H, Passamani A, Zonta F, Ferri G, et al. (2011): Volumetric MRI analysis of hippocampal subregions in Cushing's disease: A model for glucocorticoid neural modulation. *European Psychiatry*. 26:64-67.
15. Fendler K, Karmos G, Telegdy G (1961): EFFECT OF HIPPOCAMPAL LESION ON PITUITARY-ADRENNAL FUNCTION. *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 20:293-&.
16. Fischette CT, Komisaruk BR, Edinger HM, Feder HH, Siegel A (1980): Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion. *Brain Research*. 195:373-387.
17. Herman JP, Mueller NK (2006): Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behavioural Brain Research*. 174:215-224.
18. Jankord R, Herman JP (2008): Limbic Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Function during Acute and Chronic Stress. *Stress, Neurotransmitters, and Hormones: Neuroendocrine and Genetic Mechanisms*. 1148:64-73.
19. Radley JJ, Sawchenko PE (2011): A Common Substrate for Prefrontal and Hippocampal Inhibition of the Neuroendocrine Stress Response. *Journal of Neuroscience*. 31:9683-9695.
20. Joels M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ (2007): Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 28:72-96.
21. Joels M (2008): Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *European Journal of Pharmacology*. 583:312-321.
22. Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (2005): Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:19204-19207.
23. Hu W, Zhang M, Czeh B, Fluegge G, Zhang W (2010): Stress Impairs GABAergic Network Function in the Hippocampus by Activating Nongenomic Glucocorticoid Receptors and Affecting the Integrity of the Parvalbumin-Expressing Neuronal Network. *Neuropsychopharmacology*. 35:1693-1707.
24. Czeh B, Varga ZKK, Henningsen K, Kovacs GL, Miseta A, Wiborg O (2015): Chronic Stress Reduces the Number of GABAergic Interneurons in the Adult Rat Hippocampus, Dorsal-Ventral and Region-Specific Differences. *Hippocampus*. 25:393-405.
25. Arancibia S, Payet O, Givalois L, Tapia-Arancibia L (2001): Acute stress and dexamethasone rapidly increase hippocampal somatostatin synthesis and release from the dentate gyrus hilus. *Hippocampus*. 11:469-477.
26. Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008): Somatostatinergic systems in brain: Networks and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 286:75-87.
27. Martel G, Dutar P, Epelbaum J, Viollet C (2012): Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Frontiers in endocrinology*. 3:154-154.
28. Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003): Opportunities in somatostatin research: Biological, chemical and therapeutic aspects. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:999-1017.
29. Hannon JP, Bruns C, Weckbecker G, Hoyer D (2004): Somatostatin receptor gene family subtype selectivity for ligand binding. *Somatostatin*. 24:81-106.
30. Zeyda T, Hochgeschwender U (2008): Null mutant mouse models of somatostatin and cortistatin, and their receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 286:18-25.

31. Viollet C, Vaillend C, Videau C, Bluet-Pajot MT, Ungerer A, L'Heritier A, et al. (2000): Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *European Journal of Neuroscience*. 12:3761-3770.
32. Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT (2008): Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience*. 157:666-676.
33. Engin E, Treit D (2009): Anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin: the role of sst2 and sst3 receptors. *Psychopharmacology*. 206:281-289.
34. Epelbaum J, Guillou J-L, Gastambide F, Hoyer D, Duron E, Viollet C (2009): Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: An old story coming of age? *Progress in Neurobiology*. 89:153-161.
35. Soumier A, Sibille E (2014): Opposing Effects of Acute versus Chronic Blockade of Frontal Cortex Somatostatin-Positive Inhibitory Neurons on Behavioral Emotionality in Mice. *Neuropsychopharmacology*. 39:2252-2262.
36. Lin LC, Sibille E (2015): Transcriptome changes induced by chronic psychosocial/environmental or neuroendocrine stressors reveal a selective cellular vulnerability of cortical somatostatin (SST) neurons, compared with pyramidal (PYR) neurons. *Molecular psychiatry*. 20:285-285.
37. Yeung M, Engin E, Treit D (2011): Anxiolytic-like effects of somatostatin isoforms SST 14 and SST 28 in two animal models (*Rattus norvegicus*) after intra-amygdalar and intra-septal microinfusions. *Psychopharmacology*. 216:557-567.
38. Yeung M, Treit D (2012): The anxiolytic effects of somatostatin following intra-septal and intra-amygdalar microinfusions are reversed by the selective sst2 antagonist PRL2903. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 101:88-92.
39. Gastambide F, Lepousez G, Viollet C, Loudes C, Epelbaum J, Guillou J-L (2010): Cooperation Between Hippocampal Somatostatin Receptor Subtypes 4 and 2: Functional Relevance in Interactive Memory Systems. *Hippocampus*. 20:745-757.
40. Gastambide F, Viollet C, Lepousez G, Epelbaum J, Guillou J-L (2009): Hippocampal SSTR4 somatostatin receptors control the selection of memory strategies. *Psychopharmacology*. 202:153-163.
41. Guillou JL, Micheau J, Jaffard R (1993): Effects of intrahippocampal injections of somatostatin and cysteamine on spatial discrimination-learning in mice. *Psychobiology*. 21:265-271.
42. Zheng H, Bailey A, Jiang MH, Honda K, Chen HY, Trumbauer ME, et al. (1997): Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Molecular Endocrinology*. 11:1709-1717.
43. Helyes Z, Pinter E, Sandor K, Elekes K, Banvolgyi A, Keszthelyi D, et al. (2009): Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:13088-13093.
44. Paxinos G, Franklin K, B,J (2001): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2 ed. San Diego: Academic Press.
45. Martel G, Millard A, Jaffard R, Guillou JL (2006): Stimulation of hippocampal adenylyl cyclase activity dissociates memory consolidation processes for response and place learning. *Learning & Memory*. 13:342-348.
46. Dorey R, Pierard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, et al. (2011): Membrane Mineralocorticoid but not Glucocorticoid Receptors of the Dorsal Hippocampus Mediate the Rapid Effects of Corticosterone on Memory Retrieval. *Neuropsychopharmacology*. 36:2639-2649.
47. Tronche C, Lestage P, Louis C, Carrie I, Beracochea D (2010): Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behavioural Brain Research*. 215:255-260.
48. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977): Behavioral despair in mice - primary screening-test for antidepressants. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*. 229:327-336.
49. Sapolsky RM (2000): Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Archives of General Psychiatry*. 57:925-935.
50. Sapolsky RM (2000): The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: A primer on neuron death. *Biological Psychiatry*. 48:755-765.
51. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1985): Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number - implications for aging. *Journal of Neuroscience*. 5:1222-1227.
52. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2012): The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*. 13:22-37.
53. Brown ES (2009): Effects of Glucocorticoids on Mood, Memory, and the Hippocampus Treatment and Preventive Therapy. *Glucocorticoids and Mood Clinical Manifestations, Risk Factors, and Molecular Mechanisms*. 1179:41-55.
54. Dinan TG (1994): Glucocorticoids and the genesis of depressive-illness - a psychobiological model. *British Journal of Psychiatry*. 164:365-371.

55. Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, Almeida OFX, Van Dam AM, Rajkowska G, et al. (2014): Neuropathology of stress. *Acta Neuropathologica*. 127:109-135.
56. Czeh B, Lucassen PJ (2007): What causes the hippocampal volume decrease in depression? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 257:250-260.
57. Willner P, Scheel-Kruger J, Belzung C (2013): The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev*. 37:2331-2371.
58. Banasr M, Duman RS (2007): Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS & neurological disorders drug targets*. 6:311-320.
59. Banasr M, Dwyer JM, Duman RS (2011): Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Current Opinion in Cell Biology*. 23:730-737.
60. Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Matrov D, Harro J, Wojcik SM, Venzala E, et al. (2009): Increased Vulnerability to Depressive-Like Behavior of Mice with Decreased Expression of VGLUT1. *Biological Psychiatry*. 66:275-282.
61. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC (2003): GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular Psychiatry*. 8:721-737.
62. Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, et al. (2010): Rapid Stress-Induced Corticosterone Rise in the Hippocampus Reverses Serial Memory Retrieval Pattern. *Hippocampus*. 20:196-207.
63. Dorey R, Pierard C, Chauveau F, David V, Beracochea D (2012): Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 37:2870-2880.
64. Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen DM, et al. (1998): Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science*. 282:737-740.
65. Yang LH, Guo LQ, Pasternak A, Mosley R, Rohrer S, Birzin E, et al. (1998): Spiro 1H-indene-1,4 '-piperidine derivatives as potent and selective non-peptide human somatostatin receptor subtype 2 (sst(2)) agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 41:2175-2179.
66. Cryan JF, Mombereau C (2004): In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*. 9:326-357.
67. Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995): Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*. 121:66-72.
68. Reneric JP, Bouvard M, Stinus L (2001): Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*. 24:379-390.
69. Adori C, Glueck L, Barde S, Yoshitake T, Kovacs GG, Mulder J, et al. (2015): Critical role of somatostatin receptor 2 in the vulnerability of the central noradrenergic system: new aspects on Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 129:541-563.
70. Schwabe L, Wolf OT (2013): Stress and multiple memory systems: from 'thinking' to 'doing'. *Trends in Cognitive Sciences*. 17:60-68.
71. Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS (2010): Memory formation under stress: Quantity and quality. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 34:584-591.
72. Cammalleri M, Cervia D, Dal Monte M, Martini D, Langenegger D, Fehlmann D, et al. (2006): Compensatory changes in the hippocampus of somatostatin knockout mice: upregulation of somatostatin receptor 2 and its function in the control of bursting activity and synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience*. 23:2404-2422.
73. Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Dournaud P, Dutar P, Billard JM, et al. (2002): Somatostatin receptor subtypes 2 and 4 affect seizure susceptibility and hippocampal excitatory neurotransmission in mice. *European Journal of Neuroscience*. 16:843-849.
74. Videau C, Hochgeschwender U, Kreienkamp HJ, Brennan MB, Viollet C, Richter D, et al. (2003): Characterisation of I-125 -Tyr(0)DTrp(8)-somatostatin binding in sst1-to sst4-and SRIF-gene-invalidated mouse brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 367:562-571.
75. Vanetti M, Ziolkowska B, Wang X, Horn G, Holtt V (1994): mRNA distribution of two isoforms of somatostatin receptor 2 (mSSTR2A and mSSTR2B) in mouse brain. *Brain research Molecular brain research*. 27:45-50.
76. Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, et al. (2013): Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron*. 77:955-968.
77. Badia X, Valassi E, Roset M, Webb SM (2014): Disease-specific quality of life evaluation and its determinants in Cushing's syndrome: what have we learnt? *Pituitary*. 17:187-195.
78. Colao A, Boscaro M, Ferone D, Casanueva FF (2014): Managing Cushing's disease: the state of the art. *Endocrine*. 47:9-20.



## Legends to the Figures

### **Figure 1: hippocampal infusions of sst<sub>2</sub> and sst<sub>4</sub> receptor agonists decrease the reactivity of the HPA axis to acute stress.**

Animals received hippocampal infusion of aCSF (NS: Non-Stressed, N=5; and Stressed, N=6), sst<sub>1</sub> (N=4), sst<sub>2</sub> (N=7), sst<sub>3</sub> (N=4) or sst<sub>4</sub> receptor agonists (N=5), 15 minutes before acute foot-shock stress. Plasma was collected 15 minutes after stress for ELISA analysis. Both sst<sub>2</sub> and sst<sub>4</sub> receptor agonists attenuated CORT response to acute stress exposure (P=0.0022 and P=0.0164, respectively) whereas other agonists had no effect. Data are expressed in ng/ml, means + s.e.m. \*P<0.05, \*\*P<0.01 relative to the aCSF stressed group with Student's *t*-test.

### **Figure 2: hippocampal infusion of somatostatin analogues reduce hippocampal CORT elevation by acute stress.**

Infusion of RC160 (N=9) or octreotide (OCTR; N=8) reduced CORT level elevation in response to acute stress as compared to aCSF (N=16). The bar on the time scales indicates the infusion of the analogue. The grey arrow indicates the time when the acute foot-shock stress (S) was applied. Data are expressed as mean CORT concentration in pg/ml/15min ± s.e.m. \*P<0.05 compared to aCSF group with Student's *t*-tests.

**Figure 3: hippocampal concentrations of CORT and general motion activity are decreased by infusions of both sst<sub>2</sub> and sst<sub>4</sub> receptor agonists.**

**A-**Time-course evolution of CORT level in the dorsal hippocampus sampled every 15 minutes for 1 hour before and 3 hours following acute stress. The bar on the time scales indicates the infusion of the sst agonist. The grey arrow indicates when the acute foot-shock stress (S) was applied. Both sst<sub>2</sub> (red square; N=10) and sst<sub>4</sub> (blue triangle; N=7) receptor agonists rapidly decreased hippocampal CORT levels (within 15 minutes) and inhibited CORT elevation in response to acute stress as compared to aCSF (white circle; N=16). Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. hippocampal CORT concentration in pg/ml/15min. **B-** Time-course evolution of stress-induced activity. Both agonists decreased stress reactivity in a long-lasting manner. Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. of motion units/15min. \*P<0.05, \*\*P<0.01, compared to aCSF group with Student's *t*-tests.

**Figure 4: Hippocampal sst<sub>2</sub> and sst<sub>4</sub> receptors regulate emotional behaviors differently.**

Elevated-plus maze, open field, forced swim test and beam walking tests were performed on the same animals with intra-hippocampal aCSF (N=10), sst<sub>2</sub> (L-054,264; N=8) or sst<sub>4</sub> (L-803,087, N=8) agonist infusions.

**A.** Anxiety-like behavior evaluated in the elevated-plus maze showed that infusion of L-054,264 increased the time spent and the open arms entries whereas infusion of L-803,087 had no effect. Data are expressed as mean percentage of time and entries (+s.e.m.) related to total time spent or entries in all arms during the test.

**B.** Anxiety-like behavior evaluated in the open-field showed that both L-054,264 and L-803,087 decreased latency to reach the center of the arena but only L-054,264 increased the time spent in the center area. Data are expressed as mean latency to reach the center in seconds (+s.e.m). and mean percentage of time spent in the center (+s.e.m.) relatively to the entire arena. **C.** Recording of the last four minutes in the

forced swim test, showed that L-054,264 increased the time spent in swimming whereas no effect was observed on climbing nor, albeit almost significant, on immobility (P=0.07). L-803,087 decreased immobility to the benefit of increased climbing but not of swimming responses. Results are expressed in percentage of time spent (+s.e.m.) for each behavior.

**D.** Beam Walking testing showed that the time to cross the beams was decreased by L-803,087 and reached a significant level in the hardest

difficulty tested. Square or round and the associated number indicate the shape and the section size of the beam. Data are expressed as mean time (second +s.e.m.) to cross the beam.

\*P<0.05 and \*\*P<0.01 relative to the aCSF group using Student's t-tests.

**Figure 5: *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>4</sub> receptor gene invalidation differently modulate anxiety- and depressive-like behaviors.**

Elevated-plus maze testing aimed at evaluating anxiety-like behaviors showed that the latency to enter an open arm (seconds) was increased while percentage of time spent in open arms as well as entries into open arm extremities were decreased in *sst*<sub>2</sub>KO mice (**A**) but not in *sst*<sub>4</sub>KO mice (**B**) relative to their WT littermates. *sst*<sub>2</sub>KO, N=12; WT, N=12; *sst*<sub>4</sub>KO, N=10 WT N=8.

Recording of the first four minutes of the forced swim test [aimed at evaluating depressive-like behavior] revealed increased immobility in both *sst*<sub>2</sub>KO (**C**) and *sst*<sub>4</sub>KO (**D**) mice. Active behaviors differed between genotypes in that swimming decreased in *sst*<sub>2</sub>KO whereas climbing was affected in *sst*<sub>4</sub>KO mice. *Sst*<sub>2</sub>KO, N=12; WT, N=12; *sst*<sub>4</sub>KO, N=10; WT, N=12.

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 relative to wild type littermates with Student's *t*-tests

**Figure 6: *sst*<sub>2</sub> gene invalidation leads to elevated plasma and hippocampal CORT concentrations.**

**A.** Basal plasma CORT concentration measured in *sst*<sub>2</sub>KO mice (-/- , N=8) was higher than in wild-type mice (+/+, N=5) **B.** Levels of CORT concentration measured in hippocampal dialysates were also higher in *sst*<sub>2</sub>KO (N=9) than wild-type (N=9) mice, both before and after the application of electric foot-shocks. The grey arrow indicates the time when acute stress was applied. Data are expressed as mean CORT concentration (ng/ml or pg/ml/15min) ± s.e.m. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs wild-type groups using Student's t-tests.

**Figure 7: Hippocampal infusion of the *sst*<sub>4</sub> receptor agonist L-803,087 in *sst*<sub>2</sub>KO mice decreases CORT levels only during recovery of acute stress.**

Hippocampal infusion of the *sst*<sub>4</sub> agonist L-803,087 in *sst*<sub>2</sub>KO mice (N=5) did not alter the early increase in CORT levels (from 0 to 90 minutes) following acute stress. However, L-803,087 infusion accelerated recovery (from 90 to 180 minutes) and even decreased baseline CORT levels, as compared to aCSF-infused *sst*<sub>2</sub>KO mice(N=9). The bar on the time scale indicates when L-803,087 was infused. The grey arrow indicates the time when the acute foot-shock stress (S) was applied. Data are expressed as mean hippocampal CORT concentration in ng/ml/15min ± s.e.m. \*P<0.05, \*\*P<0.01 relative to the aCSF group with Student's t-tests.

Figure 1

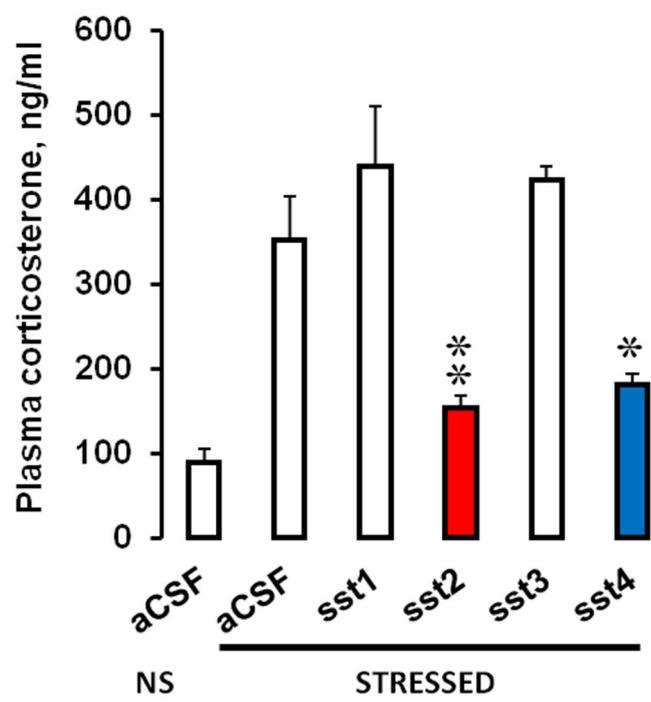


Figure 2

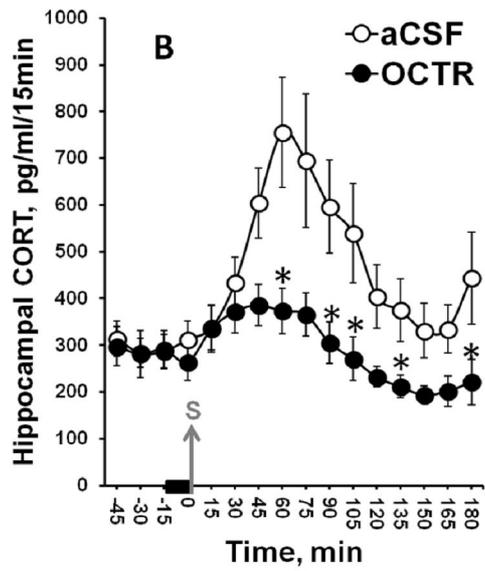
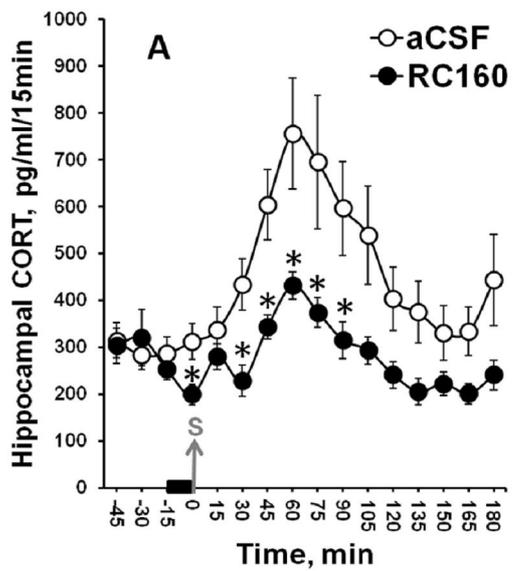


Figure 3

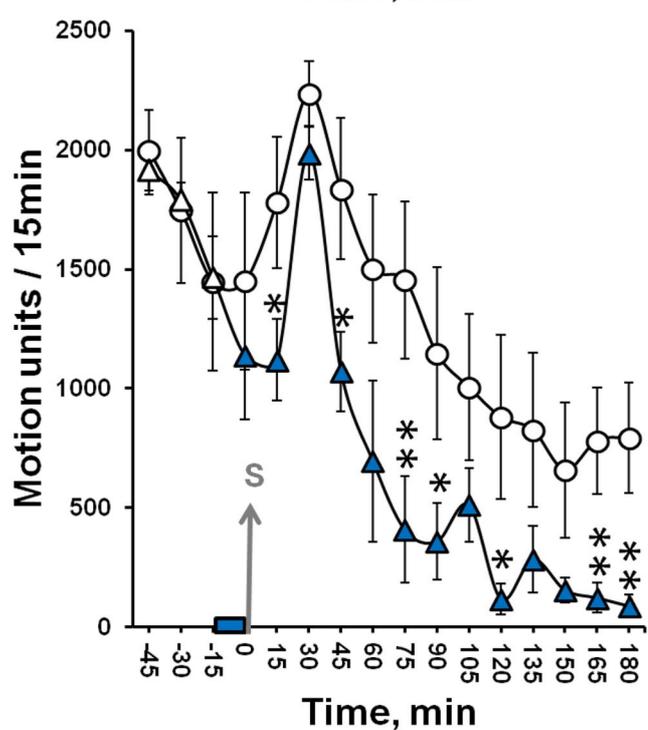
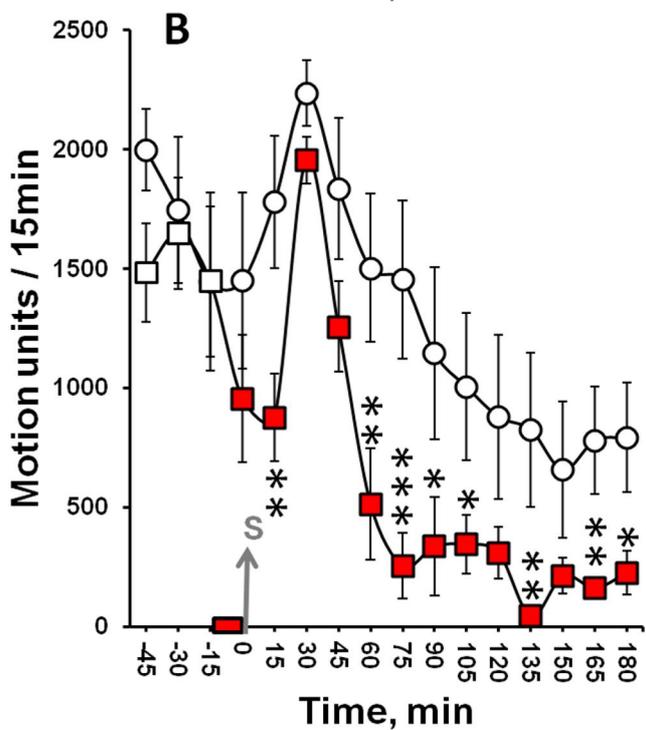
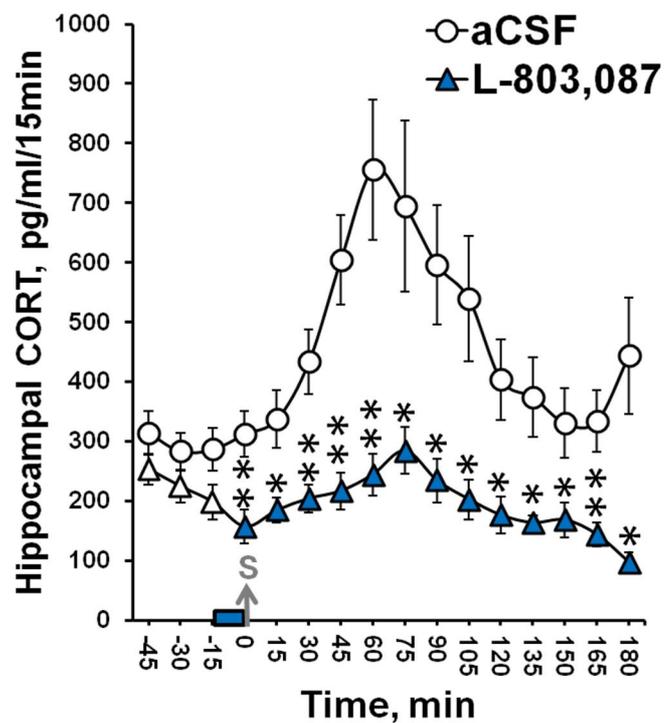
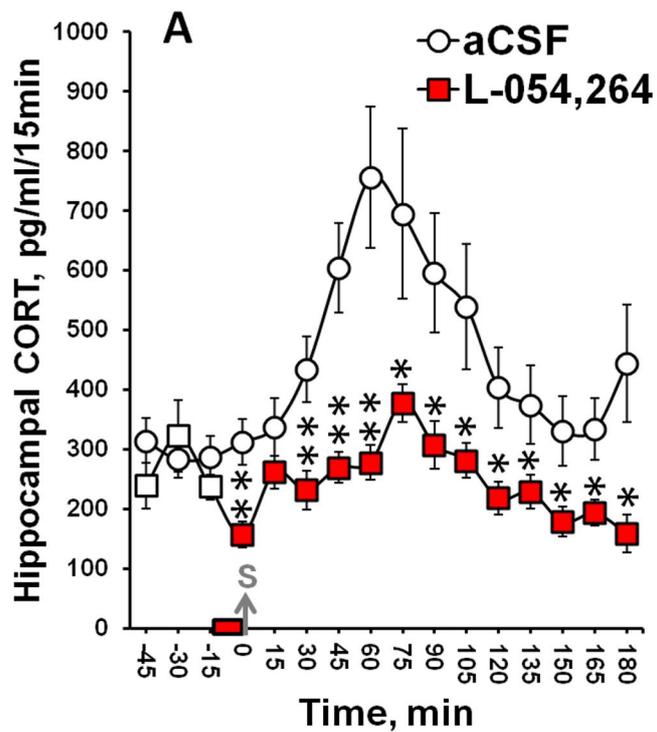


Figure 4

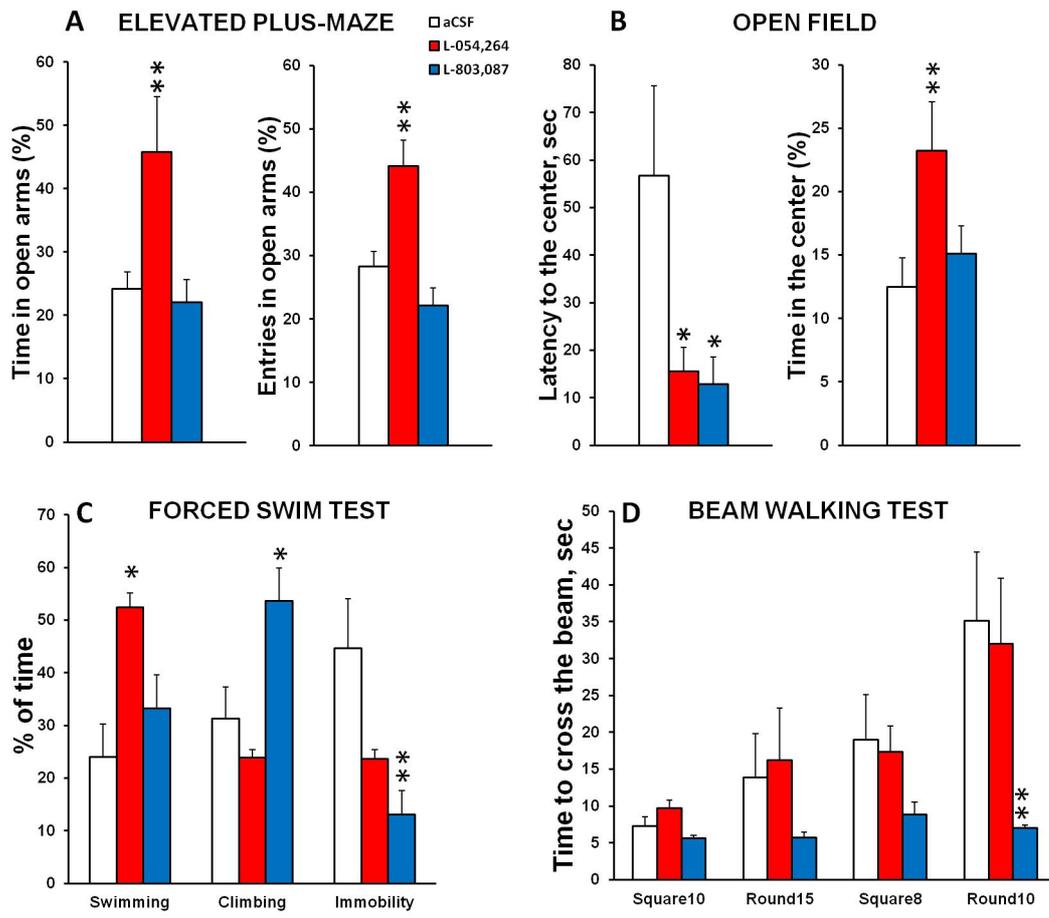


Figure 5

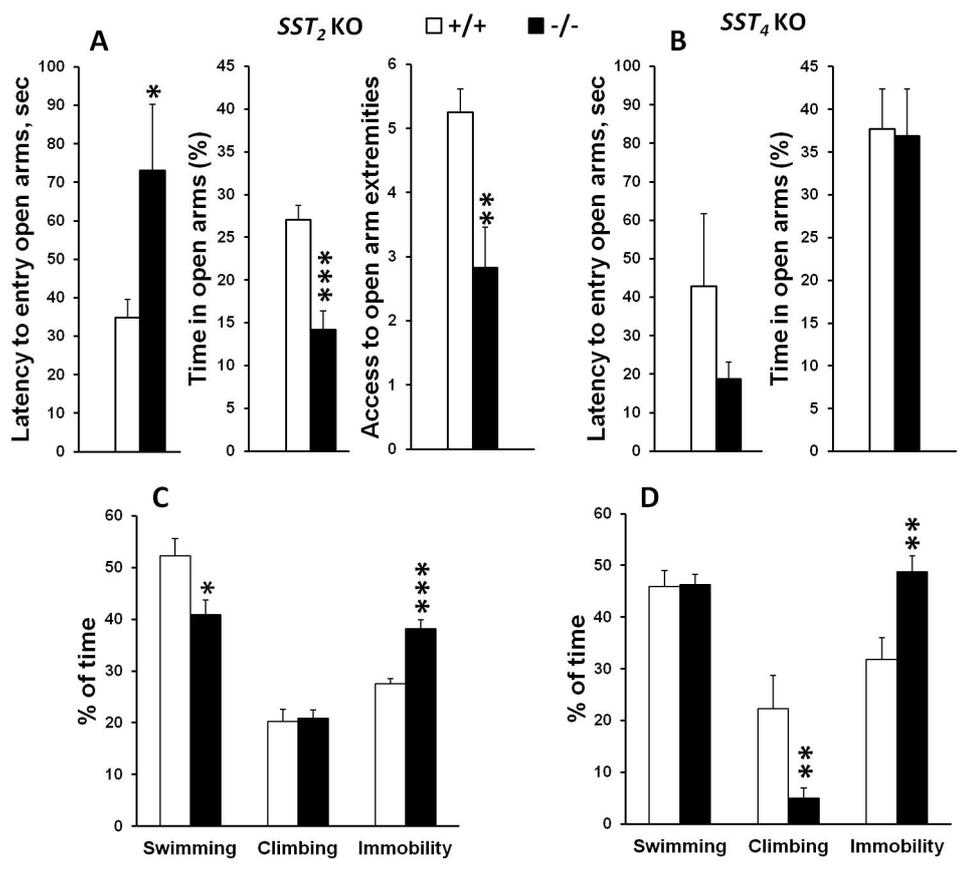


Figure 6

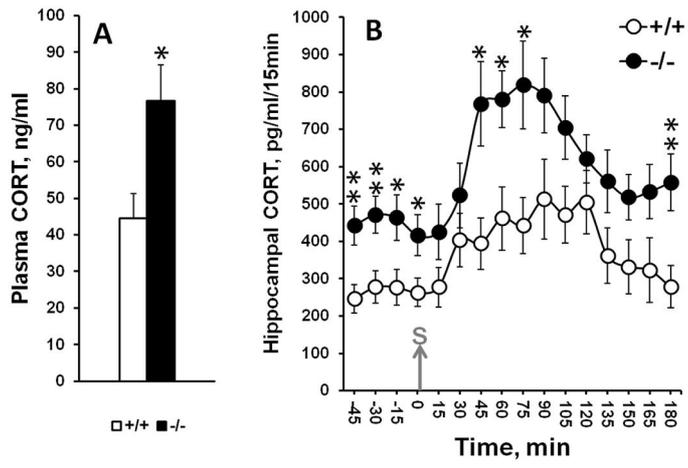
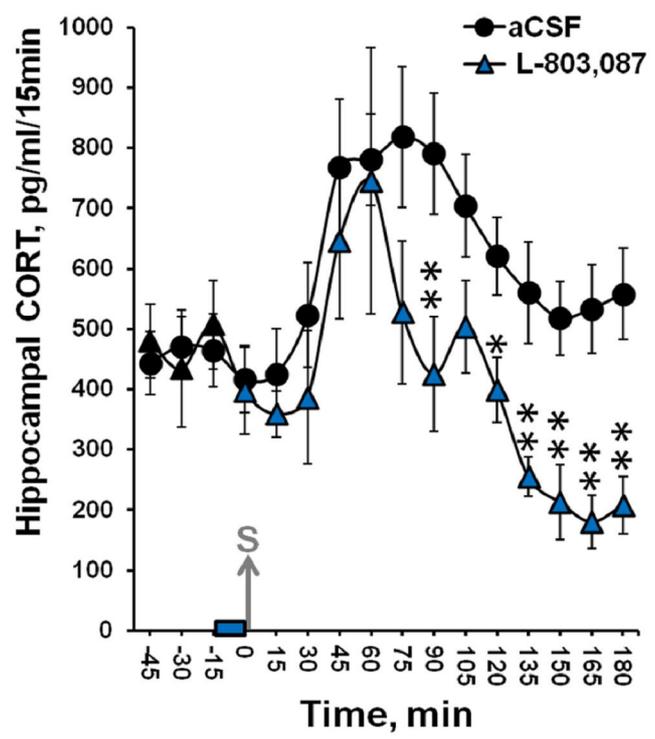


Figure 7





## **Chapitre IV : Le récepteur sst2 intervient essentiellement dans les régulations de l'état anxieux**



## Introduction

A visée adaptative, l'axe HPA est le principal élément de la réponse au stress. Il permet la mise en circulation de GC qui bénéficient d'un pouvoir d'action sur de nombreux processus comme la neurogénèse (Gould and Tanapat, 1999), la plasticité (McEwen, 1999), la survie neuronale ou les fonctions mnésiques et émotionnelles (Herbert et al., 2006). Cet important panel d'action fait du stress un des déclencheurs les plus rencontrés dans les cas de dépression majeure (Katz et al., 1981; Hammen, 2005). Au travers des différents chapitres précédents, nous avons pu mettre en avant les impacts du stress chronique chez l'adulte sur l'émergence de troubles émotionnels et cognitifs à court et long termes. La tranche d'âge adulte durant laquelle a lieu l'exposition au stress chronique a également démontré son importance primordiale dans l'installation et la persistance de certaines perturbations.

Lors d'un épisode de stress aigu, il a été démontré que le système SSTergique est activé (Arancibia et al., 2001) suggérant un rôle de la SST dans la régulation de l'axe du stress. Cinq sous-types de récepteurs à la SST ont été identifiés (sst1-5) et appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G. Le développement d'analogues SST (Weckbecker et al., 2003; Hannon et al., 2004) et les avancées en matière de mutagenèse chez la souris (Zeyda and Hochgeschwender, 2008), ont permis de mieux comprendre le rôle de chaque sous-type de récepteurs dans les fonctions cérébrales et les troubles émotionnels (Viollet et al., 2000; Engin et al., 2008; Engin and Treit, 2009; Epelbaum et al., 2009). Au niveau frontal et cingulaire, la SST intervient dans la régulation de « l'émotionnalité » chez la souris (Soumier and Sibille, 2014; Lin and Sibille, 2015a, b) et les effets anxiolytiques de la SST sont quant à eux médiés par les récepteurs sst2 de l'amygdale et du septum chez le rat (Yeung et al., 2011; Yeung and Treit, 2012). Nous avons montré dans le chapitre précédent que la SST hippocampique participe au rétrocontrôle négatif de l'axe HPA et nous avons spécifié son mode d'action en démontrant que ce mécanisme implique les récepteurs sst2 et sst4. Il est maintenant admis que la SST participe à la régulation des troubles anxio-dépressifs (Soumier and Sibille, 2014; Lin and Sibille, 2015a, b) et nos résultats du chapitre précédent ont principalement identifié l'importance du récepteur sst2 dans ces régulations. L'absence de récepteur sst2 chez la souris a déjà été étudiée dans des conditions normales (Viollet et al., 2000) ou en réponse à un stress aigu (Prévôt et al., soumis) et ont démontré l'hyperémotionnalité de ces souris. Mais aucune étude n'a directement comparer le profil

émotionnel de ces souris à des sujets WT chroniquement stressés, ni déterminer s’il existe une vulnérabilité accrue des souris sst2KO aux effets délétères d’un stress chronique.

L’objectif de ce dernier chapitre a alors été de vérifier s’il existe une sensibilité accrue face à un SCLI chez la souris adulte en l’absence de récepteur sst2. Nous avons alors formulé l’hypothèse que **l’absence de récepteur sst2 entraîne une atteinte émotionnelle exacerbée par une exposition au stress chronique à l’âge adulte**. Pour tenter de répondre à cette hypothèse, nous avons évalué les profils comportementaux d’animaux âgés de 10-12 mois WT ou sst2KO après une exposition à un stress chronique de 6 semaines.

## Méthodologie

Ce dernier chapitre correspond aux expériences du chapitre I appliquées à des animaux de 10-12 mois WT et sst2KO. Cette tranche d’âge a été choisie en raison des résultats obtenus précédemment. En effet, les animaux WT âgés de 10-12 mois présentaient des profils comportementaux peu marqués par un phénomène de vieillissement et démontraient une sensibilité modérée au protocole de SCLI.

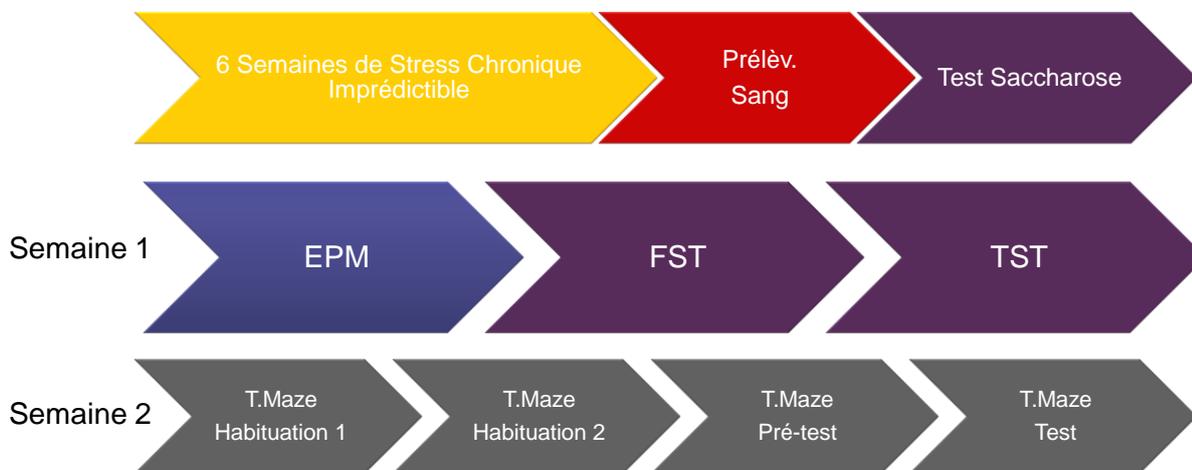
Tableau 17 : Répartition des animaux dans les groupes expérimentaux

Age et Génotype	12 mois WT		12 mois sst2KO	
<b>Condition</b>	NS	SCLI	NS	SCLI
<b>Nombre</b>	14	9	11	11

Chaque génotype a été divisée en 2 conditions (tableau 17), une condition « *non-stressé* » (NS sur les figures) et une condition expérimentale (stressée par le protocole de SCLI ; UCMS sur les figures). Les animaux du groupe *non-stressé* ont alors été groupés par cages de 5 individus. Afin d’identifier chaque animal, un marquage auriculaire a été réalisé à l’aide d’un poinçon. Les animaux du groupe *SCLI* ont été placés en cage individuelle, dans une pièce isolée afin de suivre le protocole sans interférer sur les animaux du groupe *non-stressé*.

Les animaux de chaque groupe *SCLI* de chaque génotype ont alors suivi le protocole de stress chronique pendant 6 semaines tandis que leurs homologues *non-stressés* sont restés en stabulation à l’animalerie. Durant le protocole, les animaux ont été hebdomadairement

pesés et leur pelage a été évalué selon les critères décrits dans la partie « Matériel et Méthodes » du manuscrit. La figure 82 donne l'enchaînement des expériences qui ont eu lieu après la fin du protocole de stress chronique, pour toutes les classes d'âge.



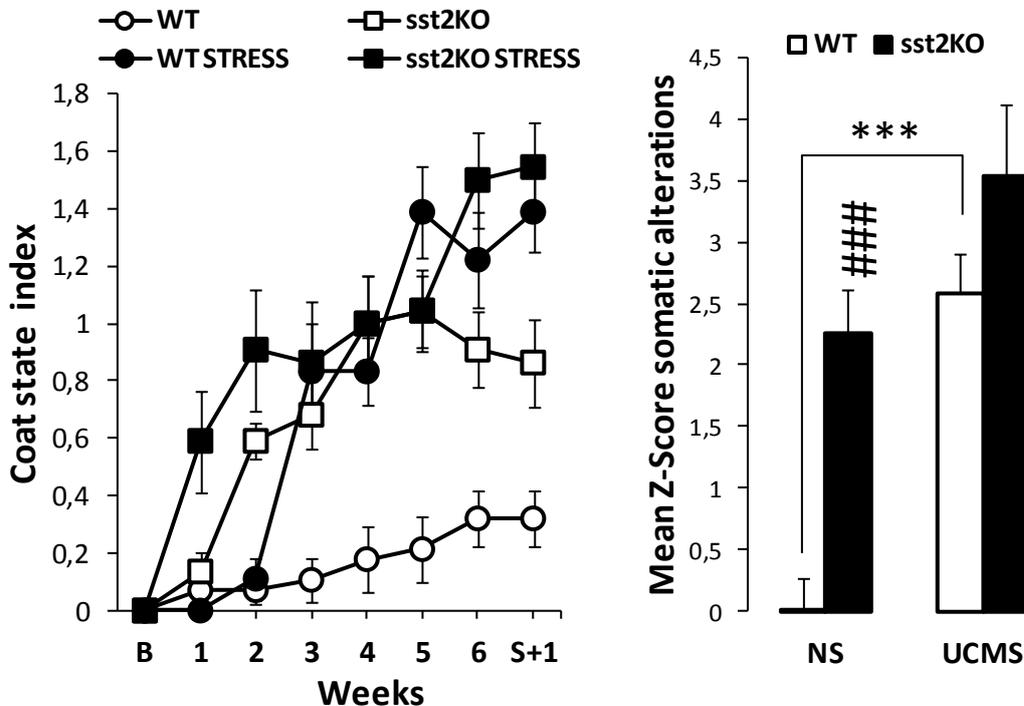
**Figure 82 : Chronologie expérimentale du protocole de stress chronique et des évaluations réalisées**

Les prélèvements de sang destinés aux dosages de la CORT ont été réalisés le jour suivant la fin du protocole de stress chronique, entre 8h et 10h. Le test d'anhédonie a ensuite été réalisé sur 48h, puis les animaux ont été successivement évalués à raison d'un test comportemental par jour dans l'ordre suivant : EPM : Elevated Plus Maze ; FST : Nage Forcée de Porsolt ; TST : Tail Suspension et T-maze.

Cinq catégories de troubles liés au stress chronique ont été évaluées, à savoir les troubles de type anxieux, les troubles de type dépressif, les troubles somatiques, les troubles cognitifs et l'hyperhédonie. Afin de normaliser les effets observés, et de comparer les différentes catégories de troubles entre elles, le calcul d'un z-score a été réalisé en prenant le groupe *WT non-stressé* comme référence. Les différents paramètres mesurés de chaque test, présentés dans l'étude, ont alors été utilisés afin de générer un z-score global pour chaque test. Les tests évaluant les mêmes catégories de troubles (parmi les 5 cités ci-dessus) ont alors été moyennés afin d'obtenir un z-score pour chaque catégorie. Le z-score ne permettant pas la comparaison des différents troubles entre eux à cause de l'absence de bornes et d'une dépendance à la déviation standard du groupe référent, nous avons appliqué la méthode de calcul d'un index allant de 0 à 4 (dont le détail est donné dans la partie « Matériels et Méthodes » de ce manuscrit), codant les différents paramètres évalués afin de comparer les amplitudes des différents catégories de troubles émergents selon les génotypes et/ou le SCLI.

## Résultats Expérimentaux

### b. Evaluations somatiques et mesures des taux de corticostérone plasmatique

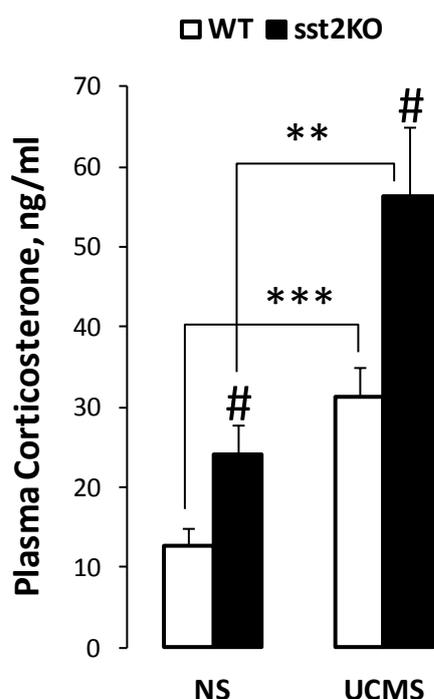


**Figure 83 : Evaluations de l'état du pelage chez des animaux WT et sst2KO âgés de 12 mois en fonction de leur condition de stress chronique et de leur génotype**

A : Le SCLI entraîne une détérioration du pelage des animaux WT et chez les animaux sst2KO malgré une atteinte détérioration déjà présente chez ces derniers (B = baseline ; S+1 = 1 semaine après le stress chronique) ; B : z-score moyen de l'état du pelage (NS = non stressé ; UCMS = stressé par le protocole de SCLI) ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; Effet génotype : # $p < 0,05$  ; ## $p < 0.01$  ; ### $p < 0.001$

La figure 83 montre l'évolution de l'état du pelage des animaux durant les 6 semaines de stress chronique. Une détérioration générale s'installe au fil des semaines ( $F_{(7;287)}=67,2$   $p=0,0001$ ) mais dépend à la fois de la condition SCLI et du génotype (interaction semaine x génotype ( $F_{(7;287)}=4,3$  ;  $p=0,0001$  et semaine x SCLI  $F_{(7;287)}=10,5$  ,  $p=0,0001$ ). Chez les animaux WT non stressés, une légère détérioration est observable à l'issue des 6 semaines de stress. La détérioration du pelage débute dès la 3<sup>ème</sup> semaine chez les animaux WT exposés au stress chronique ( $p < 0,001$ ) et est significativement plus marquée. Malgré l'absence d'exposition au protocole de stress chronique, les animaux sst2KO non stressés présentent une

détérioration du pelage supérieure à celle des WT non stressés ( $p < 0.001$ ) dès la 2<sup>ème</sup> semaine d'évaluation. L'exposition au stress chronique chez les animaux sst2KO entraîne une détérioration du pelage qui est significative ( $P < 0.01$ ) dès la première semaine d'exposition au stress. Ces résultats indiquent que la détérioration somatique liée au stress chronique est accélérée chez les animaux sst2KO. Cependant, comme résumé dans la figure 83B, l'analyse



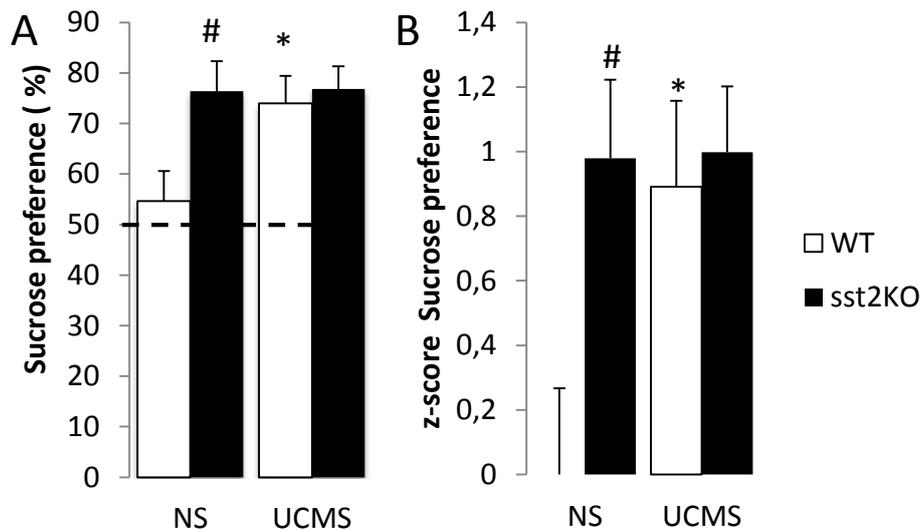
**Figure 84 : Concentration plasmatique de corticostérone chez des animaux WT et sst2KO âgés de 12 mois en fonction de leur condition de SCLI et de leur génotype**

Les animaux sst2KO présentent des concentrations plasmatiques (en ng/ml) supérieures au WT, que ce soit en condition non stressé (NS) et stressé (UCMS) ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; Effet génotype : # $p < 0,05$  ; ## $p < 0.01$  ; ### $p < 0.001$

des z-scores moyens révèle un effet significatif du génotype ( $p < 0,001$ ) et du SCLI chez les WT ( $p < 0,001$ ), qui n'est pas, mais presque, significatif chez les sst2KO ( $p = 0,07$ ).

Les concentrations plasmatiques de CORT mesurées à l'issue du SCLI sont présentées dans la figure 84. L'ANOVA indique un effet du génotype ( $F_{(1;41)} = 12,31$  ;  $p = 0,0011$ ), un effet SCLI ( $F_{(1;41)} = 24,38$  ;  $p < 0,0001$ ) mais pas d'interaction entre les facteurs ( $p = 0,13$ ). L'effet *génotype* se traduit par des niveaux de CORT plus élevés chez les sst2KO à la fois en condition *non-stressée* ( $p = 0,02$ ) qu'en réponse à un SCLI ( $p = 0,02$ ). L'effet SCLI est dû à une augmentation des taux de CORT à la fois chez les WT et les sst2KO stressés ( $p = 0,0003$  et  $p = 0,0023$ , respectivement). Ces résultats indiquent une hypercorticostéronémie liée à la fois au génotype et à l'exposition au stress chronique.

c. Evaluation de l'hyperhédonie

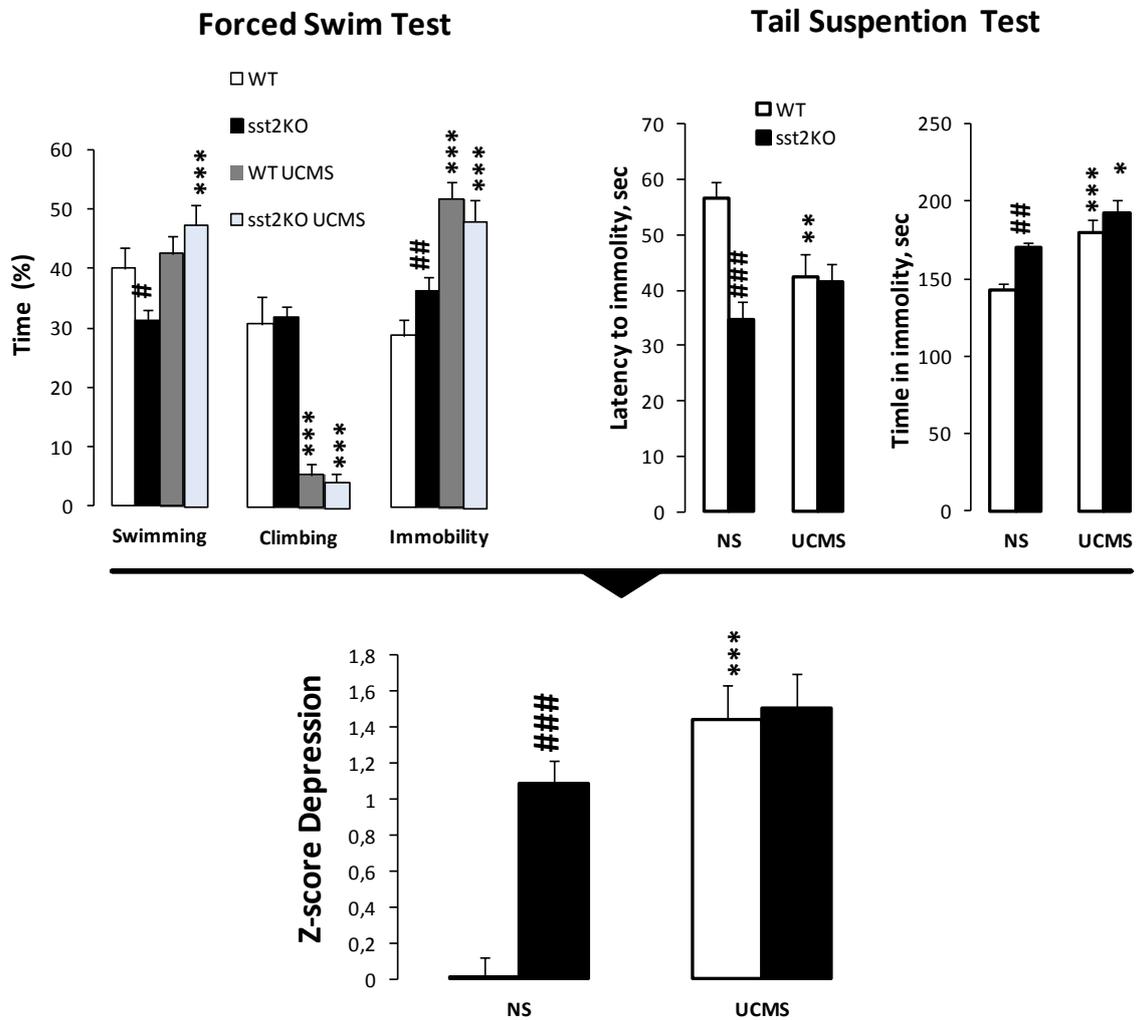


**Figure 85 : Consommation préférentielle de saccharose chez des souris WT et sst2KO en fonction de leur condition de stress chronique**

Le SCLI et la délétion du récepteur sst2 entraîne une préférence accrue pour le saccharose. A : Préférence pour le saccharose (exprimée en pourcentage); Hasard à 50%; B ; z-score des consommations préférentielles par rapport au groupe WT-NS ; Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet SCLI : \* $p < 0.05$  ; Effet du génotype : # $p < 0.05$ .

Le test de préférence au saccharose indique une différence liée au génotype (ANOVA :  $F_{(1;41)}=5,8$  ;  $p=0,02$ ) qui s'explique par une préférence accrue de la part des animaux sst2KO *non-stressés* comparativement aux animaux WT ( $p=0,014$ ) (figure 85). Un effet SCLI ( $F_{(1;41)}=4,2$  ;  $p=0,046$ ) sans interaction entre les deux facteurs ( $F_{(1;42)}=2,9$  ;  $p=0,09$ ) a également été révélé par l'analyse. Il est uniquement dû à une augmentation de la préférence au saccharose chez les animaux WT *SCLI* comparativement aux animaux WT *non stressés* ( $p=0,035$ ). Un *t* de Student a permis de montrer que les préférences de tous les groupes, hormis le groupe WT *non-stressé*, étaient différentes du hasard ( $p < 0,0033$ ). L'analyse du z-score indique également un effet du génotype qui se traduit par un z-score plus important chez les sst2KO *non stressés*. Ces données suggèrent une hyperhédonie présente chez les animaux WT *stressés*, sst2KO *non-stressés* et sst2KO *stressés* ce qui corrobore les résultats du chapitre I, montrant une préférence accrue pour le saccharose en réponse au stress chronique à l'âge de 12 mois.

d. Evaluations des troubles de type dépressif



**Figure 86 : Evaluation comportementale des troubles de type dépressif chez la souris WT et sst2KO**

Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié en aveugle dans un test de Nage Forcée de Porsolt et dans un test de Tail Suspension test. Le FST présente le pourcentage de temps passé à nager, à escalader la paroi ou à rester immobile sur les 4 premières minutes du test, chez des souris adultes de 12 mois. Le TST présente les latences d’immobilisation ainsi que le temps passé immobile durant le test. Enfin, les données ont été utilisées afin de calculer un z-score, représentant l’atteinte de type dépressif chez ces animaux. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; Effet *génotype* : # $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$ .

Le temps passé à nager, à escalader la paroi et à rester immobile a été quantifié sur les 4 premières minutes du FST (figure 86). Les analyses révèlent un effet *SCLI* sur la nage

( $F_{(1;41)}=8,6$  ;  $p<0,0054$ ) puisque les animaux sst2KO *SCLI* nagent plus que les animaux sst2KO *non-stressés* ( $p=0,0006$ ). Une interaction *SCLI* x *génotype* est également révélée sur la nage (ANOVA :  $F_{(1;41)}=4,67$  ;  $p=0,036$ ). Elle se caractérise par une diminution de la nage chez les animaux sst2KO *non-stressés* comparativement aux WT *non-stressés* ( $p=0,047$ ). L'ANOVA réalisée sur les temps d'escalade indique un effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}=68,37$  ;  $p<0,0001$ ), sans effet *génotype* ( $F_{(1;41)}<0,001$  ;  $p=0,989$ ) ni d'interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=0,107$  ;  $p=0,745$ ). En effet, l'escalade est grandement diminuée par l'exposition au *SCLI* à la fois chez les WT et les sst2KO ( $p<0,0003$ ). Pour finir, les analyses révèlent un effet du *SCLI* sur le temps passé immobile ( $F_{(1;41)}=36,27$  ;  $p<0,0001$ ) qui se caractérise par une immobilité accrue aussi bien chez des animaux WT ( $p<0,0001$ ) que chez les sst2KO ( $p=0,0112$ ). Les analyses révèlent également une interaction *SCLI* x *génotype* sur l'immobilité ( $F_{(1;41)}=3,9$  ;  $p=0,05$ ) qui témoigne d'une immobilité plus grande chez les sst2KO *non-stressés* par rapport au WT *non-stressés* ( $p=0,039$ ) ainsi que d'une immobilité accrue chez les animaux stressés comparativement aux animaux *non-stressés* (WT :  $p<0,0001$  et sst2KO :  $p=0,011$ ). Ces données sur la FST suggèrent une atteinte de type dépressif naturellement présente chez les sst2KO qui se retrouve accentuée par l'exposition au *SCLI*.

Le TST a également permis de mettre en avant la présence de troubles de type dépressif chez la souris. En effet, l'ANOVA menée sur les latences d'immobilisation montre un effet *génotype* sur ce paramètre ( $F_{(1;41)}=11,17$  ;  $p=0,0018$ ) accompagné d'une interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=9,31$  ;  $p=0,004$ ). Ceci témoigne d'une diminution importante de la latence d'immobilisation chez les sst2KO *non-stressés* ( $p<0,0001$ ) ainsi que chez les WT *SCLI* ( $p=0,01$ ) comparativement aux WT *non-stressés*. Les analyses sur le temps passé immobile indique également un effet *génotype* ( $F_{(1;41)}=10,24$  ;  $p=0,0026$ ) et un effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}=23,48$  ;  $p<0,0001$ ) sans interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=1,5$  ;  $p=0,21$ ). De cette façon, nous avons pu constater une augmentation du temps passé immobile chez les animaux sst2KO *non-stressés* comparativement aux WT *non-stressés* ( $p=0,0039$ ). L'effet *SCLI* est révélé par ce test, puisque les WT et les sst2KO passent plus de temps immobiles que leurs homologues *non-stressés* respectifs ( $p<0,018$ ). L'ensemble de ces données suggèrent la présence de troubles de type dépressifs chez la souris sst2KO, avec tout de même une sensibilité au stress chronique.

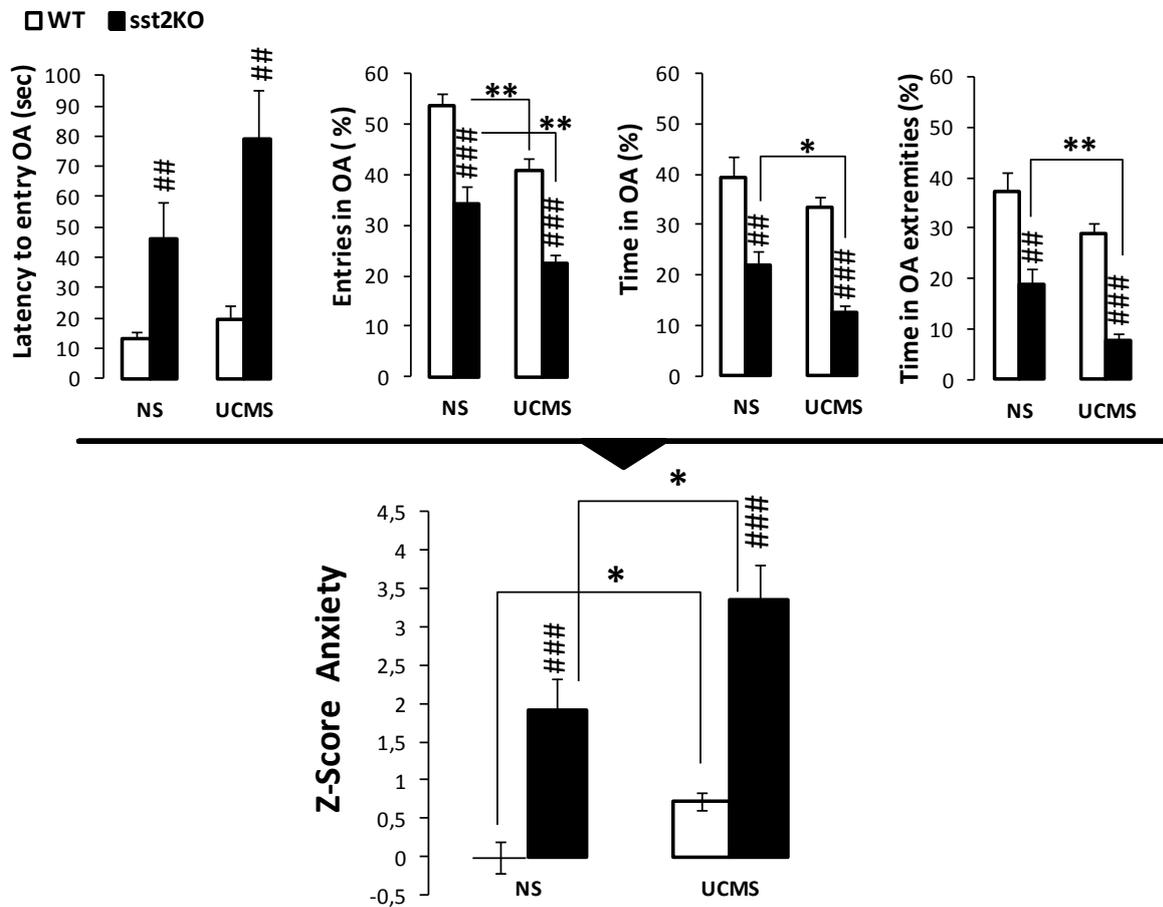
Le calcul de z-score pour l'ensemble des paramètres présentés a permis d'obtenir un z-score général sur les troubles de type dépressif. L'analyse faite sur ce z-score révèlent un effet *génotype* ( $F_{(1;41)}= 13,25$  ;  $p= 0,0008$ ), un effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}= 33,99$  ;  $p<0,0001$ ) et une

interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=10,36$  ;  $p=0,0025$ ). L'effet génotype est dû à un z-score plus important chez les animaux sst2KO *non-stressés* comparativement à des animaux WT *non-stressés* ( $p<0,0001$ ). L'effet *SCLI* est quant à lui dû à un z-score plus élevé chez les WT *SCLI* comparativement aux WT *non-stressés* ( $p<0,0001$ ), tandis qu'aucun effet du stress n'est révélé chez les sst2KO ( $p=0,087$ ). Ces données corrént avec les résultats que nous avons obtenus précédemment dans le chapitre III concernant la présence de troubles de type dépressif chez la souris sst2KO *non-stressés*, et suggèrent tout de même l'existence d'une légère sensibilité au stress chronique présente chez ces animaux.

e. Evaluations des troubles de type anxieux

Les troubles de type anxieux mesurés dans le test en EPM sont résumés dans la figure 87. Les analyses réalisées sur les latences d'entrées dans les bras ouverts indiquent un effet *génotype* (ANOVA :  $F_{(1;41)}=20,97$  ;  $p<0,0001$ ) sans effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}=3,77$  ;  $p=0,058$ ) ni interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=1,66$  ;  $p=0,20$ ). L'effet *génotype* se caractérise par une latence accrue chez les animaux sst2KO comparativement aux WT en condition *non-stressés* ( $p=0,0056$ ) et en condition *SCLI* ( $p=0,0042$ ). L'ANOVA menée sur le nombre d'entrées dans les bras ouverts a permis de mettre en évidence une significativité en fonction du *génotype* et du *SCLI* ( $F_{(1;41)}=47,41$  ;  $p<0,0001$  et  $F_{(1;41)}=20,12$  ;  $p<0,0001$  respectivement) sans interaction entre les facteurs ( $p=0,89$ ). L'effet du génotype se retrouve aussi bien chez les animaux *non-stressés* que chez les animaux *SCLI* ( $p<0,0001$ ). L'impact du *SCLI* est présent à la fois chez les WT ( $p=0,0028$ ) et les sst2KO ( $p=0,0074$ ). Le temps passé dans les bras ouverts montre également un effet *génotype* ( $F_{(1;41)}=38,21$  ;  $p<0,0001$ ) et un effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}=6,06$  ;  $p=0,018$ ) sans interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=0,3$  ;  $p=0,58$ ). L'effet *génotype* est marqué par une diminution importante d'exploration des bras ouverts ( $p<0,0001$ ) de la part des animaux sst2KO comparativement à des WT, que ce soit en condition *non-stressés* ( $p=0,0029$ ) ou en condition *SCLI* ( $p<0,0001$ ). L'effet *SCLI* se caractérise principalement par la diminution du temps passé dans les bras ouverts chez les animaux sst2KO *SCLI* comparativement à leur homologues *non-stressés* ( $p=0,0053$ ), tandis qu'aucune différence n'est mise en avant chez les WT concernant cet effet ( $p=0,28$ ). Enfin, les analyses du temps passé aux extrémités des bras ouverts indiquent un effet *génotype* (ANOVA :  $F_{(1;41)}=37,95$  ;  $p<0,0001$ ) et un effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}=9,41$  ;  $p=0,0038$ ) sans interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=0,193$  ;  $p=0,66$ ). L'effet *génotype* est dû à une diminution du temps passé aux extrémités des bras ouverts chez les sst2KO comparativement aux WT, à la fois en condition *non-stressé* ( $p=0,0023$ ) et en condition *SCLI* ( $p<0,0001$ ). L'effet *SCLI* est quant à lui dû à

une diminution encore plus marquée chez les animaux sst2KO *SCLI* comparativement à leurs homologues *non-stressés* ( $p=0,0027$ ).



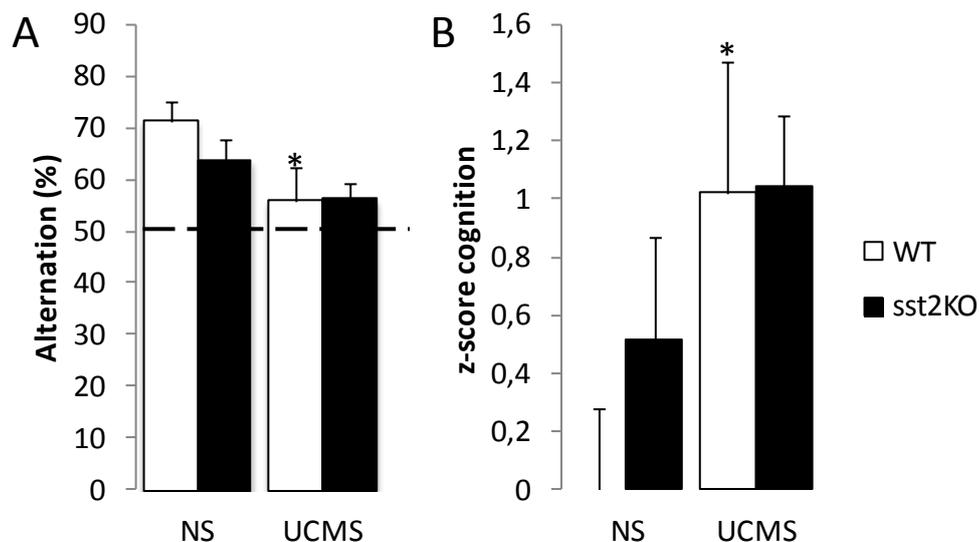
**Figure 87 : Evaluation comportementale des troubles de type anxieux chez la souris WT et sst2KO**

Les animaux sst2KO présentent un comportement de type anxieux exacerbé comparativement aux WT et ceci que ce soit en condition non stressé qu'en réponse au SCLI. Le comportement des animaux a été enregistré puis quantifié en aveugle dans un test d'Elevated Plus maze. Les paramètres mesurés sont la latence d'entrée dans les bras ouverts (OA), le nombre d'entrée dans OA, le temps passé dans les OA ainsi que le temps passé aux extrémités des OA. Le nombre d'entrée, le temps passé aux extrémités et le temps global passé dans les OA est présenté en pourcentage comparativement aux bras fermés. Enfin, ces paramètres ont été utilisés afin de calculer un z-score, représentant l'atteinte de type anxieux chez ces animaux. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$  ; Effet *génotype* : # $p<0,05$  ; ## $p<0,01$ .

Enfin, l'ensemble de ces données ont permis de calculer un z-score montrant à la fois l'impact du *génotype* et de l'*SCLI* sur les troubles de type anxieux. L'ANOVA réalisée sur ces z-score indique un effet *génotype* ( $F_{(1;41)}=46,61$  ;  $p<0,0001$ ) et un effet *SCLI* ( $F_{(1;41)}=10,665$  ;  $p=0,0022$ ) sans interaction entre les facteurs ( $F_{(1;41)}=1,21$  ;  $p=0,2781$ ). L'effet *génotype* se caractérise par une anxiété accrue chez les sst2KO, à la fois en condition *non-stressé* ( $p=0,0002$ ) et *SCLI* ( $p<0,0001$ ). L'effet *SCLI* est dû à une anxiété accrue chez les animaux stressés quel que soit le génotype (WT :  $p=0,0176$  et sst2KO :  $p=0,0271$ ).

Ces résultats corroborent ceux obtenus dans le chapitre précédent en démontrant une atteinte de type anxieux chez les animaux sst2KO qui est accentuée par l'exposition au stress chronique.

f. Evaluations des troubles cognitifs



**Figure 88 : Evaluation comportementale des troubles de mémoire de travail chez la souris WT et la souris sst2KO dans un test d'alternance spontanée en T-maze**

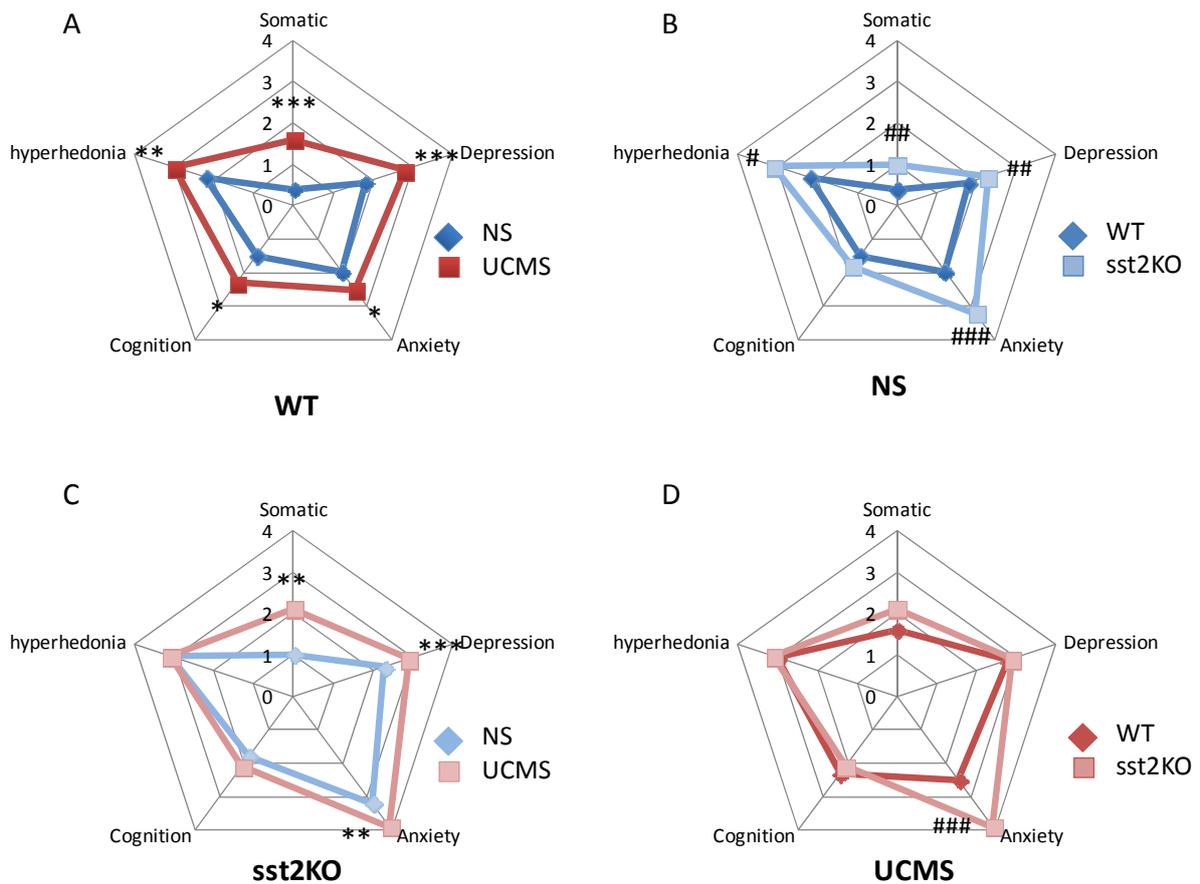
A : Alternance spontanée chez des animaux WT et sst2KO en fonction de leur condition d'SCLI. Le hasard est symbolisé par une ligne en pointillés à 50%. ; B : z-score calculé à partir des pourcentages d'alternance, illustrant l'atteinte cognitive. Moyenne  $\pm$  s.e.m. ; Effet *SCLI* : \* $p<0.05$

La figure 88 indique les résultats obtenus concernant les performances d'alternance en T-maze. Seuls trois animaux (de 3 groupes différents) n'ont pas alterné lors du 8<sup>ème</sup> essai

réalisé avec un ITI de 5 sec. Ainsi, le taux d'alternance à cet essai est de 92% indiquant que la motivation à alterner est conservée pour l'ensemble des groupes. La suite de l'analyse comprend donc uniquement les animaux ayant correctement alterné lors de ce 8<sup>ème</sup> essai. L'ANOVA a deux facteurs menée sur le pourcentage d'alternance montre un effet *SCLI* (ANOVA :  $F_{(1;38)}=5,7$  ;  $p=0,02$ ), sans effet *génotype* ( $F_{(1;38)}=0,66$  ;  $p=0,41$ ) et sans interaction entre les facteurs ( $F_{(1;38)}=0,6$  ;  $p=0,44$ ). Cette significativité est due à des pourcentages d'alternance diminués uniquement chez les animaux WT stressés comparativement à des animaux WT non stressés ( $p=0,05$ ). De façon intéressante, l'analyse avec un *t* de Student nous a permis de constater que seuls les animaux *non-stressés* (WT et sst2KO) présentent des moyennes d'alternance globale différentes du hasard ( $t(13)=5,8$  ;  $p<0,0001$  et  $t(10)=3,1$  ;  $p=0,01$  respectivement) tandis que les animaux *SCLI* (WT et sst2KO) ne présentent pas de différence par rapport au hasard ( $t(7)=1,4$  ;  $p=0,17$  et  $t(10)=1,7$  ;  $p=0,1$ ). L'ANOVA réalisée sur les z-scores indique également un effet *SCLI* (ANOVA :  $F_{(1;38)}=5,7$  ;  $p=0,02$ ), sans effet *génotype* ( $F_{(1;38)}=0,66$  ;  $p=0,41$ ) et sans interaction entre les facteurs ( $p=0,44$ ). Les analyses post-hoc ont identifié cette significativité comme étant due à une augmentation du z-score chez les animaux WT stressés comparativement aux WT non stressés. D'un point de vue cognitif, le stress chronique perturbe légèrement les capacités de mémoire de travail chez des animaux WT, alors qu'il n'a pas d'effet chez des animaux sst2KO. De plus, l'absence de récepteur de type 2 à la SST ne génère pas de perturbation cognitive dans une tâche de mémoire de travail.

#### g. Analyse comportementale

Comme précédemment, nous avons utilisé l'index d'amplitude des différentes atteintes mises en place par le SCLI. L'ensemble des effets génotype et SCLI est résumé dans la figure 89. Tout d'abord, les résultats montrent que l'amplitude de tous les symptômes mesurés est significativement supérieure chez les animaux WT exposés au SCLI ( $p<0,02$  ; figure 89A), conformément aux résultats de l'étude antérieure (Chapitre I). Ensuite, la figure 89B illustre l'effet génotype et montre que chez les animaux *non-stressés*, les sst2KO présentent une anxiété significativement accrue ( $p=0,0006$ ), un état de type dépressif accru ( $p=0,0062$ ), associée à une détérioration significative du pelage ( $p=0,006$ ) et une hédonie supérieure aux WT ( $p=0,014$ ). L'exposition au SCLI amplifie les altérations somatiques ( $p=0,0026$ ), l'atteinte anxieuse ( $p=0,0041$ ) et l'atteinte dépressive ( $p=0,007$  ; figure 89C). Enfin, chez les souris sst2KO soumises au SCLI, uniquement une anxiété accrue ( $p<0,0001$  ; figure 89D) vient se surajouter à l'ensemble des effets induits par le stress chez les WT.



**Figure 89 : Comparaison des profils comportementaux de souris non-stressées et stressées en fonction du génotype**

Chaque pentagramme permet la comparaison de 2 groupes expérimentaux. A : Le stress chronique induit des troubles sur toutes les composantes étudiées chez des animaux WT ; B : L'absence de récepteur sst2 en condition non stressée induit des troubles de type anxieux associés à des troubles somatiques et une absence d'anhédonie ; C : Le stress chronique induit des troubles de type anxieux, de type dépressif et des troubles somatiques chez des animaux sst2KO ; D : Le stress chronique chez les animaux sst2KO induit des troubles anxieux plus marqué que chez les animaux WT. Tous les troubles sont présentés selon un index de 0 à 4, 0 signifiant « pas d'atteinte » et 4 « très atteint ». Moyenne par catégorie de troubles ; Effet *génotype* : # $p < 0.05$  ; ## $p < 0.01$  ; Effet *SCLI* : \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Ainsi, ces résultats indiquent que l'absence de récepteur sst2 reproduit l'ensemble des symptômes émotionnels, mais pas cognitifs, générés par un stress chronique et potentialise uniquement l'anxiété induite par le stress.

Tableau 18 : Corrélation entre les différentes catégories de troubles étudiées en fonction du génotype (A : WT ; B : sst2KO)

A		Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte WT (Z-Score)											
		Corticostérone		Somatique		Anxiété		Dépression		Hyperhédonie		Cognition	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte WT (Z-Score)	Corticostérone			0,26	0,2565	0,46	0,0307	0,43	0,0463	0,35	0,1111	0,07	0,7649
	Somatique					0,47	0,0283	0,59	0,0030	0,24	0,2954	0,19	0,4086
	Anxiété							0,62	0,0015	0,41	0,0551	0,24	0,2888
	Dépression									0,48	0,0229	0,39	0,0709
	Anhédonie											0,17	0,4600
	Cognition												

B		Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte sst2KO (Z-Score)											
		Corticostérone		Somatique		Anxiété		Dépression		Hyperhédonie		Cognition	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Amplitude normalisée du trouble chez l'adulte sst2KO (Z-Score)	Corticostérone			0,71	0,0002	0,17	0,4837	0,36	0,1188	-0,29	0,224	0,28	0,241
	Somatique					0,23	0,3368	0,27	0,2634	-0,38	0,095	0,10	0,666
	Anxiété							0,33	0,1555	0,47	0,034	-0,12	0,62
	Dépression									-0,09	0,714	0,31	0,191
	Anhédonie											0,13	0,584
	Cognition												

Des tests de corrélations entre les différents troubles ont été réalisés en fonction du génotype des animaux. Ces résultats montrent que chez les WT (tableau 18A), la corticostéronémie, les troubles de type anxieux et les troubles de type dépressifs sont tous positivement corrélés entre eux. Les troubles de type dépressifs corrélaient également positivement avec les troubles somatiques et l'hyperhédonie. Ces résultats sont donc bien en accord avec les résultats du Chapitre I. Par contre, aucune de ces corrélations n'est retrouvée chez le sujet sst2KO (tableau 18B). Les seules corrélations significatives chez ces animaux sont d'une part, entre la corticostéronémie et les troubles somatiques et d'autre part, entre l'anxiété et l'hyperhédonie. Ce résultat indique que, globalement, les relations entre les différents symptômes sensibles au stress sont modifiées chez les souris sst2KO.

L'ensemble des résultats de cette première partie indique que les animaux sst2KO présentent une hypercorticostéronémie principalement associée à des atteintes de type anxieux et somatique. L'exposition au stress chronique amplifie cet état et modifie les relations existantes entre les différents symptômes générés.

## Discussion

L'objectif de ce dernier chapitre était de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'absence de récepteur sst2 entraîne une atteinte émotionnelle exacerbée par une exposition au stress chronique. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons analysé 5 catégories de troubles ainsi que les modifications endocriniennes liées au stress chronique. Parmi les catégories de troubles étudiées, l'atteinte somatique a révélée des différences d'émergence en lien avec le génotype et l'exposition au stress des animaux. En effet, les animaux WT non-stressés présentent une détérioration lente de leur pelage au cours des 6 semaines d'évaluation alors qu'elles ne sont pas soumises à un protocole de stress chronique. Cette détérioration peut être attribuée à la réorganisation des sujets lors de la préparation de l'expérience et à des relations antagonistes entre les animaux. La souris étant un animal social mettant en place une hiérarchie au sein du groupe (Long, 1972), souvent marquée par de confrontations entre congénères, il est possible que ces interactions expliquent l'apparition lente de la détérioration du pelage chez ces animaux. Les animaux sst2KO non-stressés, qui ont suivi le même protocole de stabulation que les WT non-stressés présentent tout de même une détérioration du pelage plus marquée qui apparaît dès la 2<sup>ème</sup> semaine d'évaluation. Il est envisageable que ceci soit le résultat de relations antagonistes entre les congénères plus marquées que celles observées chez les WT. Des études antérieures ont montré qu'il existe un lien entre le taux de CORT et le rang social des souris (Louch and Higginbotham, 1967; Leshner et al., 1980). De plus, il n'est pas à exclure que l'hypercorticostéromie des animaux sst2KO participe au remodelage de la hiérarchie au sein du groupe, ce qui conduit à de nombreux combats et ainsi à la détérioration accélérée du pelage de ces animaux. De plus, l'exposition au stress chronique, chez les WT et chez les sst2KO, détériore également l'état du pelage. Cette détérioration est donc tributaire d'un autre mécanisme que l'interaction sociale puisque les animaux de ces groupes stressés sont isolés individuellement. Des études antérieures ont montré que cette détérioration du pelage résulte d'une absence de toilettage reflétant une altération plus générale liée à l'état de stress chronique (Ducottet et al., 2003) et à la dépression. De façon intéressante, les animaux sst2KO stressés présentent une détérioration du pelage importante mise en place dès la première semaine du protocole de stress chronique tandis que chez les WT cette détérioration n'apparaît qu'à la 3<sup>ème</sup> semaine. La délétion du récepteur sst2 et les troubles que cela entraîne apparaît donc comme un facteur de sensibilité dans la mise en place de détériorations somatiques liées au stress.

L'évaluation de la préférence pour le saccharose a montré des effets dépendants à la fois du génotype et de la condition de stress chronique. En effet, les animaux WT non-stressés ont présenté une préférence au niveau du hasard. Certains auteurs montrent l'installation d'une anhédonie avec l'âge avançant (Malatynska et al., 2012) ce qui peut expliquer la préférence à 50% de nos animaux. Contrairement à la littérature qui propose la mise en place d'une anhédonie par l'exposition au stress chronique (Willner et al., 1992a; Strekalova et al., 2004; Willner, 2005), l'exposition au stress chronique dans notre étude chez les WT ou chez les sst2KO entraîne une consommation préférentielle pour le saccharose. Nous postulons alors, dans notre étude, l'existence de phénomène de compensation face au stress chronique. Des travaux indiquent également ce genre d'observations démontrant une consommation accrue de solutions à fort caractère renforçant et énergétiques chez des sujets stressés (Torres and Nowson, 2007), pouvant expliquer les cas d'obésité liés au stress (Dallman et al., 2003). Par ailleurs, la difficulté d'accès à la solution de saccharose est une composante importante qui peut expliquer les résultats obtenus en prenant en compte la composante motivationnelle de la tâche (Malatynska et al., 2012). Dans notre cas, l'accès à la solution de saccharose 1% est relativement simple, sans effort, ce qui permet aux animaux de compenser les effets délétères du stress par une consommation accrue de la solution récompensante. Pour finir, une hyperhédonie a été mise en évidence chez des animaux sst2KO en condition *non-stressé* ce qui suggère un lien entre l'état d'anxiété et l'hyperhédonie. Cette dernière observation est cohérente aux vues des résultats obtenus par l'analyse des corrélations des différents troubles. En effet, ces deux composantes sont positivement corrélées chez les animaux sst2KO, indiquant ainsi que l'hyperhédonie chez les sst2KO est relative à l'atteinte de type anxieux.

D'un point de vue cognitif, l'absence du récepteur sst2 ne semble pas suffisante pour induire des perturbations de la mémoire de travail dans le test que nous avons employé. En effet, en condition *non-stressé*, les animaux sst2KO n'ont pas démontré de performances différentes comparativement à des animaux WT. Cependant, l'exposition à un stress chronique chez des animaux WT ou sst2KO participe à l'émergence de troubles de la mémoire de travail sans sensibilité particulière liée au génotype. Le récepteur sst2 ne semble donc pas intervenir dans une tâche de mémoire de travail avec de tels ITI.

L'évaluation des troubles de type dépressif chez ces animaux confortent nos résultats du chapitre III en montrant une atteinte de type dépressif chez les animaux sst2KO, comparativement à des WT en condition *non-stressé*. Le profil comportemental observé témoigne d'une modification du système sérotoninergique. Des études antérieures ont

démontré que la sérotonine régule le fonctionnement du système SSTergique dans l'HPC en intervenant en partie sur le récepteur sst2 (Munoz-Acedo and Arilla, 1996). La délétion du gène pour le récepteur sst2 peut donc en effet altérer le fonctionnement sérotoninergique ce qui expliquerait les résultats comportementaux retrouvés chez nos animaux dans le test de FST. L'exposition au stress chronique chez des animaux sst2KO a tout de même un effet semblable à celui observé chez des animaux WT, démontrant une sensibilité au stress toujours présente, concernant l'intensité des troubles dépressifs. En effet, les analyses n'ont pas montré d'atteinte dépressive plus importante chez les sst2KO stressés que chez les WT stressés. **Ceci suggère que l'absence de récepteur sst2 entraine des troubles de type dépressif en condition non stressée mais que le stress chronique n'induit pas d'altération supérieure chez ces animaux concernant cette catégorie de symptômes.**

Les animaux sst2KO présentent également une anxiété accrue, comparativement à des animaux WT. Cette anxiété se caractérise par une exploration diminuée dans les bras ouverts d'un EPM. De façon intéressante, les troubles de l'anxiété présents chez les animaux sst2KO non stressés sont amplifiés par l'exposition au stress chronique au-delà des perturbations observées chez les animaux WT stressés. Ces résultats suggèrent alors que **l'absence de récepteur sst2 entraine un état d'anxiété en condition non stressée mais surtout que la sensibilité au stress chronique est augmentée, rendant ainsi les animaux sst2KO hyperanxieux.** Ces données complètent ainsi d'autres études qui ont déjà impliqué la SST et son récepteur sst2 dans la régulation de troubles anxio-dépressif et dans la régulation de l'axe HPA (Engin et al., 2008; Engin and Treit, 2009; Lin and Sibille, 2015a) et de l'émotionnalité.

Par ailleurs, nous avons pu conforter nos résultats précédents en montrant l'existence d'une élévation des taux basaux de CORT associée à un profil de type anxio-dépressif chez des animaux ne présentant pas le récepteur sst2. Les taux de CORT plasmatiques observés chez des animaux sst2KO montrent un niveau de base plus important que celui des WT en condition *non-stressée*. L'axe HPA est donc dérégulé mais reste sensible au stress chronique, puisqu'une élévation de taux de CORT est tout de même observable chez les sst2KO en réponse au SCLI. Ces résultats confirment donc ceux du chapitre précédent, en démontrant que l'atteinte observée chez des animaux jeunes se retrouve également chez des animaux adultes de 12 mois, du moins au niveau plasmatique et **indiquent que l'axe HPA conserve une sensibilité au stress chronique.** Cependant, les corrélations que nous avons calculées ne nous ont pas permis de mettre en évidence des relations entre l'amplitude des troubles anxieux, l'amplitude des troubles dépressifs et les taux de CORT chez les animaux sst2KO

contrairement aux animaux WT. Ces données suggèrent donc que chez ces animaux, la CORT ne soit pas un élément suffisant pour prédire la présence de troubles émotionnels. De telles conclusions ont récemment été avancées concernant l'absence de prédictibilité des taux de CORT sur les troubles de l'« émotionnalité » chez la souris n'exprimant pas la SST. (Lin and Sibille, 2015a). En effet, Lin and Sibille ont démontré que des animaux SST<sup>HZ</sup> (hétérozygote) et des animaux SSTKO (n'exprimant pas la SST) présentent des taux de CORT élevés mais que seuls les SSTKO expriment des troubles de l'émotionnalité. L'absence totale de SST chez ces animaux entraîne des dérégulations du BDNF, de l'expression de gènes associés au système GABAergique, un dérèglement endocrinien et un phénotype anxio-dépressif qui sont directement liés à l'absence de la SST et non pas induit par une hypercortico-stéronémie. Dans notre étude, l'absence de corrélation entre les taux de CORT et les différents troubles étudiés chez nos animaux sst2KO semble donc aller dans le sens des conclusions de ces auteurs et suggère ainsi que les troubles anxio-dépressifs observés sont directement dépendants de l'absence de récepteur sst2.

Pour conclure, l'implication des récepteurs sst2 dans la régulation de l'axe HPA et des troubles émotionnels a été confortée grâce aux résultats obtenus. **Ces récepteurs semblent donc être impliqués dans la mise en place de phénomène de résistance aux effets délétères du stress chronique, principalement vis-à-vis des atteintes anxieuses.** Cette conclusion est corroborée par une étude récente démontrant une augmentation de l'expression des ARNm codant le récepteur sst2 dans l'habenula de rats exposés à un protocole de stress chronique (Faron-Gorecka et al., 2015). Cette étude a également mis en avant une élévation des taux de SST plasmatique chez ces rats sensibles au stress chronique, tandis qu'aucune modification n'est observée chez des rats résilients. De telles conclusions appuient donc l'importance de la SST et de son récepteur sst2 dans la réponse au stress et dans la régulation de troubles anxio-dépressifs associés.





## DISCUSSION GENERALE

---



Les travaux réalisés dans cette thèse ont reposé sur une approche comportementale permettant d'évaluer les troubles émergents après un stress chronique chez la souris adulte. Les batteries de tests comportementaux, couplées à des analyses moléculaires, pharmacologiques et immunohistochimiques, ont permis de mettre en évidence des différences d'émergence de troubles en fonction de l'âge d'exposition au stress chronique ainsi que leur persistance à long terme et de spécifier le rôle du système SS Tergique dans les régulations de ces troubles liés au stress.

### 1. La sévérité du syndrome de stress chronique chez l'adulte dépend de l'âge du sujet

L'intérêt pour l'âge adulte repose sur l'observation que les recherches sur l'origine des troubles dépressifs liés au stress sont aujourd'hui très orientées vers les périodes de développement sensible, à savoir les périodes périnatales et l'adolescence (Sternberg and Ridgway, 2003 ; Bourke and Neigh, 2011), ou vers le vieillissement (Landfield et al., 2007). Cependant, l'hypothèse d'une charge allostatique s'accumulant avec l'âge (McEwen, 2003a; Joels, 2008b) recentre l'intérêt d'étudier les effets du stress chez l'adulte, âge auquel la charge allostatique s'accumule. Différents symptômes pouvant être générés lors d'un stress chronique ont été étudiés afin de déterminer si certains troubles émergent de manière différentielle en relation avec des phénomènes de résistance et/ou de sensibilité particulière selon l'âge adulte des sujets.

Les résultats de notre étude indiquent que le syndrome de stress chronique chez la souris adulte regroupe un ensemble de symptômes qui peuvent être classés selon leur apparition dans les classes d'âge étudiées. Des troubles apparaissent de manière constante à chaque classe d'âge adulte alors que d'autres émergent de manière plus sporadique en fonction de l'âge.

#### a. Les troubles constants générés par un épisode de stress chronique

La littérature est aujourd'hui riche en documents relatant l'impact du stress chronique sur l'émergence de troubles de type dépressif (Mineur et al., 2006; Logan et al., 2015). La dépression est une pathologie complexe, multifactorielle, hétérogène et récurrente qui touche environ 120 millions de personnes dans le monde (Kessler and Bromet, 2013). En 2010, la dépression majeure était la deuxième cause d'invalidité dans le monde et les spécialistes prévoient qu'elle devienne la première cause à l'horizon 2030 (WHO-Report-EB130/9, 2011).

Le stress est un des facteurs les plus couramment reconnus dans l'émergence de troubles dépressifs (Katz et al., 1981). En plus d'avoir la faculté d'être un élément déclencheur de la dépression, la perturbation de l'axe HPA est également un symptôme observé chez des patients souffrant de troubles dépressifs liés au stress. Ainsi, nous avons uniquement abordé la dépression par le lien étroit qu'elle possède avec le stress même si d'autres étiologies qui n'ont pas été abordées durant ces travaux de thèse sont reconnues (Pour revue voir : (Hirschfeld, 2000; Cai et al., 2015)). Il est donc important de souligner que les interprétations faites dans ce manuscrit s'appliquent uniquement aux pathologies dépressives liées au stress.

L'atteinte de type dépressif chez la souris a été évaluée par une mesure du renoncement à des comportements de fuite dans le test de la nage forcée (FST) et de la suspension par la queue (TST). Ces tests sont parfois controversés et certains auteurs estiment que l'absence de tentative d'échappement dans ces deux tests est le signe d'une adaptation et non d'un trouble de type dépressif (Molendijk and de Kloet, 2015). Cependant, de très nombreuses études ont démontré l'effet d'antidépresseurs sur l'activité des animaux dans ces tests (Detke et al., 1995; Dulawa et al., 2004; Petit-Demouliere et al., 2005; El-Hage et al., 2013). De plus, le fait que l'évaluation du désespoir comportemental chez la souris ne se déroule qu'en un seul essai rend la diminution des comportements de fuite difficilement attribuable à une plus grande adaptabilité à la situation. Les tests de FST et de TST ont été employés en se référant à plusieurs études utilisant ces mêmes tests afin d'évaluer l'atteinte de type dépressif que peut générer l'exposition à un stress chronique (Chourbaji et al., 2006; Mineur et al., 2006; Roni and Rahman, 2015). Les résultats obtenus ont montré que les comportements de type dépressif évalués par ces tests apparaissent chez toutes les classes d'âge adulte ayant suivi le protocole de stress chronique et est systématiquement accompagnée d'une détérioration de l'état du pelage et d'une augmentation importante des taux de CORT plasmatique. Les corrélations entre les différents troubles présents chez l'adulte ont indiqué des relations entre la corticostéronémie, les troubles de type dépressif et l'atteinte somatique. Ainsi, la corticostéronémie apparaît comme un bon indicateur de l'installation d'un syndrome de stress chronique. La constance de l'association de ces trois paramètres conforte l'idée que le stress chronique chez la souris adulte entraîne des modifications à la fois comportementales, somatiques et physiologiques et renforce la validité du modèle de stress chronique léger et imprédictible dans l'induction de troubles de type dépressif chez la souris C57BL/6 quel que soit son âge.

b. Les troubles rencontrés de manière sporadique après un épisode de stress chronique

Les résultats obtenus dans les expériences du chapitre I ont montré que les troubles de type anxieux générés par le stress chronique se manifestent de manière différentielle selon l'âge adulte. En effet, des troubles de type anxieux étaient systématiquement associés à l'état dépressif chez les animaux stressés jeunes adultes ou à l'âge adulte avancé, alors qu'à l'âge de 10 mois le stress chronique n'a pas induit d'atteinte de type anxieux malgré une atteinte de type dépressif effective. La sévérité du syndrome de stress chronique chez les animaux d'âge intermédiaire est donc moindre comparativement à celle observée chez des animaux plus jeunes ou plus âgés. **Ainsi, une résistance particulière au développement de troubles de type anxieux s'installerait chez les adultes d'âge intermédiaire, expliquant la divergence de sévérité du syndrome de stress chronique comparativement aux autres classes d'âge.**

L'apparition des troubles de la mémoire de travail dépend également de l'âge auquel est vécu l'épisode de stress chronique. En effet, des animaux stressés jeunes adultes n'ont exprimé aucune altération dans le test d'alternance séquentielle en T-maze alors que les animaux adultes stressés d'âge plus avancé ont présenté des performances d'alternance proches du hasard. Ce test de mémoire de travail repose en particulier sur l'intégrité du cortex préfrontal, une structure sensible au vieillissement (Dunnett, 1990). La diminution de l'activité préfrontale avec l'âge est cohérente avec l'atteinte de la mémoire de travail sélectivement chez des adultes d'âge avancé et conforte l'idée qu'une **sensibilité particulière au stress affectant la mémoire de travail se met progressivement en place chez l'adulte.**

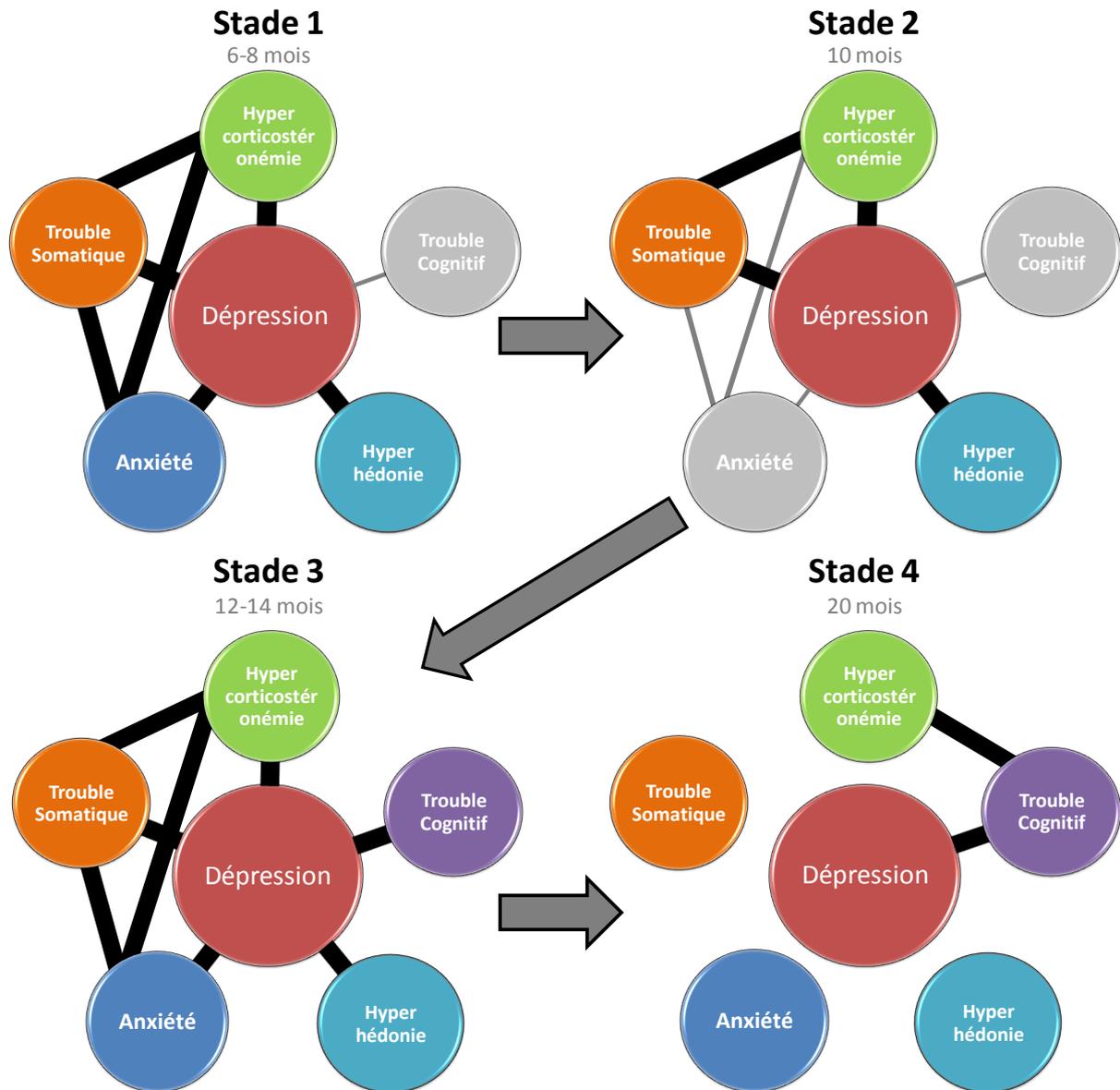
Ensuite, contrairement aux résultats dominants de la littérature (Willner et al., 1992a; Strekalova et al., 2004; Willner, 2005), non seulement aucune anhédonie n'a été détectée suite à l'exposition au stress chronique mais de plus, tous les animaux stressés ont systématiquement présenté une consommation préférentielle pour le saccharose. Des études ont rapporté de telles surconsommations de solutions à fort caractère renforçant et énergétique pouvant à terme conduire jusqu'à l'obésité chez des sujets stressés (Torres and Nowson, 2007). Elles expliquent ce phénomène par un mécanisme de compensation des effets délétères générés par le stress permettant de réguler l'homéostasie de la balance plaisir/déplaisir (Dallman et al., 2003). Cependant, à partir de l'âge de 12 mois, la préférence pour le saccharose d'animaux non-stressés tend à se rapprocher du hasard suggérant qu'une anhédonie se met en place avec l'âge. Certains auteurs ont documenté l'installation

d'anhédonies liées au vieillissement et ont apporté des arguments expliquant qu'une motivation diminuée avec l'âge réduirait la réalisation des efforts requis pour satisfaire l'homéostasie du plaisir (Malatynska et al., 2012). L'atteinte motivationnelle entraînée par le vieillissement pourrait alors expliquer l'anhédonie observée chez les animaux au-delà de 12 mois. Néanmoins, l'observation d'une consommation préférentielle de saccharose chez les sujets stressés de même âge suggère que la consommation d'aliments plaisants pourrait encore contrebalancer les effets délétères du stress, tout au moins lorsqu'ils sont faciles d'accès. La détection de corrélations positives entre la consommation préférentielle de saccharose et l'amplitude du trouble de type dépressif appuie l'hypothèse d'un mécanisme de compensation des effets délétères du stress par le développement d'une hyperhédonie compensatrice, mécanisme qui serait conservé avec le vieillissement.

c. Particularités des troubles induits par le stress chez le sujet âgé

L'étude des effets d'un stress chronique réalisé chez le sujet âgé (20 mois) a indiqué des résultats intéressants comparativement à ceux obtenus chez l'adulte. En effet, le stress chronique chez le sujet âgé a entraîné toute la symptomatologie du syndrome de stress étudié. Toutefois, la caractérisation des effets liés au stress s'est avérée être en partie masquée par les effets du vieillissement normal. Par ailleurs, les analyses de corrélation ont permis de montrer que chez le sujet âgé, les troubles émotionnels et somatiques ne sont plus corrélés avec la corticostéronémie et également qu'ils ne sont plus corrélés entre eux. En revanche, cette analyse a révélé l'apparition de corrélations entre la sévérité des troubles cognitifs, la corticostéronémie et l'amplitude du trouble dépressif. **Chez le sujet âgé, le syndrome de stress chronique se caractérise par la rupture des interrelations entre les symptômes émotionnels et somatiques au profit de l'établissement de relations entre les symptômes cognitifs, la corticostéronémie et l'état dépressif.**

d. Conclusion



**Figure 90 : Dynamique d'émergence des troubles liés au stress chronique chez la souris adulte**

Chaque trouble est présenté sous la forme d'un cercle, coloré si le trouble est présent ou grisé si le trouble est absent. Les corrélations entre les différents troubles sont symbolisées par un trait noir entre les cercles lorsque le trouble est présent, et gris lorsque le trouble est absent. Si aucune corrélation n'existe entre les troubles, ces derniers ne sont pas reliés par un trait. Quatre stades sont présentés, à savoir le stade 1 correspondant à des animaux adultes jeunes (6-8 mois), le stade 2 à des adultes d'âge intermédiaire (10 mois), le stade 3 à des adultes d'âge avancé (12-14 mois) et le stade 4 correspondant à des animaux âgés (20mois).

Considérés dans leur ensemble, les résultats ont permis de mettre en avant que d'une part, l'émergence des symptômes liés au stress et d'autre part, les interconnexions entre les différents troubles varient selon 4 stades de la vie de l'animal adulte. La figure 90 résume les différents stades caractérisés en réponse à un stress chronique. Le stade 1 apparaît chez des adultes jeunes et correspond à l'émergence de troubles émotionnels interconnectés. Le deuxième stade apparaît chez des animaux adultes d'âge intermédiaire et correspond à une rémission des troubles anxieux. Le stade 3 correspond à des animaux adultes d'âge avancé chez lesquels une atteinte émotionnelle s'accompagne de troubles cognitifs (de mémoire de travail). Ces stades caractérisent donc des âges où la sévérité des atteintes liées au stress chronique est particulièrement marquée (stades 1 et 3) et un âge autour duquel une phase de résistance se met en place (stade 2). Pour terminer, un stade 4 peut être décrit chez les animaux âgés, dans lequel les troubles émotionnels et somatiques sont présents mais ne sont plus interconnectés alors que l'amplitude de la corticostéronémie et les troubles dépressifs sont corrélés avec l'amplitude des troubles cognitifs installés. Ces observations renforcent alors les données de la littérature concernant les modifications de sensibilité au stress liées au vieillissement (Lupien et al., 1998; Lupien et al., 2009)

## 2. Le stress chronique rencontré à l'âge adulte entraîne des perturbations comportementales à long terme et est associé à l'installation durable de marques épigénétiques

Le caractère récurrent de la dépression (Frank and Thase, 1999) a orienté les travaux de cette thèse vers l'étude des répercussions à long terme du syndrome de stress chronique. Ces répercussions à long terme peuvent varier en fonction de la sévérité de l'atteinte chez l'adulte et donc de l'âge d'occurrence du stress chronique. La deuxième partie de ces travaux de thèse visait à vérifier la persistance de certains troubles liés au stress chronique chez le sujet âgé de 18 mois qui pourrait être sous-tendue par des modifications épigénétiques, principalement dans l'hippocampe.

- a. La persistance/rémission de l'atteinte émotionnelle à long terme est influencée par la sévérité de l'atteinte anxieuse chez l'adulte.

Alors que la dépression générée par le stress chronique était un des symptômes constants chez l'adulte stressé, elle a été retrouvée de manière plus sporadique chez le sujet âgé en fonction de l'âge d'occurrence du stress. Les animaux âgés de 18 mois ayant subi le stress entre 8 et 10 mois, chez qui une résistance à l'installation des troubles anxieux avait été

caractérisée (Cf. supra), ont présentés des troubles de type dépressif et les troubles de type anxieux moins marqués que les autres classes d'âge. La résistance à l'installation de l'atteinte anxieuse chez le sujet adulte serait donc un élément de prédictibilité de la rémission des troubles anxio-dépressifs chez le sujet âgé. De manière cohérente, les analyses de corrélations ont indiqué que les niveaux d'anxiété et de dépression chez l'adulte sont corrélés avec l'amplitude du trouble dépressif retrouvé chez le sujet âgé. Par ailleurs, les données de la littérature révèlent que les troubles dépressifs et les troubles anxieux présentent un taux de comorbidité allant de 45 à 80% (Gorman, 1996; Beekman et al., 2000), et que la sévérité des troubles dépressifs se trouve accentuée par la présence de troubles anxieux (Oude Voshaar et al., 2015). Un tel lien entre ces deux symptômes n'est donc plus à démontrer mais les travaux de cette thèse mettent l'accent sur la relation entre la comorbidité des troubles anxieux et dépressifs chez le sujet adulte et la persistance/rémission de ces derniers chez le sujet âgé. **Les résultats indiquent donc que la rémission serait plus favorable lorsque la dépression engendrée par le stress chronique a eu lieu chez des adultes d'âge intermédiaire, soit 8-12 mois chez la souris, 35-45 ans chez l'humain** (Flurkey et al., 2001).

Il n'en reste pas moins que des troubles anxio-dépressifs marqués ont été retrouvés à l'âge de 18 mois chez les animaux qui avaient été stressés jeunes adultes (4-6 mois) ou adultes d'âge avancé (12-14 mois). Il est difficile d'imaginer une persistance constante sur l'ensemble de la durée de vie entre 6 et 18 mois. Une telle durée chez la souris correspond à environ 40-45 % de sa vie entière, soit près de 30 ans à l'échelle humaine (calculé à partir de l'espérance de vie mondiale estimée à 70 ans par l'OMS en 2012). Dans environ 35 à 65 % des cas, les patients en rémission de troubles dépressifs rencontrent une, voire plusieurs phases de rechute (Steinert et al., 2014). Ainsi, il n'est pas à exclure que les animaux stressés adultes jeunes aient pu rencontrer une (ou plusieurs) phase(s) de rémission au cours du reste de leur vie d'adulte. Pour cela, des expériences complémentaires seraient alors nécessaires pour vérifier si une phase de rémission se met en place après l'arrêt du protocole de stress chronique, durant le reste de leur vie d'adulte. Si tel était le cas, le vieillissement pourrait être considéré comme un facteur de vulnérabilité qui expliquerait alors la réapparition du syndrome de stress chronique chez les sujets âgés.

b. Effets à long terme du stress chronique sur les capacités d'apprentissage spatial et associatif

L'analyse des troubles d'apprentissage associatif liés au stress chronique a révélé une atteinte chez tous les animaux stressés. Par contre, les altérations observées s'accompagnent d'une diminution d'activité suggérant que **l'atteinte observée ne soit pas cognitive mais résulte plutôt d'atteintes émotionnelles ou sensori-motrices liées au vieillissement et exacerbées par l'exposition au stress chronique à l'âge adulte**. Par ailleurs, les corrélations obtenues entre les troubles observés chez les sujets âgés vont dans ce sens puisque les atteintes associatives (Striatum-dépendantes) sont corrélées avec l'hypercorticostéronémie et les troubles de l'anxiété chez le sujet âgé.

Les troubles de l'apprentissage spatial chez l'animal âgé apparaissent chez les animaux ayant été stressés à partir de l'âge de 10-12 mois. L'atteinte cognitive générée par le stress à l'âge de 10-12 mois est cohérente avec les résultats obtenus précédemment montrant une atteinte de la mémoire de travail en réponse au stress chronique aux alentours de cet âge. Des études antérieures ont démontré les effets délétères du stress chronique et de la corticostérone sur l'apprentissage spatial dans le water-maze chez le rat adulte d'âge moyen mais pas chez le jeune rat (Bodnoff et al., 1995; Conrad, 2010). Ces résultats suggèrent qu'une période de sensibilité particulière au stress affectant la capacité d'apprentissage spatial se met en place chez le sujet adulte d'âge avancé et que cette sensibilité persiste à long terme. Cette possibilité est appuyée par les analyses de corrélation qui ont indiqué que la corticostéronémie chez le sujet âgé est corrélée avec les troubles de l'apprentissage spatial. Ainsi, en accord avec les données de la littérature, **le stress chronique chez l'adulte d'âge avancé entraîne des perturbations de l'apprentissage spatial hippocampe-dépendant qui perdurent chez le sujet âgé**.

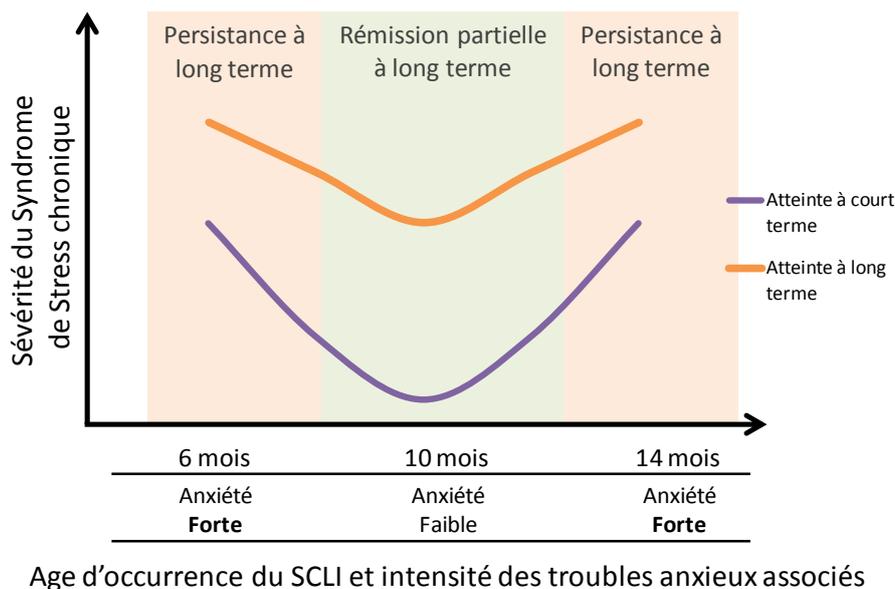
c. Le stress chronique chez le sujet adulte entraîne des modifications de la marque répressive retrouvée chez le sujet âgé

L'implication de l'HPC dans les processus de mémoire spatiale (Moser et al., 1993) et dans les régulations émotionnelles (Fanselow and Dong, 2010) fait de cette structure une cible intéressante. Les analyses des modifications de la triméthylation d'H3K27, marque de répression transcriptionnelle, dans le CA1 dorsal chez des animaux âgés ont indiqué une augmentation chez les animaux ayant été stressés jeunes adultes et adultes d'âge avancé. Récemment, des auteurs ont démontré qu'un enrichissement du milieu diminue l'action

répressive liée à H3K27me3 au niveau des régions promotrices du gène du BDNF dans l'HPC (Kuzumaki et al., 2011). Les régulations négatives durables du BDNF hippocampique dans les atteintes anxieuses et dépressives n'étant plus à démontrer (Martinowich et al., 2007), il apparaît cohérent que cette répression de la transcription dans l'HPC dorsal soit retrouvée sur les mêmes classes d'âge qui ont présenté une persistance des troubles anxio-dépressifs à long terme. Par ailleurs, l'augmentation de la répression transcriptionnelle dans l'HPC dorsal est accompagnée d'une diminution dans l'HPC ventral. Le rôle préférentiel de l'HPC ventral dans les régulations émotionnelles (Bannerman et al., 2003; Fanselow and Dong, 2010) concorde avec l'idée que les dérégulations épigénétiques induites par un stress chronique cibleraient principalement des gènes intervenant dans les régulations émotionnelles. Quoiqu'il en soit, **ces résultats indiquent que des modifications de marques épigénétiques consécutives à un stress chronique peuvent être retrouvées à très long terme, jusqu'à 12 mois après l'exposition au stress (soit une trentaine d'années à l'échelle humaine) et qui plus est, de manière corrélée avec l'amplitude des troubles anxieux initialement générés par le stress.**

### d. Conclusion

En résumé, un stress chronique chez l'adulte génère des impacts immédiats qui persistent à long terme tant sur le plan comportemental que sur la modification de marques épigénétiques réprimant la transcription génique. L'atteinte générée par un épisode de stress chez l'adulte porte principalement sur l'état émotionnel et l'anxiété initialement générée serait un facteur de persistance du syndrome de stress à long terme. Comme illustré dans la figure 91, la capacité de résistance à l'installation des troubles anxieux, telle que constatée chez des adultes d'âge intermédiaire, favoriserait la rémission à long terme du syndrome de stress chronique.



**Figure 91 : Sévérité du syndrome de stress chronique à court et long terme en fonction de l'âge d'exposition au stress et de l'intensité des troubles anxieux à l'âge adulte.**

Les courbes violette et orange représentent la sévérité à court terme et à long terme (respectivement) en fonction de l'âge d'exposition au stress chronique et de la sévérité de l'atteinte anxieuse observée en sortie de stress chronique à l'âge adulte. La courbe violette permet d'illustrer la capacité de résistance des animaux stressés à 8-10 mois, et la courbe orange permet d'illustrer la rémission partielle dont ces animaux bénéficient à long terme.

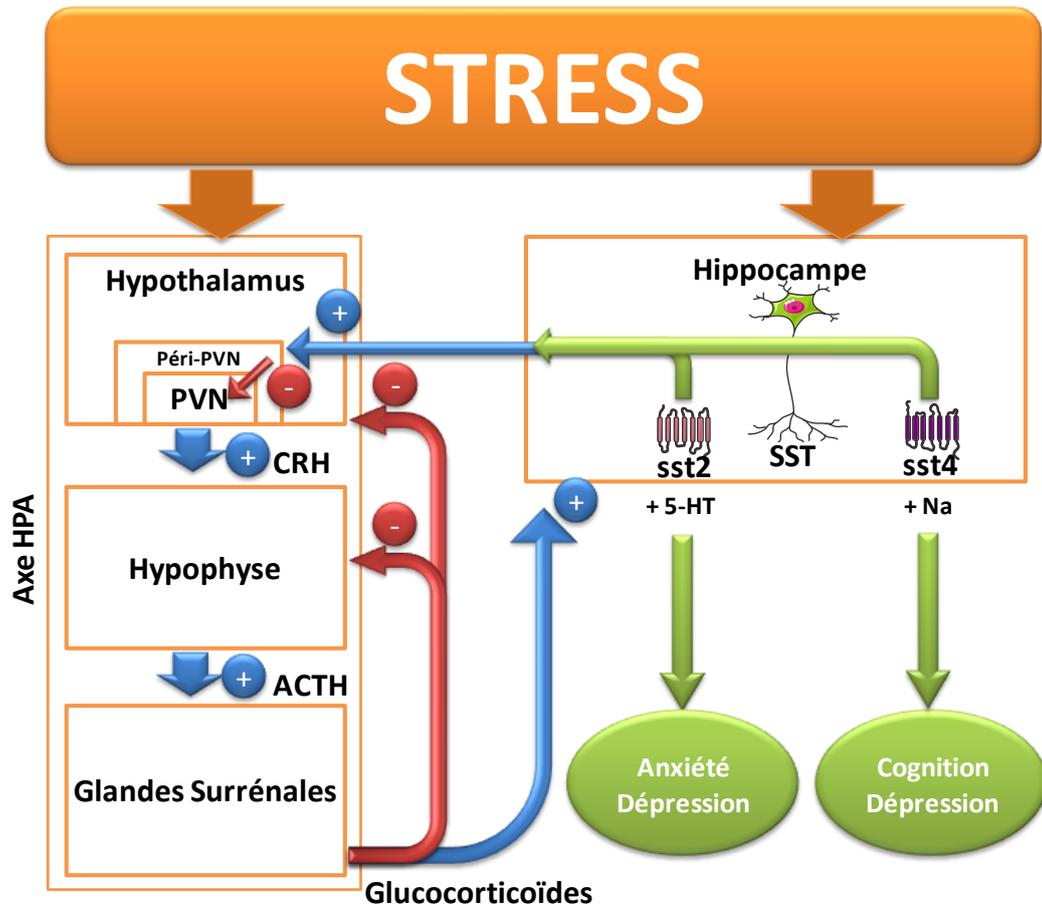
### 3. La SST hippocampique joue un rôle sur la régulation de l'axe HPA et les comportements de type anxieux et dépressif, via une action différentielle des récepteurs sst2 et sst4.

Les régulations de l'HPC sur l'axe HPA et les fonctions émotionnelles (Fendler et al., 1961 ; Sheline, 1996 ; Joels et al., 2007) apparaissent cruciales dans l'émergence de troubles psychiatriques et neurocognitifs en réponse à un stress chronique (Sapolsky et al., 1985; Sapolsky, 2000b, a). Un dérèglement de l'axe HPA peut ainsi permettre la mise en place de troubles liés au stress comme la dépression, l'anxiété, les syndromes de stress post-traumatique ou encore des déficits mnésiques (Sapolsky, 2000a; Pariante and Lightman, 2008). L'implication de la SST de l'amygdale et du septum dans l'anxiété et la régulation de l'axe HPA par l'inhibition des cellules à ACTH de l'hypophyse ont été démontrées (Viollet et al., 2000; Engin et al., 2008; Lin and Sibille, 2013, 2015a) mais l'implication de la SST hippocampique dans ces fonctions reste encore inexploree malgré la démonstration d'une libération de ce neuropeptide dans l'HPC induite par le stress (Arancibia et al., 2001).

a. Implication des récepteurs sst2 et sst4 hippocampiques dans l'inhibition de l'axe HPA et les régulations émotionnelles

L'activation du système SSTergique hippocampique par des analogues ou des agonistes sélectifs des récepteurs sst2 et sst4 produit un effet inhibiteur rapide sur l'axe HPA. Malgré leur similarité d'action physiologique sur l'inhibition de l'axe HPA, l'activation des récepteurs sst2 et sst4 hippocampiques entraîne des effets comportementaux distincts.

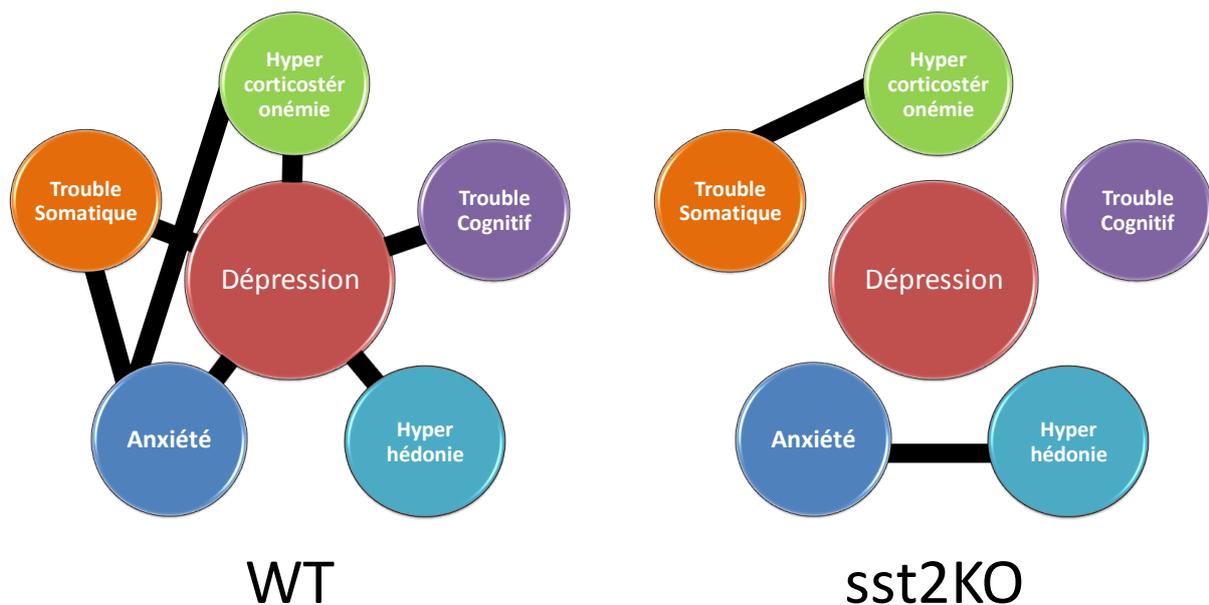
Seule l'infusion intra-hippocampique d'un agoniste sst2 produit un effet anxiolytique suggérant l'action privilégiée du récepteur sst2 dans la régulation des troubles de type anxieux. De manière intéressante, les deux agonistes (sst2 et sst4) produisent un effet antidépresseur via des comportements actifs différents. L'activation du récepteur sst2 entraîne une diminution de l'immobilité au profit de la nage dans le FST, comme c'est le cas avec des traitements antidépresseurs à activité sérotoninergique (Detke et al., 1995). Par contre, l'infusion intra-hippocampique d'agonistes sst4 produit une diminution de l'immobilité mais cette fois au profit de l'escalade de la paroi du bocal comme c'est le cas avec des traitements antidépresseurs à activité noradrénergique (Detke et al., 1995; Cryan and Mombereau, 2004). Par ailleurs, le récepteur sst4 hippocampique participe également à des régulations cognitives en permettant un « switch » entre les systèmes de mémoire (Gastambide et al., 2010). Ce switch a également été observé en réponse à un stress aigu (Schwabe et al., 2010) et nécessite l'intégrité du système noradrénergique (Goodman et al., 2015) ce qui conforte la possibilité d'une interaction entre les récepteurs sst4 hippocampiques et le système noradrénergique dans l'élaboration de réponses adaptatives à un stress. Par ailleurs, des études antérieures ont démontré que les terminaisons noradrénergiques possèdent des récepteurs à la SST au niveau de l'HPC ce qui renforce notre hypothèse qu'une partie des réponses au stress est médiée par les récepteurs à la SST couplés au système noradrénergique (Lopez-Sanudo and Arilla, 1992). Comme résumé dans la figure 92 l'ensemble des résultats indique que **la SST de l'HPC inhibe l'axe HPA et exerce une régulation des troubles de type dépressif et cognitif préférentiellement par le récepteur sst4 (en interaction avec le système noradrénergique) et une régulation des troubles de type anxio-dépressif via le récepteur sst2 (en interaction avec le système sérotoninergique).**



**Figure 92 : Schématisation du rôle de la somatostatine hippocampique sur l'axe HPA et sur les réponses comportementales associées à un stress aigu**

L'application d'un stress aigu induit l'activation de l'axe HPA et plus tard la libération de SST dans l'HPC. L'activation de l'axe HPA aboutit à la libération de GC qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe et active une seconde voie de rétrocontrôle négatif en provenance de l'HPC. La libération de SST dans l'HPC participe alors à l'inhibition de l'axe HPA et permet la mise en place de réponse comportementale adaptée.

b. Le récepteur sst2 est impliqué dans les phénomènes de résistance à l'installation de troubles anxieux



**Figure 93 : Emergence des troubles liés au stress chronique chez la souris adulte WT et sst2KO**

Chaque trouble est présenté sous la forme d'un cercle coloré. Les corrélations entre les différents troubles sont symbolisées par un trait noir entre les cercles. Malgré la présence des mêmes troubles liés au stress chronique chez les WT et sst2KO, il est néanmoins possible de constater des corrélations différentes entre les troubles en fonction du génotype. Les troubles émotionnels chez l'animal WT corrélaient entre eux tandis que chez les sst2KO, les troubles sont tous indépendants, mise à part l'anxiété et l'anhédonie, et l'hypercorticotestéronémie et les troubles somatiques.

Les travaux de cette thèse ont souligné l'importance de l'atteinte de type anxieuse dans la pathogénicité du syndrome de stress chronique. Des animaux n'exprimant pas de récepteur sst2 présentent principalement un état de type anxieux accru et des troubles de type dépressif rappelant une atteinte du système sérotoninergique (augmentation de l'immobilité et diminution de la nage) associée à une élévation basale de CORT en accord avec des travaux antérieurs conduits chez ces animaux (Viollet et al., 2000). Les résultats développés dans cette thèse indiquent une similitude entre le phénotype comportemental observés chez les sst2KO et les symptômes observés en réponse à un stress chronique. De plus, les animaux sst2KO

stressés présentent un profil comportemental témoignant d'une part d'une sensibilité accrue aux effets délétères du stress (en particulier sur l'anxiété) et d'autre part, d'une absence d'interrelation entre les différents symptômes, comme c'était le cas dans le stade 4 du syndrome de stress initialement caractérisé chez des animaux âgés de 20 mois (figure 93). L'ensemble de ces résultats suggère que **ces récepteurs sst2 pourraient être impliqués dans la mise en place de phénomène de résistance aux effets délétères du stress chronique, principalement via la régulation de l'anxiété.**

### c. Conclusion

Pour résumer, le système SSTergique hippocampique semble fonctionner selon 2 voies différentes. L'activation des récepteurs sst2 régule les troubles liés à l'état anxieux principalement et semble faire intervenir le système sérotoninergique dans ces régulations. Le récepteur sst4 est lui davantage impliqué dans les régulations liées au système noradrénergique, comme c'est le cas dans la dépression ainsi que dans les fonctions mnésiques (Goodman et al., 2015). Ces deux sous-systèmes SSTergiques sont cependant étroitement liés puisqu'ils participent tous les deux à la régulation de l'axe HPA, et leur coopération au niveau hippocampique a déjà été démontrée dans des travaux passés de l'équipe (Gastambide et al., 2010).

## 4. Conclusion Générale et Perspectives

Les travaux réalisés dans cette thèse ont démontré l'émergence différentielle des troubles liés au stress chronique chez l'adulte avec des répercussions à long terme dépendante de la sévérité des troubles initialement induits. Par ailleurs, une période de l'âge adulte a été identifiée durant laquelle la résistance à l'émergence de trouble anxieux est renforcée et la rémission d'un syndrome de stress chronique plus favorable. Cette étude apporte des arguments suggérant que le système SSTergique et plus particulièrement le récepteur sst2 pourrait être critique dans la mise en place de phénomènes de résistance aux effets délétères du stress via la régulation de l'anxiété.

Pour développer les travaux initiés par cette étude, il serait intéressant d'explorer les modifications du système SSTergique qui peuvent exister chez des animaux démontrant une résistance à l'émergence de troubles anxieux face au stress chronique comme c'est le cas pour les animaux d'âge adulte intermédiaire. Ceci pourrait permettre de mieux étayer l'hypothèse de l'implication de la SST dans la résistance aux effets délétères du stress. Il serait également

envisageable de tester si des traitements à base de composés ciblant sélectivement un ou plusieurs sous-types de récepteurs SST pourraient avoir des propriétés curatives lorsqu'un syndrome de stress chronique est établi et/ou prévenir le développement de pathologies anxio-dépressives.

De plus, les résultats préliminaires obtenus sur l'évaluation des marques de répression transcriptionnelle sont encourageants et il serait intéressant de développer davantage cette approche en s'intéressant aux gènes ciblés par la répression transcriptionnelle engendrée par le stress chronique. Cette étude pourrait être complétée par l'analyse d'autres marques de modifications transcriptionnelles comme l'acétylation des histones et l'étude des gènes ciblés afin de voir les modifications à long terme que peut avoir un stress chronique sur les fonctions transcriptionnelles du génome. Il serait également envisageable de vérifier si des traitements antidépresseurs permettent de normaliser les dérégulations épigénétiques à long terme induites par un stress chronique dans les régions cérébrales impliquées dans les régulations émotionnelles. L'absence de symptômes associée à des modulations de la marque de répression transcriptionnelle pourrait alors constituer une preuve de rémission suite à un syndrome de stress chronique.

Pour terminer, il pourrait être intéressant de mettre au point un modèle transgénique inducible permettant l'activation et l'inactivation des récepteurs sst2. La création d'un modèle transgénique inducible du système SSTergique pourrait être un développement intéressant autorisant un contrôle du récepteur sur une période de temps donnée plus ou moins longue (par exemple 6 semaines pour mimer un protocole de stress chronique). Ce phénomène inducible permettrait alors de s'affranchir des modifications constitutives que présentent les modèles transgéniques de type KO ou KI, ce qui permettrait alors d'évaluer à long terme, les effets d'une inactivation temporaire du récepteur sst2.



# ANNEXES

---



# HDAC Inhibition Facilitates the Switch between Memory Systems in Young But Not Aged Mice

Malorie Dagnas, Jean-Louis Guillou, Thomas Prévôt, and Nicole Mons

Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5287, 33405 Talence, France

Chromatin modifications, especially histone acetylation, are critically involved in gene regulation required for long-term memory processes. Increasing histone acetylation via administration of histone deacetylase inhibitors before or after a learning experience enhances memory consolidation for hippocampus-dependent tasks and rescues age-related memory impairments. Whether acutely and locally enhancing histone acetylation during early consolidation processes can operate as a switch between multiple memory systems is less clear. This study examined the short- and long-term behavioral consequences of acute intra-CA1 administration of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA) on cue versus place learning strategy selection after a cue-guided water maze task and competition testing performed 1 or 24 h later in mice. Here, we show that intra-CA1 TSA infusion administered immediately post-training biased young mice away from striatum-dependent cue strategy toward hippocampus-dependent place strategy under training condition that normally promotes cue strategy in vehicle controls. However, concomitant infusions of TSA with either PKA inhibitor, Rp-cAMPS, into CA1 or cAMP analog, 8Br-cAMP, into dorsal striatum failed to bias young mice to place strategy use. Behavioral and immunohistochemical analyses further indicated that post-training TSA infusion in aged mice rescued aging-associated deregulation of H4 acetylation in the CA1 but failed to reverse phosphorylated CREB deficits and to produce strategy bias on the 24 h probe test. These findings suggest that post-training intra-CA1 TSA infusion promotes dynamic shift from striatum toward the hippocampal system in young but not aged animals, and support the possibility of a role for CREB in the TSA-mediated switch between these two memory systems.

## Introduction

Chromatin remodeling via acetylation at multiple lysine residues on the N-terminal tail of specific histone proteins plays a crucial role in regulating hippocampus-dependent synaptic function and long-term memory formation (Sweatt, 2009; Stilling and Fischer, 2011; Peixoto and Abel, 2013). Age-dependent declines in histone acetylation and resulting disruption of plasticity-related target genes are key mechanisms contributing substantially to the deterioration of hippocampal synaptic function and deficits in many forms of hippocampus-dependent memory in rodents (Peleg et al., 2010; Zeng et al., 2011; Castellano et al., 2012). For example, several reports provided evidence that decreased acetylation of histone H4 in the hippocampus is implicated with associative memory declines in aged mice (Peleg et al., 2010) and in mouse models for Alzheimer's disease (Francis et al., 2009). Increasing histone acetylation via treatments with nonselective histone deacetylase (HDAC) inhibitors, such as sodium

butyrate or Trichostatin A (TSA), enhances synaptic plasticity and memory formation in young rodents (Haggarty and Tsai, 2011) and prevents or rescues memory deficits associated with aging as well as cognitive disorders in animal models of neurological diseases (Fischer et al., 2010; Stilling and Fischer, 2011). While beneficial effects of pre-training treatments with HDAC inhibitors (HDACi) on learning and memory are well established, few studies have examined how post-training administration of HDACi, by specifically acting on the consolidation phase, modulates memory (Vecsey et al., 2007; Federman et al., 2009; Stefanko et al., 2009; Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011; Reolon et al., 2011). Post-training HDACi infusion into the hippocampus or the insular cortex strengthens long-term memory for object location and object recognition, respectively (Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011). One mechanism by which HDAC inhibition may enhance memory at the time of early consolidation processes is by increasing the strength of functional connectivity between the hippocampus and interconnected structures (Stafford et al., 2012). Whether locally enhancing histone acetylation during early consolidation processes controls the formation of multiple forms of memory remains presently unknown.

To identify the role of hippocampal histone acetylation in modulation of strategies selection and memory formation, we trained mice in a water maze task that can be solved with equal efficiency using either a striatum-based cue/response strategy or a hippocampus-based place strategy. The strategy used in retention depends on the training regimen experienced during acquisition

Received July 18, 2012; revised Dec. 7, 2012; accepted Dec. 8, 2012.

Author contributions: N.M. designed research; M.D., T.P., and N.M. performed research; M.D., J.-L.G., and N.M. analyzed data; M.D., J.-L.G., and N.M. wrote the paper.

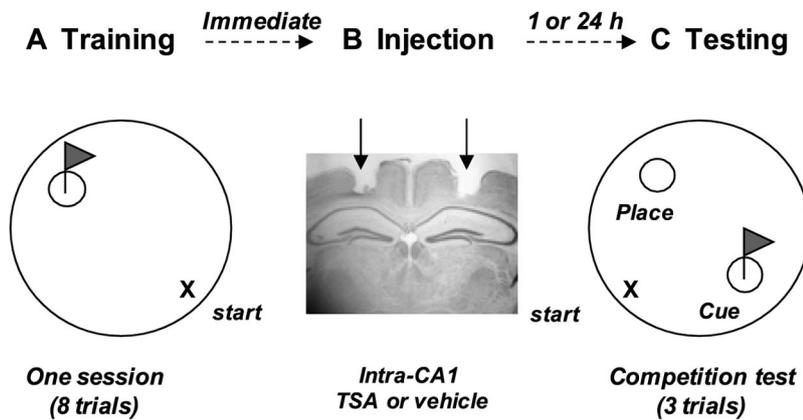
This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Bordeaux. We thank L. Decorte and A. Faugère for technical assistance and D. Panzeri, N. Argenta, and J. Huard for animals care.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Nicole Mons, Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5287, 33405 Talence, France. E-mail: nicole.mons@u-bordeaux1.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3453-12.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/331954-10\$15.00/0



**Figure 1.** Schematic representation of the experimental procedure. **A**, In the eight-trial training session, both young and aged mice learned to search for a submerged cue-marked platform. **B**, Immediately post-training, mice received bilateral infusion of TSA or vehicle into the CA1. Illustration of cannulae placements in the dorsal CA1 region (arrows). **C**, During the probe test performed 1 or 24 h later, mice had to choose between a submerged platform located in the same position as during the training session (place strategy) and the cue-marked platform located in the opposite quadrant of the pool (cue strategy). For detailed explanations, see Material and Methods.

and correlates with the temporal dynamic of CREB phosphorylation in the dorsal hippocampal CA1 during memory consolidation (Martel et al., 2007; Blanchard et al., 2008). We chose a training condition in which the use of the cued strategy prevails over spatial strategy to examine the modulatory influence of post-training intra-CA1 TSA infusion on consolidation processes mediated by the dorsal hippocampus and dorsal striatum in young adult and aged mice. We also investigated the effects of post-training intra-CA1 TSA infusion on cognitive strategy-specific changes in histone H4 acetylation and CREB phosphorylation. Finally, we examined whether the behavioral effects of TSA observed in young mice can be disrupted by pharmacological manipulation of CREB function in the hippocampus and dorsal striatum.

## Materials and Methods

### Animals

A total of 120 male C57BL/6 mice, aged 4 ( $n = 80$ ) and 18–20 ( $n = 40$ ) months, from Charles River Laboratories were individually housed in a temperature-controlled colony room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) and *ad libitum* access to food and water. Mice were handled daily for 5 d before training. Young and aged mice that were infused with either TSA or vehicle into the CA1 immediately after water maze training and received a competition test either 1 or 24 h later (Fig. 1; for detailed methods, see Behavioral procedure, below). All mice subjected to the 1 h probe test were killed immediately after testing for immunohistochemical localizations of histone H4 acetylation and CREB phosphorylation. Changes in H4 acetylation were also performed in mice killed immediately after the 24 h probe test. The results were compared with resting values from young and aged mice infused with TSA or vehicle (Veh) and killed 1 h later directly from their home cage (Young-Veh, naive:  $n = 6$ ; Aged-Veh, naive:  $n = 6$ ; Young-TSA, naive:  $n = 5$ ; Aged-TSA, naive:  $n = 4$ ). In additional experiments, cohorts of young mice received post-training intra-CA1 TSA administration with concomitant infusion of the competitive antagonist of cAMP-induced activation of PKA cAMPS-Rp, triethylammonium salt (Rp-cAMPS) into the CA1 or cAMP analog 8-bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8Br-cAMP) into the dorsal striatum and were subjected to the 24 h probe test. All experimental procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

### Surgery

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (6 mg/kg body weight, i.p.) (Bayer) and placed

in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the dorsal hippocampus (anteroposterior,  $-2$  mm; mediolateral,  $\pm 1.4$  mm; dorsoventral, 0.9 mm; relative to dura and bregma; Fig. 1B), according to the atlas of Franklin and Paxinos (1997). Guide cannulae were fixed to the skull with dental cement and three jewel screws. Mice from the 8Br-cAMP experiment were implanted with two sets of bilateral cannulae, one pair into the dorsal hippocampus as described previously and the second pair 1 mm above the dorsal striatum (anteroposterior, 0.9 mm; mediolateral,  $\pm 2$  mm; dorsoventral, 1.5 mm; relative to dura and bregma) according to the atlas of Franklin and Paxinos (1997). Mice were allowed to recover for 10 d before further experiments.

### Behavioral procedure

**Apparatus.** The experiments were conducted in a round tank, 150 cm diameter and 55 cm in height, filled with water made opaque with white nontoxic paint. The water temperature was maintained at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Two hidden platforms (PF, 13 cm diameter) made of transparent Plexiglas were submerged 1 cm below water surface. A 10 cm height cue (a cylinder structure with black and white striped pattern) was placed on the submerged platform to indicate its location. Several distal visual cues were placed on the walls of the water maze room.

**Procedure.** Mice were submitted to one training session of eight trials followed 1 or 24 h later by a series of three test trials. Acquisition consisted of a spatial and nonspatial reference memory task during which one PF remained in a fixed position and was marked by a cue. In each trial, mice were released facing the wall at a constant start position (middle of the southeast quadrant) and allowed to swim until they found and climbed onto the cued PF (northwest quadrant) or 90 s had elapsed. If a mouse failed to find the PF within 90 s, it was gently guided to the cued-platform by hand, where it was left for 20 s. After each training trial, mice were dried, returned to their home cage, and placed in a warm box equipped with dark lamps. Mice were trained in squads of five or six animals with an intertrial interval of 10–12 min and fully counterbalanced with respect of age and treatment. Escape latency (in seconds) from the releasing point to the PF was analyzed to assess learning during acquisition session.

Mice were submitted 1 or 24 h after the last training trial to three test trials (intertrial interval 5 min) in which two PF were submerged to assess the search strategy used. One PF remained in the spatial location of the training PF (northwest quadrant). The second PF, located in the opposite quadrant (southeast), was marked by the cue. The start position was equidistant from both platforms (southwest). If the animals swam to the original PF (currently hidden), a place response was noted; if the animal swam to the new and cued PF, a cue response was noted. Performance was calculated for each mouse as mean percentage of a particular response over the three test trials.

**Quantification and analysis of behavioral data.** A video camera mounted above the pool was used to record swim trials. Data were analyzed using an automated tracking system (Videotrack). The acquisition performances were analyzed for each trial, defined as the mean latency (in seconds) to escape from the releasing point to the submerged platform. Data were analyzed by repeated-measures ANOVAs, with Age as between-subject factor and Trial as within-subject factors, using StatView 5.01 (SAS Institute). For the competition tests, escape latency and swim distance were analyzed using one- or two-way ANOVAs with Age and Treatment as between-subject factors. Individual strategy selection was categorized as cue-guided or place response according to the choice made by the animal.  $\chi^2$  analyses with Yates corrections (a conservative adjustment to allow for cells with frequencies of  $<5$ ) were computed to determine whether any training groups exhibited a significant tendency

to display one type of strategy selection over the three probe trials. Within-group comparison between the percentages of each strategy selection used paired *t* tests to determine which response type was preferred. For all comparisons, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant.

#### Local drug infusion

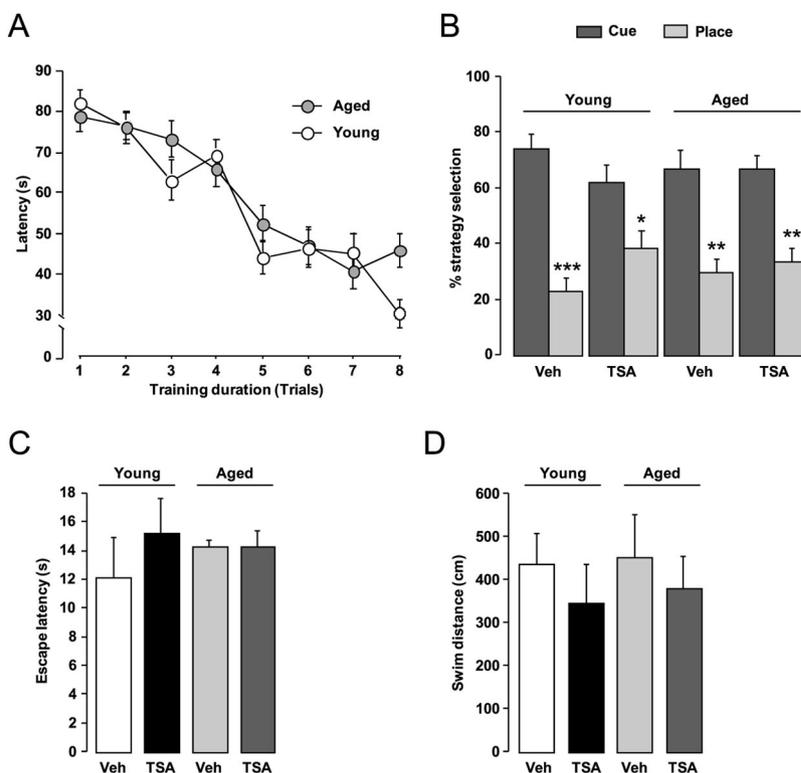
The HDACi TSA (2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Tocris Bioscience) was dissolved in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in artificial CSF (aCSF). Bilateral injections of 0.5  $\mu\text{l}$  of TSA (4 nmol per side) or its vehicle were infused into the dorsal hippocampal CA1 immediately after training. Bilateral infusion took  $\sim 5$  min and the cannulae were left in place for an additional 1 min before removal to allow diffusion of the drug away from the cannulae tips. The Rp-cAMPS (Tocris Bioscience), a membrane-permeable PKA inhibitor, was dissolved in 20% DMSO and diluted in aCSF (35.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 40 nmol dissolved in 0.5  $\mu\text{l}$  per side). The concentration was based on both published evidence in rats (Taylor et al., 1999; Ramos et al., 2003) and our recent study in C57BL/6 mice (Baudonnat et al., 2011). Bilateral Rp-cAMPS infusion occurred in combination with TSA infusion into the dorsal hippocampus. The cAMP analog 8Br-cAMP (Sigma-Aldrich) was dissolved in aCSF (Vehicle). The 8Br-cAMP concentration (2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 3 nmol dissolved in 0.5  $\mu\text{l}$  per side) was based on previous studies (Bernabeu et al., 1997). Mice received infusion of 8Br-cAMP or vehicle into the dorsal striatum immediately after training, with concomitant infusion of TSA or vehicle into the dorsal hippocampus.

#### Histological controls

All surgical implantations were controlled after experiments using thionin blue coloration. Animals were anesthetized with Avertin (10 ml/kg, i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Brains were stored overnight in the same solution and then in paraformaldehyde containing 30% sucrose for 72 h before being cut in 60  $\mu\text{m}$  sections with a freezing microtome (Leica SM2400). After being collected onto gelatin-coated slides, brain sections were stained with thionin and coverslipped.

#### Immunohistochemistry and quantification

Animals were deeply anesthetized with Avertin (10 ml/kg, i.p.) and perfused transcardially with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB. Brains were removed and stored overnight in the same fixation solution, sectioned (50  $\mu\text{m}$ ) on a vibratome (Leica) and kept in a solution containing 30% ethylene glycol, 30% glycerol, 0.1 M PB at  $-20^\circ\text{C}$  until processed for immunohistochemistry, as previously described (Porte et al., 2011). Free-floating sections were incubated with rabbit primary polyclonal antibodies anti-acetyl(Lys5,8,12,16)H4 (1:4000) and anti-phospho(ser133)-CREB (1:4000) (Millipore). The specificity of anti-acetyl(Lys5,8,12,16)H4 antibody has been previously established in rat hippocampus (Levenson et al., 2004; Tsankova et al., 2004). Then sections were incubated with a biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:2000; Jackson ImmunoResearch). This was followed by incubation with an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). The peroxidase reaction was visualized in a Tris solution containing diaminobenzidine tetrahydrochloride and hydrogen peroxide. Sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped. All images were acquired using an imaging analysis system (Biocom Visiolab 2000, V4.50). For each animal, positive nuclei were quantified in the dorsal hippocampal



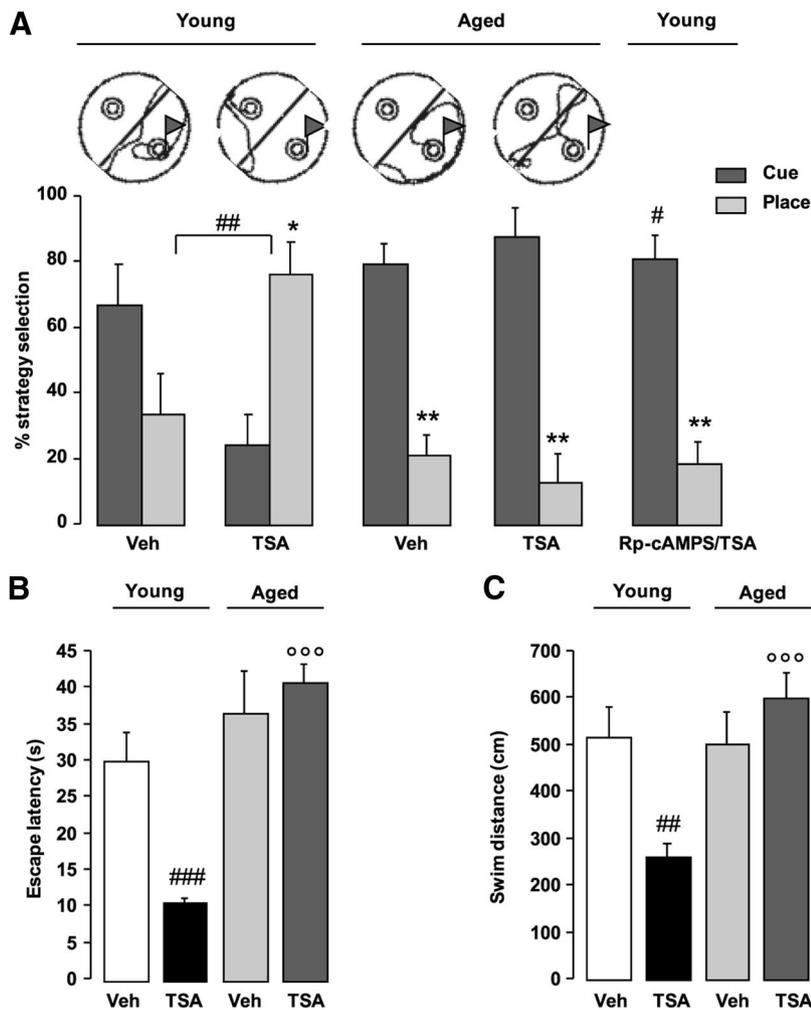
**Figure 2.** Post-training intra-CA1 infusion of TSA does not affect strategy selection or memory performance during the short-term retention test. **A**, Learning curves of Young (open circles,  $n = 29$ ) and Aged (gray circles,  $n = 30$ ) mice during the training session. Data are expressed as mean latencies  $\pm$  SEM (in seconds) to find the platform over the eight consecutive trials. **B**, Mean percentage ( $\pm$  SEM) of (cue, place) strategy selection for young and aged mice infused with TSA (Young-TSA:  $n = 6$ ; Aged-TSA:  $n = 6$ ) or vehicle (Young-Veh:  $n = 8$ ; Aged-Veh:  $n = 8$ ) and subjected to the 1 h probe test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; cue versus place strategy selection. **C**, **D**, Memory performances expressed as mean latencies  $\pm$  SEM (in seconds) (**C**) and mean distance  $\pm$  SEM (in centimeters) (**D**) to reach one of the platforms during the 1 h probe test. Young and aged mice exhibited a preference for the cue-guided platform, regardless of treatment.

pal CA1 region and dorsal part of the striatum according to Franklin and Paxinos (1997). At least three consecutive serial sections were examined bilaterally, and the number of positive nuclei/ $\text{mm}^2$  was averaged to produce Group mean  $\pm$  SEM and compared with that of home cage (naive) mice. Data were statistically analyzed using software Statview 5.01 (SAS Institute) using one- or two-way ANOVAs with Age and Treatment as between-group factors followed by *post hoc* tests (Fisher's PLSD) when appropriate. The data were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Post-training TSA infusion into the CA1 potentiates long-term consolidation of spatial memory in young but not aged mice

During the acquisition phase, both young and aged mice learned to locate the cue-guided PF as attested by a progressive decrease in escape latencies over the eight training trials (Fig. 2A). Two-way repeated-measures ANOVA confirmed no significant effect of Age ( $F_{(1,57)} < 1$ ;  $p = 0.4$ ), a significant effect of Trials ( $F_{(7,399)} = 33.73$ ;  $p < 0.0001$ ) and no significant Age  $\times$  Trial interaction ( $F_{(7,399)} = 1.57$ ;  $p = 0.1$ ). On the 1 h competition test, analysis of the percentage of (cue, place) response strategy for each age group indicated no difference on strategy preference between TSA- and vehicle-infused animals ( $\chi^2$  comparisons:  $ps > 0.1$ ). As shown in Figure 2B, both age groups showed a significant bias toward the cue-guided PF, regardless of whether or not they previously received TSA infusion (paired comparisons:  $p < 0.001$  for Young-Veh;  $p < 0.01$  for Aged-Veh or TSA;  $p < 0.05$  for Young-TSA). In addition to strategies, there was no statistically signifi-



**Figure 3.** Post-training intra-CA1 infusion of TSA facilitates the shift to the use of place strategy and enhances long-term memory performance in young but not aged mice. **A**, Top, Swim paths from a representative “place learner” of the TSA-infused young group (Young-TSA;  $n = 7$ ) and representative “cue learners” of the vehicle-infused young group (Young-Veh;  $n = 8$ ) and vehicle- or TSA-infused aged groups (Aged-Veh;  $n = 8$ ; Aged-TSA;  $n = 8$ ). Bottom, Mean percentage (+SEM) of (cue, place) strategy selection during the 24 h probe test in Young-Vehicle and Young-TSA (left), Aged-Vehicle and Aged-TSA (middle), and Rp-cAMPS/TSA young mice (right;  $n = 9$ ) receiving post-training coinjection of TSA and the PKA inhibitor Rp-cAMPS into CA1. Disruption of hippocampal CREB function completely blocked the TSA-induced bias toward the use of place strategy. **B**, **C**, Memory performances expressed as mean latencies + SEM (in seconds) (**B**) and mean distance + SEM (in centimeters) (**C**) to reach one of the platforms during the 24 h probe test. Young mice infused with TSA showed greater preference for the place platform compared with other groups. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : cue versus place strategy; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ : main effect of Treatment; °°° $p < 0.001$ : main effect of Age.

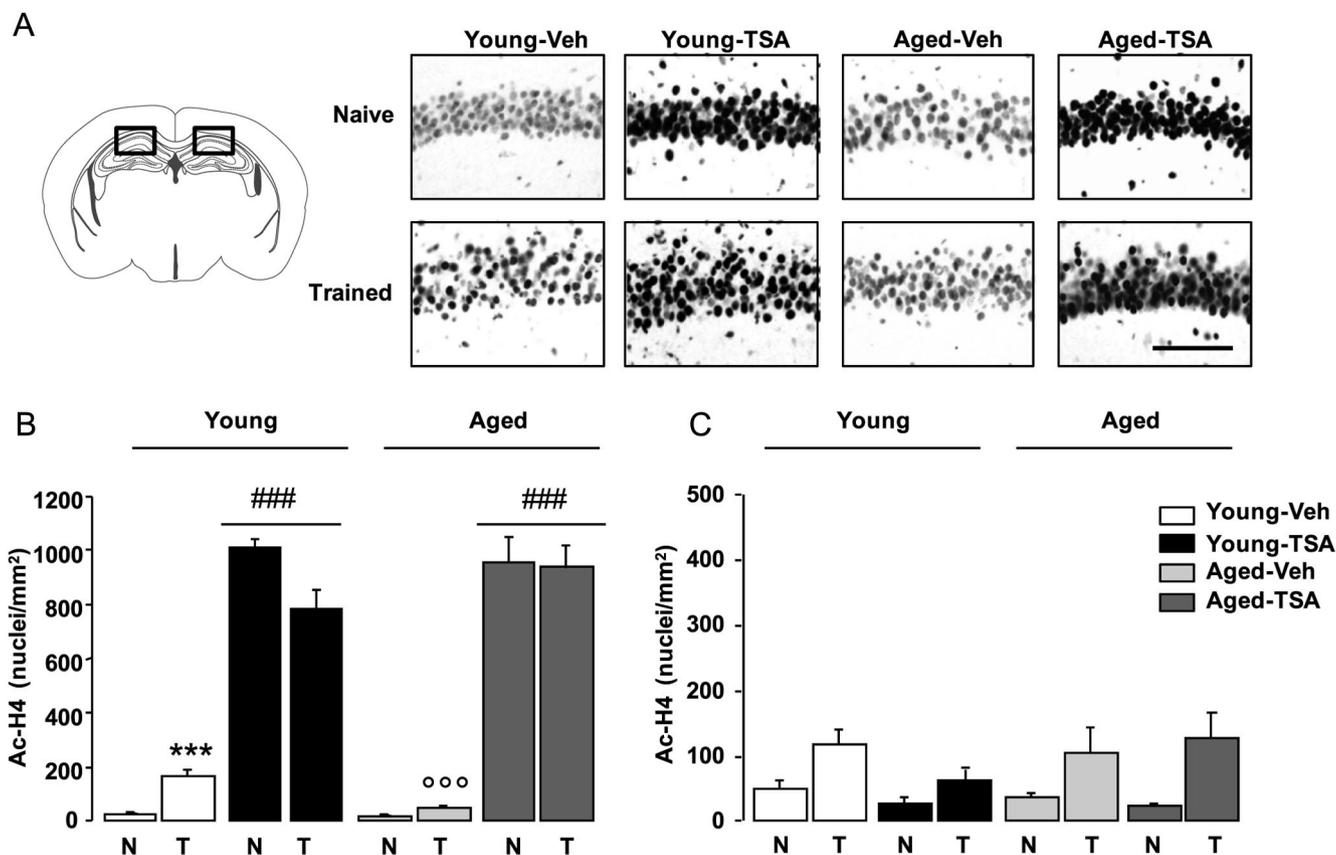
cant difference between TSA- and vehicle-infused groups for performance parameters such as swim latency and distance to reach the PF (Fig. 2C,D;  $p > 0.05$ ). These results indicated that post-training TSA infusion into the CA1 did not affect short-term memory for cue learning in young and aged mice.

When examining the effects of immediate post-training infusion of TSA on learning strategy selection during the 24 h competition test, our data indicated that mice behaved differently according to their age (Fig. 3A). Analysis of the percentage of (cue, place) strategy selection for young animals indicated that the difference in the distribution of place/cue learners between TSA- and vehicle-infused groups was of borderline significance ( $\chi^2 = 3.36$ ;  $p = 0.06$ ). In contrast, there was no difference on strategy preference between TSA- and vehicle-infused aged groups ( $\chi^2 < 1$ ;  $p = 0.5$ ). As shown in Figure 3A, left, most of young adults previously given intra-CA1 TSA infusion showed a

clear bias toward the use of the place strategy (two-tailed paired  $t$  test,  $t_{(6)} = 2.75$ ;  $p = 0.033$ ), whereas vehicle controls did not display significant preference but kept a bias toward the use of the cue strategy (two-tailed paired  $t$  test,  $t_{(7)} = -1.33$ ;  $p = 0.2$ ). Figure 3A, right, shows that aged mice displayed a clear bias toward the cue-guided strategy, regardless of whether they received TSA infusion or not (TSA, paired  $t$  test,  $t_{(7)} = 4.27$ ;  $p = 0.003$ ; Vehicle, paired  $t$  test,  $t_{(7)} = 4.78$ ;  $p = 0.002$ ; TSA vs Vehicle,  $p = 0.45$ ). Two-way ANOVAs for additional performance parameters confirmed a significant effect of Age (latency:  $F_{(1,27)} = 21.78$ ;  $p < 0.0001$ ; distance:  $F_{(1,27)} = 7.69$ ;  $p < 0.01$ ) and a significant Age  $\times$  Treatment interaction (both  $F_{(1,27)} > 9$ ; both  $p < 0.01$ ). *Post hoc* comparisons indicated that young mice receiving TSA had shorter latencies ( $p < 0.001$ ; Fig. 3B) and swam more direct routes ( $p < 0.01$ ; Fig. 3C) than did vehicle-infused young controls. *Post hoc* comparisons further revealed that aged mice receiving TSA displayed longer escape latencies and swim distance to reach the PF than TSA-infused young adults (both  $p < 0.001$ ), whereas the vehicle-infused groups did not differ from each other (both  $p > 0.3$ ). Together, these results indicated that immediate post-training TSA infusion into the CA1 facilitates long-term memory for place learning in young mice but is inefficient in aged animals.

### Blockade of cAMP-PKA pathway in dorsal CA1 interferes with the TSA-induced bias toward the use of a hippocampus-based place strategy in young mice

Previous studies have indicated that intact CREB function is required for beneficial effects of HDAC inhibition on hippocampus-dependent learning and memory (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007; Haettig et al., 2011). We therefore thought to examine the consequence of post-training blockade of cAMP-PKA-CREB pathway into the CA1 on the “place” bias effect induced by TSA infusion in young mice. To this end, young mice received concomitant intra-CA1 infusion of TSA and the cAMP inhibitor Rp-cAMPS immediately post-training and then were submitted to the 24 h competition test. Importantly, Rp-cAMPS/TSA animals kept a clear bias toward the use of the cue-guided strategy (two-tailed paired  $t$  test,  $t_{(8)} = -3.9$ ;  $p = 0.004$ ) and significantly differed from the TSA-infused young group ( $\chi^2 = 6.13$ ;  $p = 0.013$ ) (Fig. 3A, right), supporting the hypothesis that the effects of post-training TSA infusion on hippocampus-dependent memory consolidation are dependent on hippocampal cAMP-PKA-CREB cascade.



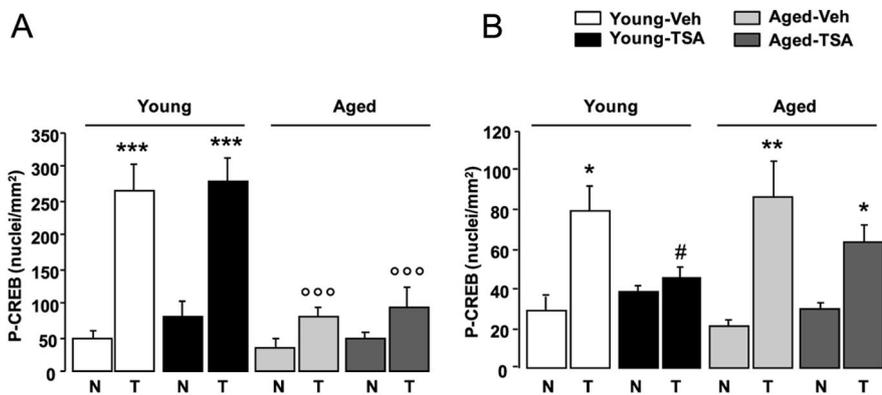
**Figure 4.** Age-dependent effects of TSA infusion on histone H4 acetylation in the dorsal hippocampus and the dorsal striatum. Animals were killed immediately after the 1 h retention test. Levels of Ac-H4 in the dorsal CA1 and the striatum from vehicle-infused young mice [Young-Veh, naive (N):  $n = 6$ ; trained (T):  $n = 8$ ], TSA-infused young mice (Young-TSA, naive:  $n = 5$ ; trained:  $n = 6$ ), vehicle-infused aged mice (Aged-Veh, naive:  $n = 6$ ; trained:  $n = 8$ ), and TSA-infused aged mice (Aged-TSA, naive:  $n = 4$ ; trained:  $n = 6$ ). **A**, Representative Ac-H4 immunostainings in the dorsal CA1 for the different naive (top) and trained (bottom) groups. Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ . **B**, Levels of Ac-H4 in the dorsal CA1 were significantly reduced in the Aged-Veh-Trained mice relative to matched Young-Veh-Trained animals. All mice infused with TSA showed significantly greater H4 acetylation levels in the dorsal CA1 than corresponding vehicle controls, regardless of age or training condition. **C**, Neither aging nor TSA infusion significantly altered H4 acetylation in the dorsal striatum. Data are expressed as mean ( $\pm$  SEM) number of positive Ac-H4 nuclei/mm<sup>2</sup>. \*\*\* $p < 0.001$ : main effect of Training; ### $p < 0.001$ : main effect of Treatment; °°° $p < 0.001$ : main effect of Age.

#### Effects of post-training intra-CA1 infusion of TSA on histone H4 acetylation and CREB phosphorylation

We next examined the changes in acetylated H4 (Ac-H4) in the dorsal hippocampal CA1 and dorsal striatum in groups of mice killed immediately after the 1 h competition test (Fig. 4). First, naive control mice infused with TSA displayed greater hippocampal Ac-H4 levels than age-matched vehicle controls, regardless of age (Fig. 4A, top; quantitated data, Fig. 4B). A two-way ANOVA performed on these data confirmed a significant effect of Treatment ( $F_{(1,17)} = 628$ ;  $p < 0.0001$ ) but no effect of Age ( $F_{(1,17)} = 0.37$ ;  $p = 0.5$ ) or Age  $\times$  Treatment interaction ( $F_{(1,17)} = 0.32$ ;  $p = 0.6$ ). Second, Young-Vehicle but not Aged-Vehicle mice displayed a marked increase in the number and intensity of CA1 Ac-H4-positive neurons in response to training (Fig. 4A, bottom, B). Two-way ANOVA yielded significant effects of Age ( $F_{(1,24)} = 29.71$ ;  $p < 0.0001$ ) and Training ( $F_{(1,24)} = 56.63$ ;  $p < 0.0001$ ) as well as a significant Age  $\times$  Training interaction ( $F_{(1,24)} = 28.30$ ;  $p < 0.0001$ ). Further analyses confirmed a significant difference between the trained Young-Vehicle and Aged-Vehicle groups ( $p < 0.0001$ ). Importantly, we observed no Age- and Training-dependent changes in Ac-H4 in mice infused with TSA (both  $F < 3$ ; both  $p > 0.1$ ). Indeed, both trained Young-TSA and Aged-TSA groups displayed significantly greater levels of Ac-H4 in CA1 than did matched vehicle groups (Young,  $F_{(1,12)} =$

106;  $p < 0.0001$ ; Aged,  $F_{(1,12)} = 175$ ;  $p < 0.0001$ ), reaching similar levels to those observed in naive Young-TSA and Aged-TSA controls (both  $p > 0.05$ ; Fig. 4A). Importantly, and as previously observed (Levenson et al., 2004), TSA infusion failed to enhance CA1 Ac-H4 levels in animals killed immediately after the 24 h probe test, underlining the transient effect of TSA on histone acetylation (data not shown). In the dorsal striatum, we found no statistically significant changes in Ac-H4 levels as a function of training status, Age, or Treatment (Fig. 4C).

Prompted by evidence linking CREB activation/phosphorylation to enhancement of hippocampus-dependent memory processes by TSA treatment (Vecsey et al., 2007), we next examined learning-related changes in phosphorylated CREB (P-CREB) in mice killed immediately after the 1 h competition test. In agreement with our previous study indicating that the intensity and number of CA1 P-CREB-immunopositive neurons were dramatically reduced by aging (Porte et al., 2008a), training produced an overall increase in CA1 P-CREB levels in young but not aged mice, independent of treatment condition (Figs. 5A, 6A). Namely, TSA infusion had no effect on CA1 P-CREB levels in naive control animals (Treatment,  $F_{(1,17)} = 1.7$ ;  $p = 0.21$ ; Treatment  $\times$  Age,  $F_{(1,17)} < 1$ ;  $p = 0.93$ ). Whereas training increased P-CREB levels in CA1 from Young-Vehicle ( $F_{(1,12)} = 22$ ;  $p <$



**Figure 5.** Effects of TSA infusion on CREB phosphorylation in the dorsal hippocampus and the dorsal striatum. Animals were killed immediately after the 1 h retention test. Levels of P-CREB in the dorsal CA1 and the striatum from vehicle-infused young mice [Young-Veh, naive (N):  $n = 6$ ; trained (T):  $n = 8$ ], TSA-infused young mice (Young-TSA, naive:  $n = 5$ ; trained:  $n = 6$ ), vehicle-infused aged mice (Aged-Veh, naive:  $n = 6$ ; trained:  $n = 8$ ), and TSA-infused aged mice (Aged-TSA, naive:  $n = 4$ ; trained:  $n = 6$ ). **A**, Training-related changes of P-CREB in CA1 were significantly reduced by aging and were not rescued by TSA infusion. **B**, In the dorsal striatum, training significantly increased P-CREB levels in all groups except the Young-TSA group. Data are expressed as mean (+SEM) number of positive P-CREB nuclei/mm<sup>2</sup>. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : main effect of Training; # $p < 0.05$ : main effect of Treatment; °°° $p < 0.001$ : main effect of Age.

0.001) and Young-TSA ( $F_{(1,9)} = 26$ ;  $p < 0.001$ ) mice, no training-related changes were observed in Aged-Vehicle or Aged-TSA animals (both  $p > 0.1$ ; Fig. 6A, bottom). Further analyses confirmed that, regardless of whether or not they received TSA infusion, trained young mice displayed significantly greater CA1 P-CREB levels than did aged mice (Vehicle and TSA: both  $p < 0.001$ ; Fig. 6A). The patterns of P-CREB in the dorsal striatum are shown in Figures 5B and 6B. No statistically significant changes were found as a function of Treatment or Age in naive control groups (Fig. 6B, top). Training resulted in significantly greater P-CREB levels in the striatum of young and aged mice and significantly differed from naive controls (Young,  $F_{(1,21)} = 6.9$ ;  $p = 0.01$ ; Aged,  $F_{(1,20)} = 13.45$ ;  $p = 0.001$ ). However, compared with age-matched naive controls, the levels of P-CREB in dorsal striatum were significantly increased in Young-Vehicle, Aged-Vehicle, and Aged-TSA groups (all  $ps < 0.05$ ) but not Young-TSA group ( $p = 0.4$ ) (Fig. 6B, bottom).

#### Enhanced CREB phosphorylation in the striatum reverses the TSA-mediated switch from striatum-based to hippocampus-based memory systems

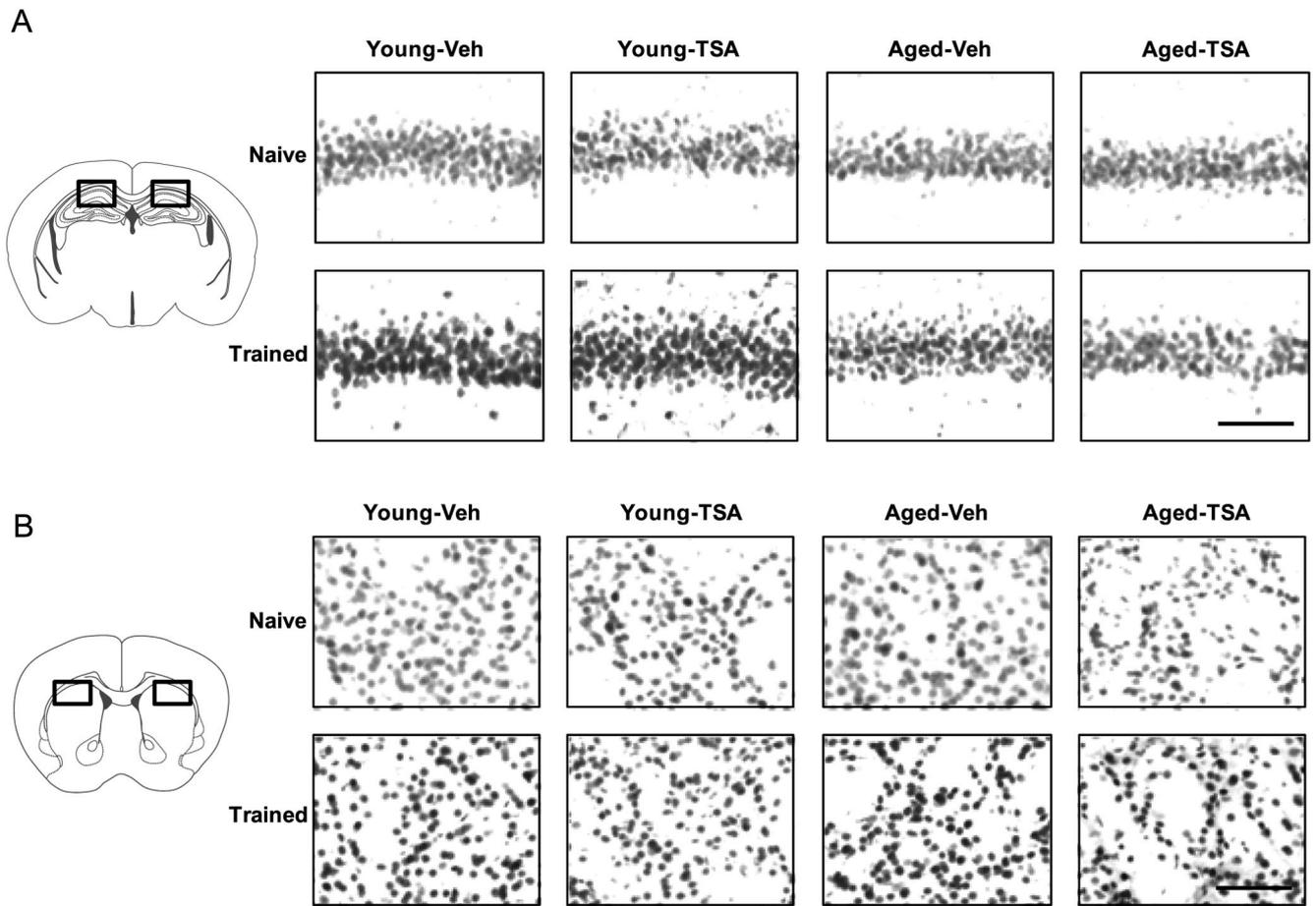
Because our immunohistochemical data indicated that, compared with age-matched naive controls, all training groups displayed high levels of striatal P-CREB except the Young-TSA group, we next examined whether the effects of intra-CA1 TSA infusion on search strategy preference are relevant to striatal CREB function. To this end, three groups of young mice (8Br-cAMP/TSA, Vehicle/TSA, and Vehicle/Vehicle) received post-training infusions of either the cAMP analog 8Br-cAMP or vehicle into the dorsal striatum with concomitant infusion of TSA or vehicle into the CA1 (Fig. 7). Cannulae placements are schematized in Figure 7A. Analyses of the percentage of strategy selection for each group during the 24 h competition test indicated significant difference in the distribution of place/cue learners between the three groups ( $\chi^2 = 10.25$ ;  $p = 0.0059$ ). As shown in Figure 7B, animals of the Vehicle/Vehicle and 8Br-cAMP/TSA groups showed a significant bias toward the cue-guided PF (two-tailed paired  $t$  test,  $t_{(9)} = -3.5$ ;  $p = 0.007$  and  $t_{(9)} = -7.8$ ;

$p < 0.0001$ , respectively) whereas Vehicle/TSA animals were evenly divided between the use of place and cue strategies (two-tailed paired  $t$  test,  $t_{(10)} = 0.14$ ;  $p = 0.8$ ). Importantly, although Vehicle/TSA mice had more modest changes in strategy bias than Young-TSA mice in the first experiment (Fig. 3A), significant differences in percentage of strategy selection were found between the Vehicle/TSA and the 8Br-cAMP/TSA ( $p = 0.006$ ) and the Vehicle/Vehicle ( $p = 0.031$ ) groups.

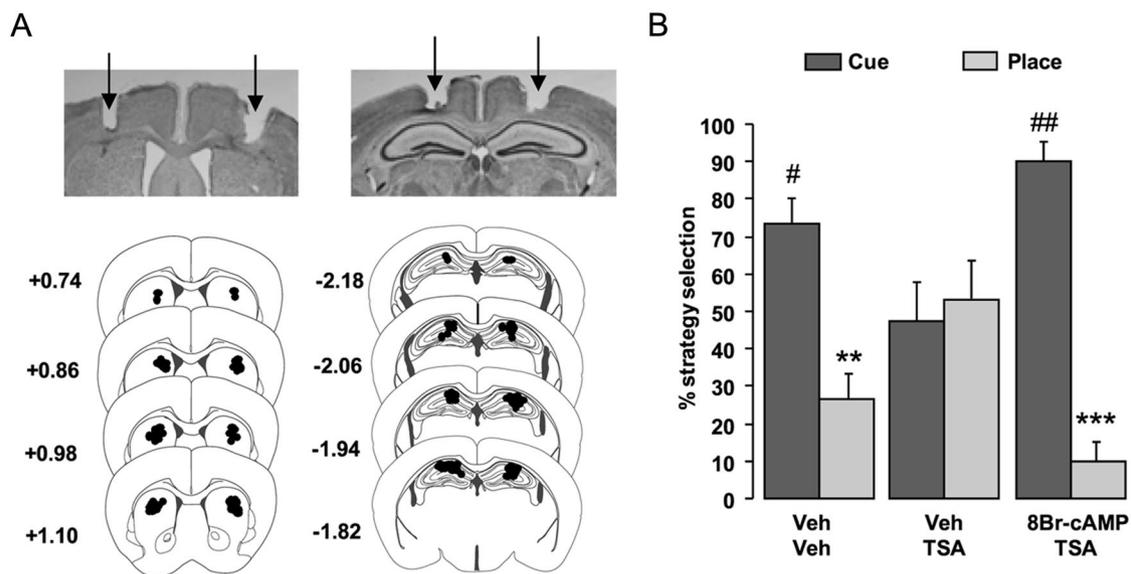
#### Discussion

When either of two competing (i.e., place and cue/response) strategies can lead to successful resolution of a task, mice predominantly adopt the striatum-dependent cue-guided strategy after a short training regimen, whereas the preference for using a hippocampus-dependent place strategy comes to dominate on the condition that training or preexposure to the spatial environment is sufficient (Nicolle et al., 2003; Martel et al., 2006; 2007; Sung et al., 2008; Tunur et al., 2010). This is the first study to demonstrate that post-training infusion of TSA in CA1 of young mice facilitates the shift from the use of a striatum-dependent cue/response strategy toward the use of hippocampus-dependent place strategy under training conditions that promote cue-based strategy in vehicle-infused controls. However, this biasing effect of post-training infusion of TSA was observed only in young mice and when probe test was assessed 24 h after learning, indicating that inducing histone hyperacetylation at the time of early consolidation processes promotes transcription of genes required for long-term memory. We provide evidence that inhibiting hippocampal cAMP-PKA-CREB pathway in young mice receiving concomitant infusion of TSA and PKA inhibitor, Rp-cAMPS, into CA1 disrupts the switch from predominantly cue to place strategy preference. Post-training TSA infusion in aged mice rescues aging-associated deregulation of H4 acetylation in the CA1 but fails to reverse P-CREB deficits or to produce a place strategy bias on the 24 h probe test. We further demonstrate that concomitant infusion of intra-CA1 TSA with the cAMP analog, 8Br-cAMP, into the dorsal striatum prevents TSA-infused young mice from predominantly using place strategy. All these findings highlight that post-training intra-CA1 TSA infusion promotes dynamic shift from striatal toward hippocampal memory system in young but not aged animals, and support the possibility of a critical role for CREB in the TSA-mediated switch between these two memory systems.

Systemic or intracerebral administration of HDACi before training facilitates the formation of hippocampus-dependent memory for spatial learning (Fischer et al., 2007; Dash et al., 2009; Ricobaraza et al., 2009), contextual associative fear conditioning (Levenson et al., 2004; Lattal et al., 2007; Kilgore et al., 2010; Peleg et al., 2010), or novel object recognition (Fontán-Lozano et al., 2008; Giralt et al., 2012). In contrast, only a few works have investigated the modulating effects of post-training HDAC inhibition on memory. Studies have shown that intrahippocampal



**Figure 6.** Representative photomicrographs of P-CREB-immunopositive nuclei within the CA1 (**A**) and the dorsal striatum (**B**) from naive (top) and trained (bottom) groups of young and aged animals infused with vehicle or TSA. All trained mice were killed immediately after the 1 h retention test. Scale bar, 50  $\mu$ m.



**Figure 7.** Striatal CREB phosphorylation is critical for the switch from predominantly striatum-based cue to hippocampus-based place strategy. Young mice received post-training intrahippocampal injection of either vehicle or TSA concomitant with intrastriatal administration of vehicle (Veh/Veh;  $n = 10$ ; Veh/TSA;  $n = 11$ ) or cAMP analog, 8Br-cAMP (8Br-cAMP/TSA;  $n = 10$ ) to increase CREB phosphorylation in the striatum. **A**, Top, Representative views of injection sites in the dorsal striatum (left) and the hippocampus (right) showing tracks of guide cannulae (arrows). Bottom, Histological controls of all stereotaxically implanted mice. Black dots show locations of the tip of injection cannulae. **B**, Mean percentage (+SEM) of (cue, place) strategy selection during the 24 h probe test. In contrast to Veh/TSA animals, no switch from the use of cue to place strategy preference was observed in 8Br-cAMP/TSA and Veh/Veh groups of mice. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : cue versus place response; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ : main effect of Treatment.

infusion of HDACi immediately after learning enhances long-term memory processes without affecting short-term memory by specifically influencing the consolidation phase (Vecsey et al., 2007). Further, intrahippocampal HDAC inhibition during early memory consolidation can generate a form of long-term memory that persists beyond the point at which normal memory fails (Roosendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011). Consistent with these findings, our behavioral results in young mice indicate that inducing histone hyperacetylation in the dorsal hippocampus immediately after learning is sufficient to modulate long-term, but not short-term, memory formation and to control the establishment of different kinds of memory by interacting brain systems during consolidation. Specifically, vehicle-infused young mice subjected to eight-trial acquisition predominantly expressed a cue-guided response independently of the time interval (1 or 24 h) interposed between the acquisition and test sessions. In contrast, TSA-infused young mice predominantly used the cue strategy on the 1 h probe test but switched to the place strategy on the 24 h probe test. These observations suggest that inducing histone hyperacetylation into the CA1 immediately after training does not interfere with short-term memory but facilitates long-term consolidation of spatial information after a training regimen that normally promotes memory consolidation for simple associations between specific behaviors and selective cues. These results further highlight a critical role for histone acetylation into the hippocampus in regulating cellular connectivity between interacting memory systems during consolidation processes. Specifically, post-training intra-CA1 TSA infusion in young mice facilitated switching from striatum- to hippocampus-dependent memory strategy on the 24 h retention test. Consistent with previous observation of a dynamic hippocampus-striatum interplay during the consolidation period (Martel et al., 2007), these findings suggest that increasing hippocampal histone acetylation immediately after training blocks striatum-based cued memory and promotes the formation of hippocampus-dependent spatial memory.

In the hippocampus, remodeling of chromatin via regulation of histone acetylation constitutes a key mechanism to controlling subsets of genes implicated in associative memory formation (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006; Fischer et al., 2007; Peleg et al., 2010; Sharma, 2010). Accordingly, histone H4 acetylation-dependent transcriptional events in the dorsal hippocampus occur selectively during the consolidation phase (30–60 min after training) of long-term contextual fear memory in mice (Peleg et al., 2010) and spatial memory in rats (Bousiges et al., 2010). Our finding that young mice displayed increased H4 acetylation during the early phase of consolidation (at 1 but not 24 h after learning) is in line with a permissive role for acetylated histones in upregulating subsets of activity-associated genes implicated in plasticity and memory (Levenson et al., 2004). Furthermore, while immediate post-training TSA infusion produced strategy shift on the 24 h retention test, TSA-induced H4 hyperacetylation occurred 1 h, but not 24 h, after training, arguing in favor of a causal role for histone acetylation in the rapid molecular mechanisms engaging transcription-dependent pathways necessary for memory consolidation (Federman et al., 2009; Stefanko et al., 2009; Reolon et al., 2011). This is also consonant with recent observations that increasing hippocampal histone acetylation at the time of early consolidation processes promotes transcription of genes required for long-term memory formation by influencing the strength of

functional connectivity between the hippocampus and interconnected structures (Stafford et al., 2012).

Studies in both aged mice (Peleg et al., 2010) and rats (Zeng et al., 2011) have found that reduced histone H4 acetylation in the hippocampus correlates with impaired spatial or contextual memory and that treatments with HDACi before training rescue these deficits. Immediate post-training systemic HDACi administration also efficiently reversed aging-related object recognition memory declines in rats (Reolon et al., 2011). An unexpected result from our study is that, in sharp contrast to previous findings, post-training intra-CA1 TSA infusion rescued the age-associated decrease in H4 acetylation but was not sufficient to bias an aged animal toward the use of place strategy on the 24 h probe test. In addition, post-training TSA infusion was unable to reverse reduced P-CREB levels in aged CA1 neurons, suggesting that post-training TSA infusion, by restoring/enhancing H4 acetylation while keeping P-CREB at low levels in the CA1, might not be sufficient to bias the aged brain toward the use of a hippocampus-based place strategy. These observations are in contrast to recent findings wherein restoration of histone H4 lysine 12 acetylation in aged mice receiving intrahippocampal infusion of the HDACi suberoylanilide hydroxamic acid reinstates the expression of learning-induced genes and leads to the recovery of associative learning behavior (Peleg et al., 2010). We found that a shift toward a place strategy can be prevented by coadministration of TSA with the PKA inhibitor, Rp-cAMPS, into the CA1, which is consistent with studies reporting that HDACi modulates hippocampus-dependent memory in a CREB-dependent manner (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007; Chen et al., 2010; Haettig et al., 2011). These findings and recent evidence that modification-specific, bidirectional chromatin regulation is dependent on recent experience, age, and hippocampal subfields (Castellano et al., 2012) caution that use of HDACi may have hazardous consequences when treating cognitive disorders, especially those associated with CREB deficits.

Consistent with previous reports indicating that specific forms of memory depend on region-specific patterns of P-CREB (Pittenger et al., 2002; Colombo et al., 2003; Martel et al., 2007; Lee et al., 2008; Porte et al., 2008b, 2011; Sung et al., 2008), predominant cue search strategy in Aged-Vehicle and Aged-TSA animals was associated with high P-CREB levels in the striatum but not the hippocampus. In contrast, the use of place strategy in Young-TSA mice correlated with high P-CREB in the hippocampus but not striatum, suggesting that P-CREB provides a signature in the hippocampus of TSA-infused young mice that coincides with their bias in selecting place strategy. To gain further insight into the role of CREB in modulating cognitive strategies, young mice received coinjection of TSA into CA1 and cAMP analog, 8Br-cAMP, into the dorsal striatum. Importantly, young mice infused with 8Br-cAMP/TSA remained to use cue strategy, indicating that striatal PKA/CREB hyperactivity blocked the TSA-induced shift toward the use of a place strategy. These findings suggest that post-training intra-CA1 histone hyperacetylation promotes dynamic shift from predominantly cue to more place learning; this, however, requires accurate regulation of CREB function within the hippocampus and striatum.

Our current findings indicate that enhancing histone acetylation into the dorsal CA1 at the time of early consolidation process is a positive factor facilitating the switch from predominantly striatum-based cue to hippocampus-based place strategy in young mice. These findings and recent reports converge to suggest that both histone H4 and CREB are critical components of the mechanism by which HDACi enhances hippocampus-



- Sharma SK (2010) Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1234–1240. [CrossRef Medline](#)
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (2012) Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biol Psychiatry* 72:25–33. [CrossRef Medline](#)
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009) Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9447–9452. [CrossRef Medline](#)
- Stilling RM, Fischer A (2011) The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96:19–26. [CrossRef Medline](#)
- Sung JY, Goo JS, Lee DE, Jin DQ, Bizon JL, Gallagher M, Han JS (2008) Learning strategy selection in the water maze and hippocampal CREB phosphorylation differ in two inbred strains of mice. *Learn Mem* 15:183–188. [CrossRef Medline](#)
- Sweatt JD (2009) Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 65:191–197. [CrossRef Medline](#)
- Taylor JR, Birnbaum S, Ubriani R, Arnsten AF (1999) Activation of cAMP-dependent protein kinase A in prefrontal cortex impairs working memory performance. *J Neurosci* 19:RC23. [Medline](#)
- Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ (2004) Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 24:5603–5610. [CrossRef Medline](#)
- Tunur T, Dohanich GP, Schrader LA (2010) Pre-exposure to context affects learning strategy selection in mice. *Learn Mem* 17:328–331. [CrossRef Medline](#)
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27:6128–6140. [CrossRef Medline](#)
- Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW (2011) Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *J Neurosci* 31:17800–17810. [CrossRef Medline](#)





## Références Bibliographiques

- Abercrombie HC, Schaefer SM, Larson CL, Oakes TR, Lindgren KA, Holden JE, Perlman SB, Turski PA, Krahn DD, Benca RM, Davidson RJ (1998) Metabolic rate in the right amygdala predicts negative affect in depressed patients. *Neuroreport* 9:3301-3307.
- Adori C, Gluck L, Barde S, Yoshitake T, Kovacs GG, Mulder J, Magloczky Z, Havas L, Bolcskei K, Mitsios N, Uhlen M, Szolcsanyi J, Kehr J, Ronnback A, Schwartz T, Rehfeld JF, Harkany T, Palkovits M, Schulz S, Hokfelt T (2015) Critical role of somatostatin receptor 2 in the vulnerability of the central noradrenergic system: new aspects on Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 129:541-563.
- Aguila MC, Dees WL, Haensly WE, McCann SM (1991a) Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11485-11489.
- Aguila MC, Pickle RL, Yu WH, McCann SM (1991b) Roles of somatostatin and growth hormone-releasing factor in ether stress inhibition of growth hormone release. *Neuroendocrinology* 54:515-520.
- Aguilera G (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15:321-350.
- Aguilera G (2011) HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 46:90-95.
- Agulleiro MJ, Sanchez E, Leal E, Cortes R, Fernandez-Duran B, Guillot R, Davis P, Does RM, Gallo-Payet N, Cerda-Reverter JM (2013) Molecular characterization and functional regulation of melanocortin 2 receptor (MC2R) in the sea bass. A putative role in the adaptation to stress. *PLoS One* 8:e65450.
- Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Strack AM, Walker CD, Dallman MF (1992) Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone. *Endocrinology* 131:585-594.
- Alangari AA (2010) Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med* 5:133-139.
- Alfonso J, Frick LR, Silberman DM, Palumbo ML, Genaro AM, Frasch AC (2006) Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* 59:244-251.
- Alonso J, Angermeyer MC, Lepine JP (2004) The European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project: an epidemiological basis for informing mental health policies in Europe. *Acta Psychiatr Scand Suppl*:5-7.
- Arancibia S, Epelbaum J, Boyer R, Assenmacher I (1984) In vivo release of somatostatin from rat median eminence after local K<sup>+</sup> infusion or delivery of nociceptive stress. *Neurosci Lett* 50:97-102.
- Arancibia S, Payet O, Givalois L, Tapia-Arancibia L (2001) Acute stress and dexamethasone rapidly increase hippocampal somatostatin synthesis and release from the dentate gyrus hilus. *Hippocampus* 11:469-477.
- Arancibia S, Rage F, Grauges P, Gomez F, Tapia-Arancibia L, Armario A (2000) Rapid modifications of somatostatin neuron activity in the periventricular nucleus after acute stress. *Exp Brain Res* 134:261-267.
- Araneda S, Gysling K, Calas A (1999) Raphe serotonergic neurons projecting to the olfactory bulb contain galanin or somatostatin but not neurotensin. *Brain Res Bull* 49:209-214.
- Arimura A, Sato H, Dupont A, Nishi N, Schally AV (1975) Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science* 189:1007-1009.

- Arnett MG, Muglia LM, Laryea G, Muglia LJ (2015) Genetic Approaches to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation. *Neuropsychopharmacology*.
- Arnsten AF (2009) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10:410-422.
- Arnsten AF, Raskind MA, Taylor FB, Connor DF (2015) The Effects of Stress Exposure on Prefrontal Cortex: Translating Basic Research into Successful Treatments for Post-Traumatic Stress Disorder. *Neurobiol Stress* 1:89-99.
- Aston C, Jiang L, Sokolov BP (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 10:309-322.
- Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA (2015) Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci Biobehav Rev* 48:70-91.
- Baddeley A (2000) The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci* 4:417-423.
- Baddeley A, Hitch G, eds (1974) *Working Memory*: Academic Press.
- Bagot RC, Labonte B, Pena CJ, Nestler EJ (2014) Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 16:281-295.
- Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P (2001) Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav* 70:187-192.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24:410-414.
- Banasr M, Duman RS (2007) Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:311-320.
- Banasr M, Duman RS (2008) Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry* 64:863-870.
- Banasr M, Dwyer JM, Duman RS (2011) Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Curr Opin Cell Biol* 23:730-737.
- Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G (2010) Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry* 15:501-511.
- Bannerman DM, Grubb M, Deacon RM, Yee BK, Feldon J, Rawlins JN (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139:197-213.
- Banou E, Hobfoll SE, Trochelman RD (2009) Loss of resources as mediators between interpersonal trauma and traumatic and depressive symptoms among women with cancer. *J Health Psychol* 14:200-214.
- Barch DM, Sheline YI, Csernansky JG, Snyder AZ (2003) Working memory and prefrontal cortex dysfunction: specificity to schizophrenia compared with major depression. *Biol Psychiatry* 53:376-384.
- Barik J, Marti F, Morel C, Fernandez SP, Lanteri C, Godeheu G, Tassin JP, Mombereau C, Faure P, Tronche F (2013) Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. *Science* 339:332-335.
- Basso MR, Bornstein RA (1999a) Neuropsychological deficits in psychotic versus nonpsychotic unipolar depression. *Neuropsychology* 13:69-75.
- Basso MR, Bornstein RA (1999b) Relative memory deficits in recurrent versus first-episode major depression on a word-list learning task. *Neuropsychology* 13:557-563.

- Bauer ME (2008) Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation* 15:241-250.
- Baumeister AA, Hawkins MF, Uzelac SM (2003) The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. *J Hist Neurosci* 12:207-220.
- Baumeister H, Meyerhof W (2000) Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *J Physiol Paris* 94:167-177.
- Beck F, Guignard R (2012) La dépression en France : évolution de la prévalence, du recours au soin et du sentiment d'information de la population par rapport à 2005. *La Santé de l'homme, Inpes*:7-9.
- Beekman AT, de Beurs E, van Balkom AJ, Deeg DJ, van Dyck R, van Tilburg W (2000) Anxiety and depression in later life: Co-occurrence and communality of risk factors. *Am J Psychiatry* 157:89-95.
- Beekman AT, Bremmer MA, Deeg DJ, van Balkom AJ, Smit JH, de Beurs E, van Dyck R, van Tilburg W (1998) Anxiety disorders in later life: a report from the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Int J Geriatr Psychiatry* 13:717-726.
- Beitz AJ, Shepard RD, Wells WE (1983) The periaqueductal gray-raphé magnus projection contains somatostatin, neurotensin and serotonin but not cholecystokinin. *Brain Res* 261:132-137.
- Belmaker RH, Agam G (2008) Major depressive disorder. *N Engl J Med* 358:55-68.
- Bennett MR, Lagopoulos J (2014) Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. *Prog Neurobiol* 112:80-99.
- Benoit JD, Rakic P, Frick KM (2015) Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. *Behav Brain Res* 281:1-8.
- Benoit R, Esch F, Bennett HP, Ling N, Ravazzola M, Orci L, Mufson EJ (1990) Processing of prosomatostatin. *Metabolism* 39:22-25.
- Beracochea DJ, Jaffard R (1990) Effects of ibotenic lesions of mammillary bodies on spontaneous and rewarded spatial alternation in mice. *J Cogn Neurosci* 2:133-140.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.
- Bhagwagar Z, Hafizi S, Cowen PJ (2003) Increase in concentration of waking salivary cortisol in recovered patients with depression. *Am J Psychiatry* 160:1890-1891.
- Bhagwagar Z, Wylezinska M, Jezzard P, Evans J, Boorman E, P MM, P JC (2008) Low GABA concentrations in occipital cortex and anterior cingulate cortex in medication-free, recovered depressed patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:255-260.
- Bizik G, Picard M, Nijjar R, Tourjman V, McEwen BS, Lupien SJ, Juster RP (2013) Allostatic load as a tool for monitoring physiological dysregulations and comorbidities in patients with severe mental illnesses. *Harv Rev Psychiatry* 21:296-313.
- Blazer DG (2005) *The age of melancholy : "major depression" and its social origins*. New York: Routledge.
- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 15:61-69.
- Born J, Spath-Schwalbe E, Schwakenhofer H, Kern W, Fehm HL (1989) Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 68:904-911.

- Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 94:147-160.
- Bouchard TJ, Jr., Loehlin JC (2001) Genes, evolution, and personality. *Behav Genet* 31:243-273.
- Bourke CH, Neigh GN (2011) Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Horm Behav* 60:112-120.
- Bourke CH, Neigh GN (2012) Exposure to repeated maternal aggression induces depressive-like behavior and increases startle in adult female rats. *Behav Brain Res* 227:270-275.
- Branda CS, Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6:7-28.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157:115-118.
- Breuner CW, Orchinik M (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99-112.
- Brodie BB, Comer MS, Costa E, Dlabac A (1966) The role of brain serotonin in the mechanism of the central action of reserpine. *J Pharmacol Exp Ther* 152:340-349.
- Brown ES (2009) Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. Treatment and preventive therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1179:41-55.
- Brown GW (1993) Life events and affective disorder: replications and limitations. *Psychosom Med* 55:248-259.
- Brown KW, Weinstein N, Creswell JD (2012) Trait mindfulness modulates neuroendocrine and affective responses to social evaluative threat. *Psychoneuroendocrinology* 37:2037-2041.
- Brown MR, Rivier C, Vale W (1984) Central nervous system regulation of adrenocorticotropin secretion: role of somatostatins. *Endocrinology* 114:1546-1549.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G (2002) SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antiseecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146:707-716.
- Bruns C, Raulf F, Hoyer D, Schloos J, Lubbert H, Weckbecker G (1996) Binding properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 45:17-20.
- Buckley TM, Schatzberg AF (2005a) Aging and the role of the HPA axis and rhythm in sleep and memory-consolidation. *Am J Geriatr Psychiatry* 13:344-352.
- Buckley TM, Schatzberg AF (2005b) On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3106-3114.
- Bunney WE, Jr., Davis JM (1965) Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry* 13:483-494.
- Burcusa SL, Iacono WG (2007) Risk for recurrence in depression. *Clin Psychol Rev* 27:959-985.
- Burgess E, Dorn LD, Haaga DA, Chrousos G (1996) Sociotropy, autonomy, stress, and depression in Cushing syndrome. *J Nerv Ment Dis* 184:362-367.
- Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC (2005) Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 30:846-856.
- Burt DB, Zembar MJ, Niederehe G (1995) Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. *Psychol Bull* 117:285-305.
- Butler RK, White LC, Frederick-Duus D, Kaigler KF, Fadel JR, Wilson MA (2012) Comparison of the activation of somatostatin- and neuropeptide Y-containing neuronal

- populations of the rat amygdala following two different anxiogenic stressors. *Exp Neurol* 238:52-63.
- Cai N (2015) Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature* 523:588-591.
- Cai S, Huang S, Hao W (2015) New hypothesis and treatment targets of depression: an integrated view of key findings. *Neurosci Bull* 31:61-74.
- Campbell SN, Zhang C, Monte L, Roe AD, Rice KC, Tache Y, Masliah E, Rissman RA (2015) Increased tau phosphorylation and aggregation in the hippocampus of mice overexpressing corticotropin-releasing factor. *J Alzheimers Dis* 43:967-976.
- Cannon (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*:339-430.
- Cannon WB (1914) The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researches. *The American Journal of Psychology* 25:256-282.
- Cannon WB (1927) The James-Lange Theory of Emotions: A Critical Examination and an Alternative Theory. *The American Journal of Psychology* 39:106-124.
- Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, Liu PY, Veldhuis JD (2007) Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl*:90-103.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.
- Castagne V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011) Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 10A.
- Cattaneo A, Riva MA (2015) Stress-Induced Mechanisms in Mental Illness: A Role for Glucocorticoid Signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Cavigelli SA, Caruso MJ (2015) Sex, social status and physiological stress in primates: the importance of social and glucocorticoid dynamics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Champagne FA (2008) Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol* 29:386-397.
- Chan S, Debono M (2010) Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab* 1:129-138.
- Chaudhury D et al. (2013) Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493:532-536.
- Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, Beracochea D (2010) Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196-207.
- Checkley S (1996) The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull* 52:597-617.
- Chourbaji S, Urani A, Inta I, Sanchis-Segura C, Brandwein C, Zink M, Schwaninger M, Gass P (2006) IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis* 23:587-594.
- Chrousos G, Vgontzas AN, Kritikou I (2000) HPA Axis and Sleep.
- Clarke AS, Wittwer DJ, Abbott DH, Schneider ML (1994) Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* 27:257-269.
- Conrad CD (2010) A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:742-755.
- Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS (1996) Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* 110:1321-1334.

- Covington HE, 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ, 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 29:11451-11460.
- Crawford LK, Rahman SF, Beck SG (2013) Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. *ACS Chem Neurosci* 4:200-209.
- Cronholm B, Ottosson JO (1961) Memory functions in endogenous depression before and after electroconvulsive therapy. *Arch Gen Psychiatry* 5:193-199.
- Cryan JF, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9:326-357.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238-245.
- Czeh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:250-260.
- Czeh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M (2015a) Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Czeh B, Varga ZK, Henningsen K, Kovacs GL, Miseta A, Wiborg O (2015b) Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus* 25:393-405.
- Dagnas M, Guillou JL, Prevot T, Mons N (2013) HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *J Neurosci* 33:1954-1963.
- Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF (2004) Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* 145:2633-2638.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11696-11701.
- Damasio AR (1996) The somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:1413-1420.
- Damasio AR, Graff-Radford NR, Eslinger PJ, Damasio H, Kassel N (1985) Amnesia following basal forebrain lesions. *Arch Neurol* 42:263-271.
- Darcet F, Mendez-David I, Tritschler L, Gardier AM, Guilloux JP, David DJ (2014) Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front Behav Neurosci* 8:136.
- Darwin C (1877) L'expression des émotions chez l'Homme et les animaux
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- de Lecea L (2008) Cortistatin--functions in the central nervous system. *Mol Cell Endocrinol* 286:88-95.
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242-245.
- DeBoeck A, ed (2008) *Physiologie des Emotions*.
- Destrade C, Cardo B (1974) Effects of post-trial hippocampal stimulation on time-dependent improvement of performance in mice. *Brain Res* 78:447-454.

- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E (2009) Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol* 607:121-125.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121:66-72.
- Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM (1992) Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus* 2:421-430.
- Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Halonen J, Zoladz PR (2007) The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. *Neural Plast* 2007:60803.
- Dolan RJ (2002) Emotion, cognition, and behavior. *Science* 298:1191-1194.
- Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59:1136-1143.
- Drevets W, Price JL (2005) Neuroimaging and neuropathological studies of mood disorders. *Biology of depression: from novel insights to therapeutic strategies.*
- Drevets WC (2000) Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* 48:813-829.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213:93-118.
- Ducottet C, Griebel G, Belzung C (2003) Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:625-631.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29:1321-1330.
- Duman RS (2004) Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med* 5:11-25.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.
- Dun SL, Brailoiu GC, Tica AA, Yang J, Chang JK, Brailoiu E, Dun NJ (2010) Neuronostatin is co-expressed with somatostatin and mobilizes calcium in cultured rat hypothalamic neurons. *Neuroscience* 166:455-463.
- Dunnett SB (1990) Role of prefrontal cortex and striatal output systems in short-term memory deficits associated with ageing, basal forebrain lesions, and cholinergic-rich grafts. *Can J Psychol* 44:210-232.
- Eaton WW, Shao H, Nestadt G, Lee HB, Bienvenu OJ, Zandi P (2008) Population-based study of first onset and chronicity in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 65:513-520.
- Einstein EB, Patterson CA, Hon BJ, Regan KA, Reddi J, Melnikoff DE, Mateer MJ, Schulz S, Johnson BN, Tallent MK (2010) Somatostatin signaling in neuronal cilia is critical for object recognition memory. *J Neurosci* 30:4306-4314.
- Eisch AJ, Bolanos CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ (2003) Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54:994-1005.
- El-Hage W, Leman S, Camus V, Belzung C (2013) Mechanisms of antidepressant resistance. *Front Pharmacol* 4:146.

- Elliott AD, Ustione A, Piston DW (2015) Somatostatin and insulin mediate glucose-inhibited glucagon secretion in the pancreatic alpha-cell by lowering cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308:E130-143.
- Engeland WC, Arnhold MM (2005) Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28:325-332.
- Engin E, Treit D (2009) Anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin: the role of sst2 and sst3 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 206:281-289.
- Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT (2008) Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience* 157:666-676.
- Epelbaum J (1986) Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 27:63-100.
- Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C (1994) The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol* 8:25-44.
- Epelbaum J, Guillou JL, Gastambide F, Hoyer D, Duron E, Viollet C (2009) Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: an old story coming of age? *Prog Neurobiol* 89:153-161.
- Evans SJ, Choudary PV, Neal CR, Li JZ, Vawter MP, Tomita H, Lopez JF, Thompson RC, Meng F, Stead JD, Walsh DM, Myers RM, Bunney WE, Watson SJ, Jones EG, Akil H (2004) Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15506-15511.
- Fairman BJ, Anthony JC (2012) Are early-onset cannabis smokers at an increased risk of depression spells? *J Affect Disord* 138:54-62.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.
- Faron-Gorecka A, Kusmider M, Kolasa M, Zurawek D, Szafran-Pilch K, Gruca P, Pabian P, Solich J, Papp M, Dziedzicka-Wasylewska M (2015) Chronic mild stress alters the somatostatin receptors in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Farooq RK, Isingrini E, Tanti A, Le Guisquet AM, Arlicot N, Minier F, Leman S, Chalon S, Belzung C, Camus V (2012) Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res* 231:130-137.
- Feifel D, Vaccarino FJ (1994) Growth hormone-regulatory peptides (GHRH and somatostatin) and feeding: a model for the integration of central and peripheral function. *Neurosci Biobehav Rev* 18:421-433.
- Fendler K, Karmos G, Telegdy G (1961) The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 20:293-297.
- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ (2009) Tests of causal links between alcohol abuse or dependence and major depression. *Arch Gen Psychiatry* 66:260-266.
- Filho CB, Jesse CR, Donato F, Giacomeli R, Del Fabbro L, da Silva Antunes M, de Gomes MG, Goes AT, Boeira SP, Prigol M, Souza LC (2015) Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na(+),K(+)-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. *Neuroscience* 289:367-380.
- Fischette CT, Komisaruk BR, Edinger HM, Feder HH, Siegel A (1980) Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion. *Brain Res* 195:373-387.
- Flint J, Kendler KS (2014) The genetics of major depression. *Neuron* 81:484-503.

- Flurkey K, Curren JM, Harrison DE (2007) The Mouse in Aging Research. In *The Mouse in Biomedical Research* 2nd Edition. In, Fox JG, et al, editors Edition, pp 637–672: American College Laboratory Animal Medicine.
- Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC (1996) Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol Behav* 60:1481-1484.
- Forthomme B (2000) De l'acédie monastique à l'anxio-dépression : histoire philosophique de la transformation d'un vice en pathologie. *Sanofi-Synthélabo*:630.
- Fossati P, Harvey PO, Le Bastard G, Ergis AM, Jouvent R, Allilaire JF (2004) Verbal memory performance of patients with a first depressive episode and patients with unipolar and bipolar recurrent depression. *J Psychiatr Res* 38:137-144.
- Frank E, Thase ME (1999) Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders. *Annu Rev Med* 50:453-468.
- Frodl T, Meisenzahl E, Zetsche T, Bottlender R, Born C, Groll C, Jager M, Leinsinger G, Hahn K, Moller HJ (2002) Enlargement of the amygdala in patients with a first episode of major depression. *Biol Psychiatry* 51:708-714.
- Fuchs E, Flugge G (2004) Cellular consequences of stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 6:171-183.
- Gallagher BB, Flanigin HF, King DW, Littleton WH (1987) The effect of electrical stimulation of medial temporal lobe structures in epileptic patients upon ACTH, prolactin, and growth hormone. *Neurology* 37:299-303.
- Garrido P (2011) Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Aging Dis* 2:80-99.
- Gastambide F, Viollet C, Lepousez G, Epelbaum J, Guillou JL (2009) Hippocampal SSTR4 somatostatin receptors control the selection of memory strategies. *Psychopharmacology (Berl)* 202:153-163.
- Gastambide F, Lepousez G, Viollet C, Loudes C, Epelbaum J, Guillou JL (2010) Cooperation between hippocampal somatostatin receptor subtypes 4 and 2: functional relevance in interactive memory systems. *Hippocampus* 20:745-757.
- Gerner RH, Hare TA (1981) GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. *Am J Psychiatry*:1098–1101.
- Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L (2007) Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* 61:145-153.
- Ghosal S, Nunley A, Mahbod P, Lewis AG, Smith EP, Tong J, D'Alessio DA, Herman JP (2015) Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav*.
- Gilad GM, Li R, Wyatt RJ, Tizabi Y (1993) Effects of genotype on age-related alterations in the concentrations of stress hormones in plasma and hypothalamic monoamines in rats. *J Reprod Fertil Suppl* 46:119-130.
- Gillies G (1997) Somatostatin: the neuroendocrine story. *Trends Pharmacol Sci* 18:87-95.
- Glowinski J, Axelrod J (1964) Inhibition of Uptake of Tritiated-Noradrenaline in the Intact Rat Brain by Imipramine and Structurally Related Compounds. *Nature* 204:1318-1319.
- Gohier B, Ferracci L, Surguladze SA, Lawrence E, El Hage W, Kefi MZ, Allain P, Garre JB, Le Gall D (2009) Cognitive inhibition and working memory in unipolar depression. *J Affect Disord* 116:100-105.
- Gold PW (2015) The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol Psychiatry* 20:32-47.
- Goldman-Rakic PS (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477-485.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A (2007) Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* 1:3.

- Gorman JM (1996) Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* 4:160-168.
- Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R (2008) Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 13:717-728.
- Gould E, Tanapat P (1999) Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46:1472-1479.
- Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008) The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 11:868-870.
- Guillou JL, Micheau J, Jaffard R (1994) [Hippocampus as interaction sites between cerebral memory systems]. *C R Seances Soc Biol Fil* 188:459-467.
- Guillou JL, Micheau J, Jaffard R (1999) Intrahippocampal injections of cysteamine improve the retention of a bar-pressing task in mice. *Behav Brain Res* 103:113-117.
- Guilloux JP, Douillard-Guilloux G, Kota R, Wang X, Gardier AM, Martinowich K, Tseng GC, Lewis DA, Sibille E (2012) Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry* 17:1130-1142.
- Guilloux JP, David DJ, Xia L, Nguyen HT, Rainer Q, Guiard BP, Reperant C, Deltheil T, Toth M, Hen R, Gardier AM (2011) Characterization of 5-HT(1A/1B)-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology* 61:478-488.
- Gulyas AI, Hajos N, Katona I, Freund TF (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci* 17:1861-1872.
- Gumuslu E, Mutlu O, Sunnetci D, Ulak G, Celikyurt IK, Cine N, Akar F (2013) The effects of tianeptine, olanzapine and fluoxetine on the cognitive behaviors of unpredictable chronic mild stress-exposed mice. *Drug Res (Stuttg)* 63:532-539.
- Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron MG, Bonisch H (2009) Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 111:403-416.
- Hammar A, Lund A, Hugdahl K (2003a) Selective impairment in effortful information processing in major depression. *J Int Neuropsychol Soc* 9:954-959.
- Hammar A, Lund A, Hugdahl K (2003b) Long-lasting cognitive impairment in unipolar major depression: a 6-month follow-up study. *Psychiatry Res* 118:189-196.
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* 1:293-319.
- Hannon JP, Bruns C, Weckbecker G, Hoyer D (2004) Somatostatin receptor gene family subtype selectivity for ligand binding. *Somatostatin* 81-106.
- Hannon JP, Petrucci C, Fehlmann D, Viollet C, Epelbaum J, Hoyer D (2002) Somatostatin sst2 receptor knock-out mice: localisation of sst1-5 receptor mRNA and binding in mouse brain by semi-quantitative RT-PCR, in situ hybridisation histochemistry and receptor autoradiography. *Neuropharmacology* 42:396-413.
- Harald B, Gordon P (2012) Meta-review of depressive subtyping models. *J Affect Disord* 139:126-140.
- Harlow JM (1868) Recovery from the passage of an iron bar through the head. *Massachusetts medical society*.
- Haroutunian V, Mantin R, Campbell GA, Tsuboyama GK, Davis KL (1987) Cysteamine-induced depletion of central somatostatin-like immunoactivity: effects on behavior, learning, memory and brain neurochemistry. *Brain Res* 403:234-242.

- Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC (2007) Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 64:193-200.
- Hauge-Evans AC, Bowe J, Franklin ZJ, Hassan Z, Jones PM (2015) Inhibitory effect of somatostatin on insulin secretion is not mediated via the CNS. *J Endocrinol* 225:19-26.
- Hayashi M, Yamashita A, Shimizu K (1997) Somatostatin and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the primate brain: decreased levels of mRNAs during aging. *Brain Res* 749:283-289.
- Heaney JL, Phillips AC, Carroll D (2010) Ageing, depression, anxiety, social support and the diurnal rhythm and awakening response of salivary cortisol. *Int J Psychophysiol* 78:201-208.
- Heim C, Binder EB (2012) Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol* 233:102-111.
- Hendriksen H, Korte SM, Olivier B, Oosting RS (2015) The olfactory bulbectomy model in mice and rat: one story or two tails? *Eur J Pharmacol* 753:105-113.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR (2006) Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18:393-411.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1201-1213.
- Hickie I, Naismith S, Ward PB, Turner K, Scott E, Mitchell P, Wilhelm K, Parker G (2005) Reduced hippocampal volumes and memory loss in patients with early- and late-onset depression. *Br J Psychiatry* 186:197-202.
- Higgins JE, Endler NS (1995) Coping, life stress, and psychological and somatic distress. *European journal of personality* 9:253-270.
- Hildebrand ME, Snutch TP (2015) The unusual suspects: Regulation of retinal calcium channels by somatostatin. *Channels (Austin)* 9:61-62.
- Hintzpeter J, Stapelfeld C, Loerz C, Martin HJ, Maser E (2014) Green tea and one of its constituents, Epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *PLoS One* 9:e84468.
- Hirayasu Y, Shenton ME, Salisbury DF, Kwon JS, Wible CG, Fischer IA, Yurgelun-Todd D, Zarate C, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW (1999) Subgenual cingulate cortex volume in first-episode psychosis. *Am J Psychiatry* 156:1091-1093.
- Hirschfeld RM (2000) History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 6:4-6.
- Hokfelt T, Johansson O, Efendic S, Luft R, Arimura A (1975) Are there somatostatin-containing nerves in the rat gut? Immunohistochemical evidence for a new type of peripheral nerves. *Experientia* 31:852-854.
- Hollis F, Kabbaj M (2014) Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J* 55:221-232.
- Holmans P, Weissman MM, Zubenko GS, Scheftner WA, Crowe RR, Depaulo JR, Jr., Knowles JA, Zubenko WN, Murphy-Eberenz K, Marta DH, Boutelle S, McInnis MG, Adams P, Gladis M, Steele J, Miller EB, Potash JB, Mackinnon DF, Levinson DF

- (2007) Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. *Am J Psychiatry* 164:248-258.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477-501.
- Horowitz MA, Zunszain PA (2015) Neuroimmune and neuroendocrine abnormalities in depression: two sides of the same coin. *Ann N Y Acad Sci*.
- Hoyer D, Lubbert H, Bruns C (1994) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350:441-453.
- Hu W, Zhang M, Czeh B, Flugge G, Zhang W (2010) Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacology* 35:1693-1707.
- Huang Y, Coupland NJ, Lebel RM, Carter R, Seres P, Wilman AH, Malykhin NV (2013) Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 74:62-68.
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:249-276.
- Hyman SE (2009) How adversity gets under the skin. *Nat Neurosci* 12:241-243.
- Ilsley JE, Moffoot AP, O'Carroll RE (1995) An analysis of memory dysfunction in major depression. *J Affect Disord* 35:1-9.
- Ishikawa J, Nishimura R, Ishikawa A (2015) Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. *Eur J Neurosci* 41:442-453.
- Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C (2010) Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One* 5:e10404.
- Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-134.
- Jaffard R (1994) Les systèmes de mémoire. In: *Journées internationales sur les sciences cognitives*.
- Jaffard R, Destrade C, Soumireu-Moral B, Cardo B (1974) Time-dependent improvement of performance on appetitive tasks in mice. *Behav Biol* 11:89-100.
- James WL (1884) What is emotion? *Mind* ix:189.
- Jay TM, Burette F, Laroche S (1995) NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. *Eur J Neurosci* 7:247-250.
- Jinno S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsaki G, Somogyi P (2007) Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J Neurosci* 27:8790-8804.
- Joels M (2008a) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321.
- Joels M (2008b) The concept of allostasis and allostatic load. *Eur J Pharmacol* 583:173.
- Joels M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459-466.
- Joels M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ (2007) Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 28:72-96.
- Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31:1-7.
- Johansson O, Hokfelt T, Elde RP (1984) Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13:265-339.

- Joormann J, Gotlib IH (2010) Emotion regulation in depression: relation to cognitive inhibition. *Cogn Emot* 24:281-298.
- Kadmiel M, Cidlowski JA (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34:518-530.
- Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG (2002a) Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization and tolerance. *Neuropsychopharmacology* 27:518-533.
- Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG (2002b) Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:131-140.
- Kalueff AV, Tuohimaa P (2004) Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:151-158.
- Kandel DB, Davies M (1986) Adult sequelae of adolescent depressive symptoms. *Arch Gen Psychiatry* 43:255-262.
- Kaplan MJ, Klinetob NA (2000) Childhood emotional trauma and chronic posttraumatic stress disorder in adult outpatients with treatment-resistant depression. *J Nerv Ment Dis* 188:596-601.
- Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R (2005) Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* 136:29-37.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19204-19207.
- Katayama S, Kito S, Miyoshi R, Yamamura Y (1990) Mapping of somatostatin receptor localization in rat brain: forebrain and diencephalon. *Brain Res Bull* 24:331-339.
- Katz RJ, Hersh S (1981) Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5:265-271.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5:247-251.
- Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31:277-287.
- Kegeles LS, Malone KM, Slifstein M, Ellis SP, Xanthopoulos E, Keilp JG, Campbell C, Oquendo M, Van Heertum RL, Mann JJ (2003) Response of cortical metabolic deficits to serotonergic challenge in familial mood disorders. *Am J Psychiatry* 160:76-82.
- Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ (1995) Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry* 152:833-842.
- Kerr DS, Campbell LW, Applegate MD, Brodish A, Landfield PW (1991) Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci* 11:1316-1324.
- Kessler RC, Bromet EJ (2013) The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health* 34:119-138.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453-462.

- Kleen JK, Sitomer MT, Killeen PR, Conrad CD (2006) Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. *Behav Neurosci* 120:842-851.
- Koehl M, van der Veen R, Gonzales D, Piazza PV, Abrous DN (2012) Interplay of maternal care and genetic influences in programming adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 72:282-289.
- Koelsch S, Jacobs AM, Menninghaus W, Liebal K, Klann-Delius G, von Scheve C, Gebauer G (2015) The quartet theory of human emotions: An integrative and neurofunctional model. *Phys Life Rev* 13:1-27.
- Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59:11-34.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:69-72.
- Kosaka K, Kosaka T (2007) Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167:42-55.
- Kraus J, Woltje M, Schonwetter N, Holtt V (2000) Gene structure and regulation of the somatostatin receptor type 2. *J Physiol Paris* 94:199-204.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
- Krishnan V et al. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391-404.
- Krugers HJ, Hoogenraad CC, Groc L (2010) Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 11:675-681.
- Kuzis G, Sabe L, Tiberti C, Leiguarda R, Starkstein SE (1997) Cognitive functions in major depression and Parkinson disease. *Arch Neurol* 54:982-986.
- Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T, Suzuki T (2011) Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus* 21:127-132.
- La Greca AM, Harrison HM (2005) Adolescent peer relations, friendships, and romantic relationships: do they predict social anxiety and depression? *J Clin Child Adolesc Psychol* 34:49-61.
- Lajud N, Torner L (2015) Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front Mol Neurosci* 8:3.
- Lalonde R, Botez MI, Boivin D (1986) Spontaneous alternation and habituation in a t-maze in nervous mutant mice. *Behav Neurosci* 100:350-352.
- Laloux C, Mairesse J, Van Camp G, Giovine A, Branchi I, Bouret S, Morley-Fletcher S, Bergonzelli G, Malagodi M, Gradini R, Nicoletti F, Darnaudery M, Maccari S (2012) Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. *Psychoneuroendocrinology* 37:1646-1658.
- Lambert G, Johansson M, Agren H, Friberg P (2000) Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:787-793.
- Lamirault L, Guillou JL, Micheau J, Jaffard R (2001) Intrahippocampal injections of somatostatin dissociate acquisition from the flexible use of place responses. *Eur J Neurosci* 14:567-570.
- Lancon C (2009) [Severe depression : life events, patient history]. *Encephale* 35 Suppl 7:S279-281.

- Landfield PW, Baskin RK, Pitler TA (1981) Brain aging correlates: retardation by hormonal-pharmacological treatments. *Science* 214:581-584.
- Landfield PW, Blalock EM, Chen KC, Porter NM (2007) A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: implications for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4:205-212.
- Lange C (1887) Ueber Gemuthsbewungen.
- Le Menuet D, Lombes M (2014) The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. *Steroids* 91:11-19.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM (2002) Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord* 4:117-128.
- Lee AS, Duman RS, Pittenger C (2008) A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17163-17168.
- Lee T, Jarome T, Li SJ, Kim JJ, Helmstetter FJ (2009) Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport* 20:1554-1558.
- Lee YA, Goto Y (2015) Chronic stress effects on working memory: association with prefrontal cortical tyrosine hydroxylase. *Behav Brain Res* 286:122-127.
- Lepousez G, Mouret A, Loudes C, Epelbaum J, Viollet C (2010a) Somatostatin contributes to in vivo gamma oscillation modulation and odor discrimination in the olfactory bulb. *J Neurosci* 30:870-875.
- Lepousez G, Csaba Z, Bernard V, Loudes C, Videau C, Lacombe J, Epelbaum J, Viollet C (2010b) Somatostatin interneurons delineate the inner part of the external plexiform layer in the mouse main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 518:1976-1994.
- Lesch KP (2001) Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J Affect Disord* 62:57-76.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274:1527-1531.
- Leshner AI, Korn SJ, Mixon JF, Rosenthal C, Besser AK (1980) Effects of corticosterone on submissiveness in mice: some temporal and theoretical considerations. *Physiol Behav* 24:283-288.
- Lewy AJ, Lefler BJ, Emens JS, Bauer VK (2006) The circadian basis of winter depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7414-7419.
- Lewy AJ, Emens JS, Songer JB, Sims N, Laurie AL, Fiala SC, Buti AL (2009) Winter Depression: Integrating mood, circadian rhythms, and the sleep/wake and light/dark cycles into a bio-psycho-social-environmental model. *Sleep Med Clin* 4:285-299.
- Lightman SL, Conway-Campbell BL (2010) The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* 11:710-718.
- Lin LC, Sibille E (2013) Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Front Pharmacol* 4:110.
- Lin LC, Sibille E (2015a) Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Mol Psychiatry* 20:377-387.
- Lin LC, Sibille E (2015b) Transcriptome changes induced by chronic psychosocial/environmental or neuroendocrine stressors reveal a selective cellular vulnerability of cortical somatostatin (SST) neurons, compared with pyramidal (PYR) neurons. *Mol Psychiatry* 20:285.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180-185.

- Lisurek M, Bernhardt R (2004) Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol Cell Endocrinol* 215:149-159.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
- Logan RW, Edgar N, Gillman AG, Hoffman D, Zhu X, McClung CA (2015) Chronic Stress Induces Brain Region-Specific Alterations of Molecular Rhythms that Correlate with Depression-like Behavior in Mice. *Biol Psychiatry* 78:249-258.
- Long SY (1972) Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Anim Behav* 20:10-12.
- Lopez-Sanudo S, Arilla E (1992) Desmethylimipramine pretreatment prevents 6-hydroxydopamine induced somatostatin receptor reduction in the rat hippocampus. *Regul Pept* 41:227-236.
- Louch CD, Higginbotham M (1967) The relation between social rank and plasma corticosterone levels in mice. *Gen Comp Endocrinol* 8:441-444.
- Louvart H, Maccari S, Vaiva G, Darnaudery M (2009) Prenatal stress exacerbates the impact of an aversive procedure on the corticosterone response to stress in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34:786-790.
- Lucassen PJ, Naninck EF, van Goudoever JB, Fitzsimons C, Joels M, Korosi A (2013) Perinatal programming of adult hippocampal structure and function; emerging roles of stress, nutrition and epigenetics. *Trends Neurosci* 36:621-631.
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czeh B (2010) Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:1-17.
- Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, Almeida OF, Van Dam AM, Rajkowska G, Swaab DF, Czeh B (2014) Neuropathology of stress. *Acta Neuropathol* 127:109-135.
- Lupien S, ed (2010) *Par Amour du Stress*, Editions au Carré Edition.
- Lupien S, King S, Meaney MJ, McEwen BS (2001) Can poverty get under your skin? Basal cortisol levels and cognitive function in children from low and high socioeconomic status. *Development and Psychopathology*:653-679.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:434-445.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE (2007) The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65:209-237.
- Lupien SJ, Nair NP, Briere S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, McEwen BS, Meaney MJ (1999) Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci* 10:117-139.
- Lupien SJ, Gaudreau S, Tchiteya BM, Maheu F, Sharma S, Nair NP, Hauger RL, McEwen BS, Meaney MJ (1997) Stress-induced declarative memory impairment in healthy elderly subjects: relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2070-2075.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci* 1:69-73.
- Luscher B, Shen Q, Sahir N (2011) The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 16:383-406.

- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O (2003) Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27:119-127.
- MacLean PD (1985) Evolutionary psychiatry and the triune brain. *Psychol Med* 15:219-221.
- MacQueen G, Frodl T (2011) The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Mol Psychiatry* 16:252-264.
- Malatynska E, Steinbusch HW, Redkozubova O, Bolkunov A, Kubatiev A, Yeritsyan NB, Vignisse J, Bachurin S, Strekalova T (2012) Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Exp Gerontol* 47:552-564.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Mann JJ (2005) The medical management of depression. *N Engl J Med* 353:1819-1834.
- Marchand A, Durand P, Juster RP, Lupien SJ (2014) Workers' psychological distress, depression, and burnout symptoms: associations with diurnal cortisol profiles. *Scand J Work Environ Health* 40:305-314.
- Marin MF, Lord C, Andrews J, Juster RP, Sindi S, Arseneault-Lapierre G, Fiocco AJ, Lupien SJ (2011) Chronic stress, cognitive functioning and mental health. *Neurobiol Learn Mem* 96:583-595.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998) Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18:135-174.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Martel G, Blanchard J, Mons N, Gastambide F, Micheau J, Guillou JL (2007) Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. *Neuroscience* 150:743-753.
- Martini S, Wagner FA, Anthony JC (2002) The association of tobacco smoking and depression in adolescence: evidence from the United States. *Subst Use Misuse* 37:1853-1867.
- Martinowich K, Manji H, Lu B (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10:1089-1093.
- Mascardo RN, Barton RW, Sherline P (1984) Somatostatin has an antiproliferative effect on concanavalin A-activated rat thymocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 33:131-138.
- Mason JW (1975) A historical view of the stress field. *J Human Stress* 1:22-36 concl.
- Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, Silva JA, Tekell JL, Martin CC, Lancaster JL, Fox PT (1999) Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry* 156:675-682.
- Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K (2014) Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* 34:15490-15496.
- McDonald AJ, Mascagni F, Zaric V (2012) Subpopulations of somatostatin-immunoreactive non-pyramidal neurons in the amygdala and adjacent external capsule project to the basal forebrain: evidence for the existence of GABAergic projection neurons in the cortical nuclei and basolateral nuclear complex. *Front Neural Circuits* 6:46.
- McEvoy LK, Pellouchoud E, Smith ME, Gevins A (2001) Neurophysiological signals of working memory in normal aging. *Brain Res Cogn Brain Res* 11:363-376.
- McEwen BS (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:105-122.
- McEwen BS (2003a) Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry* 54:200-207.

- McEwen BS (2003b) Interacting mediators of allostasis and allostatic load: towards an understanding of resilience in aging. *Metabolism* 52:10-16.
- McEwen BS (2005) Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism* 54:20-23.
- McEwen BS, Seeman T (1999) Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 896:30-47.
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43:2-15.
- McEwen BS, Morrison JH (2013) The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79:16-29.
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS (1968) Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220:911-912.
- McEwen BS, Gray JD, Nasca C (2015a) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *J Endocrinol* 226:T67-83.
- McEwen BS, Nasca C, Gray JD (2015b) Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*.
- McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM (2012) Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62:3-12.
- McGowan PO, Roth TL (2015) Epigenetic pathways through which experiences become linked with biology. *Dev Psychopathol* 27:637-648.
- McGowan PO, Suderman M, Sasaki A, Huang TC, Hallett M, Meaney MJ, Szyf M (2011) Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PLoS One* 6:e14739.
- McKinney BC, Lin CW, Oh H, Tseng GC, Lewis DA, Sibille E (2015) Hypermethylation of BDNF and SST Genes in the Orbital Frontal Cortex of Older Individuals: A Putative Mechanism for Declining Gene Expression with Age. *Neuropsychopharmacology*.
- Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24:1161-1192.
- Melzer S, Michael M, Caputi A, Eliava M, Fuchs EC, Whittington MA, Monyer H (2012) Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* 335:1506-1510.
- Mendel CM, Kuhn RW, Weisiger RA, Cavalieri RR, Siiteri PK, Cunha GR, Murai JT (1989) Uptake of cortisol by the perfused rat liver: validity of the free hormone hypothesis applied to cortisol. *Endocrinology* 124:468-476.
- Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H (2004) Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci* 24:1478-1485.
- Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Sagrati S, Hussey D, Garcia A, Young T, Praschak-Rieder N, Wilson AA, Houle S (2006) Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:1209-1216.
- Mill J, Petronis A (2008) Pre- and peri-natal environmental risks for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): the potential role of epigenetic processes in mediating susceptibility. *J Child Psychol Psychiatry* 49:1020-1030.
- Millenson JR (1967) *The Psychology of Emotion: Theories of Emotion Perspective*. John Wiley & Sons Chapter 4:35-36.

- Miller GE, Chen E, Zhou ES (2007) If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull* 133:25-45.
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006) Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175:43-50.
- Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE (2003) Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav Genet* 33:513-519.
- Moghaddam B (2002) Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51:775-787.
- Molendijk ML, de Kloet ER (2015) Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 62:389-391.
- Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Dournaud P, Dutar P, Billard JM, Carlo AS, Viollet C, Hannon JP, Fehlmann D, Nunn C, Hoyer D, Epelbaum J, Vezzani A (2002) Somatostatin receptor subtypes 2 and 4 affect seizure susceptibility and hippocampal excitatory neurotransmission in mice. *Eur J Neurosci* 16:843-849.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
- Moser E, Moser MB, Andersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916-3925.
- Munafò MR, Brown SM, Hariri AR (2008) Serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype and amygdala activation: a meta-analysis. *Biol Psychiatry* 63:852-857.
- Munier M, Law F, Meduri G, Le Menuet D, Lombes M (2012) Mineralocorticoid receptor overexpression facilitates differentiation and promotes survival of embryonic stem cell-derived neurons. *Endocrinology* 153:1330-1340.
- Munoz-Acedo G, Arilla E (1996) Modulation by 5-hydroxytryptamine of the somatostatin receptor-effector system and somatostatin levels in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 37:259-266.
- Myin-Germeys I, Peeters F, Havermans R, Nicolson NA, DeVries MW, Delespaul P, Van Os J (2003) Emotional reactivity to daily life stress in psychosis and affective disorder: an experience sampling study. *Acta Psychiatr Scand* 107:124-131.
- Naismith SL, Norrie LM, Mowszowski L, Hickie IB (2012) The neurobiology of depression in later-life: clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathophysiological features. *Prog Neurobiol* 98:99-143.
- Naneix F, Marchand AR, Di Scala G, Pape JR, Coutureau E (2009) A role for medial prefrontal dopaminergic innervation in instrumental conditioning. *J Neurosci* 29:6599-6606.
- Naninck EF, Hoeijmakers L, Kakava-Georgiadou N, Meesters A, Lazic SE, Lucassen PJ, Korosi A (2015) Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus* 25:309-328.
- Nater UM, Moor C, Okere U, Stallkamp R, Martin M, Ehlert U, Kliegel M (2007) Performance on a declarative memory task is better in high than low cortisol responders to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 32:758-763.
- Nemeroff CB (1996) Augmentation strategies in patients with refractory depression. *Depress Anxiety* 4:169-181.
- Nemeroff CB (2002) Recent advances in the neurobiology of depression. *Psychopharmacol Bull* 36 Suppl 2:6-23.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.

- Neumeister A, Hu XZ, Luckenbaugh DA, Schwarz M, Nugent AC, Bonne O, Herscovitch P, Goldman D, Drevets WC, Charney DS (2006) Differential effects of 5-HTTLPR genotypes on the behavioral and neural responses to tryptophan depletion in patients with major depression and controls. *Arch Gen Psychiatry* 63:978-986.
- Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK (2006) Cushing's syndrome. *Lancet* 367:1605-1617.
- Nieman LK, Chanco Turner ML (2006) Addison's disease. *Clin Dermatol* 24:276-280.
- Nilsson L, Mohammed AK, Henriksson BG, Folkesson R, Winblad B, Bergstrom L (1993) Environmental influence on somatostatin levels and gene expression in the rat brain. *Brain Res* 628:93-98.
- O'Neil MF, Moore NA (2003) Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol* 18:239-254.
- Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castren E, Ceccatelli S (2008) Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem* 106:1378-1387.
- Oude Voshaar RC, van der Veen DC, Hunt I, Kapur N (2015) Suicide in late-life depression with and without comorbid anxiety disorders. *Int J Geriatr Psychiatry*.
- Panksepp J (2007) Neurologizing the Psychology of Affects: How Appraisal-Based Constructivism and Basic Emotion Theory Can Coexist. *Perspect Psychol Sci* 2:281-296.
- Papadopoulou A, Siamatras T, Delgado-Morales R, Amin ND, Shukla V, Zheng YL, Pant HC, Almeida OF, Kino T (2015) Acute and chronic stress differentially regulate cyclin-dependent kinase 5 in mouse brain: implications to glucocorticoid actions and major depression. *Transl Psychiatry* 5:e578.
- Pardon MC, Rattray I (2008) What do we know about the long-term consequences of stress on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders? *Neurosci Biobehav Rev* 32:1103-1120.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31:464-468.
- Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198.
- Patel YC, Reichlin S (1978) Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology* 102:523-530.
- Perona MT, Waters S, Hall FS, Sora I, Lesch KP, Murphy DL, Caron M, Uhl GR (2008) Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. *Behav Pharmacol* 19:566-574.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177:245-255.
- Petty F, Schlessler MA (1981) Plasma GABA in affective illness. A preliminary investigation. *J Affect Disord* 3:339-343.
- Petty F, Sherman AD (1984) Plasma GABA levels in psychiatric illness. *J Affect Disord* 6:131-138.
- Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR (2005) 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 8:828-834.
- Pine DS, Cohen E, Cohen P, Brook J (1999) Adolescent depressive symptoms as predictors of adult depression: moodiness or mood disorder? *Am J Psychiatry* 156:133-135.

- Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav* 43:47-55.
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109.
- Poleshuck EL, Talbot NL, Su H, Tu X, Chaudron L, Gamble S, Giles DE (2009) Pain as a predictor of depression treatment outcomes in women with childhood sexual abuse. *Compr Psychiatry* 50:215-220.
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2012) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13:22-37.
- Porsolt RD (1979) Animal model of depression. *Biomedicine* 30:139-140.
- Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C (2004) Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 155:135-146.
- Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A (1980) N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109:55-58.
- Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, Seifritz E, Tegethoff M, Meinschmidt G (2011) Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacol Ther* 132:242-267.
- Putnam FW (2003) Ten-year research update review: child sexual abuse. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 42:269-278.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD (2001) Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 49:741-752.
- Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ (2007) GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology* 32:471-482.
- Ramana R, Paykel ES, Cooper Z, Hayhurst H, Saxty M, Surtees PG (1995) Remission and relapse in major depression: a two-year prospective follow-up study. *Psychol Med* 25:1161-1170.
- Redgate ES, Fahringer EE (1973) A comparison of the pituitary adrenal activity elicited by electrical stimulation of preoptic, amygdaloid and hypothalamic sites in the rat brain. *Neuroendocrinology* 12:334-343.
- Reneric JP, Bouvard M, Stinus L (2001) Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 24:379-390.
- Repovs G, Baddeley A (2006) The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience* 139:5-21.
- Reubi JC, Maurer R (1985) Autoradiographic mapping of somatostatin receptors in the rat central nervous system and pituitary. *Neuroscience* 15:1183-1193.
- Rich EL, Romero LM (2005) Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1628-1636.
- Robertson DA, Beattie JE, Reid IC, Balfour DJ (2005) Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: the role of serotonin and stress. *Eur J Neurosci* 21:1511-1520.
- Rohrer SP et al. (1998) Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 282:737-740.
- Rolls ET (2000) *Precis of The brain and emotion*. *Behav Brain Sci* 23:177-191; discussion 192-233.

- Rome HP, Braceland FJ (1952) The psychological response to ACTH, cortisone, hydrocortisone, and related steroid substances. *Am J Psychiatry* 108:641-651.
- Roni MA, Rahman S (2015) The effects of lobeline on depression-like behavior and hippocampal cell proliferation following chronic stress in mice. *Neurosci Lett* 584:7-11.
- Roosendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (1997) Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage. *Ann N Y Acad Sci* 821:247-258.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423-433.
- Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS (2014) Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 53:23-34.
- Rosler AS, Joubert C, Chapouthier G (2000) Chronic mild stress alleviates anxious behaviour in female mice in two situations. *Behav Processes* 49:163-165.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71:45-61.
- Rusch BD, Abercrombie HC, Oakes TR, Schaefer SM, Davidson RJ (2001) Hippocampal morphometry in depressed patients and control subjects: relations to anxiety symptoms. *Biol Psychiatry* 50:960-964.
- Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U (2005) Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162:127-134.
- Rypma B, Prabhakaran V, Desmond JE, Gabrieli JD (2001) Age differences in prefrontal cortical activity in working memory. *Psychol Aging* 16:371-384.
- Sacher J, Rekkas PV, Wilson AA, Houle S, Romano L, Hamidi J, Rusjan P, Fan I, Stewart DE, Meyer JH (2015) Relationship of monoamine oxidase-A distribution volume to postpartum depression and postpartum crying. *Neuropsychopharmacology* 40:429-435.
- Sahay A, Hen R (2008) Hippocampal neurogenesis and depression. *Novartis Found Symp* 289:152-160; discussion 160-154, 193-155.
- Saleem KS, Kondo H, Price JL (2008) Complementary circuits connecting the orbital and medial prefrontal networks with the temporal, insular, and opercular cortex in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 506:659-693.
- Salthouse TA (1990) Working memory as a processing resource in cognitive aging. *Developmental Review* 10:101-124.
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62:63-77.
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 61:705-713.
- Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Petroff OA, Berman RM, Charney DS, Krystal JH (1999) Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 56:1043-1047.
- Sandi C (2013) Stress and cognition. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 4:245-261.
- Sandi C, Loscertales M, Guaza C (1997) Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 9:637-642.

- Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Niehoff ML, Morley JE, Crider AM, Witt KA (2011) Chronic peripheral administration of somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 enhances learning and memory in SAMP8 mice. *Eur J Pharmacol* 654:53-59.
- 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.
- Sapolsky RM (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34:721-732.
- Sapolsky RM (2000a) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:925-935.
- Sapolsky RM (2000b) The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry* 48:755-765.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1985) Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci* 5:1222-1227.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.
- Sapolsky RM, Alberts SC, Altmann J (1997) Hypercortisolism associated with social subordination or social isolation among wild baboons. *Arch Gen Psychiatry* 54:1137-1143.
- Schachter S, Singer JE (1962) Cognition, Social and Physiological Determinants of Emotional State. *Psychological Review* 69:379-399.
- Schwabe L (2013) Stress and the engagement of multiple memory systems: integration of animal and human studies. *Hippocampus* 23:1035-1043.
- Schwabe L, Wolf OT (2010) Stress impairs the reconsolidation of autobiographical memories. *Neurobiol Learn Mem* 94:153-157.
- Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS (2010a) Memory formation under stress: quantity and quality. *Neurosci Biobehav Rev* 34:584-591.
- Schwabe L, Bohringer A, Chatterjee M, Schachinger H (2008) Effects of pre-learning stress on memory for neutral, positive and negative words: Different roles of cortisol and autonomic arousal. *Neurobiol Learn Mem* 90:44-53.
- Schwabe L, Schachinger H, de Kloet ER, Oitzl MS (2010b) Stress impairs spatial but not early stimulus-response learning. *Behav Brain Res* 213:50-55.
- Seligman ME, Maier SF, Geer JH (1968) Alleviation of learned helplessness in the dog. *J Abnorm Psychol* 73:256-262.
- Selye H (1973) The evolution of the stress concept. *Am Sci* 61:692-699.
- Seney ML, Walsh C, Stolakis R, Sibille E (2012) Neonatal testosterone partially organizes sex differences in stress-induced emotionality in mice. *Neurobiol Dis* 46:486-496.
- Sequeira A, Mamdani F, Ernst C, Vawter MP, Bunney WE, Lebel V, Rehal S, Klempan T, Gratton A, Benkelfat C, Rouleau GA, Mechawar N, Turecki G (2009) Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS One* 4:e6585.
- Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM (1998) Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry* 172:527-532.
- Shanks N, Griffiths J, Zalzman S, Zacharko RM, Anisman H (1990) Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 36:515-519.
- Sheline YI (1996) Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry* 1:298-299.

- Sheline YI (2000) 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biol Psychiatry* 48:791-800.
- Sheline YI (2003) Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 54:338-352.
- Sheline YI, Gado MH, Price JL (1998) Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *Neuroreport* 9:2023-2028.
- Shimada M, Date Y, Mondal MS, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu H, Matsuo H, Nakazato M (2003) Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 302:520-525.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22:3251-3261.
- Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA (2011) GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:721-734.
- Siehler S, Nunn C, Hannon J, Feuerbach D, Hoyer D (2008) Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:26-34.
- Sinha R (2008) Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141:105-130.
- Smialowska M, Szewczyk B, Wozniak M, Wawrzak-Wlecial A, Domin H (2013) Glial degeneration as a model of depression. *Pharmacol Rep* 65:1572-1579.
- Smoller JW, Kendler K, Craddock N (2013) Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *The Lancet* 381:1371-1379.
- Soares JC (2003) Contributions from brain imaging to the elucidation of pathophysiology of bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 6:171-180.
- Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K (2006) Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* 83:186-193.
- Sosulina L, Meis S, Seifert G, Steinhäuser C, Pape HC (2006) Classification of projection neurons and interneurons in the rat lateral amygdala based upon cluster analysis. *Mol Cell Neurosci* 33:57-67.
- Soumier A, Sibille E (2014) Opposing effects of acute versus chronic blockade of frontal cortex somatostatin-positive inhibitory neurons on behavioral emotionality in mice. *Neuropsychopharmacology* 39:2252-2262.
- Sousa VC, Vital J, Costenla AR, Batalha VL, Sebastiao AM, Ribeiro JA, Lopes LV (2014) Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiol Aging* 35:1680-1685.
- Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH (1992) Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* 72:825-852.
- Squire LR (1987) The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* 21-22:218-222.
- Squire LR (1992) Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *J Cogn Neurosci* 4:232-243.
- Srikant CB (1995) Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209:400-406.

- Starr LR, Hammen C (2015) Genetic moderation of the association between adolescent romantic involvement and depression: Contributions of serotonin transporter gene polymorphism, chronic stress, and family discord. *Dev Psychopathol*:1-11.
- Steffens DC, McQuoid DR, Payne ME, Potter GG (2011) Change in hippocampal volume on magnetic resonance imaging and cognitive decline among older depressed and nondepressed subjects in the neurocognitive outcomes of depression in the elderly study. *Am J Geriatr Psychiatry* 19:4-12.
- Steinberg EE, Christoffel DJ, Deisseroth K, Malenka RC (2015) Illuminating circuitry relevant to psychiatric disorders with optogenetics. *Curr Opin Neurobiol* 30:9-16.
- Steinert C, Hofmann M, Kruse J, Leichsenring F (2014) The prospective long-term course of adult depression in general practice and the community. A systematic literature review. *J Affect Disord* 152-154:65-75.
- Stengel A, Rivier J, Tache Y (2013) Modulation of the adaptive response to stress by brain activation of selective somatostatin receptor subtypes. *Peptides* 42:70-77.
- Stengel A, Karasawa H, Tache Y (2015) The role of brain somatostatin receptor 2 in the regulation of feeding and drinking behavior. *Horm Behav* 73:15-22.
- Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, Müller MB, Schmidt MV (2008) Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. *Horm Behav* 53:386-394.
- Sternberg WF, Ridgway CG (2003) Effects of gestational stress and neonatal handling on pain, analgesia, and stress behavior of adult mice. *Physiol Behav* 78:375-383.
- Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters BW, Roubos EW, Kozicz T (2011) Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One* 6:e28128.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85:367-370.
- Stokes PE (1995) The potential role of excessive cortisol induced by HPA hyperfunction in the pathogenesis of depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 5 Suppl:77-82.
- Strekalova T, Steinbusch HW (2010) Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:348-361.
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P (2004) Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29:2007-2017.
- Stromgren LS (1977) The influence of depression on memory. *Acta Psychiatr Scand* 56:109-128.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157:1552-1562.
- Suri D, Vaidya VA (2015) The adaptive and maladaptive continuum of stress responses - a hippocampal perspective. *Rev Neurosci* 26:415-442.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4:141-194.
- Taliaz D, Loya A, Gersner R, Haramati S, Chen A, Zangen A (2011) Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 31:4475-4483.
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ (2011) A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71:995-1013.

- Tanti A, Belzung C (2013) Hippocampal neurogenesis: a biomarker for depression or antidepressant effects? Methodological considerations and perspectives for future research. *Cell Tissue Res* 354:203-219.
- Tasker JG, Herman JP (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 14:398-406.
- Tentler JJ, Hadcock JR, Gutierrez-Hartmann A (1997) Somatostatin acts by inhibiting the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A pathway, cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation, and CREB transcription potency. *Mol Endocrinol* 11:859-866.
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19:162-166.
- Toates F (2002) Application of a multilevel model of behavioural control to understanding emotion. *Behav Processes* 60:99-114.
- Toffanin T, Nifosi F, Follador H, Passamani A, Zonta F, Ferri G, Scanarini M, Amista P, Pigato G, Scaroni C, Mantero F, Carollo C, Perini GI (2011) Volumetric MRI analysis of hippocampal subregions in Cushing's disease: a model for glucocorticoid neural modulation. *Eur Psychiatry* 26:64-67.
- Tomar A, Polygalov D, Chattarji S, McHugh TJ (2014) The dynamic impact of repeated stress on the hippocampal spatial map. *Hippocampus*.
- Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N (2005) Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 21:1587-1600.
- Torregrossa MM, Jutkiewicz EM, Mosberg HI, Balboni G, Watson SJ, Woods JH (2006) Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. *Brain Res* 1069:172-181.
- Torres SJ, Nowson CA (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23:887-894.
- Toth E, Avital A, Leshem M, Richter-Levin G, Braun K (2008a) Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behav Brain Res* 190:135-139.
- Toth E, Gersner R, Wilf-Yarkoni A, Raizel H, Dar DE, Richter-Levin G, Levit O, Zangen A (2008b) Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. *J Neurochem* 107:522-532.
- Toth M (2003) 5-HT1A receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur J Pharmacol* 463:177-184.
- Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E (2011) Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis* 42:116-124.
- Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E (2012) Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 169:1194-1202.
- Tronche C, Lestage P, Louis C, Carrie I, Beracochea D (2010a) Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behav Brain Res* 215:255-260.
- Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010b) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93:343-351.

- Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ (2004) Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 24:5603-5610.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9:519-525.
- Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- Tuboly G, Vecsei L (2013) Somatostatin and cognitive function in neurodegenerative disorders. *Mini Rev Med Chem* 13:34-46.
- Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L (2015) Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*:1-19.
- Van Bokhoven P, Oomen CA, Hoogendijk WJ, Smit AB, Lucassen PJ, Spijker S (2011) Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 33:1833-1840.
- van der Doelen RH, Calabrese F, Guidotti G, Geenen B, Riva MA, Kozicz T, Homborg JR (2014) Early life stress and serotonin transporter gene variation interact to affect the transcription of the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors, and the co-chaperone FKBP5, in the adult rat brain. *Front Behav Neurosci* 8:355.
- Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M, Bodard S, Kousignian I, Belzung C, Chalon S (2008) n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *J Lipid Res* 49:340-348.
- Vandesquille M, Baudonnat M, Decorte L, Louis C, Lestage P, Beracochea D (2013) Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal alpha4beta2\*-nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol Aging* 34:1599-1609.
- Vanetti M, Vogt G, Holtt V (1993) The two isoforms of the mouse somatostatin receptor (mSSTR2A and mSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylate cyclase and in agonist-induced receptor desensitization. *FEBS Lett* 331:260-266.
- Vialou V, Feng J, Robison AJ, Nestler EJ (2013) Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:59-87.
- Vialou V, Bagot RC, Cahill ME, Ferguson D, Robison AJ, Dietz DM, Fallon B, Mazei-Robison M, Ku SM, Harrigan E, Winstanley CA, Joshi T, Feng J, Berton O, Nestler EJ (2014) Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystinin: role of DeltaFosB. *J Neurosci* 34:3878-3887.
- Videau C, Hochgeschwender U, Kreienkamp HJ, Brennan MB, Viollet C, Richter D, Epelbaum J (2003) Characterisation of [125I]-Tyr0DTrp8-somatostatin binding in sst1- to sst4- and SRIF-gene-invalidated mouse brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367:562-571.
- Viltart O, Mairesse J, Darnaudery M, Louvart H, Vanbesien-Mailliot C, Catalani A, Maccari S (2006) Prenatal stress alters Fos protein expression in hippocampus and locus coeruleus stress-related brain structures. *Psychoneuroendocrinology* 31:769-780.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008) Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. *Mol Cell Endocrinol* 286:75-87.
- Viollet C, Vaillend C, Videau C, Bluet-Pajot MT, Ungerer A, L'Heritier A, Kopp C, Potier B, Billard J, Schaeffer J, Smith RG, Rohrer SP, Wilkinson H, Zheng H, Epelbaum J (2000) Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci* 12:3761-3770.

- Vogel WH, Jensh R (1988) Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci Lett* 87:183-188.
- Vollmayr B, Gass P (2013) Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. *Cell Tissue Res* 354:171-178.
- Volmar CH, Wahlestedt C (2015) Histone deacetylases (HDACs) and brain function. *Neuroepigenetics* 1:20-27.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2:999-1017.
- Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1073-1086.
- Weiss JM (1970) Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosom Med* 32:397-408.
- WHO-Report-EB130/9 (2011) Global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social sectors at the country level. In.
- Wiborg O (2013) Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell Tissue Res* 354:155-169.
- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83:1-16.
- Willner P (1995) Animal models of depression: validity and applications. *Adv Biochem Psychopharmacol* 49:19-41.
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110.
- Willner P, Muscat R, Papp M (1992a) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16:525-534.
- Willner P, Muscat R, Papp M (1992b) An animal model of anhedonia. *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A:550A-551A.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93:358-364.
- Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1998) Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139:443-450.
- Wolkowitz OM, Epel ES, Reus VI, Mellon SH (2010) Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depress Anxiety* 27:327-338.
- Wu Y, Patchev AV, Daniel G, Almeida OF, Spengler D (2014) Early-life stress reduces DNA methylation of the *Pomc* gene in male mice. *Endocrinology* 155:1751-1762.
- Yalcin I, Belzung C, Surget A (2008) Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res* 193:140-143.
- Yang LH, Guo LQ, Pasternak A, Mosley R, Rohrer SP, Birzin ET, al. E (1998) Spiro 1H-indene-1,4'-piperidine derivatives as potent and selective non-peptide human somatostatin receptor subtype 2 (sst(2)) agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*:2175-2179.
- Yau JL, Seckl JR (2012) Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front Aging Neurosci* 4:24.
- Yeung M, Treit D (2012) The anxiolytic effects of somatostatin following intra-septal and intra-amygdalar microinfusions are reversed by the selective sst2 antagonist PRL2903. *Pharmacol Biochem Behav* 101:88-92.

- Yeung M, Engin E, Treit D (2011) Anxiolytic-like effects of somatostatin isoforms SST 14 and SST 28 in two animal models (*Rattus norvegicus*) after intra-amygdalar and intra-septal microinfusions. *Psychopharmacology (Berl)* 216:557-567.
- Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22:513-523.
- Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K (2010) Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem* 114:1840-1851.
- Zeyda T, Hochgeschwender U (2008) Null mutant mouse models of somatostatin and cortistatin, and their receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:18-25.
- Zeyda T, Diehl N, Paylor R, Brennan MB, Hochgeschwender U (2001) Impairment in motor learning of somatostatin null mutant mice. *Brain Res* 906:107-114.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KR, Caron MG (2005) Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45:11-16.
- Zheng H, Bailey A, Jiang MH, Honda K, Chen HY, Trumbauer ME, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, Leng G, Smith RG (1997) Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol Endocrinol* 11:1709-1717.
- Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407-417.
- Zisook S, Rush AJ, Lesser I, Wisniewski SR, Trivedi M, Husain MM, Balasubramani GK, Alpert JE, Fava M (2007) Preadult onset vs. adult onset of major depressive disorder: a replication study. *Acta Psychiatr Scand* 115:196-205.