



**réponse, non-réponse et résistance aux traitements
antidépresseurs monoaminergiques. Etude des
marqueurs neurogéniques et moléculaires dans un
modèle animal d'anxiété-dépression**

Maryam Mekiri

► **To cite this version:**

Maryam Mekiri. réponse, non-réponse et résistance aux traitements antidépresseurs monoaminergiques. Etude des marqueurs neurogéniques et moléculaires dans un modèle animal d'anxiété-dépression. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS051 . tel-01687526

HAL Id: tel-01687526

<https://theses.hal.science/tel-01687526>

Submitted on 18 Jan 2018

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.

NNT : 2017SACLS051

**Thèse de Doctorat
de l'Université Paris-Saclay
préparée à
l'Université PARIS SUD**

ÉCOLE DOCTORALE N°569

INNOVATION THERAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUE

Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques

Par

Mme Maryam Mekiri

**Réponse, non-réponse et résistance aux traitements
antidépresseurs. Aspects comportementaux et neurogéniques
dans un modele animal d'anxiété/dépression.**

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 24 Février 2017

Composition du Jury :

Président du jury : Pr Sylvie Granon, Institut des Neurosciences, UMR CNRS 9197, Université Paris Saclay, Examinatrice.

Pr Etienne Sibille, Campbell Family Chair in Clinical Neuroscience, Université de Toronto, Canada, Rapporteur.

Dr Nicolas Ramoz, Centre de Psychiatrie et de Neurosciences, INSERM UMR 894, Paris, France, Rapporteur.

Dr Alexandre Surget, INSERM U930 Imagerie et Cerveau, Université François Rabelais, Tours, France, Examineur

Dr Jean-Philippe Guilloux, Université Paris Saclay, UMRS 1178, Directeur de thèse.

Pr Alain Gardier, Université Paris Saclay, UMRS 1178, Co-directeur de thèse.

Remerciements

Aux membres du jury,

Je remercie le Professeur **Etienne Sibille**, Directeur de Recherche au Center for Addiction and Mental Health à l'université de Toronto (Ontario, Canada), et monsieur le Docteur **Nicolas Ramoz**, Chercheur au Centre de Psychiatrie et de Neurosciences, unité U894 de l'Inserm (Paris, France) qui ont accepté d'évaluer et de juger ce manuscrit en qualité de rapporteur et experts des études en psychiatrie et neuroscience réalisées chez l'Humain ou chez le Rongeur.

Je remercie également, Madame la Professeure **Sylvie Granon**, Chercheur au département cognition et comportement de l'Institut des Neurosciences Paris Saclay (Orsay, France) et le Docteur **Alexandre Surget**, enseignant chercheur à l'unité U930 à l'université de Tours (France) qui me font l'honneur de juger mon travail de doctorante en tant que spécialistes ès neurosciences et neuropsychopharmacologie.

A mes collègues de l'UMRS1178,

Monsieur le Professeur Alain Gardier,

Je vous remercie pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire depuis le Master 2, et m'avoir permis de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche dans les meilleures conditions. Je vous remercie également pour m'avoir toujours encouragé dans les moments où les résultats n'allaient pas forcément dans le sens espéré. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour vos encouragements, vos conseils avisés et votre soutien. J'ai apprécié travailler dans votre laboratoire et je m'y suis sentie comme chez moi pendant ces 4 années.

Monsieur le Docteur Jean-Philippe Guilloux,

Je te remercie pour avoir supervisé ce travail de thèse pendant ces 4 années et pour m'avoir permis de mener à bien ce projet. J'ai énormément appris en travaillant à tes côtés : des connaissances scientifiques pratiques et théoriques mais également informatiques (il y a 4 ans je savais à peine utiliser Excel et aujourd'hui je me débrouille même avec Illustrator donc ce n'est pas rien !). J'ai aussi trouvé en toi un directeur de thèse accessible et compréhensif, toujours disponible lorsque j'avais besoin d'aide pour une manip ou que je venais te solliciter à ton bureau pour la moindre petite question. Toutes nos discussions enrichissantes, nos échanges et nos débats auront permis de faire de notre collaboration et de ma thèse une expérience humaine et professionnelle riche et passionnante.

Monsieur le Professeur Denis David,

Je te remercie pour ton aide technique sur plusieurs aspects de mon projet, notamment pour m'avoir familiarisé avec l'immunohistochimie et le microscope. Mais je te remercie également pour tes conseils avisés et bienveillants, aussi bien sur les questions concernant mon projet de thèse que sur mon projet professionnel. Tous nos échanges m'ont beaucoup apporté et je t'en suis très reconnaissante.

Monsieur le Docteur Laurent Tritschler,

Je te remercie pour tes conseils avisés notamment pour mes Western Blot, mais également pour tout ce qui a attiré au monde de la recherche, ton expérience et ton enthousiasme m'ont beaucoup apporté. Tu as beaucoup contribué à la vie et à la bonne humeur du laboratoire, notamment avec tes petites histoires rocambolesques que je suis toujours la seule à croire! ☺

Indira,

Je pense que pour le restant de ma vie, quand j'entendrai « western blot », je penserai à nous 2 dans la petite salle de révélation, *waiting desperately for the bands to appear on the screen* ! Je te remercie pour ton aide dans ces manips qui n'auront pas été de tout repos, et pour t'être acharnée avec moi à les faire fonctionner. Ton expérience et tes conseils m'auront énormément appris tout au long de ma thèse, et ton esprit scientifique et ton investissement auront été une source d'inspiration pour moi.

A mes super collègues Céline, Charlène, Ha et Julie

Je vous remercie pour avoir toujours été une source de bonne humeur, pour votre disponibilité et votre gentillesse. Vous avez toujours été présentes pour me soutenir et m'encourager dans le déroulement de ma thèse, surtout dans la période très stressante de la fin. Ce fut un réel plaisir de partager un petit bout de chemin de cette aventure avec vous. Je vous souhaite beaucoup de réussite car vous le méritez toutes.

Françoise et Louise,

Je vous remercie pour votre gentillesse, votre aide et votre disponibilité.

Et tous ceux qui sont déjà partis mais qui m'ont tous aidé d'une manière ou d'une autre dans le déroulement de ma thèse (Gaël, Yannick, Lin, Julianne, Dalila, Aurélie) notamment :

Flavie,

Pour avoir été ma super voisine de bureau pendant 2 années. Je te remercie pour ton soutien dans les moments difficiles, et aussi pour tous nos bons moments de rire et de partages musicaux inoubliables (ce fut une chance inespérée d'avoir une voisine aussi fan de Disney que moi ☺). Je te souhaite un avenir personnel et professionnel radieux.

Daniela,

J'envie ceux qui auront la chance de t'avoir pour collègue, car tu es vraiment ce qu'on peut espérer de mieux : disponible, à l'écoute, souriante et toujours prête à rendre service (je te suis éternellement reconnaissante pour ton aide avec les PBMCs !). Je garde un excellent souvenir de nos séances de travail nocturnes qui auront marqué ma thèse (l'arme ultime pour arriver à allier travail et bonne bouffe ! ☺). Tu as été et tu es toujours une source de réconfort pour moi et je t'en remercie sincèrement. Je te souhaite beaucoup de succès dans tout ce que tu entreprendras.

Au personnel de la plateforme Animalerie, particulièrement **Valérie Dupont-Domergue**, **Ayma Galland** et **Pauline Robert** pour leur aide, leur gentillesse et leur professionnalisme qui auront permis à mes études de comportement de se passer dans les meilleures conditions.

Au personnel de la plateforme Trans-Prot, particulièrement **Claudine Delomenie** et **Céline Boursier** pour leur formation et leurs conseils.

A ma famille,

Mes parents,

Sans aucun doute, vous êtes ceux qui méritez le plus mes remerciements. Vous m'avez toujours supporté dans mes choix, et apporté votre soutien moral et financier dans mes études. Vous m'avez encouragé à ne mettre aucune barrière entre mes rêves et moi, et à ne laisser aucune difficulté avoir raison de ma détermination. Votre éducation a fait de moi quelqu'un avec des principes et des valeurs dont je suis fière. Ce travail n'aura pas été de tout repos, vous le savez mieux que quiconque, et je vous remercie de m'avoir aidé à la mener à bien jusqu'au bout car vous êtes mon moteur et ma force. Je ne vous serai jamais assez reconnaissante pour tout ce que vous m'avez donné et permis d'accomplir et je vous dédie ce travail. Fièvre d'être Docteur Mekiri, 2^{ème} du nom ☺

Mes sœurs, je vous remercie de m'avoir supporté pendant cette thèse et notamment cette dernière ligne droite, car je dois le reconnaître je n'ai pas été un cadeau ! Vous avoir familiarisé avec les concepts d'*emotionality score* et de neurogenèse aura été ma petite victoire personnelle en plus de ce diplôme ☺. Je vous souhaite à toutes beaucoup de succès dans vos études. *I love you to the moon and back !*

Hadjer, merci d'avoir été pour moi une sœur et une amie, et donc le meilleur soutien qu'on puisse espérer durant ces années. Et merci de m'avoir écouté répéter inlassablement mes présentations. Quelque chose me dit que tu vas connaître par cœur ma soutenance avant même le jour J ☺

Sarah, « *Il suffirait simplement...* ». Je n'ai que ces 3 mots à dire pour nous replonger directement dans ce que furent ces dernières années. Merci pour m'avoir supporté sur ton tapis de Buckingham Palace et pour avoir partagé ces doux moments de panade avec moi.

Isra, mon petit rayon de soleil. Tu es quelqu'un de tellement talentueux, créatif, intelligent et sensible et toutes ces qualités feront de toi une adulte qui n'apportera que du bien autour de toi, et surtout quelqu'un qui pourra réaliser tous ses rêves. Le chemin des études est encore long et sinueux, mais tu as en toi toutes les capacités pour réussir. Pas de secrets : on bosse et on y croit !

A mes amis,

Que seraient des remerciements si je ne vous remerciais pas... Chacun à votre manière, vous m'avez aidé à mener à bien cette thèse. Votre soutien a pu vous sembler anodin, mais il a tout changé pour moi, et je ne vous en serais jamais assez reconnaissante. J'ai une chance énorme de vous avoir. Une petite mention spéciale pour :

Eya, on en aura vécu des choses ces 3 dernières années ! Des événements heureux, d'autres douloureux. Mais toujours là l'une pour l'autre. Je ne te remercierai jamais assez pour faire partie de ma vie après toutes ces années, pour tes conseils, ton écoute, ta disponibilité, tes encouragements, pour croire en moi quoiqu'il arrive. Ces quelques mots ne sauront exprimer toute ma gratitude, merci pour tout.

Salma, Douce et Sage Salma... Tu as toujours le mot qu'il faut pour réconforter ou redonner un coup de boost quand c'est nécessaire. Je te remercie pour l'intérêt que tu as porté à mon travail, pour avoir fait de chez toi mon petit refuge dans les moments de stress et aussi pour avoir corrigé mes fautes d'orthographe dans cet ouvrage. Tu es irremplaçable.

Hanane, Nous aurons toutes les 2 fait le choix des très longues études, donc tu es la mieux placée pour en comprendre le défi et la difficulté. Merci d'avoir été un soutien infaillible et indispensable.

Fatima, je te remercie pour t'être toujours préoccupée de mon avancement, pour ton soutien indispensable et tes encouragements.

Emna, tu étais là quand j'ai commencé cette thèse, et il était écrit que tu n'assisterais pas à sa fin. Ton départ aura été un tournant dans ma vie car sans le vouloir tu m'as insufflé un courage et une patience dont je ne me serai jamais cru capable. Ton combat face à la maladie est une source d'inspiration au quotidien pour moi. Bien que j'aurais sincèrement souhaité que tu sois là pour partager cette réussite et cette fierté avec toi, te remercier pour tes encouragements et pour ton soutien inconditionnel, la pensée de savoir combien tu aurais été fière m'emplit de joie. Je te dédie cette thèse ma chère et douce Emna.

A mes amis d'El Médina, pour votre soutien infaillible et vos encouragements.

Et à **Celui** qui m'a soutenu dès le début et qui me soutiendra jusqu'au bout. لا يشكر الله من لا يشكر الناس

Publications Scientifiques

Articles de recherche en lien avec le document de thèse

Mekiri M, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP. Chronic corticosterone administration effects on emotionality in female C57BL6 mice. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* (2017)

Mekiri M, Xia L, Mendez-David I, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP. Treatment-resistant anxiety-depressive like disorder in mice is associated with altered neurogenesis and differential peripheral expression of β -arrestin 1 in mice (*en préparation*).

Autres articles de recherche

Guilloux JP, Samuels BA, Mendez-David I, Hu A, Levinstein M, Faye C, **Mekiri M**, Mocaer E, Gardier AM, Hen R, Sors A, David DJ. S 38093, a histamine H₃ antagonist/inverse agonist, promotes hippocampal neurogenesis and improves context discrimination task in aged mice. *Scientific Reports* 2017

Guilloux JP, Felice D, Pehrson A, Li Y, Mendez-David I, Doan J, **Mekiri M**, Gardier AM, Sanchez C, David DJ. Aging and corticosterone differently affect gene expression in the dentate gyrus. *Genes Brain & Behavior* (Manuscript en révision G2B-00174-2016)

Communications affichées

Mekiri M, Xia L, Faye C, Mendez-David I, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP. Lack of response to fluoxetine in a neuroendocrine model of depression with altered neurogenesis. *Journées de l'Ecole Doctorale, Chatenay-Malabry, 2014*.

Mekiri M, Xia L, Faye C, Mendez-David I, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP. Non-response and resistance to chronic antidepressant treatment: a behavioral and neurogenic study in a neuroendocrine-based model of depression. *European College of Neuropsychopharmacology, Nice, 2015*.

Mekiri M, Xia L, Faye C, Mendez-David I, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP. Non-response and resistance to chronic antidepressant treatment: a behavioral and neurogenic study in a neuroendocrine-based model of depression. ULLA Summer School. *Châtenay-Malabry, 2015*.

Mekiri M, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP. Resistance to a chronic antidepressant treatment: a behavioral and neurogenic study in a neuroendocrine model of depression. *Society for Neurosciences. Chicago 2015*.

Communications orales

Study of non-response to an antidepressant treatment in a neuro-endocrine based model of depression. *Journées de l'Ecole Doctorale, Chatenay-Malabry, 2016*

1	INTRODUCTION.....	15
1.1	LES EPISODES DEPRESSIFS CARACTERISES	15
1.1.1	GENERALITES	15
1.1.2	ASPECTS MECANISTIQUES DE LA DEPRESSION	16
1.1.3	LES TRAITEMENTS ANTIDEPRESSEURS	19
1.1.4	LA NON-REPONSE/RESISTANCE AUX ANTIDEPRESSEURS EN CLINIQUE.....	22
1.1.5	DIMORPHISME SEXUEL DE LA DEPRESSION CHEZ L'HOMME	23
1.1.6	LE ROLE DE L'HIPPOCAMPE DANS LES TROUBLES ANXIO-DEPRESSIFS	26
1.2	LA DEPRESSION RESISTANTE AU TRAITEMENT : TRD	27
1.2.1	ASPECTS CLINIQUES DE LA TRD	27
1.2.2	LA TRD EN PRECLINIQUE.....	40
1.3	LES BIOMARQUEURS DANS LA DEPRESSION ET LA REPONSE ANTIDEPRESSIVE	49
1.3.1	SOURCES DE PRELEVEMENTS D'ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE DE BIOMARQUEURS	51
1.3.2	STRATEGIES DE DECOUVERTE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE DEPRESSION	52
1.3.3	BIOMARQUEURS DE LA DEPRESSION ET DE LA REPONSE AU TRAITEMENT	54
1.3.4	BIOMARQUEURS DE LA TRD	56
1.4	LA PROTEINE B-ARRESTINE 1, UN BIOMARQUEUR PERIPHERIQUE ET CENTRAL DE LA DEPRESSION ET DE LA REPONSE ANTIDEPRESSIVE ?.....	62
1.4.1	GENERALITES SUR LES PROTEINES B-ARRESTINES.....	62
1.4.2	REPARTITION CEREbraLE DE LA B-ARRESTINE 1	63
1.4.3	STRUCTURE ET MECANISMES D'ACTION DE LA PROTEINE B-ARRESTINE 1`	63
1.4.4	IMPLICATION DE LA PROTEINE B-ARRESTINE 1 DANS LES TROUBLES DE L'HUMEUR.....	65
2	MATERIEL ET METHODES	70
2.1	ANIMAUX	70
2.1.1	CHOIX DU MODELE ANIMAL D'ANXIETE/DEPRESSION.....	70
2.1.2	MODELE D'ADMINISTRATION CHRONIQUE A LA CORTICOSTERONE	73
2.2	ETUDES DES PERFORMANCES LIEES A L'EMOTION	75
2.2.1	TESTS PREDICTIFS D'UN PHENOTYPE OU D'UNE ACTIVITE DE TYPE ANXIOLYTIQUE	75
2.2.2	TEST PREDICTIF D'UN PHENOTYPE OU D'UNE ACTIVITE ANXIOLYTIQUE ET ANTIDEPRESSIVE : LE TEST D'ALIMENTATION SUPPRIMEE PAR LA NOUVEAUTE OU « NOVELTY SUPPRESSED FEEDING ».....	77
2.2.3	TESTS PREDICTIFS D'UN PHENOTYPE OU D'UNE ACTIVITE DE TYPE ANTIDEPRESSIVE.....	78
2.2.4	« L'EMOTIONALITY SCORE », UN OUTIL D'ANALYSE DES RESULTATS DES TESTS COMPORTEMENTAUX.	79
2.2.5	VERIFICATION DES ETAPES DU CYCLE MENSTRUEL CHEZ LA FEMELLE	80
2.3	MANIPULATIONS <i>EX VIVO</i>	81
2.3.1	ADMINISTRATION DES TRAITEMENTS.....	81
2.3.2	MESURE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN BLOT	82
2.4	ETUDE DE LA NEUROGENESE HIPPOCAMPIQUE ADULTE	84
2.4.1	PREPARATION DES TISSUS	84
2.4.2	ETUDE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES PROGENITRICES	86
2.4.3	ETUDE DE LA SURVIE DES CELLULES PROGENITRICES.....	86
2.4.4	ETUDE DE LA MATURATION NEURONALE	87
2.4.5	TRIPLE MARQUAGE BrdU+/DCX+/NEUN+	89

3	<u>PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THESE</u>	<u>91</u>
4	<u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	<u>96</u>
4.1	ARTICLE 1: CHRONIC CORTICOSTERONE ADMINISTRATION EFFECTS ON EMOTIONALITY IN FEMALE C57BL6 MICE.....	97
4.2	ARTICLE 2: TREATMENT-RESISTANT ANXIO-DEPRESSIVE LIKE DISORDER IN MICE IS ASSOCIATED WITH ALTERED NEUROGENESIS AND DIFFERENTIAL PERIPHERAL EXPRESSION OF β -ARRESTIN 1 IN MICE.....	138
5	<u>REFERENCES:</u>	<u>168</u>
6	<u>DISCUSSION</u>	<u>174</u>
6.1	MODELISATION DE LA NON-REPOSE DANS LE MODELE CORT CHEZ LES FEMELLES	175
6.2	MODELISATION DE LA RESISTANCE DANS LE MODELE CORT CHEZ LES SOURIS MALES....	177
6.3	LA NON-REPOSE/RESISTANCE AUX ANTIDEPRESSEURS EST ASSOCIEE A DES ALTERATIONS DE LA NEUROGENESE HIPPOCAMPIQUE ADULTE	185
6.4	LA DIFFERENCE DE REPOSE AU TRAITEMENT ANTIDEPRESSEUR EST ASSOCIEE A DES VARIATIONS D'EXPRESSION PERIPHERIQUE DE LA PROTEINE β -ARRESTINE 1	189
7	<u>PERSPECTIVES</u>	<u>195</u>
8	<u>REFERENCES.....</u>	<u>202</u>
9	<u>ARTICLES ANNEXES SANS RELATION AVEC LE SUJET DE THESE.....</u>	<u>238</u>
9.1	ARTICLE ANNEXE N°1	238
9.2	ARTICLE ANNEXE N°2	238

Figure 1 : Circuit de la réponse au stress	17
Figure 2 : Nombre de cellules granulaires dans le gyrus dentelé de l'hippocampe.....	18
Figure 3 : Nombre total de prescription pour les 11 antidépresseurs les plus prescrits aux Etats-Unis.....	21
Figure 4 : Evolution de la symptomatologie de la maladie après administration d'un antidépresseur	23
Figure 5 : Processus de neurogenèse dans le gyrus dentelé de l'hippocampe adulte de Souris	27
Figure 6 : Un des algorithmes proposés pour le traitement de la dépression	32
Figure 7 : Schéma reliant les manifestations cliniques aux mécanismes biologiques sous-tendant la dépression majeure.	50
Figure 8 : Nombre de publications annuelles sur les biomarqueurs humains de la MDD (losanges) et sur les biomarqueurs humains de la TRD (ronds) (Smith 2013)	57
Figure 9 : Expression de la β -arrestine 1 dans le système nerveux central par une technique d'hybridation <i>in situ</i> (souris)	63
Figure 10 : Structure cristallographique de la protéine β -arrestine 1.....	64
Figure 11 : Mécanisme d'action de la protéine β -arrestine.....	65
Figure 12 : Expression de la β -arrestine 1 réduite dans les leucocytes de patients déprimés et corrélation entre les concentrations de β -arrestine 1 et la sévérité des symptômes dépressifs.	66
Figure 13: Expression de la protéine β -arrestine 1 dans les leucocytes de patients déprimés ou de souris anxio-déprimées non traité(e)s et après traitements antidépresseurs.....	67
Figure 14 : Répondeurs et non-répondeurs à un traitement antidépresseur dans le Novelty Suppressed Feeding	71
Figure 15 : Système de réponse au stress via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.	73
Figure 16: Test de Champ Ouvert chez la Souris.	76
Figure 17: Test du labyrinthe en croix surélevée.	77
Figure 18 : Test du Novelty Suppressed Feeding.	78
Figure 19 : Dégradation de l'état du pelage.	78
Figure 20 : Réalisation d'un frottis chez une souris femelle et étapes du cycle estrus chez la souris	81
Figure 21 : Différentes étapes pour l'isolement des PBMCs à partir du sang total chez la souris.....	83
Figure 22 : Photographies de coupes histologiques du gyrus dentelé de l'hippocampe adulte après marquage au BrdU à différents grossissements	87
Figure 23: Caractérisation des neurones immatures marqués à la doublecortine en fonction de leur morphologie dendritique.	88
Figure 24: Variation des résultats comportementaux chez les animaux contrôle au cours des différentes évaluations comportementales.....	182
Figure 25 : La réponse aux antidépresseurs peut être ciblée par des mécanismes dépendants ou indépendants de la neurogenèse.	187
Figure 26 : Voie reliant une administration chronique d'un antidépresseur à la réponse au traitement.	189
Figure 27 : Approche translationnelle pour la découverte de biosignatures prédictives de la réponse au traitement antidépresseur.	200

Tableau 1 : Dimorphisme sexuel des manifestations cliniques de la dépression	24
Tableau 2 : Différentes études comparant la réponse aux antidépresseurs en fonction du sexe	25
Tableau 3 : Méthode de classification de Thase et Rush pour définir la résistance au traitement antidépresseur (Thase and Rush 1997)	28
Tableau 4 : Différentes stratégies pour traiter la dépression résistante	39
Tableau 5 : Modèles animaux de non-réponse aux antidépresseurs	48
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des principales sources de prélèvement.....	52
Tableau 7 : Différentes stratégies pour identifier des nouveaux biomarqueurs de la dépression	54
Tableau 8 : Pistes de biomarqueurs de la TRD ayant fait l'objet d'investigations	61
Tableau 9 : Modèles chroniques d'anxiété/dépression chez le rongeur.....	72
Tableau 10 : Anticorps utilisés en Western Blot	84
Tableau 11: Récapitulatif des anticorps utilisés en immunohistochimie.....	88
Tableau 12 : Critères de validation dans notre modèle de TRD	179
Tableau 13 : Avantages et inconvénients des modèles couramment utilisés et de notre modèle de TRD	184
Tableau 14 : Critères d'un biomarqueur de réponse au traitement antidépresseur.....	192
Tableau 15 : Différentes tâches du projet translationnel ANR en préclinique et en clinique	198
Tableau 16 : Paramètres caractérisant les répondeurs et résistants.....	199

5-HT : sérotonine

ACTH : adreno-corticotropic hormone

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARN : acide ribonucléique

ATP : adenosine triphosphate

ADP : adenosine diphosphate

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

CORT : corticostérone

CRH : corticotropin-releasing hormone

CRF : cortico-releasing factor

CRP : C-reactive protein

DEX : dexaméthasone

DST : dexamethasone suppression test

ECT : electroconvulsive therapy

EDM : épisode dépressif majeur

EPM : elevated plus maze (labyrinthe en croix surélevé)

FDA : food and drug administration

FGF : fibroblast growth factor

GDP : guanosine diphosphate

GR : glucocorticoid receptor (récepteur glucocorticoïde)

GRK : G-protein coupled receptor kinase

GTP : guanosine triphosphate

GWAS : genome wide association study

HPA : hypothalamo-pituitary axis (axe hypothalamo-hypophysaire)

LCR : liquide céphalo-rachidien

IFN : interféron

IL : interleukine

IMAO : inhibiteur de la MAO oxydase

IRM : imagerie par résonance magnétique

ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine

ISRN : inhibiteur sélectif de la recapture de noradrénaline

LPS : lipopolysaccharide

LTPP : long term psychotherapy

MDD : major depressive disorder

MR : mineralocorticoid receptor (récepteur minéralocorticoïde)

NMDA : N-Methyl-D-Aspartate

NSF : novelty suppressed feeding (test d'hypophagie induite par la nouveauté)

OF : open field (test du champ ouvert)

PBMC : peripheral blood mononuclear cells

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

SCP : stimulation cérébrale profonde

SERT : transporteur de la sérotonine

TCA : antidépresseur tricyclique

TNF : tumor necrosis factor

TRD : treatment resistant depression (dépression résistante au traitement)

TrK : récepteur tyrosine kinase

UCMS : unpredictable chronic mild stress

VEGF : vascular endothelial growth factor

VGF : vascular growth factor

RESUME

Environ 30% des patients ne répondent pas de manière adéquate à un traitement antidépresseur. Cette absence de rémission, voire aggravation de l'état dépressif après la mise en place du traitement est qualifiée de non-réponse au traitement. La résistance au traitement est caractérisée lorsque cet échec thérapeutique est récurrent pour différentes stratégies thérapeutiques de mécanisme d'action différents. Afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques visant à traiter les patients résistants, une meilleure compréhension des mécanismes biologiques associés à la non-réponse/résistance est nécessaire. De nombreux travaux ont associé le phénomène de neurogenèse hippocampique adulte à la réponse antidépressive, et qu'un blocage de la neurogenèse altère la réponse antidépressive chez la Souris. Cependant, aucune étude n'a montré si la non-réponse/résistance au traitement était associée à des altérations de la neurogenèse. De plus, il n'existe à ce jour aucun modèle de résistance qui ne présente une validité translationnelle à ce qui est observé chez l'Homme. Enfin, alors que 2/3 des patients dépressifs sont des femmes, la majorité des études précliniques sont réalisées chez des mâles. Le but de mon travail de thèse a donc été de modéliser la résistance au traitement antidépresseur chez la souris C57BL6 mâle et femelle.

Le premier objectif de ce travail a été la modélisation chez la femelle d'un phénotype anxio-dépressif, en adaptant un modèle neuroendocrinien de la dépression élaboré chez le mâle, basée sur l'administration chronique de corticostérone. Le deuxième objectif a été l'étude de la comparaison de la neurogenèse entre les souris répondeuses et non-répondeuses à un traitement chronique de fluoxétine ou résistantes à 2 stratégies successives de traitement présentant un mécanisme d'action différent (fluoxétine puis imipramine).

D'autre part, les données de la littérature clinique suggèrent qu'un marqueur périphérique, la protéine β -arrestine 1, serait un marqueur de l'état dépressif et de la réponse au traitement. Nous avons donc mesuré dans notre modèle les variations de ce potentiel biomarqueur clinique.

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de montrer la complexité d'induire un phénotype anxio/dépressif chez la souris femelle de façon stable et robuste *via* l'administration chronique de corticostérone. Chez le mâle, nous avons pu modéliser la résistance au traitement antidépresseur dans le modèle CORT. Nous avons pu observer que les processus neurogéniques semblent jouer un rôle essentiel dans la réponse au traitement, puisqu'une absence de réponse est associée avec une altération de la neurogenèse hippocampique adulte. Si dans notre modèle, l'expression périphérique de la β -arrestine 1 n'est pas diminuée chez les souris présentant un phénotype anxio-dépressif, elle permet cependant de discriminer les souris répondeuses des souris résistantes au traitement, ce qui valide son intérêt en tant que biomarqueur de la réponse antidépressive.

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

1.1 Les épisodes dépressifs caractérisés

1.1.1 Généralités

L'Organisation Mondiale de la Santé classe les troubles anxio-dépressifs comme la quatrième cause d'invalidité dans le monde et des prédictions annoncent qu'elle deviendra **la première cause d'invalidité dans les pays occidentaux d'ici 2030** (Mathers and Loncar 2006). Ces troubles de l'humeur touchent environ 7% de la population mondiale (Murray and Lopez 1996, Kessler et al. 2005), 1 personne sur 5 sera confrontée à un épisode dépressif au cours de son existence (Kessler et al. 2005) et ces troubles deviendront chroniques chez 15 à 25% des patients (Bschor and Adli 2008). Malgré le fait que la dépression soit une pathologie de plus en plus médiatisée et reconnue en tant que pathologie invalidante, elle reste très méconnue du grand public. Quelle est la différence entre anxiété et dépression ? Quels sont les facteurs de risque ? Est-il possible de traiter cette pathologie ? Si chaque individu est susceptible d'expérimenter des fluctuations de l'humeur ou des moments de stress au cours de son existence, tout le monde ne souffre pas pour autant d'épisodes dépressifs caractérisés (EDC). En 1980, afin d'améliorer la caractérisation de cette maladie, le manuel diagnostique de l'Association Américaine de Psychiatrie a classé les différents symptômes de la dépression (American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. 2013). La dépression majeure est ainsi diagnostiquée à l'aide du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5). Un épisode dépressif caractérisé (EDC) est caractérisé par une humeur ou une perte d'intérêt ou de plaisir généralisée pendant au moins deux semaines consécutives accompagnée d'autres symptômes comme la fatigue, un ralentissement psychomoteur, une perte de poids ou d'appétit, un sommeil altéré, des difficultés à se concentrer ou à prendre des décisions, d'idées de dévalorisation ou de culpabilité et idées de mort récurrentes ou tentatives de suicide, l'ensemble de ces symptômes entraînant une perturbation des activités habituelles (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé et al. 2009). En outre, il existe plusieurs facteurs de risque, comme l'âge du patient, son sexe, ou les comorbidités associées à l'état dépressif.

Le diagnostic de la pathologie repose donc essentiellement sur les observations cliniques des symptômes. La sévérité de l'état dépressif est évaluée par différentes échelles qui permettent de mesurer le nombre et la gravité des symptômes et ainsi de quantifier la réponse au traitement antidépresseur (Gelenberg 2010). Les plus utilisées sont **les échelles d'Hamilton**

et de Montgomery et Asberg (MADRS) (Montgomery and Asberg 1979). L'échelle d'Hamilton est un questionnaire composé de 24 items dans sa version complète (Hamilton 1967) permettant d'évaluer quantitativement la sévérité des symptômes et des atteintes somatiques associées. Une personne diagnostiquée comme dépressive présente un score minimal de 15. Le score d'un patient évolue proportionnellement avec l'intensité de l'épisode dépressif et du nombre de symptômes présentés par le patient. Cet outil permet également l'évaluation de la réponse au traitement antidépresseur. Classiquement, celle-ci est définie par **une diminution d'au moins 50% du score obtenu lors de la première évaluation du patient** (Guilloux et al. 2011).

1.1.2 Aspects mécanistiques de la dépression

D'un point de vue mécanistique, comprendre la pathogénèse de la dépression est complexe. Contrairement à d'autres pathologies où il est possible d'identifier précisément un ou plusieurs facteurs déclencheurs de la maladie, ce n'est pas le cas pour la dépression. Quatre hypothèses ont été formulées pour caractériser un épisode dépressif, et bien qu'elles soient souvent présentées comme étant indépendantes l'une de l'autre, il est fort probable qu'elles soient intrinsèquement liées. La dépression est donc **une maladie multifactorielle**, et plusieurs mécanismes biologiques sont impliqués de manière concomitante.

1.1.2.1 L'hypothèse monoaminergique

C'est la première hypothèse, la plus ancienne (Hirschfeld 2000). Elle stipule que la dépression serait liée au **dysfonctionnement du système de neurotransmetteurs monoaminergiques** (sérotonine, noradrénaline et dopamine), entraînant une diminution de ces neurotransmetteurs au niveau extracellulaire et une neurotransmission cérébrale altérée. Cette hypothèse a été formulée à la suite d'observations montrant une diminution de la concentration des métabolites monoaminergiques dans le liquide céphalo-rachidien, le sang, l'urine et le cerveau de patients dépressifs. Il faut cependant noter que ces dix dernières années plusieurs études sont venues apporter des limites à cette théorie, en démontrant que l'hypothèse monoaminergique à elle seule ne peut entièrement expliquer l'étiologie de la dépression (Duman et al. 1997).

1.1.2.2 Axe hypothalamo-hypophysaire

La deuxième hypothèse est celle d'une atteinte de l'axe hypothalamo-hypophysaire-adrénalien (HPA), qui est l'un des principaux acteurs de la gestion du stress par l'organisme.

En effet, des taux élevés de cortisol, d'ACTH et de CRH ont été mesurés dans le sang, l'urine, la salive, le LCR ou dans des prélèvements post-mortem de certains cerveaux de patients dépressifs (Carroll et al. 2007). Cette augmentation est due à une hyperactivité de l'axe HPA entraînant un défaut de rétrocontrôle inhibiteur (Coryell 2007)(Figure 1). Néanmoins, seule une partie des patients dépressifs présentent cette dérégulation de l'axe HPA, principalement ceux atteints d'une dépression avec une composante mélancolique ou psychotique (Stetler and Miller 2011). Cette hypothèse à elle seule ne peut donc pas expliquer l'ensemble de la pathogénèse de la maladie.

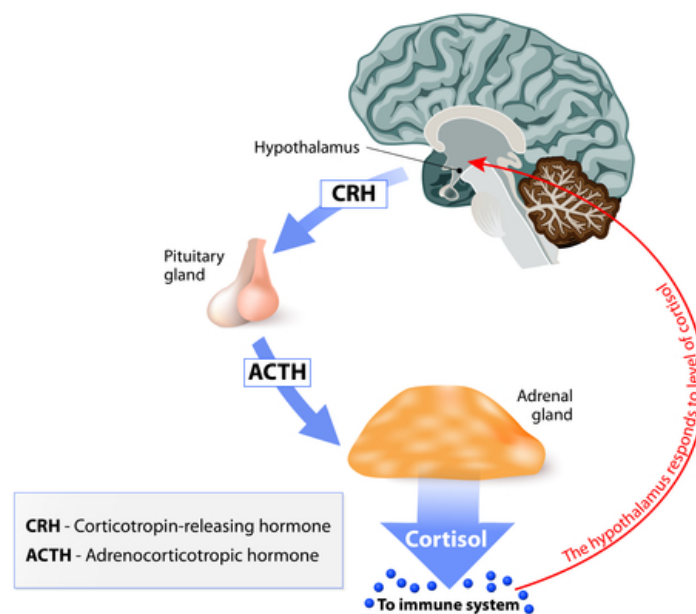


Figure 1 : Circuit de la réponse au stress

Le noyau paraventriculaire est relié à l'hypophyse, aux centres du tronc cérébral et la moelle épinière qui commandent le système nerveux végétatif. Les neurones parvocellulaires du PVN produisent la *corticotropin releasing hormone* (CRH) et la vasopressine, les deux hormones principales qui stimulent la sécrétion de l'ACTH. La stimulation de ces neurones au cours du stress entraîne la libération de CRH dans la circulation porte hypophysaire à partir de l'hypothalamus. L'ACTH agit à son tour sur les cellules de la cortico-surrénale qui libèrent le cortisol dont l'élévation freine le système par rétrocontrôle négatif à plusieurs niveaux (hypophyse, hypothalamus, hippocampe).

1.1.2.3 Hypothèse neurodégénérative de la dépression

Cette hypothèse stipule qu'une **altération du processus de neurogenèse dans l'hippocampe** pourrait être à l'origine d'un état dépressif caractérisé, et qu'une augmentation de la neurogenèse hippocampique adulte est nécessaire pour observer les effets comportementaux d'un traitement antidépresseur (Duman and Monteggia 2006). La neurogenèse est le

processus de production de nouveaux neurones et a été décrite chez l'Homme (Spalding et al. 2013) et d'autres mammifères (Eriksson et al. 1998). Elle se déroule, chez l'adulte, dans 2 régions du cerveau : la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe. Les cellules souches présentes dans ces zones deviennent des cellules progénitrices qui pourront ensuite évoluer en plusieurs types de cellules : astrocytes, neurones, oligodendrocytes ou cellules microgliales. Les neurotrophines, dont le BDNF, sont d'importants régulateurs de l'activité neuronale, impliqués aussi bien dans la différenciation des neurones que dans la survie ou la maturation neuronale. Des études post-mortem ont montré une diminution des quantités de BDNF dans l'hippocampe (Dwivedi et al. 2003), le cortex cingulaire (Tripp et al. 2012) ou de l'amygdale (Guilloux et al. 2012) chez des patients dépressifs. Chez les patients recevant un traitement antidépresseur, les observations post-mortem montrent une augmentation de la neurogenèse (Boldrini et al., 2013, Figure 2) et du BDNF dans l'hippocampe (Chen et al. 2001). Cette augmentation de BDNF se retrouve également au niveau plasmatique (pour revue : (Molendijk et al. 2014)). De manière intéressante, cette altération de la neurogenèse est retrouvée dans de nombreux modèles animaux de dépression (pour revue : (Miller and Hen 2015)).

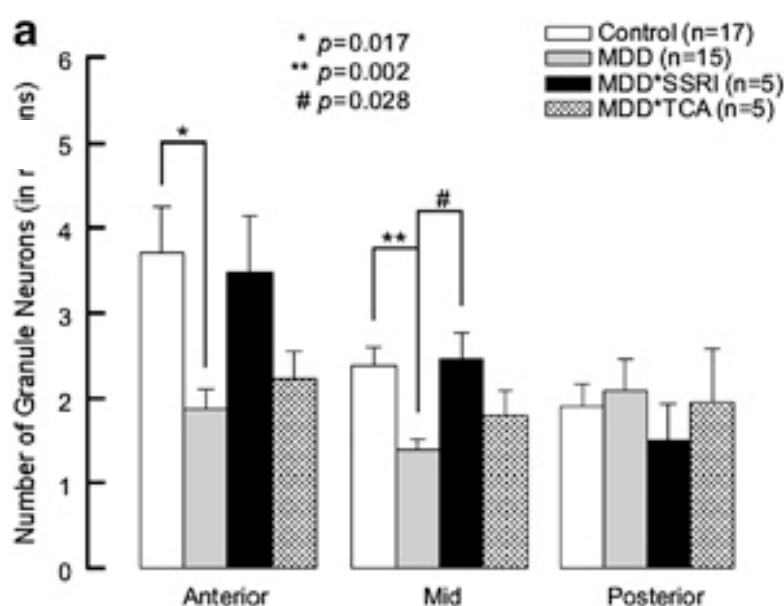


Figure 2 : Nombre de cellules granulaires dans le gyrus dentelé de l'hippocampe

Données issues d'une étude post-mortem sur des cerveaux de patient. Les patients non-traités souffrant de troubles dépressifs majeurs ont moins de cellules granulaires que les patients sains ou les patients dépressifs traités par ISRS dans le gyrus dentelé antérieur et médian. (Boldrini et al. 2013)

1.1.2.4 *La théorie neuro-inflammatoire de la dépression*

Enfin, une dernière hypothèse a émergé ces 20 dernières années : l'hypothèse immuno-inflammatoire. Cette hypothèse suggère qu'une **augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires, et une diminution des cytokines anti-inflammatoires**, ainsi que **l'activation des cellules de l'immunité** seraient associées à la pathogénèse de la dépression. Les premiers travaux établissant un lien entre la dépression et l'activation des cellules T a été publié en 1990 (Maes et al. 1990). Depuis, plusieurs études ont confirmé cette observation en montrant notamment une augmentation du taux périphérique de cytokines pro-inflammatoires chez des patients dépressifs (Dowlati et al. 2010). Des processus inflammatoires et des interactions entre les systèmes neurologique et immunitaire seraient ainsi impliqués dans le développement de la dépression. Le mécanisme de la pathogénèse serait le suivant : des facteurs de stress externes (Steptoe et al. 2007, Shapira-Lichter et al. 2008) ou internes, comme une translocation du lipopolysaccharide (LPS) à partir de bactéries *E. coli* de l'intestin (Maes et al. 2008) entraîneraient une inflammation au niveau systémique mais également au niveau central avec une activation de la microglie cérébrale qui stimulerait la production de médiateurs pro-inflammatoires. Plusieurs conséquences découlent de cette réaction inflammatoire : une diminution de zinc, une augmentation du stress oxydatif et nitrosatif, une activation de l'axe HPA via la stimulation de production de CRF, d'ACTH et de cortisol, et la stimulation de la production de indolamine-2,3-dioxygénase, enzyme induisant le catabolisme de tryptophane , et par voie de conséquence une diminution de la quantité de tryptophane et de sérotonine disponibles (Maes et al. 2011). Par ailleurs, certains de ces catabolites du tryptophane sont neurotoxiques et peuvent avoir des effets sur le comportement, la kynurénine par exemple a un effet anxiogène (Lapin 2003). D'autre part, il a été montré que l'inflammation provoque également une altération de la neurogenèse chez le Rat, caractérisée par une diminution de la prolifération cellulaire (Fujioka and Akema 2010), ainsi que de la survie et la maturation neuronale (Monje et al. 2003).

1.1.3 *Les traitements antidépresseurs*

Une médication par des antidépresseurs est classiquement initiée pour les formes modérées à sévères d'EDM. La prise en charge thérapeutique diffère cependant selon l'intensité des symptômes et le stade du patient (premier épisode, rechute ou récurrence). De plus, le choix précis de la stratégie thérapeutique sera orienté en fonction des antécédents du patient, de l'efficacité et des effets pharmacologiques recherchés, des effets indésirables connus, des

possibles propriétés secondaires des composés (sédatives, stimulantes) et de la présence de comorbidités psychiatriques diagnostiquées.

Il existe plusieurs classes d'antidépresseurs sur le marché présentant des mécanismes d'action différents.

Les inhibiteurs de monoamine oxydase (IMAO) sont les premiers antidépresseurs utilisés à partir de 1950 (tel que la phénelzine) qui augmente la concentration en sérotonine en inhibant la monoamine oxydase A chargée de sa dégradation. Cependant, les IMAO présentent des effets indésirables graves comme les interactions avec d'autres médicaments. Les IMAO ont été remplacés rapidement par **les antidépresseurs tricycliques** (TCA : amitriptyline, imipramine, clomipramine). Les TCA présentent une faible sélectivité pharmacologique, et augmentent les concentrations de neurotransmetteurs par inhibition de la recapture de sérotonine et de noradrénaline. Ils présentent également une activité antagoniste des récepteurs α_1 adrénergique, H1 et M1. Ces derniers effets antimuscariniques sont responsables des principaux effets indésirables reportés avec ces molécules.

Les Inhibiteurs Sélectifs de Recapture de la Sérotonine (ISRSs) sont les médicaments de référence pour le traitement de la dépression et des troubles anxieux généralisés, notamment la fluoxétine et le citalopram (Figure 3). Leur activité consiste à inhiber sélectivement le transporteur permettant la recapture de la sérotonine (SERT) induisant ainsi une augmentation des concentrations intra-synaptiques de sérotonine, ce qui permet ainsi l'activation prolongée des récepteurs sérotoninergiques postsynaptiques. S'ils présentent une efficacité similaire à celle des TCA, ils bénéficient de moins d'effets indésirables qui justifie leur utilisation comme traitement de première intention.

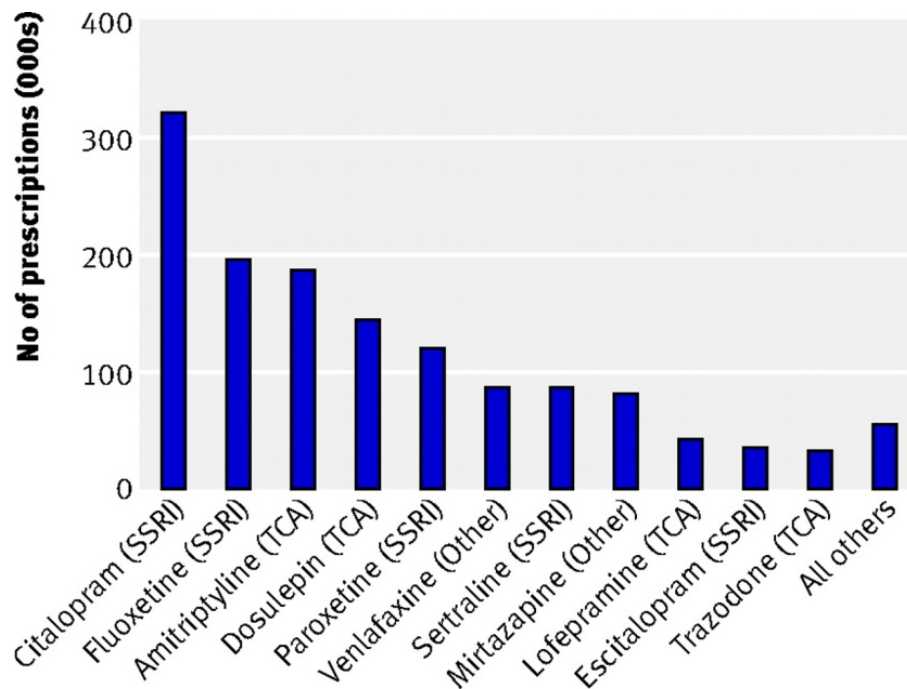


Figure 3 : Nombre total de prescription pour les 11 antidépresseurs les plus prescrits aux Etats-Unis

Les ISRS avec le citalopram et la fluoxétine font partie des antidépresseurs les plus prescrits (D'après (Coupland et al. 2011))

D'autres traitements, tels que les Inhibiteurs de recapture « mixtes » de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN, par exemple la venlafaxine et duloxétine), ont fait la preuve de leur efficacité et sont très utilisés. Dans l'optique d'améliorer le traitement de la dépression majeure, de nouvelles stratégies ont été mises en place. Le développement de molécules capables d'agir sur plusieurs systèmes à la fois semble une piste intéressante (Millan, 2009). Les nouvelles molécules mises sur le marché présentent ainsi des mécanismes d'action multicible (Agomelatine : agoniste des récepteurs de la mélatonine 1 et 2 associé à des propriétés antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C}) ou multimodale (Vortioxetine : inhibiteur de la recapture de sérotonine, agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, agoniste partiel 5-HT_{1B}, antagoniste 5-HT_{1D}, 5-HT₃, 5-HT₇). Ces actions multimodales sont un retour à une non sélectivité pharmacologique « choisie » afin de diminuer le délai d'action, de potentialiser l'effet des antidépresseurs, diminuer certains effets indésirables (notamment la dysfonction sexuelle induite par les ISRS), restaurer la fonction cognitive (Tritschler et al. 2014).

Cependant, après instauration de ces traitements, des inconvénients majeurs autres que leurs effets indésirables, et ce quelle que soit la classe considérée, sont à noter :

- D'une part, on observe **un long délai d'action de la molécule** pour induire une réponse et donc mesurer une efficacité clinique. En effet, il faut compter environ 4 semaines avant de mesurer les premiers effets du traitement.
- Le deuxième élément à noter concernant la réponse aux antidépresseurs, est le fait qu'environ 30% des patients sont non-répondeurs et/ou résistants au traitement, c'est-à-dire qu'ils ne présentent aucun signe de rémission de la maladie. La plus large étude portant sur la dépression résistante au traitement (TRD), **l'étude STAR*D** qui a été menée aux Etats-Unis avec 4.000 participants, a montré une rémission chez 37% des patients après un traitement de 12 semaines avec du citalopram, et chez 67% après 4 traitements successifs (Rush et al. 2006). La pathologie va alors être qualifiée de dépression résistante au traitement. De nombreux algorithmes de traitements, développés dans la partie suivante, ont été mis en place pour traiter la TRD, et bien que de nouveaux protocoles et nouvelles stratégies soient constamment au centre de la préoccupation de la recherche sur la dépression, il n'existe à ce jour aucun protocole spécifique validé pour traiter la TRD (National Collaborating Centre for Mental Health (Great Britain) and Royal College of Psychiatrists. 2010).

1.1.4 La non-réponse/résistance aux antidépresseurs en clinique

La caractéristique commune à tous les traitements antidépresseurs, de façon indépendante de leur mécanisme d'action, est que plus de la moitié des patients souffrants d'épisodes dépressifs majeurs ne répondent pas de façon optimale au traitement et ne montrent pas d'amélioration significative de leur état clinique, quel que soit l'âge ou le sexe des patients (Kornstein et al. 2000 , Thiels et al. 2005 , Young et al. 2008).

Si l'on suit la trajectoire de l'état psychique d'un patient, on observe que, suite à la mise en place d'un traitement antidépresseur, le patient peut présenter différents types de réponse (Figure 4).

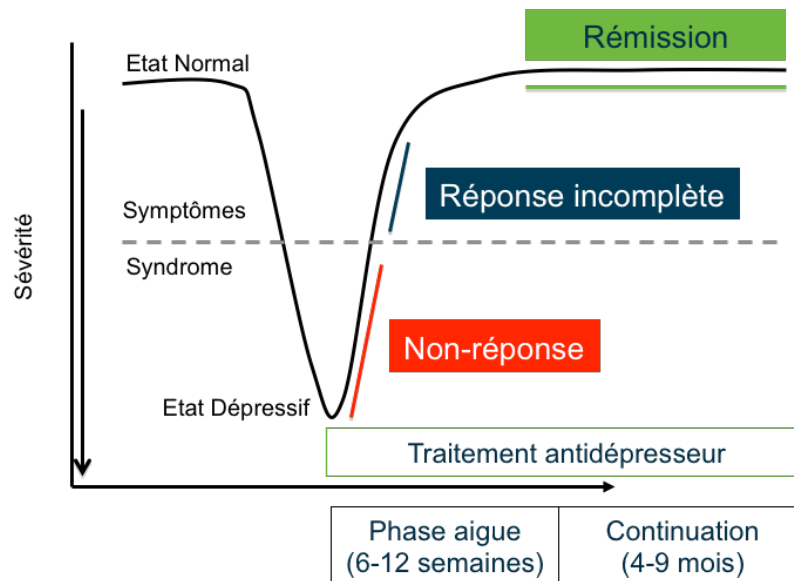


Figure 4 : Evolution de la symptomatologie de la maladie après administration d'un antidépresseur

Suite au traitement, et en fonction des patients, certains vont présenter une rémission de leur état dépressif, alors que d'autres présenteront une réponse incomplète voire une absence de réponse au traitement. (D'après (Kupfer 1991))

La réponse à un antidépresseur est caractérisée par **la diminution d'au moins 50% du score sur l'échelle d'Hamilton** (Riso et al. 1997) correspondant à une amélioration de l'état psychique du patient. Néanmoins, si une telle diminution du score permet de mettre en évidence une réponse, elle ne permet pas de caractériser une rémission. En effet, tant que le score d'Hamilton est supérieur à 15, le patient sera toujours considéré comme dépressif quelle que soit la diminution mesurée.

Pour la non-réponse, il est moins aisé de définir un seuil mais elle est souvent définie comme **une diminution inférieure à 25%** du score par rapport à la valeur initiale sur l'échelle de dépression. Enfin, la résistance au traitement antidépresseur est définie le plus couramment comme l'absence de réponse à deux traitements antidépresseurs (espacées de 4 mois) appartenant à des classes différentes, prescrits à une posologie et pendant une durée adéquates (Connolly and Thase 2011, Ruhe et al. 2012).

1.1.5 Dimorphisme sexuel de la dépression chez l'Homme

Des études épidémiologiques ont montré que la prévalence de la dépression est **deux fois plus importante chez les femmes que chez les hommes**, et ce indépendamment de l'âge, du contexte socio-économique ou géographique des personnes (Ferrari et al. 2013, Whiteford et al. 2013). A partir de l'adolescence, on observe une augmentation considérable du nombre d'épisodes dépressifs chez les femmes par rapport aux hommes (Wade et al. 2002). Ce

dimorphisme sexuel a été très étudié au cours de ces dernières années, afin d'essayer de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces différences, la finalité étant d'optimiser le diagnostic et le traitement de la maladie.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce dimorphisme. Certaines ont par exemple stipulé qu'il pouvait y avoir des facteurs génétiques impliqués. Cependant, la majorité des études réalisées n'a montré aucune différence de vulnérabilité génétique aux épisodes dépressifs entre les hommes et les femmes (Bierut et al. 1999 , Kendler and Prescott 1999). En revanche, ce qui semble plus probable c'est **l'influence des hormones sexuelles sur le dimorphisme de la dépression**, car celles-ci impactent le fonctionnement du système de neurotransmetteurs (Fink et al. 1996 , Palanza 2001). Ces derniers étant des acteurs majeurs dans la physiopathologie de la dépression, les différences de variations hormonales entre les hommes et les femmes peuvent expliquer des différences dans les manifestations de la maladie.

1.1.5.1 *Dimorphisme des manifestations cliniques de la dépression*

L'étude STAR*D a montré une prépondérance chez les femmes de comorbidités d'anxiété généralisée, de boulimie, et de troubles de somatisation alors que les hommes souffriraient plutôt de comorbidités liées à l'abus de substances, telles que l'alcool (Marcus et al. 2005, Marcus et al. 2008). D'autres études ont confirmé ces profils de dépression différents entre les hommes et les femmes (Angst et al. 2002 , Silverstein 2002, Lamers et al. 2010).

Tableau 1 résume les principales différences dans les manifestations cliniques des épisodes dépressifs entre les hommes et les femmes.

Femmes	Hommes
Premier épisode dépressif à un plus jeune âge Taux de suicide plus important Attaques de panique (+agoraphobie) Anxiété généralisée Dépression atypique ++ (augmentation de l'appétit, prise de poids, hypersomnie...) Somatisation de la maladie Durée de l'épisode plus longue	Abus d'alcool et/ou de drogues Diminution de la tolérance au stress Comportement impulsif et agressif Dépendance au travail Exercice physique excessif Diminution de la libido Insomnie

Tableau 1 : Dimorphisme sexuel des manifestations cliniques de la dépression
(D'après (Schuch et al. 2014, Kim et al. 2015)

1.1.5.2 Dimorphisme sexuel de la réponse au traitement

Si le dimorphisme sexuel quant à la vulnérabilité de développer un état dépressif est bien documenté, il semble qu'en terme de réponse aux antidépresseurs, les données ne convergent pas vers le même résultat. Depuis plusieurs années, un nombre important d'études a été mené afin de montrer une éventuelle différence de réponse au traitement antidépresseur entre les hommes et les femmes. Si certaines ont pu observer une association entre le sexe et la réponse à l'antidépresseur (Kornstein et al. 2000 , Martenyi et al. 2001 , Domschke et al. 2008, Young et al. 2008) d'autres ont montré que la réponse était indépendante du sexe du patient (Thiels et al. 2005, Kornstein 2006 , Kornstein 2010 , Deligiannidis et al. 2013 , Kornstein et al. 2014) (

Tableau 2). Il faut tout de même rester prudent lorsqu'on compare ces différentes études, car le nombre de patients, la classe d'antidépresseurs ou la durée du traitement varie de l'une à l'autre, et ces différents paramètres peuvent influencer sur les résultats obtenus (Damoiseaux et al. 2014).

Auteurs	Nombre de patients	Traitement	Durée (semaines)	Résultat clinique
(Kornstein et al. 2000)	635	Sertraline Imipramine	12	Réponse à la sertraline ♀ à la
(Martenyi et al. 2001)	105	Fluoxétine Maprotiline	6	♂ : réponse différente entre la fluoxetine et la maprotiline
(Young et al. 2008)	2876340	Citalopram	12-14	Réponse ♀ > ♂
(Thiels et al. 2005)	5452	Sertraline	24	Réponse ♀ = ♂
(Kornstein et al. 2006)	896	Duloxétine	9	Réponse ♀ = ♂
(Kornstein et al. 2014)	1805	Desvenlafaxine	8	Réponse ♀ = ♂
(Kornstein et al. 2014)	1047	Venlafaxine Fluoxétine	10	Réponse ♀ = ♂
(Coyle and Laws 2015)	437	Kétamine	4h, 7h, 24h, 7jours et 12-14 jours	Réponse ♀ = ♂ Réponse ♂ > ♀
(Zhang et al. 2015)	7666	Vortioxétine	1 dose	Réponse ♀ = ♂

Tableau 2 : Différentes études comparant la réponse aux antidépresseurs en fonction du sexe

En conclusion, si la compréhension des mécanismes sous-tendant le dimorphisme sexuel de la dépression reste primordiale, il semble d'après ces études, que le sexe ne semble pas jouer un rôle critique dans la réponse thérapeutique (Sotsky et al. 1991).

1.1.6 Le rôle de l'hippocampe dans les troubles anxio-dépressifs

L'hippocampe est une structure limbique qui semble jouer un rôle majeur dans la physiopathologie (Sheline et al. 2002, Malykhin and Coupland 2015) et le traitement des troubles de l'humeur (Dusi et al. 2015), et qui module la réponse antidépressive dans les modèles comportementaux de la dépression (Miller and Hen 2015). C'est une structure qui a notamment pour rôle de **moduler le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien** (HPA). Ainsi, une lésion de l'hippocampe affaiblit le contrôle de la réponse hormonale au stress (Jacobson and Sapolsky 1991, Dedovic et al. 2009). Par ailleurs, une augmentation des taux de cortisol/corticostérone induit à un dysfonctionnement de l'hippocampe chez l'Homme et chez les rongeurs (McEwen et al. 1997, Herman et al. 2005).

En outre, l'hippocampe, et plus exactement **le gyrus dentelé de l'hippocampe** est le siège du processus de production de nouveaux neurones chez l'adulte. La neurogenèse inclut plusieurs étapes distinctes : la prolifération cellulaire, la survie des neurones et la maturation neuronale (Figure 5). Des études ont montré une atrophie de l'hippocampe associée à une perte de neurones dans cette structure chez des patients dépressifs (Gurvits et al. 1996) et une durée des épisodes dépressifs corrélée à la diminution du volume de l'hippocampe chez l'Homme (Sheline et al. 1999, Sheline et al. 2002, Sheline et al. 2003). De plus, d'autres études chez le rongeur ont montré qu'une exposition chronique à un stress peut diminuer la neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé (Jayatissa et al. 2006). Ces altérations sont corrigées par un traitement antidépresseur chronique (Czeh et al. 2001 , David et al. 2009). Le long délai d'action des ISRS pourrait correspondre au temps nécessaire pour mise en place de la neurogenèse dans l'hippocampe.

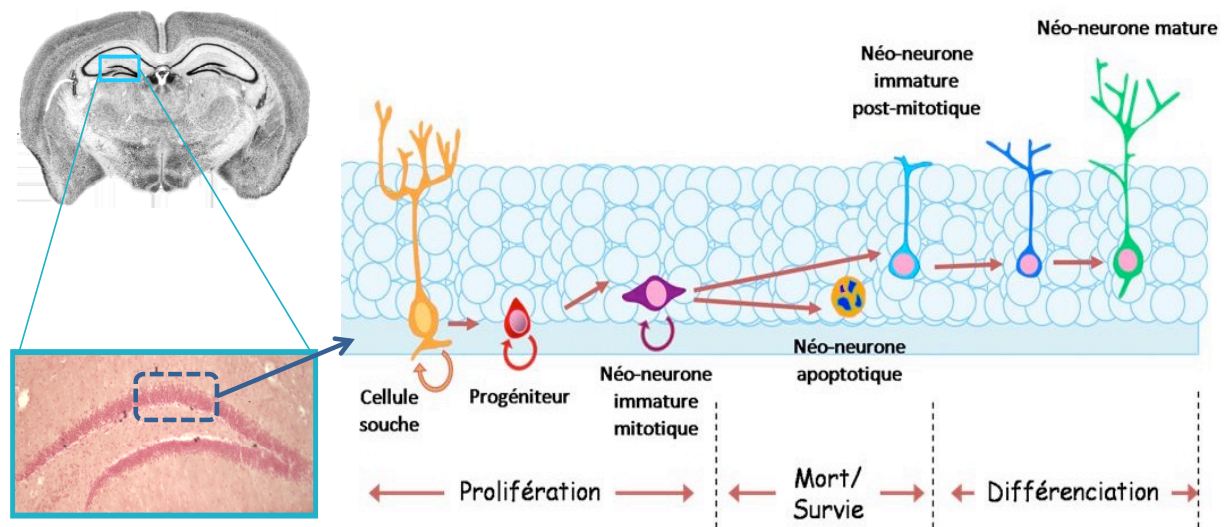


Figure 5 : Processus de neurogène dans le gyrus dentelé de l'hippocampe adulte de Souris

La neurogenèse hippocampique chez l'adulte a lieu dans le gyrus dentelé, et consiste en la prolifération de cellules progénitrices dans la couche sous granulaire, qui migrent vers la couche granulaire lors de leur différenciation en neurones ou astrocytes. Les antidépresseurs en traitement chronique augmentent la neurogène chez l'adulte en agissant à différents niveaux : ils augmentent le nombre de cellules qui prolifèrent, accélèrent la maturation, et augmentent la survie des neurones nouvellement formés (Wang et al. 2008)

1.2 La dépression résistante au traitement : TRD

Elucider les mécanismes de la résistance au traitement antidépresseur est aujourd'hui un défi majeur pour les chercheurs et les prescripteurs. De manière générale, un échec thérapeutique est toujours compliqué à vivre pour un patient, et il l'est d'autant plus lorsque ledit patient est dépressif. Cibler dès la mise en place de la stratégie thérapeutique un traitement efficace favoriserait l'adhérence du patient au traitement. Il est donc primordial d'approfondir l'étude des mécanismes de la résistance au traitement, d'identifier des biomarqueurs, et de mettre en évidence des stratégies thérapeutiques appropriées à chaque catégorie de patients.

1.2.1 Aspects cliniques de la TRD

1.2.1.1 Non-réponse et résistance : définitions

Le concept de résistance au traitement antidépresseur a été introduit en 1974 (Heimann 1974 , Lehmann 1974). De manière simplifiée, cela représente l'incapacité du praticien à traiter un patient dépressif avec une thérapeutique spécifique adaptée à sa pathologie (Ionescu et al. 2015). Depuis, plusieurs définitions de la résistance ont été développées, et il existe plusieurs guidelines nationales permettant de caractériser la résistance. Cependant, aucune définition

standard et validée de la TRD n'est disponible et aucune guideline spécifique internationale n'a été adoptée (Berman et al. 1997, Berlim and Turecki 2007).

Il existe 2 méthodes pour définir la TRD : une approche dite de **l'échec thérapeutique** (Souery et al. 1999) ou **l'utilisation d'un modèle de stratification** (Souery et al. 2006). Ces 2 méthodes se basent sur le nombre de différentes tentatives et stratégies thérapeutiques antidépresseurs (psychothérapie, médicamenteuse, sismothérapie) avant d'induire une réponse, l'éventuelle utilisation de stratégies d'augmentation, et peut aussi inclure la chronicité de la pathologie. Les méthodes de définition actuellement disponibles sont les suivantes :

- *Thase and Rush staging model* (TRSM) (Thase and Rush 1997)
- *European Staging model* (ESM) (Souery et al. 1999)
- *Antidepressant treatment history form* (ATHF) (Sackeim et al. 1990, Oquendo et al. 1999)
- *Masachussetts general hospital* (MGH) (Fava 2003)
- *Maudsley staging method* (MSM) (Fekadu et al. 2009)

La méthode de classification de Thase et Rush est la plus répandue (Pérez-Wehbe et al. 2014) et elle consiste à considérer un patient résistant **lorsque deux traitements antidépresseurs successifs adéquats (administré à la posologie et pendant la durée adéquates) appartenant à 2 classes pharmacologiques différentes ne permettent pas d'amener le patient à un état de rémission** (Tableau 3).

Stade	Description
Stade 1	Echec de ≥ 1 essai avec un antidépresseur classique
Stade 2	Echec de ≥ 2 essais avec des antidépresseurs appartenant à des classes différentes
Stade 3	Résistance de stade 2 + échec d'un essai avec un antidépresseur tricyclique
Stade 4	Résistance de stade 3 + échec d'un essai avec un IMAO
Stade 5	Résistance de stade 4 + échec de l'ECT

Tableau 3 : Méthode de classification de Thase et Rush pour définir la résistance au traitement antidépresseur (Thase and Rush 1997)

1.2.1.2 Facteurs expliquant la résistance au traitement

Plusieurs études ont tenté de répondre à la question des facteurs influant la réponse thérapeutique.

- La résistance aux antidépresseurs peut tout d'abord être expliquée par **des facteurs non-spécifiques au médicament**, comme le métabolisme hépatique, via notamment les polymorphismes du CYP450 (CYP2C19) (Mrazek et al. 2011) ou un transport insuffisant à travers la barrière hémato-encéphalique (Kato et al. 2008).
- D'autre part, **l'hétérogénéité de la maladie**, associée au manque de prédicteurs biologiques stables connus de la réponse au traitement sont certainement d'autres facteurs compliquant l'étude de la non-réponse ou la résistance (Thase 2014)

Malgré les différentes hypothèses, nous n'avons encore aucune certitude sur le mécanisme de survenue d'une résistance à un traitement antidépresseur. Par ailleurs, il ne faut pas négliger que **60% des patients** catégorisés en tant que résistants au traitement seraient en fait **pseudorésistants** (Nierenberg and Amsterdam 1990, Kornstein and Schneider 2001). La pseudorésistance correspond à une erreur de diagnostic, le plus souvent à une confusion avec un trouble bipolaire. Par conséquent, avant de considérer un patient comme résistant, le praticien doit s'assurer que le diagnostic de dépression unipolaire est correct, que l'antidépresseur a été convenablement sélectionné, que le patient présente une bonne observance au traitement, et que les comorbidités médicales et psychiatriques associées ont été correctement évaluées et traitées (Tundo et al. 2015).

1.2.1.3 Les facteurs de risque de la TRD

1.2.1.3.1 L'âge

La période la plus fréquente d'apparition d'un épisode dépressif caractérisé se situe approximativement entre 25 et 45 ans (Kessler et al. 2007). **Un âge avancé** est associé à un taux de réponse plus bas aux antidépresseurs (Tedeschini et al. 2011). Cette catégorie de la population présente donc un risque plus élevé de développer une TRD (Kornstein and Schneider 2001).

D'autre part, plus la pathologie dépressive apparaît tôt, plus le risque de développer une maladie chronique (Akiskal et al. 1981) et résistante au traitement antidépresseur est élevée (Souery et al. 2007).

1.2.1.3.2 *Influence du sexe*

Comme mentionné précédemment, la prévalence de la dépression caractérisée est double dans la population féminine par rapport aux hommes (Kornstein et al. 2000) et les femmes seraient 4 fois plus susceptibles de développer une dépression récurrente (Perugi et al. 1990). Dans la littérature, le sexe féminin a souvent été mentionné comme un facteur de risque de la TRD. Cependant, ces données s'expliquent par le fait que pendant longtemps, les tricycliques ont été les antidépresseurs les plus prescrits et que les femmes répondent moins bien aux tricycliques que les hommes. Par conséquent, comme mentionné dans le

Tableau 2, la réponse au traitement dépend du traitement administré, et la plupart des études n'ont montré **aucune différence de réponse entre les hommes et les femmes**.

1.2.1.3.3 *Autres facteurs de risque*

La sévérité et la durée des épisodes dépressifs sont également des facteurs de risque de la TRD (Berman et al. 1997, Kornstein 2006). Le risque de développer une TRD est en effet plus élevé chez les patients qui souffrent de dépression chronique (Souery et al. 2007).

Bien que les comorbidités psychiatriques et médicales, telles que les comorbidités cardiaques, cérébro-vasculaires ou neurodégénératives puissent aussi être des facteurs de risque de la maladie, aucune évidence n'a confirmé leur responsabilité dans l'augmentation de la non-réponse chez les patients (cardiaque (Scherrer et al. 2012) ; cérébro-vasculaire (Miller et al. 2002) ; maladies neurodégénératives (Price et al. 2011)).

Enfin, en ce qui concerne les facteurs socio-démographiques, les résultats sont trop hétérogènes pour pouvoir tirer des conclusions quant à leur implication dans le développement d'une TRD (Berman et al. 1997, Souery et al. 1999).

1.2.1.4 *Traitements de la TRD*

Bien que plusieurs stratégies thérapeutiques soient à ce jour disponibles pour traiter la TRD et que la recherche de nouveaux protocoles efficaces soit constamment au cœur des préoccupations, il n'existe à ce jour aucun protocole spécifique **validé** et **recommandé** pour traiter la TRD. (National Collaborating Centre for Mental Health (Great Britain) and Royal College of Psychiatrists. 2010)

1.2.1.4.1 *Stratégies thérapeutiques*

Afin d'apprécier la thérapeutique la mieux adaptée au patient, il existe des *guidelines* qui recommandent quel traitement choisir en première intention (Bauer 2007 , Ramasubbu et al. 2012).

Le choix du traitement

Les *guidelines* de prescription permettent de guider le praticien dans les choix de traitement en fonction du profil du patient. Pour la prescription d'un traitement antidépresseur, il existe plusieurs *guidelines* (*American Psychiatric Association guidelines, Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments guidelines, British Association of Psychopharmacology guidelines, Institute for clinical systems improvement healthcare guideline, German society of psychiatry guidelines, psychotherapy and neurology guidelines, World federation of societies of biological psychiatry guidelines*). Cependant, l'utilisation de ces directives est plus limitée en ce qui concerne la prise en charge des patients résistants au traitement. De ce fait, les psychiatres se reposent principalement sur leur expérience professionnelle personnelle, sur l'historique thérapeutique du patient, les effets indésirables et les potentielles interactions avec les autres traitements que prend le patient.

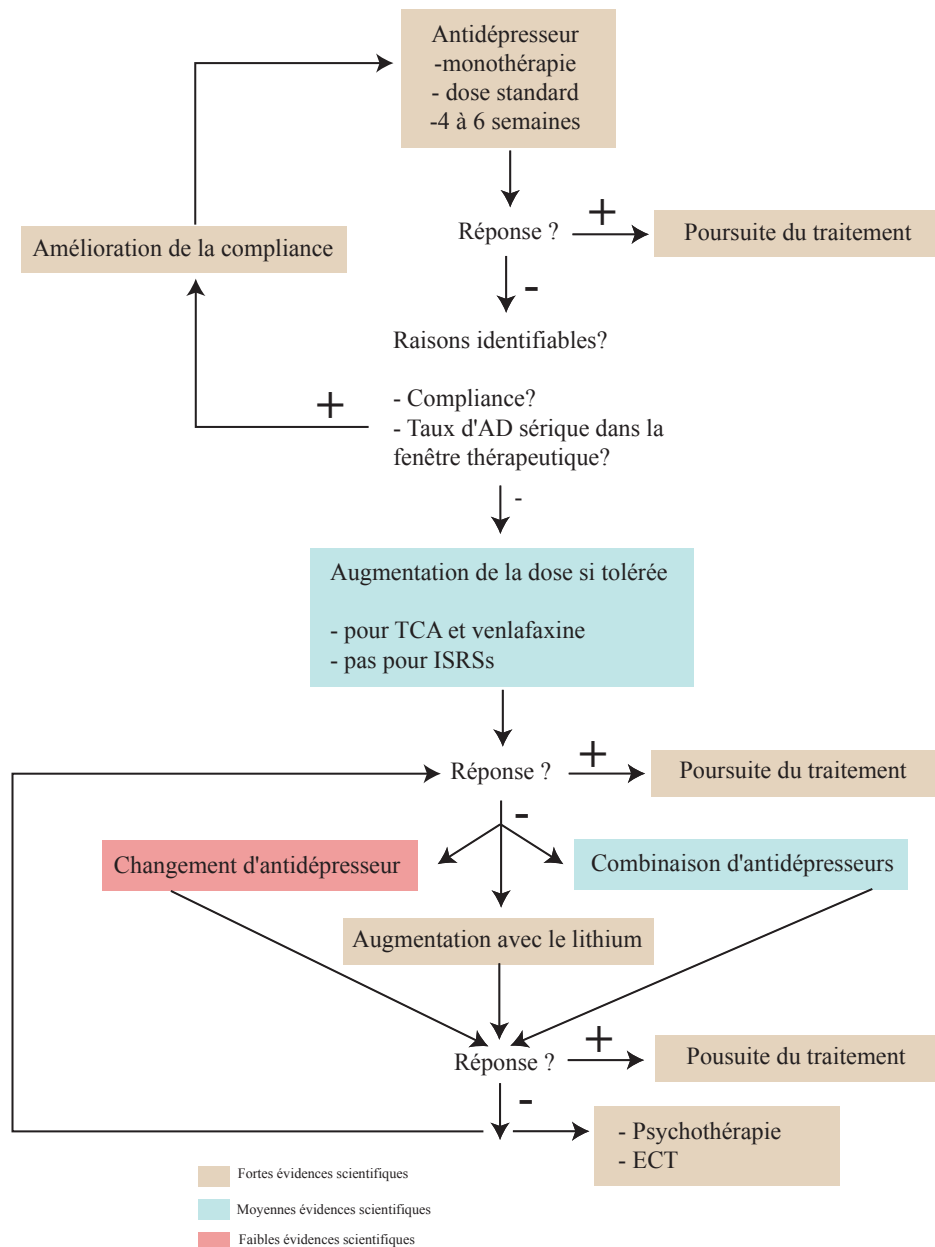


Figure 6 : Un des algorithmes proposés pour le traitement de la dépression

Après administration d'un antidépresseur pendant 4 à 6 semaines, on évalue la réponse au traitement. Soit le patient a répondu au traitement, auquel cas, on continue le traitement, soit il n'a pas répondu et dans ce cas, on évalue l'observance et le taux de concentration plasmatique du médicament. Si la non-réponse n'est pas due à un problème d'observance, on augmente la posologie du médicament, et à nouveau on évalue la réponse. Si le patient répond, on continue le traitement avec la même posologie, et s'il ne répond pas, 3 stratégies existent : changer l'antidépresseur, augmentation avec du lithium, ou combiner plusieurs antidépresseurs. Si le patient ne répond toujours pas après tout cela, il faudra envisager d'autres alternatives, comme la psychothérapie ou des traitements somatiques (D'après (Bschor et al. 2014))

L'antidépresseur est d'abord prescrit à la dose standard. Si le patient présente une rémission de ses symptômes, le traitement est maintenu pendant 6 à 12 mois après la rémission. Dans le cas où le patient est non-répondeur, avant toute décision thérapeutique, la mesure du taux plasmatique du traitement est recommandée afin de vérifier que la concentration est bien dans

la fenêtre optimale pour l'efficacité clinique. Si le patient ne répond toujours pas après l'augmentation de la dose, plusieurs stratégies sont envisageables : 1) changer de traitement (Barowsky and Schwartz 2006), 2) combiner 2 antidépresseurs de classes différentes (Dodd et al. 2005), 3) combiner l'antidépresseur avec un traitement non-antidépresseur (Carvalho et al. 2007) ou 4) augmenter la dose jusqu'à la dose maximale tolérée pendant au moins 6 à 12 semaines (Figure 6).

Changement d'antidépresseur

C'est la stratégie la plus fréquente en pratique clinique parce qu'elle présente un moindre risque, qu'elle est bien tolérée et qu'elle diminue les coûts de traitement (Tundo et al. 2015). Néanmoins il n'existe pas d'évidence clinique du bénéfice du changement d'un traitement antidépresseur, les résultats obtenus étant contradictoires. (Ruhe et al. 2006 , Rush et al. 2006 , Papakostas et al. 2008 , Bschor and Baethge 2010). Le praticien a 2 options : changer de traitement en restant dans la même classe thérapeutique ou bien changer de classe thérapeutique. Les résultats tendent à montrer que la stratégie de changement d'antidépresseur est plus efficace dans le cadre d'une **intolérance**, plutôt que d'une résistance à un précédent traitement. (Brown and Harrison 1992 , Zarate et al. 1996 , Shelton et al. 2010)

Augmentation avec le lithium

Le lithium est un métal alcalin utilisé depuis longtemps en médecine notamment dans le traitement des troubles bipolaires. Des études cliniques ont montré que le lithium pouvait également être efficace dans le traitement d'une TRD, et qu'une augmentation avec du lithium avait trois fois plus de chance de déclencher une réponse au traitement qu'une augmentation avec un placebo (Tableau 4). Jusque récemment, la stratégie d'augmentation avec le lithium était la plus étudiée. (Nelson and Papakostas 2009)

Le lithium peut être co-administré si le patient n'a pas répondu à au moins un traitement antidépresseur standard. Il est administré à une dose croissante et les taux plasmatiques doivent être contrôlés régulièrement car la fenêtre thérapeutique est très étroite (entre 0,6 et 0,9 mmol/L). Si le patient ne répond toujours pas au bout de 2 semaines, le traitement doit être interrompu. En revanche, si le patient y répond favorablement, la co-administration antidépresseur/lithium est prolongée pendant 6 à 12 mois (Bschor et al. 2014).

Augmentation avec un antipsychotique de 2^{ème} génération à faible dose

La première étude concernant l'utilisation de médicaments antipsychotiques pour traiter des patients dépressifs n'ayant pas répondu à un traitement conventionnel avec un ISRS date de 1999 (Ostroff and Nelson 1999). Néanmoins avec l'arrivée de la nouvelle génération, présentant beaucoup moins d'effets indésirables, leur utilisation est devenue plus courante et a intégré la plupart des *guidelines* de prescription en tant que stratégie d'augmentation reconnue chez les patients non-répondeurs aux antidépresseurs. Dans une méta-analyse sur l'utilisation des antipsychotiques atypiques, il a été montré que les patients traités avec ces médicaments associés aux antidépresseurs présentaient 2 fois plus de chance de rémission que les patients sous placebo. Aucune différence d'efficacité n'a été observée entre différentes molécules antipsychotiques (olanzapine, risperidone, quetiapine et aripiprazole) (Nelson and Papakostas 2009) et peu d'informations sont disponibles sur la durée optimale de cette augmentation ou sur l'utilisation chez les personnes âgées ou les adolescents (Patkar and Pae 2013).

Combinaison de 2 antidépresseurs

Cette stratégie consiste à combiner la thérapeutique actuellement prise par le patient, avec un autre antidépresseur, prescrit à la dose optimale et pendant une durée adéquate. Les études utilisant cette stratégie concernent principalement les combinaisons qui impliquent un inhibiteur de recapture (ISRS, ISRN, ATC) couplé avec un bloqueur des autorécepteurs présynaptiques (miansérine, mirtazapine ou trazodone) et ont montré **un effet synergique** de cette combinaison (Bschor et al. 2014)

(±)-Kétamine

La kétamine est un antagoniste non-compétitif à haute affinité du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), utilisé pour ses propriétés anesthésiantes (Green and Li 2000) et également pour aider à soulager les douleurs chroniques (Mathew et al. 2012). Il a été montré qu'une perfusion de 4 minutes d'une dose sub-anesthésique de kétamine (0.5 mg/kg) pouvait avoir une action antidépressive rapide sur des patients n'ayant reçu aucun traitement, et également sur des patients TRD (Murrough et al. 2013, Fond et al. 2014, McGirr and Berlim 2014). Ces effets persistent de 3 à 7 jours (Zarate et al. 2006)

Une étude menée sur des patients TRD avec de la kétamine a montré des taux de réponse de 64,8% par rapport à 28% pour des patients contrôles après une unique perfusion IV pendant 40 minutes (Murrough et al. 2013). Des perfusions répétées (jusqu'à 6 perfusions IV pendant

2 semaines) ont élevé le taux de réponse à 70.8%. Le temps moyen de rechute après la dernière perfusion est de 18 jours.

De manière générale, bien que les nombreuses études réalisées avec le mélange racémique de kétamine montrent des taux de réponse qui sont variables, l'administration de kétamine semble bien augmenter la réponse au traitement antidépresseur comparé au placebo (Perry et al. 2007). Par ailleurs, l'administration de kétamine est aussi possible par voie intranasale, afin de limiter les effets indésirables psychomimétiques, ce qui présente ainsi un bon équilibre entre la faisabilité et l'efficacité. L'hydroxynorkétamine est également à l'étude et présenterait des effets antidépresseurs sans effets psychomimétiques (Hashimoto 2016).

Autres stratégies

Depuis sa découverte en 1969 par Prange et al (Prange et al. 1969), l'augmentation avec les **hormones thyroïdiennes** a été la deuxième stratégie d'augmentation la plus étudiée après celle avec le lithium, et a montré son efficacité dans plusieurs études (Iosifescu et al. 2005 , Abraham et al. 2006), bien que certaines n'aient observé aucune amélioration avec des suppléments thyroïdiens (Joffe et al. 2006).

D'autres études ont suggéré que d'autres traitements tels que le **pindolol** ou la **lamotrigine** pouvaient être efficaces (Philip et al. 2010) mais les données obtenues sont inconsistantes et contradictoires, ils ne sont donc pas considérés comme des stratégies valides à l'heure actuelle.

Si toutes les stratégies citées précédemment sont infructueuses et ne permettent pas d'induire une réponse du patient, des stratégies de 3^{ème} ligne doivent être envisagées.

Inhibiteurs irréversibles de la mono-amine oxydase (IMAO)

La plupart du temps, les IMAO sont évités car ils possèdent de nombreux effets indésirables. En effet, les patients sous IMAO (iproniazide, MARSILID®) doivent suivre un régime strict bas en tyramine pour éviter le risque d'une crise hypertensive. Par ailleurs, aucune molécule sérotoninergique ne doit être administrée juste après un traitement par IMAO et la dose doit être augmentée progressivement (Adli et al. 2008)

Thérapie électro-convulsive (ECT)

La thérapie électro-convulsive est le traitement le plus efficace disponible aujourd'hui pour traiter une dépression résistante. En effet, le taux de réponse est de 50 à 75% parmi les non-répondeurs au traitement antidépresseur et on a observé une réponse plus élevée chez les patients ayant reçu une ECT seule que chez ceux ayant reçu un antidépresseur seul.

Le mécanisme d'action de l'ECT n'est pas encore totalement résolu, mais certaines études ont suggéré que l'ECT augmente des taux de dopamine et 5-hydroxytryptamine (Xie et al. 2013). Elle pourrait aussi entraîner une augmentation de la concentration de BDNF (Bocchio-Chiavetto et al. 2006, Rocha et al. 2016) et une augmentation du volume de l'hippocampe (Nordanskog et al. 2014). Des troubles cognitifs sont assez souvent observés après une cure d'ECT mais sont dans la majorité des cas transitoires, et se normalisent 3 mois post-ECT. Le principal problème de cette technique est un taux de récurrence élevé qui survient assez tôt après le traitement. Il peut aller jusqu'à 80% dans les 6 mois qui suivent si aucun traitement antidépresseur n'est administré.

Stimulation cérébrale profonde (SCP)

Lorsque le patient n'a répondu à aucune des stratégies citées ci-dessus, une stimulation cérébrale profonde peut être envisagée. Contrairement à la thérapie électro-convulsive, cette stimulation est une méthode invasive qui consiste à implanter des électrodes dans le cerveau du patient sous anesthésie. Les régions ciblées sont principalement la substance blanche de l'aire 25 de Brodmann qui correspond à une sous-région du cortex cingulaire, la capsule ventrale du striatum et le nucleus accumbens (Delaloye and Holtzheimer 2014).

Cette technique est principalement indiquée pour la maladie de Parkinson mais quelques études ont évalué son efficacité sur la TRD et montrent une efficacité chez les patients résistants, avec pour certaines études, de bons taux de réponse notamment après implantation dans le cortex cingulaire (taux de réponse à 1, 2 et 3 ans après l'implantation respectivement de 62.5%, 46.2% et 75% (Kennedy et al. 2011)). Cependant, si les résultats semblent encourageants, ils proviennent principalement d'études cliniques ouvertes, incluant peu de patients déprimés, sans groupe contrôle.(Delaloye and Holtzheimer 2014)

Stratégies	Etudes	Avantages	Inconvénients	Mécanismes
Changer d'antidépresseur	(Ruhe et al. 2006) (Papakostas et al. 2008) (Thase et al. 2002) (Fava et al. 2001) (Kaplan 2002) (Nierenberg et al. 2003) (de Montigny et al. 1999)	Méthode sûre et bien tolérée Réduis les coûts du traitement A privilégier plutôt lorsque le patient ne tolère pas bien le 1 ^{er} traitement	Pas de solides preuves scientifiques en faveur de cette méthode Augmente le nombre de traitements successifs et donc le risque de résistance Certains traitements nécessitent une période de <i>wash-out</i> (les IMAOs par exemple) Possible perte de tout effet thérapeutique du premier traitement	Changement du mécanisme d'action de l'antidépresseur
Augmentation au lithium	(Baumann et al. 1996) (Bauer and Dopfmer 1999) (Crossley and Bauer 2007) (Fava et al. 1994) (Nierenberg et al. 2006)	Augmente par 3 les chances de réponse Réponse au traitement dans des brefs délais : à partir de 48h et en moyenne en 6 semaines	Fenêtre thérapeutique étroite : la concentration de lithium doit être mesurée régulièrement Effets indésirables potentiellement sévères	Augmente la libération présynaptique de sérotonine Effets synergiques sur les systèmes de second messenger liés à la production de monoamines
Augmentation avec un antipsychotique	(Bauer et al. 2009) (Shelton et al. 2001) (Thase et al. 2008) (Yoshimura et al. 2012) (Fabrazzo et al. 2012)	Améliore les symptômes tels que l'agitation et l'insomnie	Effets indésirables nombreux : prise de poids, syndrome métabolique, sédation, effets extrapyramidaux...	Antagonistes D2 / 5-HT _{2A}
Augmentation dose et durée du traitement	(Crismon et al. 1999) (Fredman et al. 2000) (Nierenberg et al. 1995)	Le patient garde le même traitement donc ne change pas ses habitudes ce qui une meilleure compliance au traitement.	Augmentation des effets indésirables et toxicité cardiaque (arythmies) Stratégie pas applicable pour tous les traitements antidépresseurs Potentielle augmentation du délai de réponse	Augmentation de l'efficacité du traitement

Combinaison 2 AD	(Carvalho et al. 2014) (Levitt et al. 1999) (Seth et al. 1992) (Carpenter et al. 2002) (Licht and Qvitzau 2002)	Effet synergique des traitements Diminution du risque des symptômes de sevrage Accélère la réponse au traitement Améliorations à l'initiation du traitement maintenues	Etudes peu nombreuses Etudes de combinaison souvent réalisées dans le cadre d'un traitement initial et non d'une TRD Possible interaction entre les traitements	Effet synergique pharmacocinétique = élargit le spectre d'action de l'antidépresseur
Kétamine	(Shiroma et al. 2014) (Murrough et al. 2013) (Zarate et al. 2006) (Murrough et al. 2013) (aan het Rot et al. 2010)	Action antidépresseur rapide Traitement sûr et bien toléré Administration intranasale possible	Rechute rapide après administration IV Changements transitoires dans les mesures hémodynamiques chez 30% des patients Effets indésirables : somnolence, vertiges, vision floue, troubles de la coordination, sentiment d'irréel	Antagoniste non compétitif à haute affinité du récepteur NMDA
IMAO	(Thase et al. 1995) (Adli et al. 2008)	Traitement plus efficace que les tricycliques chez les patients avec des symptômes atypiques	Régime strict pauvre en tyramine Contre-indiqués avec les médicaments sérotoninergiques Posologie doit être augmentée progressivement	Inhibiteurs de la monoamine oxydase
ECT	(Kellner et al. 2012)	Traitement le plus efficace contre la TRD Risques et effets indésirables moindres	Rechute rapide après arrêt du traitement Troubles cognitifs transitoires après ECT	Stimulation électrique cérébrale Augmentation du BDNF Augmentation dopamine et sérotonine
Augmentation avec Bupropion	(Bodkin et al. 1997) (DeBattista et al. 2003) (Lam et al. 2004) (Trivedi et al. 2006)	Peut aider à diminuer les effets secondaires sexuels des antidépresseurs Pas d'addiction	Effets indésirables gastro-intestinaux A utiliser avec précaution sur les patients épileptiques	Antagoniste indirect des récepteurs à la noradrénaline Bloque légèrement la recapture de dopamine

Augmentation avec stimulants et/ou modafinil	(DeBattista et al. 2003) (Fava et al. 2005) (Menza et al. 2000) (Gwirtsman et al. 1994) (Lavretsky et al. 2003)	Améliore la vigilance Améliore la fatigue Améliore la libido et l'humeur	Effets indésirables nombreux : anxiété, insomnie, hypertension, exacerbation des manies ou des symptômes psychotiques Potentiels abus d'utilisation	Augmentation de la libération présynaptique de dopamine et d'autres monoamines
Augmentation avec pindolol	(Perry et al. 2004) (Martinez et al. 2000) (Ballesteros and Callado 2004) (Berman et al. 1997) (Moreno et al. 1997) (Perez et al. 2001)	Relativement bien toléré Améliore la réponse aux ISRS	Effets indésirables : vertiges, hypotension, fatigue Etudes d'efficacité contradictoires	β-Bloquants Antagoniste présynaptique 5-HT _{1A} et des récepteurs β-adrénrgiques = favorise la libération de sérotonine
Suppléments thyroïdiens	(Aronson et al. 1996) (Iosifescu et al. 2005) (Abraham et al. 2006) (Kelly and Lieberman 2009) (Joffe et al. 2006)	Accélère la réponse à l'antidépresseur Plus sûr et mieux toléré que le lithium Augmente par 2 les chances de réponse	Arythmies cardiaques (tachycardie) Agitation, nervosité, insomnie Déméralisation osseuse Manque d'études randomisées en double aveugle Surtout efficace chez les non-répondeurs au TCA	Interagiraient directement avec la noradrénaline via l'axe hypophyse-thyroïde en augmentant la fonction du récepteur β-adrénrgique central.
Benzodiazépines	(Fava et al. 2006) (Nolen et al. 1993) (Smith et al. 2002)	Améliore l'adhésion au traitement AD Contrôle rapidement le niveau de base d'anxiété Amélioration du sommeil	Ralentissement cognitif chez les personnes âgées Sédation passagère Symptômes de manque si arrêt brusque Possibles de dégradation de l'humeur Efficace chez les patients avec une dépression atypique	Fixation sur les récepteurs GABA _A

Tableau 4 : Différentes stratégies pour traiter la dépression résistante

La psychothérapie

La psychothérapie est la stratégie non-pharmacologique la plus communément employée, en complément de la pharmacothérapie. Son objectif est d'augmenter l'efficacité du traitement, d'améliorer le fonctionnement social et la qualité de vie du patient et de prévenir le risque de récurrence.

Deux grands types de thérapie sont actuellement utilisés : les thérapies psychodynamiques et les thérapies cognitives et comportementales. Il existe un grand débat dans le monde de la psychanalyse pour savoir laquelle de ces thérapies est la plus efficace. Dans une revue sur les traitements de la TRD, Carvalho et al (Carvalho et al. 2014) a montré que les thérapies cognitives semblaient être un traitement efficace en complément d'une pharmacothérapie. En effet, une psychothérapie combinée avec l'administration d'un antidépresseur est associée avec une réponse plus élevée qu'une pharmacothérapie seule. De plus, le risque d'abandonner le traitement est réduit lors de la combinaison pharmacothérapie et traitement psychologique (Pampallona et al. 2004).

1.2.2 La TRD en préclinique

La recherche préclinique est fondamentale pour une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui sous-tendent la dépression chez l'Homme. Willner entre autres, a proposé certains critères à l'établissement d'un bon modèle animal d'une pathologie neuropsychiatrique (Willner 1984) : les modèles doivent répondre à **une validité créative** (les symptômes observés chez l'Homme doivent être comparable chez l'animal), **une validité de construction** (homologie et similitude dans les mécanismes neurobiologiques) et **une validité prédictive** (les traitements efficaces chez l'Homme doivent l'être dans le modèle).

L'objectif d'un modèle de TRD n'est pas d'étudier les mécanismes biologiques qui sous-tendent la dépression mais ceux qui sous-tendent la réponse au traitement antidépresseur. Par ailleurs, ces modèles doivent être de bons outils pour le *screening* de nouvelles molécules efficaces pour traiter la résistance aux antidépresseurs, ce que ne sont pas les modèles de dépression.

La dépression résistante au traitement étant une pathologie très hétérogène, il est impossible pour un seul modèle animal de parvenir à répliquer l'ensemble du phénotype complexe de la maladie humaine. Chaque modèle animal reflète donc seulement une catégorie de patients

résistants. De la même façon que des critères sont définis pour valider un modèle de dépression, des critères pour valider un modèle de TRD ont été proposés (Willner and Belzung 2015) : 1) une **vulnérabilité accrue au stress**, 2) présenter **une diminution de la réponse aux traitements antidépresseurs conventionnels** et 3) répondre **aux nouvelles thérapies efficaces chez les patients souffrant de TRD**. (Kétamine, lithium etc.).

La proposition d'inclure la vulnérabilité accrue au stress dans les critères de validation d'un modèle de TRD découle de l'observation suivante : les antidépresseurs conventionnels agissent principalement en corrigeant les effets induits par un stress chronique et sont donc moins efficaces chez les patients présentant des prédispositions à la dépression, car chez ces patients l'intensité du stress nécessaire pour déclencher la maladie est diminuée (Willner and Belzung 2015). Ces prédispositions peuvent correspondre à des facteurs de risque génétiques ou environnementaux (dépression récurrente, exposition à un stress pendant l'enfance...). La résistance serait ainsi associée à l'incapacité des antidépresseurs conventionnels de remédier aux composantes de la dépression liés à ces prédispositions. Les modèles animaux ayant une bonne validité en tant que modèle de dépression peuvent partiellement satisfaire ce critère de vulnérabilité au stress (Willner and Belzung 2015).

L'absence de réponse aux antidépresseurs est bien entendu un critère essentiel pour la validation du modèle. Il est important de souligner que la résistance doit être établie dans le cadre d'une **administration chronique du traitement**, et que les antidépresseurs choisis doivent être des antidépresseurs dits « conventionnels » et ne pas appartenir à la catégorie des nouveaux antidépresseurs utilisés dans le cadre de stratégies d'augmentation (par exemple le lithium ou les antipsychotiques). L'utilisation d'un vaste panel d'antidépresseurs est également recommandée pour consolider la validité du modèle.

Enfin le dernier critère pour valider le modèle de TRD est une réponse positive aux nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces en clinique pour surmonter une résistance au traitement. Dans la majorité des cas, on retrouve cette efficacité dans les modèles précliniques de TRD. Par exemple, le rôle des antipsychotiques en tant que stratégie d'augmentation a été confirmé dans une étude montrant une amélioration de la réponse chez des rats résistants à la fluoxétine, lorsque la quétiapine était associée au traitement antidépresseur (Wang et al. 2013). De la même façon, une amélioration de la réponse a été observée en présence de lithium (Kitamura et al. 2002) ou avec des traitements non-pharmacologiques tels que les ECTs (Li et al. 2006).

La majorité des études précliniques mentionnées dans les sections suivantes utilisent de façon probablement « abusive » le terme de résistance aux antidépresseurs tel qu'il est utilisé en clinique. Toutes les études présentées ont associé l'absence de réponse à un traitement antidépresseur à une résistance pharmacologique, et aucune étude n'a testé différentes stratégies pharmacologiques chez le même animal, n'ayant pas répondu à un premier traitement antidépresseur. Pour la facilité de lecture du document, nous avons cependant conservé ce terme de résistance aux antidépresseurs chez les rongeurs même s'il ne correspond pas à la définition clinique.

Il existe 3 approches différentes actuellement pour modéliser la non-réponse et/ou la résistance chez l'animal.

1.2.2.1 *Approches pour modéliser la non-réponse/résistance chez les animaux*

Séparer les animaux en 2 groupes : répondeurs et non-répondeurs

Cette méthode consiste à induire un phénotype anxio-dépressif chez des animaux, grâce à des modèles validés, tels que le stress modéré chronique imprédictible (UCMS) (Jayatissa et al. 2006, Christensen et al. 2011), le modèle de défaite sociale chronique (*chronic social defeat*) (Der-Avakian et al. 2014), le modèle de résignation acquise (*learned helplessness*) (Sartorius et al. 2007), ou enfin un traitement chronique à la corticostérone (Samuels et al. 2011). Un traitement antidépresseur est ensuite administré aux animaux ayant développé un phénotype anxio-dépressif et après des tests comportementaux pour évaluer la réponse antidépressive, les animaux sont séparés en 2 groupes : les animaux qui ont répondu au traitement, et les animaux non-répondeurs/résistants.

Traitement rendant les animaux résistants

Modèle ACTH

Cette approche se base sur le fait qu'une hyperactivité de l'axe HPA est observée chez certains patients souffrant de MDD, associée à une augmentation importante de la libération d'ACTH (Holsboer 2000). Cette hyperactivité de l'axe HPA est la plupart du temps normalisée après administration d'un traitement antidépresseur. Quelques études ont suggéré que l'incapacité du traitement à normaliser l'axe HPA pourrait être un prédicteur de la résistance au traitement (Ising et al. 2007).

Ces observations ont amené à proposer **une administration exogène d'ACTH** aux animaux, entraînant ainsi une augmentation de l'ACTH circulante, et ainsi une dérégulation de l'axe HPA qui pourrait modéliser la résistance aux antidépresseurs (Kitamura et al. 2002).

Une étude a montré qu'une administration chronique d'ACTH chez le Rat bloque l'effet antidépresseur de l'imipramine et de la désipramine dans le FST (Walker et al. 2013) et a ainsi conclu qu'une administration chronique d'ACTH induisait une « résistance » au traitement. Néanmoins, ces études réalisées concernent surtout la classe des antidépresseurs tricycliques. Par conséquent, nous pouvons considérer le modèle ACTH comme un modèle de résistance aux antidépresseurs tricycliques (Kitamura et al. 2002 , Iwai et al. 2013 , Walker et al. 2013).

Induction d'une inflammation

Certaines études cliniques suggèrent que la TRD serait liée à une sur activation du système inflammatoire. Des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 et IL-6 ont été mesurées dans le plasma de patients dépressifs résistants aux antidépresseurs (O'Brien et al. 2007, Carvalho et al. 2013). Ces observations cliniques ont pu être confirmées en préclinique. Le lipopolysaccharide (LPS) est une molécule qui produit une neuro-inflammation et la libération des cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 et IL-6 (Dantzer 2009). Des rats ayant reçu du LPS chroniquement tous les jours avant un UCMS ont présenté une réponse atténuée à la fluoxétine dans le test de la nage forcée et le test d'hyponéophagie induite par la nouveauté (Wang et al. 2011).

Les modèles génétiques

Différences entre souches d'animaux

Certaines souches d'animaux présentent naturellement une sensibilité aux antidépresseurs dits conventionnels diminuée. Elles peuvent donc être utilisées en tant qu'outil pour étudier la résistance aux antidépresseurs et l'identification de nouveaux traitements efficaces pour traiter la TRD (pour revue, (Jacobson and Cryan 2007)). Les souches utilisées peuvent être congéniques, non-congéniques, ou bien sélectivement croisées pour présenter une anxiété élevée (souche de souris HAB) (Sartori et al. 2011, Schmuckermair et al. 2013), ou un syndrome de désespoir acquis (El Yacoubi et al. 2003).

Effet d'un seul gène

D'autres modèles de résistance proposés sont des animaux transgéniques impliquant **la modification d'un unique gène** qui entraîne une résistance au traitement. Il existe plusieurs gènes dont la mutation est susceptible d'entraîner une réponse amoindrie. Les antidépresseurs sérotoninergiques étant les plus prescrits, la contribution du système monoaminergique dans la réponse au traitement a été abondamment étudiée. Ainsi de nombreux modèles transgéniques de résistance concernent des gènes du système sérotoninergique (Tableau 5).

Le Tableau 5 suivant présente l'ensemble des modèles animaux répertoriés dans la littérature comme modèles animaux de résistance aux antidépresseurs par leurs auteurs. Dans ces modèles, une réponse amoindrie ou totale des effets des antidépresseurs a été reportée, avec les différents critères de validation du modèle, ainsi que les tests utilisés pour évaluer la réponse au traitement.

Il est cependant important de noter que bien que ces modèles aient été qualifiés dans la littérature de « modèles de résistance aux antidépresseurs », la plupart ne présentent une résistance qu'à quelques traitements, et la réponse n'a été évaluée que dans un seul test comportemental.

Modèle	Mécanisme	Présente un phénotype anxio-dépressif	Résistance aux traitements antidépresseurs conventionnels	Test	Réponse aux nouvelles stratégies	Articles
Modèles génétiques : mutation d'un seul gène du système monoaminergique						
TPH2 (-/-)	Blocage de la synthèse de sérotonine	Non	Fluoxétine Paroxétine Citalopram	Sucrose Preference Test TST FST	Ø	(Angoa-Perez et al. 2014)
DBH KO	Blocage du gène codant pour β -hydroxylase	Non	Desipramine, reboxetine, Pargyline, Bupropion Fluoxétine, sertraline, paroxétine (aigu)	FST	Ø	(Cryan et al. 2001)
5-HTTLPR	Blocage du transport de la sérotonine	Oui	Fluoxétine (aigu) Imipramine	TST FST	Ø	(Holmes et al. 2002) (Hariri and Holmes 2006) (Muller et al. 2011)
5-HT_{1A} KO	Ablation du récepteur 1A de la sérotonine	Oui	Fluoxétine	NSF	Ø	(Holick et al. 2008) (Santarelli et al. 2003) (Ramboz et al. 1998) (Heisler et al. 1998)
5-HT_{1B} KO p11 KO et SMARCA3 KO	Ablation du récepteur de la sérotonine Ablation de la protéine p11 et de sa cible SMARCA3	Oui	ISRS (aigu) Fluvoxamine Escitalopram Fluoxétine Citalopram	OF Anhédonie induite par le stress NSF et TST Sucrose preference test	Ø	(Mayorga et al. 2001) (Oh et al. 2013) (Svenningsson et al. 2006) (Trillat et al. 1998) (Vinkers et al. 2011)
5-HT_{2B} KO	Ablation du récepteur de la sérotonine	Non	Fluoxétine Paroxétine	NSF	Ø	(Diaz et al. 2012)
OCT2 KO	Suppression de la clairance de la sérotonine et noradrénaline	Oui	Venlafaxine	FST	Ø	(Bacq et al. 2012) (Courousse et al. 2015)

α_{2A} KO	Ablation du récepteur noradrénergique α_{2A}	Oui	Imipramine	FST	Ø	(Schramm et al. 2001)
Modèles se basant sur altération de l'axe HPA						
FKBP51 KO	Ablation de FK506 binding protein (régulation du GR)	Non	Paroxétine (aigu) Amitriptyline (aigu)	FST	Ø	(Gassen et al. 2014)
Modèle ACTH	Administration chronique d'ACTH exogène, altération de l'axe HPA	Non	Imipramine Désipramine	FST	Lithium	(Walker et al. 2013) (Kitamura et al. 2002)
Modèles se basant sur une altération de l'expression de BDNF						
BDNF +/-	Ablation du gène BDNF	Non	Imipramine	TST NSF Resident/intruder test	Kétamine	(Ibarguen-Vargas et al. 2009) (Saarelainen et al. 2003) (Lindholm et al. 2012)
BDNF KO dans hippocampe et cortex	Ablation conditionnelle du BDNF	Ø	Désipramine	FST	Ø	(Monteggia et al. 2007)
BDNF KO dans gyrus denté	Ablation partielle du BDNF	Ø	Desipramine Citalopram	FST	Ø	(Adachi et al. 2008)
BDNF Met/Met	Polymorphisme du BDNF	Oui	Fluoxétine	EPM OF Hypophagie induite par la nouveauté Resident/intruder test	Ø	(Chen et al. 2006)
TrkB KO	Ablation du récepteur TrkB	Ø	Imipramine Fluoxétine	FST	Ø	(Saarelainen et al. 2003)
Modèles se basant sur des mécanismes neuro-inflammatoires						

Modèle LPS	Administration de LPS avant un CMS	Ø	Fluoxétine	FST et NSF	Ø	(Wang et al. 2011)
Modèle LPR	Surexpression endogène d'IL6 dans le cerveau	Oui	Fluoxétine (aigu)	TST et FST	Lithium	(Sukoff Rizzo et al. 2012)
Modèles se basant sur un effet de souches						
Souche HAB	Souris élevées spécifiquement pour comportement très anxieux	Oui	ISRS (fluoxétine, paroxétine, citalopram)	FST	SCP	(Schmuckermair et al. 2013)
Wistar Kyoto	Souche non congénique	Oui	ISRS et ISRN	FST	Kétamine	(Belujon and Grace 2014) (Ivarsson et al. 2005) (Lopez-Rubalcava and Lucki 2000)
C57BL6J	Souche congénique	Non	Fluoxétine Fluvoxamine (aigu) Paroxétine (aigu) Desipramine, imipramine (aigue)	FST	Ø	(Dulawa et al. 2004) (Sugimoto et al. 2008) (Sugimoto et al. 2011) (David et al. 2003)
Balb/c	Souche congénique		Desipramine	Hypophagie induite par la nouveauté	Lithium	(O'Leary and Cryan 2013)
DBA/2	Souche congénique		Citalopram	TST FST	Ø	(Cervo et al. 2005) (David et al. 2003)
CD-1	Souche non-congénique		Fluoxétine, fluvoxamine, citalopram	FST	Ø	(Kobayashi et al. 2008) (Lucki 2001)
Séparation en répondeurs et non répondeurs						
Stress chronique imprédictible (UCMS)	Exposition de rats Wistar à différents stress	Oui	Escitalopram Sertraline	Test de préférence au sucrose	SCP	(Jayatissa et al. 2006) (Christensen et al. 2011) (Dournes et al. 2013)

Introduction

Défaite sociale chronique	Exposition de rats avec un animal agresseur	Oui	Fluoxétine Désipramine	FST	Ø	(Der-Avakian et al. 2014)
Administration chronique de corticostérone	Administration chronique de CORT chez des souris C57BL/6J	Oui	Fluoxétine	NSF	Ø	(Samuels et al. 2011)
Autres modèles						
Stress chronique imprédictible (UCMS) + Stress métabolique	UCMS combiné avec un régime riche en acide gras	Oui	Fluoxétine	Splash test Reward Maze test	Ø	(Isingrini et al. 2010)
Environnement	Exposition à un environnement stressant	Oui	Fluoxétine	Test de préférence à la saccharine	Ø	(Branchi et al. 2013)

Tableau 5 : Modèles animaux de non-réponse aux antidépresseurs

Les traitements antidépresseurs sont administrés de manière chronique, sauf lorsque la mention « aigu » est précisée.

1.3 Les biomarqueurs dans la dépression et la réponse antidépressive

Un biomarqueur peut être défini comme un paramètre mesuré de manière objective et évalué comme un indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus de pathogénèse ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (Biomarkers Definitions Working 2001). Entre 2003 et 2008, l'investissement dans la recherche de biomarqueurs est passé de 100 millions à 2 Milliards d'US\$ (Baker 2005). Malgré cet investissement considérable, la perspective d'obtenir des biomarqueurs de la pathologie dépressive utilisables en clinique est encore lointaine.

Les épisodes dépressifs ne sont diagnostiqués aujourd'hui qu'au moyen d'une évaluation clinique. Par conséquent, rendre le diagnostic plus objectif avec des biomarqueurs pertinents est une préoccupation majeure et un des objectifs du plan stratégique du *National Institute for Mental Health*. Les bénéfices de tels biomarqueurs seraient considérables. D'une part, ils pourraient être utilisés pour **prédire le risque de déclencher la maladie**, et d'autre part ils permettraient **d'évaluer la sévérité, d'établir un pronostic de la maladie** et enfin de **prédire la réponse au traitement** (Biomarkers Definitions Working 2001).

On peut placer les biomarqueurs dans 3 grandes catégories : **les biomarqueurs caractéristiques, les biomarqueurs d'état et les biomarqueurs d'endophénotype**. **Les biomarqueurs caractéristiques** sont permanents et indiquent l'existence de la pathologie avant même qu'elle ne se déclare, pendant et après la rémission. Ils sont donc utiles pour prédire si un individu est susceptible de développer la maladie. **Les biomarqueurs d'état** sont temporaires, et ils reflètent l'état clinique du patient à un instant donné. Ils sont présents avant et durant la maladie mais se normalisent après la rémission. Enfin, **les biomarqueurs d'endophénotype** sont permanents, et se basent sur l'association entre les gènes et les phénotypes spécifiques à la dépression.

Une grande diversité de molécules peut être utilisée en tant que biomarqueur : des hormones, des protéines, des marqueurs génétiques sur l'ADN et de l'ARN, mais également des altérations structurelles et fonctionnelles visualisables par des techniques d'imagerie cérébrale.

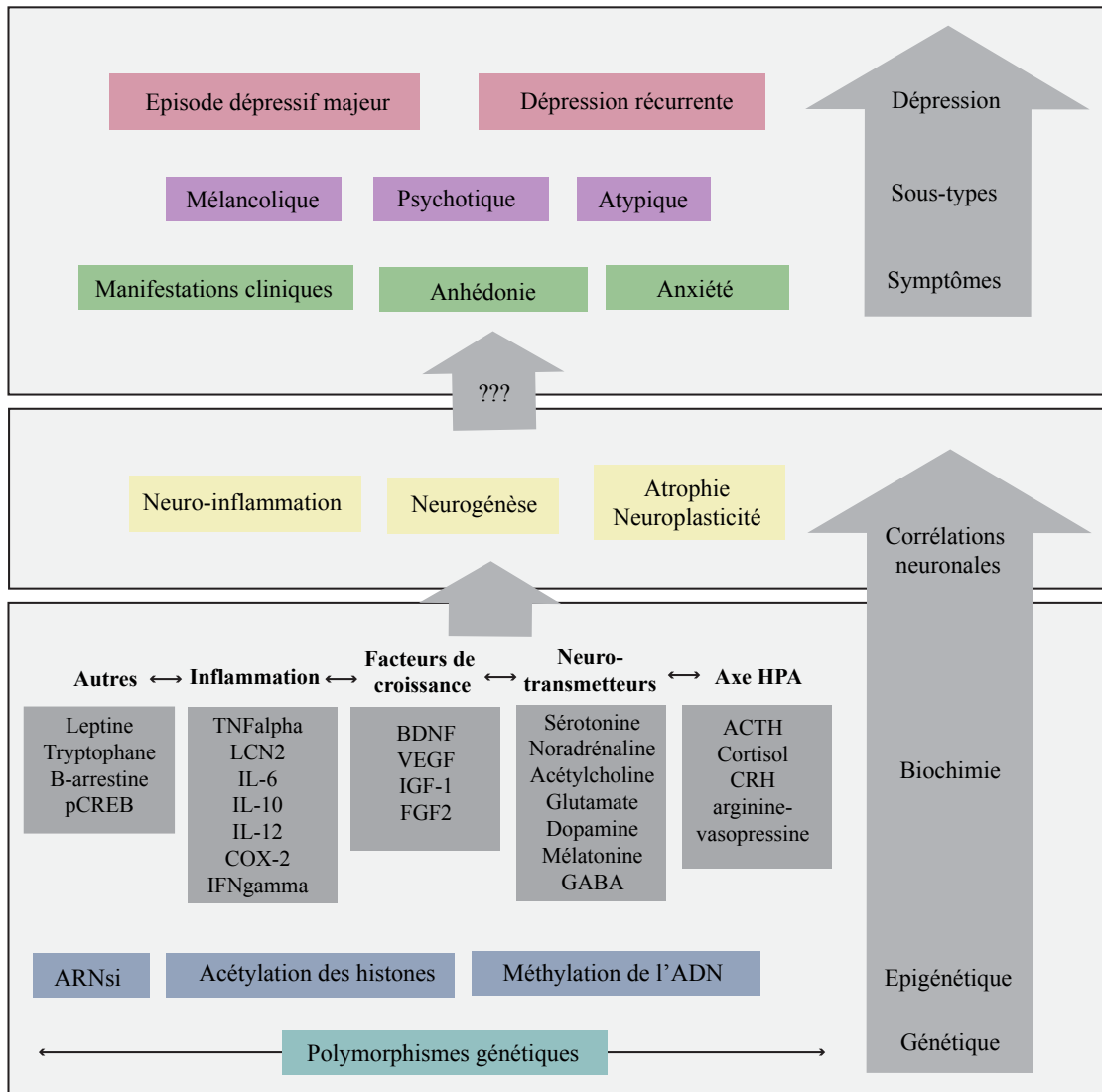


Figure 7 : Schéma reliant les manifestations cliniques aux mécanismes biologiques sous-tendant la dépression majeure.

Il illustre la complexité de la pathologie et des différentes interactions entre les facteurs impliqués dans le processus de la dépression. L'étude de ces interactions permet de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant la pathologie et la réponse au traitement, et ainsi d'identifier des biomarqueurs de la dépression. La première approche consiste à étudier les polymorphismes génétiques afin d'identifier les gènes impliqués dans la pathogénèse. La deuxième approche est l'étude des mécanismes épigénétiques qui permet d'analyser les interactions gènes x environnement. Enfin, la dernière approche, la plus courante, est orientée par les 4 théories de la dépression et elle consiste à quantifier les protéines appartenant à ces voies chez les patients, puis à établir d'éventuels liens entre les variations de ces protéines et la pathologie clinique. Parallèlement, des approches non-orientées par les théories de la dépression, via des études protéomiques dans les fluides humains ou les modèles animaux, sont de bons moyens pour identifier de nouveaux biomarqueurs et découvrir de nouvelles voies physiopathologiques de la maladie. Le lien entre les variations d'expression observées et les manifestations cliniques n'est pas encore totalement élucidé. Les facteurs qui varient de patient à patient, pourraient expliquer la différence dans la symptomatologie de la maladie et refléter les différents sous-groupes. (D'après (Jentsch et al. 2015))

La première approche pour l'identification de biomarqueurs est une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la pathologie afin d'en identifier tous les acteurs qui pourraient potentiellement se révéler être des biomarqueurs de la maladie et de la réponse au

traitement (Figure 7). L'étude de ces mécanismes peut se faire à plusieurs niveaux. Le premier est le niveau génétique, avec les études de polymorphisme de gènes, d'expression de gènes ou bien l'étude des mécanismes épigénétiques, qui permettent de prendre en considération le rôle de l'environnement sur les pathologies. Cependant, d'une part ces approches sont peu sélectives puisque certaines mutations génétiques peuvent être impliquées dans d'autres processus pathologiques (Cattaneo et al. 2013) et d'autre part, les effets de l'environnement sur l'expression des gènes est très important dans les MDD, entraînant une variabilité compliquée à évaluer entre les individus.

Ces dernières années, plusieurs biomarqueurs ont été proposés (Thase 2014). Néanmoins, trouver des biomarqueurs de dépression pertinents est compliqué à cause de certaines limites et contraintes spécifiques à ce type d'études.

Comme mentionné précédemment, les épisodes dépressifs présentent des symptômes très hétérogènes. Autrement dit, 2 patients considérés dépressifs avec la même sévérité peuvent présenter des symptômes très différents, et la source biologique peut également différer. De ce fait, **la sensibilité d'un biomarqueur** pourrait être diminuée et différente d'un patient à un autre (pour revue (Jentsch et al. 2015)).

D'autre part, aucun des processus biologiques impliqués dans la dépression n'est exclusif à cette pathologie, ce qui pose un problème **de spécificité du biomarqueur**. La spécificité et la sensibilité se réfèrent toutes deux à la probabilité qu'un patient souffrant de dépression présente un biomarqueur altéré. Ainsi le biomarqueur « idéal » est sensible et spécifique, afin de permettre d'évaluer l'état pathologique du patient et de quantifier la réponse au traitement de manière la plus fiable possible (Jentsch et al. 2015, Gururajan et al. 2016). De plus, son prélèvement doit être facile et peu onéreux. En effet, il ne faut pas perdre de vue les considérations pratiques de l'utilisation d'un biomarqueur : le coût, le caractère invasif de la méthode de prélèvement, et la disponibilité du matériel nécessaire. Un biomarqueur peut être très sensible et spécifique, mais si son prélèvement coûte très cher ou que le matériel est difficile à se procurer, il ne sera pas privilégié. De la même façon, si le prélèvement est très invasif, par exemple dans le liquide céphalo-rachidien, il ne sera pas préférable de choisir ce biomarqueur.

1.3.1 Sources de prélèvements d'échantillons pour l'analyse de biomarqueurs

Le sang et l'urine restent les sources de collection à privilégier. Etant donné que le sang périphérique contient un grand nombre de cellules différentes, le prélèvement des *cellules*

mononuclées du sang périphérique (PBMCs), contenant monocytes et lymphocytes, est souvent privilégié et préférable car plusieurs données montrent que ces cellules répondent aux stimuli internes et externes de manière similaire aux neurones en termes de profil d'expression de gènes (Liew et al. 2006, Sullivan et al. 2006) et de modifications épigénétiques (Pour revue, (Rao et al. 2013)). Le sérum et le plasma sont également des sources utilisées pour la détection de biomarqueurs. La reproductibilité des mesures est meilleure dans le plasma mais la sensibilité pour la détection de biomarqueurs est supérieure dans le sérum. De plus, le sérum a permis de révéler davantage de potentiels biomarqueurs que dans le plasma. Néanmoins, les taux de métabolites dans le plasma et dans le sérum sont fortement corrélés, ces 2 sources présentent donc un intérêt (Oresic et al. 2011).

	Avantages	Inconvénients
Biopsie cérébrale	Moyen de mesure direct	Présente des risques Difficulté de choisir la région à prélever
Liquide céphalo-rachidien	Directement relié au cerveau	Peu d'études de biomarqueurs robustes
Sang	Prélèvement rapide et facile	Corrélation faible entre le cerveau et le sang Composition hétérogène du sang périphérique : sérum et cellules (leucocytes, lymphocytes et plaquettes) Techniques de purification cellulaire peuvent affecter la stabilité et l'intégrité de l'échantillon
Salive	Prélèvement rapide, facile, non invasif Pas de personnel médical expérimenté requis	Un prélèvement unique est peu fiable à cause des variations circadiennes de l'activité de l'axe HPA
Urine	Prélèvement rapide, facile, non invasif Pas de personnel médical expérimenté requis	Evaluation de l'activité rénale nécessaire Le régime et la médication du patient doit être prise en compte

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des principales sources de prélèvement

1.3.2 Stratégies de découverte de nouveaux biomarqueurs de dépression

Afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs dans le domaine de la dépression, plusieurs stratégies sont disponibles. La méthode la plus directe est l'évaluation dans des échantillons cérébraux. Malheureusement, cette stratégie s'avère limitée puisque lorsqu'on utilise des cerveaux post-mortem, nous avons des échantillons de patients traités tout au long de leur vie par de nombreux traitements successifs et la problématique de la conservation et de la qualité

des échantillons se pose. L'alternative des biopsies cérébrales est intéressante, mais en plus de présenter des risques non négligeables pour le patient, il est compliqué de sélectionner une région cérébrale en particulier pour l'étude, la pathologie impliquant un vaste réseau cérébral. Les techniques de neuro-imagerie semblent par conséquent représenter la méthode directe la plus intéressante, mais le caractère onéreux en empêche l'utilisation à grande échelle. Les stratégies pour identifier des nouveaux biomarqueurs les plus répandues impliquent ainsi les dosages dans des échantillons biologiques ou des méthodes génomiques. Ces méthodes sont faciles, rapides et peu onéreuses mais présentent l'inconvénient majeur d'être des méthodes indirectes d'évaluation de l'état pathologique du cerveau.

L'utilisation d'un modèle animal est donc le meilleur compromis, puisque c'est une méthode directe qui permet de réaliser l'étude dans des conditions contrôlées.

	Avantages	Inconvénients
Etudes cerveau post-mortem	Evaluation directe de l'état pathologique du cerveau	Patients traités par de nombreux traitements successifs Qualité variable des cohortes (long délai post-mortem, conservation des échantillons...)
Biopsie cérébrale	Evaluation directe et patient vivant	Présente des risques Difficulté de choisir la région à prélever à cause du vaste réseau qui connecte les différentes régions impliquées
Dosage de substances dans des échantillons biologiques (hormones, protéines, neurotransmetteurs...)	Facilité de prélèvement et de dosage (dans le sang ou l'urine)	Evaluation indirecte de l'état pathologique du cerveau (après passage par la barrière hémato-encéphalique)
Génomique (qPCR, NGS, GWAS...)	Méthode rapide et peu onéreuse Plusieurs polymorphismes de gènes soupçonnés d'être associés à la dépression	Difficulté de corrélérer le polymorphisme et les symptômes cliniques à cause de la nature multifactorielle de la maladie Manque de spécificité des polymorphismes (Tammiste et al. 2013) Forte influence des mécanismes épigénétiques sur l'expression des gènes (Holden 2009) Evaluation indirecte par le biais d'échantillons sanguins, difficulté d'analyser des échantillons cérébraux
Neuro-imagerie (IRM, PET scan...)	Evaluation directe et rapide Peut permettre d'identifier le sous-type de dépression (Almeida et al. 2009)	Méthode onéreuse
Modèles animaux	Permettent à l'expérience d'être dans des conditions plus contrôlées Evaluation directe des tissus cérébraux	Limites de la translation des données animales à la clinique

Tableau 7 : Différentes stratégies pour identifier des nouveaux biomarqueurs de la dépression
(D'après (Jentsch et al. 2015))

1.3.3 Biomarqueurs de la dépression et de la réponse au traitement

A ce jour, plusieurs potentiels biomarqueurs ont été évalués et leur nombre ne cesse de croître (Jentsch et al. 2015). Dans cette partie, nous ne présenterons que brièvement ceux pour lesquels les résultats semblent les plus prometteurs.

1.3.3.1 *L'axe HPA*

De nombreuses études menées sur l'axe HPA ont montré une altération des concentrations basales de CRH, d'ACTH et du cortisol dans le sang, l'urine et la salive (Chrousos and Gold 1992 , Ehlert et al. 2001 , Merali et al. 2004 , Stetler and Miller 2011) des patients dépressifs par rapport à des patients contrôles. Une augmentation d'ARNm de CRF a également été observée dans l'hypothalamus post-mortem de patients déprimés (Austin et al. 2003)

Quelques études ont analysé l'utilité de la mesure du taux de cortisol pour le diagnostic des épisodes dépressifs et la prédiction de la réponse au traitement (Ising et al. 2007 , Juruena et al. 2013 , Owens et al. 2014). Plusieurs d'entre elles se sont focalisées sur la dérégulation de l'expression des récepteurs au cortisol, les récepteurs minéralocorticoïdes (MR) et glucocorticoïdes (GR), dans les épisodes dépressifs. Si aucune donnée consistante n'a été obtenue pour les GR, des études post-mortem ont montré une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour les MR dans l'hippocampe de patients dépressifs. (Lopez et al. 1998, Klok et al. 2011).

L'inconvénient de ces biomarqueurs repose sur le fait que les anomalies de l'axe HPA ne touchent qu'une catégorie de patients (Stetler and Miller 2011), et que ces anomalies sont aussi impliquées dans d'autres pathologies telles que la schizophrénie (Steen et al. 2014). Cependant, une méta-analyse a montré que ces dérégulations de l'axe HPA étaient le plus souvent observées chez les patients atteints de dépression de type mélancolique ou psychotique (Stetler and Miller 2011). Ces biomarqueurs seraient donc plus intéressants pour **caractériser le sous-type de dépression.**

1.3.3.2 *Les marqueurs de l'inflammation*

Les marqueurs de l'inflammation présentent également un fort intérêt, puisque plusieurs études ont montré que des épisodes dépressifs majeurs entraînent une augmentation dans les PBMCs de l'expression de l'ARNm codant pour plusieurs cytokines inflammatoires telles qu'IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, IFN, MIF et TNF (Belzeaux et al. 2010 , Cattaneo et al. 2013). Pour IFN et IL-10, le taux est normalisé dans les PBMCs après 3 mois de traitement avec de la fluoxétine combinée à l'ECT (Iacob et al. 2013, Iacob et al. 2014).

Par ailleurs, une augmentation des concentrations plasmatiques des cytokines IL-1 et IL-6 a été observée chez les patients dépressifs, et ce de manière corrélée avec le degré de gravité de la pathologie et l'hyperactivité de l'axe HPA (Maes 1995 , Maes et al. 1995).

L'augmentation des concentrations de CRP, IL-6 et TNF- α a été associée avec le développement de symptômes maniaques chez l'Homme (Becking et al. 2013), ce qui en fait également des marqueurs intéressants pour **caractériser ce sous-type de dépression**.

1.3.3.3 *La neurogenèse*

Un grand nombre d'étude s'est focalisé sur les facteurs neurotrophiques et les facteurs de croissance, tels que le **BDNF**, **VEGF**, **FGF** ou **VGF**. Ces molécules sont des protéines homodimériques qui interagissent avec la famille de récepteurs tropomyosine kinase (Trk) modulant ainsi le processus de neurogenèse et la plasticité neuronale dans le système nerveux central et périphérique. Tous ces facteurs seraient impliqués dans la dépression et sont affectés par un traitement antidépresseur et exprimés aussi bien dans le cerveau que dans la circulation périphérique, ce qui fait d'eux de bons candidats en tant que biomarqueur (pour revue (Gururajan et al. 2016).

Le BDNF joue un rôle dans le développement et le fonctionnement du système nerveux adulte, et c'est le facteur neurotrophique qui a été le plus étudié (Brunoni et al. 2008, Sen et al. 2008). Plusieurs études ont rapporté une augmentation du taux d'ARNm de BDNF chez les patients dépressifs par rapport à des patients contrôles (Pandey et al. 2010, Cattaneo et al. 2013, D'Addario et al. 2013) et une normalisation après traitement antidépresseur (Cattaneo et al. 2013). La majorité des méta-analyses ont montré une normalisation de l'expression de BDNF périphérique dans les PBMCs après un traitement antidépresseur corrélée à une amélioration des manifestations cliniques chez le patient (Sen et al. 2008, Molendijk et al. 2014). Par ailleurs, une étude récente a montré que le BDNF avait une haute sensibilité et spécificité en tant que biomarqueur de dépression (respectivement 83,9% et 93%). (Karlovic et al. 2013). En ce qui concerne les autres facteurs de croissance, une étude a montré que le facteur neurotrophique VEGF pouvait prédire la réponse au traitement (Minelli et al. 2011, Halmai et al. 2013).

Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour réellement prouver l'utilité de la quantification de FGF, VGF ou encore VEGF en tant que biomarqueurs.

Très peu d'études se sont focalisées sur l'intérêt du récepteur du BDNF, TrkB, en tant que biomarqueur. Une seule étude a reporté une diminution de l'expression de l'ARNm de TrkB dans le locus coeruleus post-mortem de patients dépressifs (Bernard et al. 2011).

1.3.4 *Biomarqueurs de la TRD*

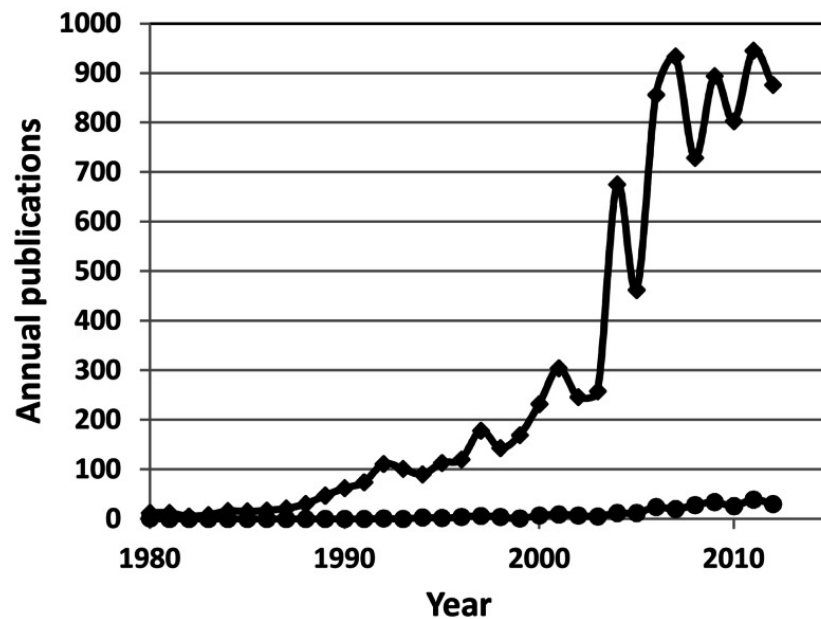


Figure 8 : Nombre de publications annuelles sur les biomarqueurs humains de la MDD (losanges) et sur les biomarqueurs humains de la TRD (ronds) (Smith 2013)

Comme mentionné précédemment, l'un des problèmes majeurs de la dépression est la difficulté à traiter cette pathologie. Des efforts particuliers ont été fournis afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs permettant de prédire la réponse au traitement, l'objectif étant de parvenir à mieux cibler dès la mise en place de la thérapeutique, le traitement idéal pour chaque patient (Figure 8). Dans ce cas, le biomarqueur se définit comme un facteur qui indique pour qui et sous quelles conditions le traitement pourrait fonctionner. A ce jour, il n'existe aucun outil disponible permettant de prédire *a priori* ou dès le début du traitement avec un haut degré de certitude la réponse du patient. Ainsi, l'identification du traitement le plus approprié pour le patient se fait au travers des divers essais et des échecs thérapeutiques. Bien que certaines pistes prometteuses aient été explorées (Guilloux et al., 2015), très peu de biomarqueurs ont montré un solide potentiel pour prédire la réponse au traitement, beaucoup de résultats sont contradictoires, et de manière générale l'état des investigations est encore à un stade très peu avancé. Les études se sont principalement focalisés sur l'axe HPA, la voie immuno-inflammatoire et l'imagerie cérébrale.

1.3.4.1 Test à la dexaméthasone

Le test à la dexaméthasone est un test bien connu montrant qu'une injection de dexaméthasone entraîne une diminution du taux de cortisol chez les patients dépressifs (Heuser et al. 1994). Par ailleurs, l'augmentation de CRH est associée à une augmentation de symptômes cliniques tels que l'anhédonie, ou la diminution de l'appétit. Par conséquent, un

test combinant CRH et dexaméthasone a été imaginé afin d'évaluer l'état du système HPA et d'augmenter le pouvoir diagnostique du test à la dexaméthasone (DST).

Ce test s'est avéré plutôt efficace comme prédicteur de la réponse au traitement puisque les patients pour qui les altérations de l'axe HPA sont persistantes présentent un risque plus important de rechute ou de résistance aux traitements antidépresseurs (ISRSs, ISRNs, TCA, mirtazapine, tianeptine) (Ising et al. 2007). Ceci suggère donc que le test **CRH/DEX** pourrait potentiellement être un biomarqueur prédictif de la réponse au traitement dans le cadre du suivi du patient. Cependant, des résultats CRH/DEX anormaux sont aussi observables dans d'autres pathologies psychiatriques (épisodes maniaques, schizophrénie (Heuser et al. 1994)) ce qui en réduit sa spécificité.

Par ailleurs, il est possible de réaliser ce test en préclinique, ce qui présente un intérêt pour la découverte de biomarqueurs chez les animaux, et permet de faire un parallèle entre les résultats obtenus en clinique et en préclinique (Ridder et al. 2005, Kolber et al. 2008).

1.3.4.2 *Utilisation de l'imagerie cérébrale*

L'imagerie cérébrale est également un moyen qui pourrait permettre de prédire la réponse au traitement, notamment en **estimant le volume des régions cérébrales**. Une étude IRM comparant la différence de la taille des structures cérébrales entre des patients sains, ceux en rémission, et ceux souffrant de TRD a ainsi montré que ces derniers présentaient un volume de l'hippocampe antérieur gauche inférieur aux deux autres groupes (Shah et al. 1998). Une étude intéressante donne beaucoup d'espoir quant à l'utilisation de l'IRM. Elle inclut des patients diagnostiqués dépressifs majeurs depuis peu, et elle montre une **hyperintensité de la substance blanche** dans les régions sous-corticales chez les patients qui s'avéreront être non-répondeurs au traitement par la suite (Simpson et al. 1998). Autrement dit, il serait possible grâce à des mesures par IRM de prédire la non-réponse au traitement.

Une autre étude utilisant **la technique du PET scan** a montré que cette technique était également réalisable pour prédire la réponse au traitement. Une diminution de la fixation de mirtazapine radiomarquée ($[^{11}\text{C}]$ mirtazapine) dans les régions du cortex cérébral et des ganglions basaux chez les patients non-répondeurs par rapport aux patients sains, révélant une altération de sa fixation sur les neuro-récepteurs des non-répondeurs, a été mesurée (Smith et al. 2009).

Le Tableau 8 présente l'ensemble des facteurs explorés pour leur potentielle utilisation en tant que biomarqueur, ainsi que les limites liées à ces études. Les 2 limites que l'on retrouve dans

la majorité des travaux sont soit un nombre de patients peu important, soit des études avec des analyses *post-hoc*, ce qui complique l'utilisation de ces biomarqueurs en tant que biomarqueurs prédictifs.

Pistes de biomarqueurs explorées		Résultats	Limites	Articles
Périphériques	Cytokines et stéroïdes	Action suppressive de la dexaméthasone sur TNF est inférieure chez les patients TRD par rapport à des patients sains	Etudes <i>post-hoc</i>	(Bauer et al. 2002)
		Taux plasmatiques de TNF et IL-6 supérieurs chez les patients TRD aux ISRSs par rapport aux patients répondeurs	Etude <i>post-hoc</i> Résultats contradictoires	(O'Brien et al. 2007) (Raison et al. 2013)
		Ratio plasmatique cortisol/DHEA supérieur chez les patients TRD par rapport aux patients sains	Pas de corrélation entre le biomarqueur et l'état clinique des patients	(Markopoulou et al. 2009)
		Les patients avec un taux de CRP pré-traitement inférieur répondent mieux à l'escitalopram tandis que ceux qui ont un taux supérieur répondent mieux à la nortriptyline	Nombre de patients peu élevé, nécessite réplique dans une cohorte plus importante	(Uher et al. 2012)
		Taux basal avant traitement d'IL-6 dans le sérum est supérieur chez les répondeurs par rapport aux non-répondeurs à la kétamine	Etude nécessite d'être répliquée dans une plus large cohorte	(Yang et al. 2015)
	BDNF	Combinaison d'un polymorphisme génétique de BDNF et 5-HT1A associé à la TRD	Nombre de patients peu élevé	(Anttila et al. 2007)
		Augmentation du taux plasmatique de BDNF induit par une injection de kétamine plus élevé chez les répondeurs par rapport aux non répondeurs à la kétamine	Nombre de patients peu élevé Pas de mesure directe du BDNF au niveau central	(Haile et al. 2014)
Centraux	Métabolites de monoamines dans le LCR	Concentration supérieure d'acide homovanillique dans le LCR de patients TRD	Etude <i>post-hoc</i>	(Aklillu et al. 2009)
		Diminution de la concentration de neuropeptide Y dans le LCR des patients TRD	Etude nécessite d'être répliquée dans une plus large cohorte	(Heilig et al. 2004)
	IRM structurelle	Diminution de la taille de l'hippocampe antérieur gauche chez les patients TRD par rapport aux patients sains et en rémission	Etude <i>post-hoc</i>	(Shah et al. 1998)

		Diminution de la substance grise et de la substance blanche dans le cortex et le cervelet chez les patients TRD	Etude <i>post-hoc</i>	(Liu et al. 2012)
		Hyper intensité de la substance blanche dans les régions sous-corticales chez les patients qui s'avéreront être résistants au traitement par la suite	Etude <i>post-hoc</i>	(Simpson et al. 1998)
	Troubles vasculaires cérébraux	Vitesse d'écoulement du LCR inférieure et angiopathies cérébrales plus prononcées chez les patients TRD	Etude <i>post-hoc</i>	(Naish et al. 2006)
	IRM fonctionnelle	Connectivité fonctionnelle entre les régions cérébrales inférieure chez les patients TRD par rapport à des patients sains. Le réseau dysfonctionnel : amygdale gauche, cortex cingulé antérieur, cortex insulaire droit, et cortex precuneus constituerait un biomarqueur de la TRD	Etude <i>post-hoc</i>	(Li et al. 2013)
		Des données d'IRM fonctionnelle pré-ECT ont montré que les patients répondeurs et non-répondeurs aux ECT présentent un profil de connectivité neuronale différent, notamment dans le cortex cingulé, le cortex médian et le cortex orbito-frontal.	Données préliminaires nécessitant d'être confirmées	(van Waarde et al. 2015)
	PET scan	Diminution de la fixation de la mirtazapine radiomarquée dans les régions du cortex cérébral et des ganglions basaux chez les patients TRD par rapport aux patients sains	Etude <i>post-hoc</i>	(Smith et al. 2009)

Tableau 8 : Pistes de biomarqueurs de la TRD ayant fait l'objet d'investigations

Parmi les différents biomarqueurs de la dépression et de la réponse aux antidépresseurs, nous sommes plus particulièrement intéressé aux β -arrestines, dont une diminution d'expression a été observée chez les patients dépressifs et corrigée après traitement antidépresseur (citalopram 20-40 mg/j ou venlafaxine 150-225 mg/j) (Avissar et al. 2004 , Matuzany-Ruban et al. 2005). De plus, il a été observé qu'un traitement chronique avec la fluoxétine chez des animaux traités par corticostérone provoquait une augmentation de l'expression de β -arrestine dans l'hypothalamus et l'hippocampe chez la souris adulte (David et al. 2009, Mendez-David et al. 2013). **Les protéines β -arrestines 1 et 2** pourraient donc être des déterminants moléculaires importants impliqués dans la réponse thérapeutique dans le cadre d'un épisode dépressif caractérisé.

1.4 La protéine β -arrestine 1, un biomarqueur périphérique et central de la dépression et de la réponse antidépressive ?

1.4.1 Généralités sur les protéines β -arrestines

Les arrestines constituent une famille de protéines qui sont capables d'interagir avec les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à la suite de leur activation par un agoniste (DeWire et al. 2007). Quatre membres de la famille des arrestines ont été identifiés :

- Arrestine 1 ou arrestine visuelle codée par le gène *SAG*
- Arrestine 2 ou β -arrestine 1 codée par le gène *ARRB1*
- Arrestine 3 ou β -arrestine 2 codée par le gène *ARRB2*
- Arrestine 4 ou arrestine conale codée par le gène *ARR3*

Les arrestines 1 et 4 sont exprimées presque exclusivement dans la rétine, où elles régulent la fonction de photorécepteurs : la rhodopsine et les opsines colorées (Pfister et al. 1985, Craft et al. 1994). Les protéines β -arrestine 1 et β -arrestine 2 sont des protéines ubiquitaires, c'est-à-dire qu'elles sont exprimées dans l'ensemble de l'organisme (Lohse et al. 1990 , Parruti et al. 1993). De manière intéressante, on les trouve exprimées abondamment dans le cerveau mais aussi dans les leucocytes du sang périphérique (Parruti et al. 1993), ce qui renforce leur intérêt en tant que biomarqueurs. D'autre part, comme leur nom l'indique, les β -arrestines ont tout d'abord été identifiées pour leur capacité à « arrêter » la signalisation du récepteur β_2 adrénergique stimulé par un agoniste. Elles sont donc initialement connues comme des régulateurs négatifs de la signalisation des RCPG (Lefkowitz and Whalen 2004).

1.4.2 Répartition cérébrale de la β -arrestine 1

Bien qu'elle soit présente dans l'ensemble des cellules de l'organisme, la β -arrestine 1 est exprimée en quantités importantes dans certaines régions cérébrales. Des analyses d'hybridation *in situ* (Allen Brain Atlas), ont permis de mettre en évidence la présence de la β -arrestine 1 au **niveau des bulbes olfactifs et de l'hippocampe** (Figure 9), deux régions cérébrales capables d'effectuer le processus de neurogenèse hippocampique chez le rongeur et l'Homme adulte.

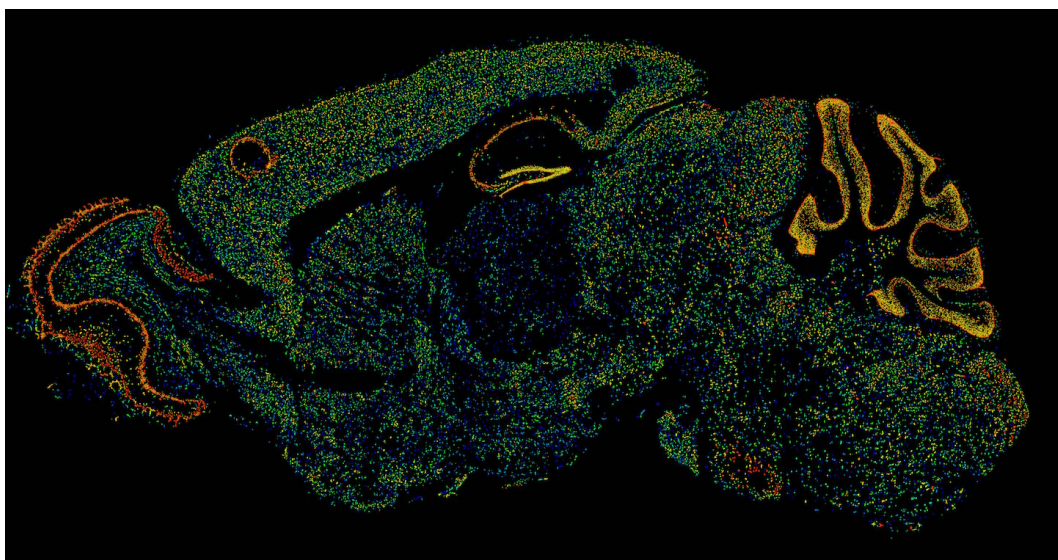


Figure 9 : Expression de la β -arrestine 1 dans le système nerveux central par une technique d'hybridation *in situ* (souris)

D'après Allen Brain Atlas

1.4.3 Structure et mécanismes d'action de la protéine β -arrestine 1`

La cristallographie a permis de décrire précisément la structure tridimensionnelle de la protéine β -arrestine 1 ainsi que les changements de conformation observés lors de son activation. Ainsi, la protéine β -arrestine 1 est une molécule de forme allongée possédant un noyau polaire central et sept boucles, incluant la « *finger loop* », la « *middle loop* » et la « *ariat loop* » encadrées de part et d'autre par des domaines N et C-terminaux qui permettent l'interaction avec les RCPG (Shukla et al. 2013) (Figure 10). Lors de son activation, la protéine β -arrestine 1 change de conformation au niveau de ces trois boucles, un changement qui applique une force de torsion sur les domaines N et C-terminaux de la protéine β -arrestine 1. Les régions N et C terminales constituent des domaines fonctionnels majeurs pour le mécanisme de la protéine β -arrestine 1 :

- le domaine N est responsable de la reconnaissance du récepteur à 7 domaines transmembranaires activé
- le domaine C est responsable de la reconnaissance secondaire du récepteur

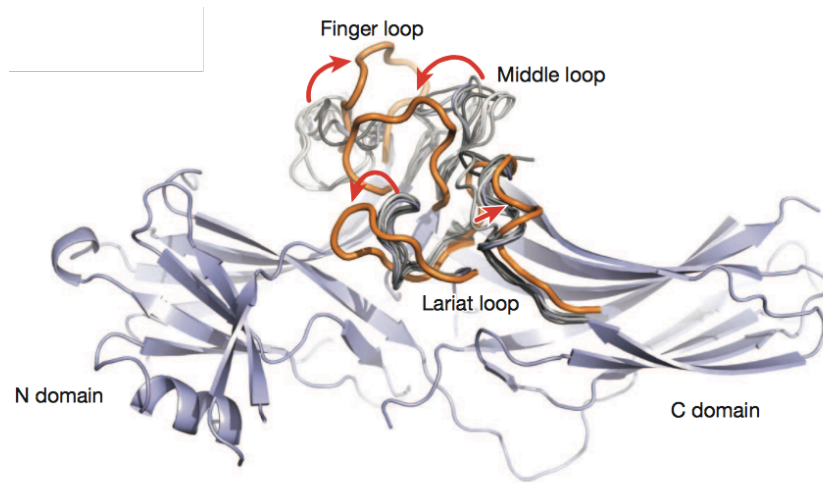


Figure 10 : Structure cristallographique de la protéine β-arrestine 1

La protéine β-arrestine 1 possède une grande flexibilité conformationnelle au niveau de ses boucles. La protéine β-arrestine 1 est inactive lorsque les boucles sont dans la conformation grise et active lorsqu'elles sont dans la conformation orange. D'après (Shukla et al. 2013)

De nouveaux rôles ont été découverts pour les β-arrestines tels que la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs (Lefkowitz and Whalen 2004) (Figure 11). Suite à leur activation par un agoniste, le RCPG est phosphorylé par des kinases RCPG appelées GRK (récepteur couplé à une kinase). Les β-arrestines, capables de reconnaître les sites de phosphorylation sur le RCPG activé, vont créer une liaison robuste avec le récepteur. Cette liaison β-arrestine/RCPG de forte affinité empêche le récepteur de se coupler avec sa protéine G apparentée, de telle sorte que malgré l'activation continue du récepteur par l'agoniste, il ne peut pas échanger le groupement GTP sur la sous-unité de la protéine G pour du GDP, causant alors une désensibilisation de la signalisation de la protéine G via les seconds messagers. Les β-arrestines servent ainsi d'inhibiteurs de signal de transduction (Lefkowitz and Whalen 2004, Violin and Lefkowitz 2007, Golan et al. 2010, Shenoy and Lefkowitz 2011).

En plus de leur rôle dans la désensibilisation des RCPG, les β-arrestines interagissent également avec des protéines de la machinerie endocytaire comme la clathrine et une protéine

adaptatrice (AP-2) permettant ainsi l'internalisation des récepteurs via des vésicules couplées à la clathrine (Lefkowitz and Whalen 2004)

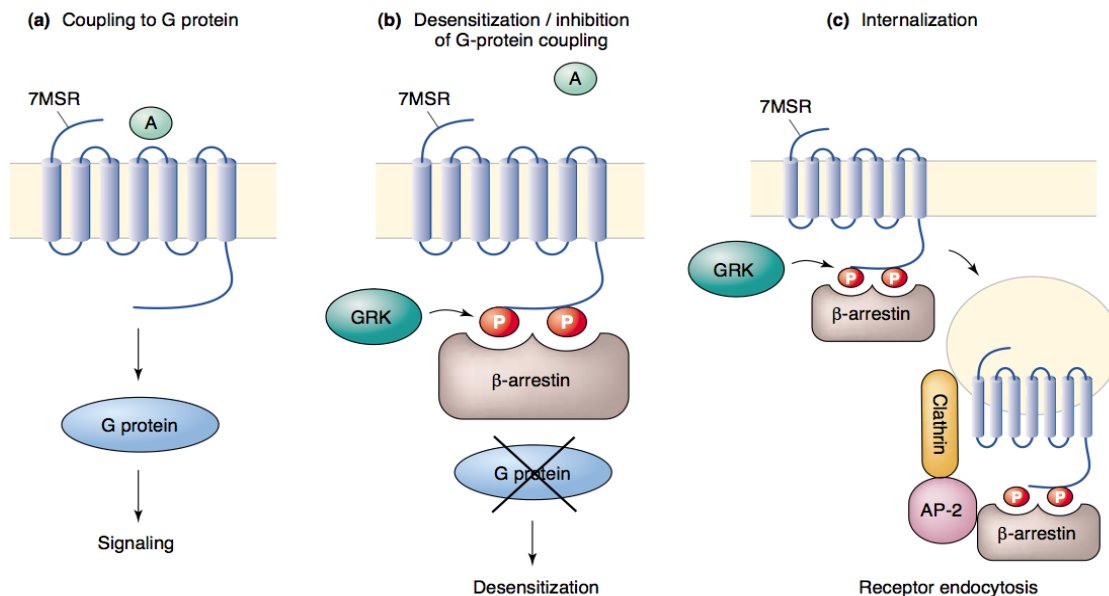


Figure 11 : Mécanisme d'action de la protéine β -arrestine

(a) les RCPG sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7 MSR) activés par un agoniste, activant ainsi un second messenger et induisant le déclenchement des voies de signalisation ; (b) Le récepteur est d'abord phosphorylé par les enzymes kinases GRK qui reconnaissent le signal puis, la β -arrestine est recrutée. Elle se loge à la place de la protéine G, achevant le mécanisme de désensibilisation du récepteur et empêchant la transduction du signal ; (c) Une fois fixée au récepteur, la β -arrestine est capable de se lier à la machinerie d'endocytose (issu de (Lefkowitz and Whalen 2004)).

Bien que la plupart des recherches concernant les processus de désensibilisation et d'internalisation d'un RCPG ait été réalisée sur des récepteurs β_2 -adrénergiques, ce processus régule la fonction de nombreux autres RCPG dont les récepteurs sérotoninergiques, dopaminergiques, muscariniques et cholinergiques (Schreiber et al. 2009).

1.4.4 Implication de la protéine β -arrestine 1 dans les troubles de l'humeur

De nombreuses études indiquent que les β -arrestines sont des protéines régulant les récepteurs couplés au protéine G, jouant ainsi un rôle majeur dans la physiopathologie des troubles de l'humeur et dans les mécanismes d'action des antidépresseurs (Avisar et al. 2004 , Matuzany-Ruban et al. 2005 , Beaulieu et al. 2008 , David et al. 2009 , Schreiber et al. 2009, Golan et al. 2010 , Alam et al. 2015). La cascade de signalisation impliquant la β -arrestine présente un intérêt majeur pour sa potentielle utilisation comme biomarqueur biochimique en pratique clinique pour la pathologie dépressive et la prédiction de réponse aux antidépresseurs (pour revue, voir (Schreiber et al. 2009) pour plusieurs raisons :

- Il existe un lien entre **l'expression de la protéine β -arrestine 1 dans les leucocytes périphériques, les épisodes dépressifs majeurs et la réponse à un traitement antidépresseur** (Avissar et al. 2004). Les taux de β -arrestine 1 ont été mesurés dans des leucocytes mononucléaires de patients déprimés et il a ainsi été démontré que l'expression de β -arrestine 1 est significativement diminuée chez ces patients en comparaison avec les patients sains (Figure 12A). De plus, les taux protéiques de β -arrestine 1 sont corrélés à la sévérité de la symptomatologie dépressive (Figure 12B) (Avissar et al. 2004, Schreiber et al. 2009).

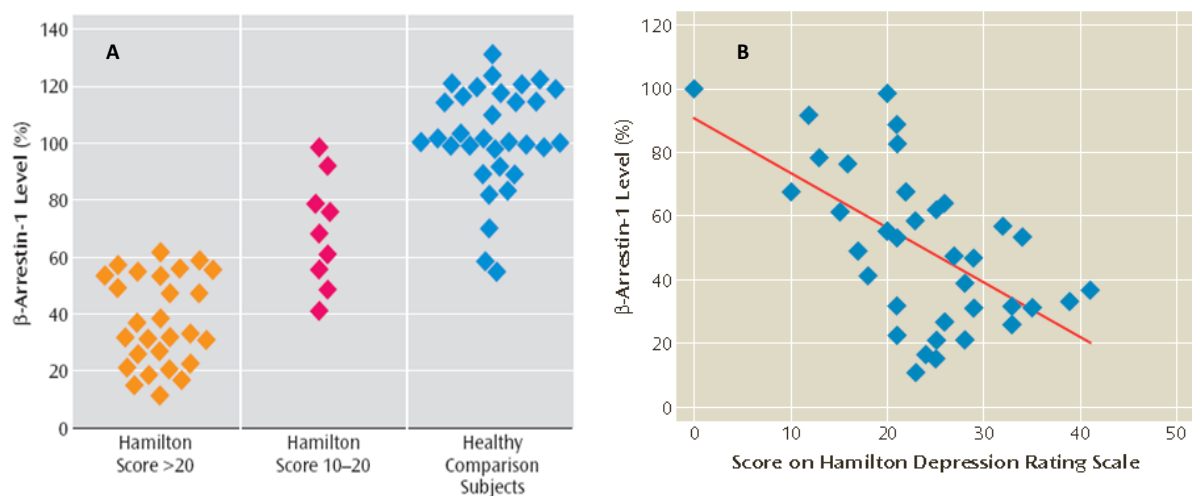


Figure 12 : Expression de la β -arrestine 1 réduite dans les leucocytes de patients déprimés et corrélation entre les concentrations de β -arrestine 1 et la sévérité des symptômes dépressifs.

(A) L'expression de β -arrestine 1 est significativement réduite dans les cellules leucocytaires mononucléaires de patients souffrant d'épisode dépressif majeur selon l'échelle d'Hamilton en comparaison avec des volontaires sains ; (B) : le degré de la réduction des concentrations de β -arrestine 1 est corrélée de manière significative à la sévérité des épisodes dépressifs. D'après (Avissar et al., 2004).

- Dans la même étude, les auteurs ont montré que la diminution de l'ARNm codant pour la protéine β -arrestine 1 était corrigée par un traitement chronique par antidépresseurs (citalopram ou venlafaxine) (Figure 13A)
- Une autre étude a montré une association entre un polymorphisme du gène *ARRB1* codant pour la β -arrestine 1 et la réponse à la mirtazapine, antidépresseur avec une action noradrénergique et sérotoninergique via l'action sur les récepteurs α_2 et 5-HT₂ (Chang et al. 2015). Ce polymorphisme aurait un effet bénéfique sur la réponse à cet antidépresseur, et en ferait un biomarqueur génétique prometteur pour prédire la réponse à la mirtazapine.

En ce qui concerne les données précliniques, chez des rats naïfs ou des souris, les ISRS, les ISRN et certains antidépresseurs non sélectifs de la recapture de la sérotonine comme l'imipramine ou la désipramine élèvent significativement les taux de la protéine β -arrestine au dans le cortex et l'hippocampe (Avissar et al. 2004 , Beaulieu et al. 2008 , David et al. 2009). De la même façon, l'expression de la β -arrestine est diminuée dans l'hypothalamus et l'hippocampe chez des souris anxio-déprimés ayant été exposées à une administration chronique de corticostérone. Un traitement chronique avec de la fluoxétine (18mg/kg/j pendant 3 semaines) est capable d'empêcher cette diminution (David et al. 2009)(Figure 13B). Enfin, la signalisation des β -arrestines 1 et 2 est impliquée dans la médiation de la réponse à la fluoxétine et au lithium (Beaulieu et al. 2008 , David et al. 2009).

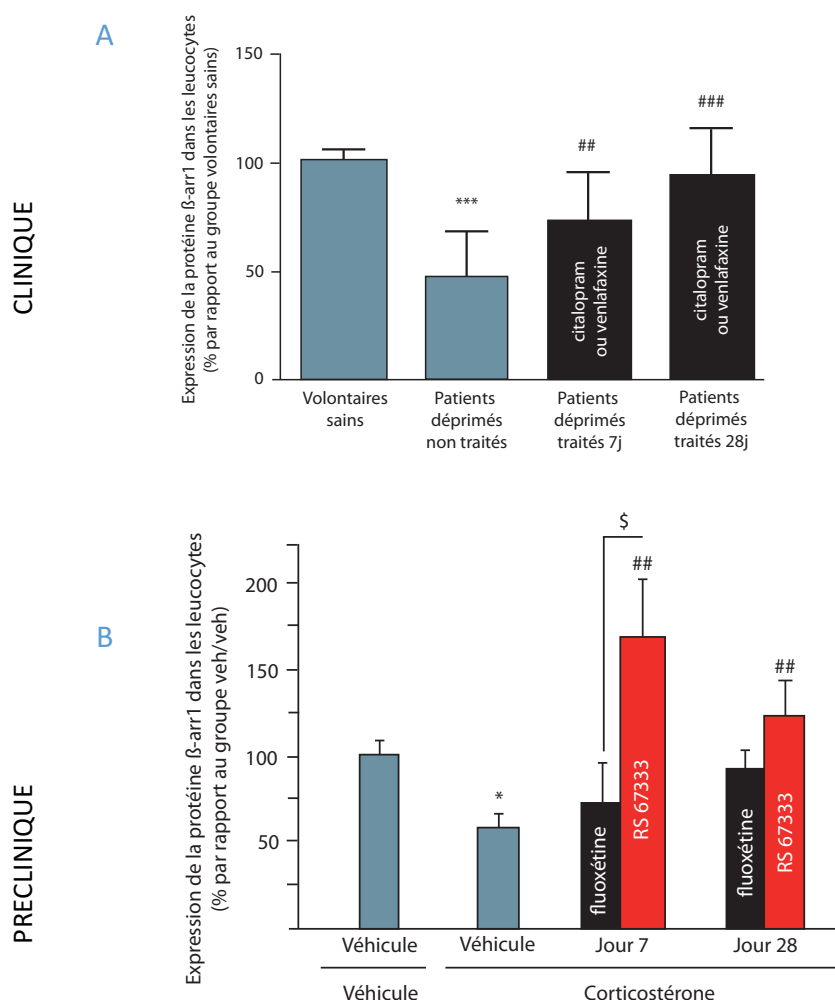


Figure 13: Expression de la protéine β -arrestine 1 dans les leucocytes de patients déprimés ou de souris anxio-déprimées non traité(e)s et après traitements antidépresseurs.

(A) Les patients déprimés montrent une diminution de l'expression de la β -arrestine 1 dans les leucocytes, rétablie par un traitement par le citalopram ou la venlafaxine. (B) Cette diminution, retrouvée chez les animaux présentant un phénotype de type anxio/dépressif est corrigée après un traitement chronique par la fluoxétine ou par le RS67333. *** $p < 0.001$ vs volontaires sains ; ## $p < 0.01$ et ### $p < 0.001$ vs patients déprimés non traités. * $p < 0.05$ vs Véhicule/Véhicule ; ## $p < 0.01$ vs CORT/Véhicule ; \$ $p < 0,05$ vs CORT/Fluoxétine (Avissar et al. 2004 , Mendez-David et al. 2015)

En se basant sur ces résultats précliniques, notre laboratoire a développé une technique permettant d'extraire et d'isoler les PBMCs du sang total d'un modèle de souris anxio-dépressives (Mendez-David et al. 2013). Dans un premier temps, les résultats cliniques ont été confirmés : les animaux traités par la CORT pendant 4 semaines affichant un phénotype anxio-dépressif, présentent **une diminution de l'expression de la protéine β -arrestine 1** dans les PBMCs, une altération qui est corrigée après 28 jours de traitement par la fluoxétine (18 mg/kg/j) (Mendez-David et al. 2013).

MATERIEL ET METHODES

2 Matériel et Méthodes

2.1 Animaux

2.1.1 *Choix du modèle animal d'anxiété/dépression*

Développer un modèle animal fiable et adapté est indispensable pour comprendre la dynamique de la pathologie humaine, mais également pour étudier les mécanismes de non-réponse au traitement. Il est donc crucial de développer un modèle dans lequel on pourra **induire un phénotype anxio-dépressif** d'une part, puis **observer une non-réponse aux antidépresseurs** d'autre part. Quelques modèles animaux d'anxiété et de dépression sont fréquemment utilisés pour cribler de nouveaux composés ayant un potentiel antidépresseur. Les différentes approches de modélisation animale en neuropsychologie peuvent être regroupées par approche génétique, pharmacologique, comportementale ou par lésion (Nestler and Hyman 2010). Le tableau qui suit présente différents protocoles de stress chronique fréquemment utilisés dans les études précliniques en neuropharmacologie (Tableau 9). Les premiers modèles présentés sont d'excellents modèles animaux permettant d'étudier la physiopathologie des troubles dépressifs, car on observe des animaux qui vont présenter un phénotype anxio-dépressif après ces stress répétés, tandis que d'autres animaux y seront résilients. L'inconvénient majeur de ces modèles est qu'ils nécessitent d'inclure un nombre important d'animaux dans l'étude afin d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant un phénotype anxio-dépressif à l'issue du protocole. En effet une proportion non négligeable d'animaux présente une résilience à ces stress et sera donc exclue de l'expérimentation.

En ce qui concerne le modèle CORT, des travaux préliminaires et basés sur un seul test comportemental (le novelty suppressed feeding), ont permis de montrer qu'un phénotype anxio-dépressif était induit chez **plus de 90% des animaux** après administration de corticostérone (David et al., 2009 ; Rainer et al., 2012 ; Samuels et al., 2011, Figure 14). Par ailleurs, ces mêmes travaux ont permis de distinguer deux sous-populations de souris après un traitement antidépresseur par fluoxétine : des répondeuses et des non-répondeuses (environ 30% des animaux). Ce modèle semble donc être le plus approprié dans le cadre d'une étude de non-réponse, puisqu'il nous permet d'obtenir un grand nombre d'animaux présentant un phénotype anxio-dépressif, mais également un nombre suffisant d'animaux non-répondeurs à la fin du protocole.

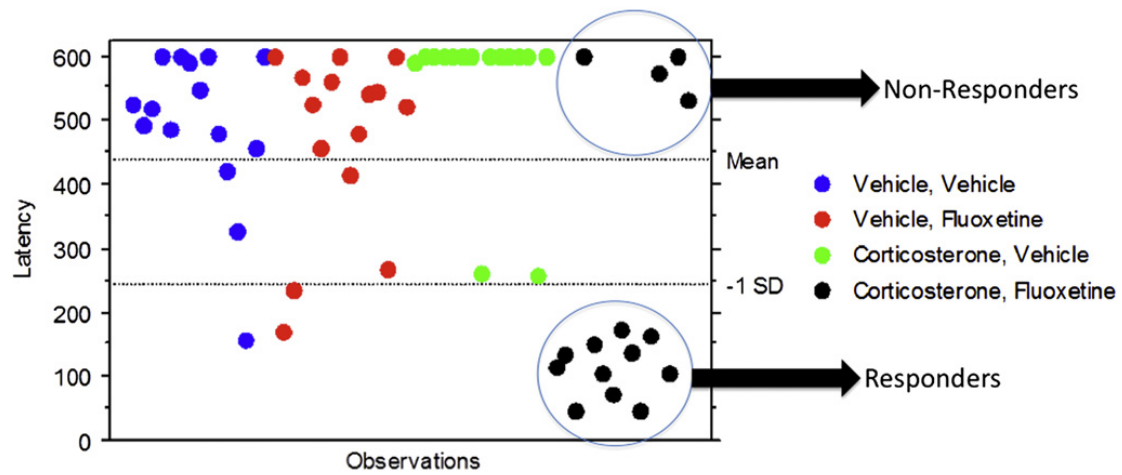


Figure 14 : Répondeurs et non-répondeurs à un traitement antidépresseur dans le Novelty Suppressed Feeding

On observe dans ce test une augmentation de la latence à aller se nourrir chez les souris traitées par corticostérone (ronds verts) en comparaison des contrôles (ronds bleus). Après traitement chronique par de la fluoxétine (28 jours, 18mg/kg/j, ronds noirs), on observe une distribution bimodale des animaux, avec un groupe d'animaux répondeurs et un groupe d'animaux non-répondeurs. D'après (Samuels et al. 2011)

Tableau 9 : Modèles chroniques d'anxiété/dépression chez le rongeur.

Type de stress	Nom du modèle	Durée du stress	Principe du stress	Avantages	Limites	Références
Stress environnementaux	Stress prénatal	1 à 4 semaines	Stress exercé sur une femelle gestante	-étude de l'impact du stress pendant période de gestation sur individu adulte	Validité prédictive et de construction	(Maccari and Morley-Fletcher 2007)
	Résignation apprise	≈10 jours	Stress majeurs par chocs électriques exercés pendant une période de conditionnement, suivi d'une période de test	-validité prédictive, faciale et de construction	-grande variabilité d'exécution -disparition du phénotype après arrêt des chocs	(Chourbaji et al. 2005, Hajszan et al. 2009)
	Stress imprédictible modéré chronique	3 à 4 semaines	Série aléatoire de situations stressantes pour l'animal (altération des rythmes circadiens, isolement social, présence d'odeurs de prédateurs dans la cage, humidification de la sciure...)	-stress légers et aléatoires -conservation des altérations induites après l'arrêt du protocole -validité prédictive, faciale et de construction	-manque de reproductibilité -protocole contraignant	(Mineur et al. 2003, Pothion et al. 2004, Willner 2005)
Interaction sociale	Défaite sociale	Au moins 3 semaines	Souris A placée en présence d'une souris de souche différente, B, plus agressive, de façon répétée	-validité faciale et prédictive	-protocole non réalisable chez les femelles	(Buwalda et al. 2005, Krishnan et al. 2007)
	Séparation maternelle	24h au 9 ^{ème} jour ou 3-4h par jour, plusieurs jours consécutifs	Séparation post-natale de la mère avec ses petits	-étude de l'impact des événements stressants en début de vie sur individu adulte	-validité de construction	(Finamore and Port 2000)
Pharmacologique	CORT	28 jours	Administration chronique et exogène de glucocorticoïdes	-facilité de mise en place du protocole -bonne reproductibilité -validité faciale et prédictive	-validité de construction	(David et al. 2009, Gourley et al. 2009)

2.1.2 Modèle d'administration chronique à la corticostérone

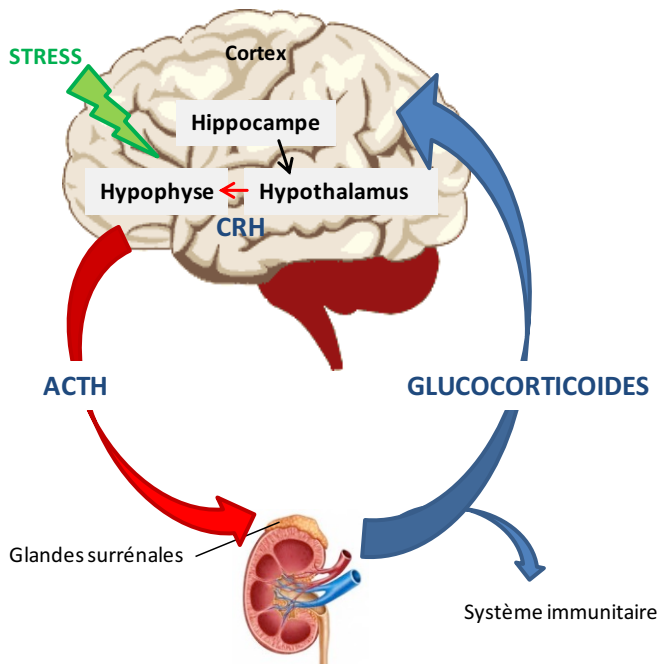


Figure 15 : Système de réponse au stress via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Les glandes surrénales produisent du cortisol chez l'Homme et de la corticostérone chez la souris. **CRH** : corticotropin-releasing hormone ; **ACTH** : adrenocorticotrophic hormone

Les stress sociaux ou le stress chronique induisent des perturbations de l'axe HPA chez le rongeur se matérialisant par une augmentation des concentrations plasmatiques en glucocorticoïdes (corticostérone pour les Rongeurs) (Grippe et al. 2006). Ainsi, le modèle développé à partir de l'augmentation des concentrations en glucocorticoïdes par l'apport de corticostérone exogène (CORT) soit par injection sous-cutanée, pompe osmotique ou plus simplement par l'intermédiaire de l'eau de boisson ou dans la nourriture, permet d'étudier directement l'influence des glucocorticoïdes sur le développement du phénotype anxio-

dépressifs (Figure 15).

2.1.2.1 Conséquences phénotypiques comportementales d'un régime chronique de corticostérone chez le rongeur

L'administration répétée de CORT semble inhiber le comportement sexuel (Gorzalka et al. 2001), provoque une diminution de la prise de saccharose (Gourley and Taylor 2009), mais également une diminution de la réponse à un renforcement alimentaire (Gourley et al. 2008) ainsi que du toilettage (David et al. 2009), tous ces paramètres étant indicateurs d'une anhédonie. En plus de l'anhédonie apparente, il apparaît que les animaux développent un phénotype anxio-dépressif à travers l'évaluation comportementale dans le labyrinthe en croix surélevée (Pego et al. 2008), la double enceinte éclairée (Murray et al. 2008), le test d'odeur de prédateur (Kalynchuk et al. 2004), ou encore dans le test d'hyponéophagie induite par la nouveauté, et le test du champ ouvert (Gregus et al. 2005, David et al. 2009). L'apparition d'un phénotype de dépression sans phénotype anxieux est rarement référencée chez les

patients (Mineka et al. 1998), ce qui renforce les résultats obtenus par ce modèle. D'autres marqueurs physiologiques d'anxiété-dépression sont également altérés, notamment la dérégulation des fonctions et des concentrations des acteurs de l'axe HPA, la prise de poids et l'atrophie des glandes surrénales (Gourley et al. 2008 , Murray et al. 2008). Cependant, de réelles données relatives aux constituants neurobiochimiques de l'axe HPA durant le protocole de stress restent à ce jour peu renseignées. La majorité des comportements induits par ce modèle est corrigée par l'administration chronique d'antidépresseurs (Ago et al. 2008 , David et al. 2009 , Rainer et al. 2012), renforçant la validité prédictive de modèle préclinique de la dépression humaine.

2.1.2.2 *Conséquences structurelles et moléculaires d'un régime chronique par de la corticostérone*

Au-delà des modifications comportementales induites par l'administration chronique de CORT, ce modèle provoque également des modifications structurales liées à la plasticité et notamment la diminution du processus de prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans l'hippocampe (Malberg et al. 2000, David et al. 2009). Plusieurs études ont pu mettre en évidence que les atteintes de la plasticité se localisent dans les régions cérébrales clefs impliquées dans la dépression. En effet, il a été observé un remodelage dendritique induit par la CORT dans l'hippocampe (Watanabe et al. 1992, Magarinos et al. 1999 , Southwick et al. 2005), l'amygdale (Mitra and Sapolsky 2008), et le cortex préfrontal, (Seib and Wellman 2003). Ces résultats sont également retrouvés après des études *post mortem* de patients souffrant de dépression (Konarski et al. 2008). En particulier, il est connu que l'exposition prolongée à la CORT induit une atrophie dendritique des cellules pyramidales de l'hippocampe, et une perte de volume des dendrites apicaux des régions CA3 et CA1 (Magarinos et al. 1999). D'autre part, bien qu'étant également le siège de la neurogenèse chez le rongeur adulte, les effets des glucocorticoïdes dans le bulbe olfactif adulte restent moins étudiés. Néanmoins, une étude récente a mis en évidence la présence de déficits olfactifs chez les animaux traités chroniquement par de la corticostérone, partiellement restaurés par un traitement chronique par de la fluoxétine (Siopi et al. 2016).

L'administration de CORT chez l'Animal et chez l'Homme est associée à une réduction du facteur de transcription de l'élément de réponse liant l'AMPc appelé CREB (Pittenger and Duman 2008). Fait intéressant, l'activation de CREB induit la neurogenèse alors que son inhibition la réduit (Nakagawa et al. 2002), faisant de CREB un acteur important de la stabilité neuronale associée au stress et à la dépression. Entre autres, CREB contrôle des

gènes effecteurs, eux aussi impliqués dans la stabilité de la plasticité synaptique. L'un de ces gènes est celui codant pour le « *brain derived neurotrophic factor* » (BDNF), qui joue un rôle critique sur la plasticité dans le développement, dans la survie et la fonction des neurones (Pittenger and Duman 2008). Chez l'animal, l'exposition aux glucocorticoïdes altère aussi bien CREB que le BDNF dans les différentes régions limbiques (Jacobsen and Mork 2006, Gourley et al. 2008), également chez les patients atteints de dépression (Dwivedi et al. 2003, Sen et al. 2008).

Outre l'effet de l'administration de CORT sur la plasticité neuronale, une étude de Western Blot réalisée au laboratoire (Mendez-David et al. 2013) a montré une diminution de l'expression de la β -arrestine 1 dans les leucocytes de souris traitées par corticostérone, de la même manière que ce qui a déjà été observée chez l'humain (Matuzany-Ruban et al. 2005). Cette diminution est corrigée par un traitement antidépresseur.

2.1.2.3 *Conséquences d'un traitement chronique de corticostérone sur la cognition*

Une étude comportementale réalisée au laboratoire (Darcet et al. 2016) a montré que des troubles cognitifs étaient observables chez les souris traitées avec la corticostérone. Il semblerait en effet qu'une exposition chronique de corticostérone chez le rongeur entraîne des altérations de la mémoire spatiale, de la mémoire de type épisodique, et de la mémoire à composante associative. Il n'existe à ce jour aucune hypothèse validée quant à l'origine de ces troubles cognitifs, mais il est plausible qu'une diminution de la neurogenèse hippocampique puisse être responsable d'une partie de ces déficits observés après traitement chronique de corticostérone. En effet, de précédentes études, utilisant une stratégie d'ablation génétique de la neurogenèse hippocampique adulte, ont montré que les jeunes neurones de 4 à 6 semaines participaient aux processus cognitifs (Sahay et al. 2011 , Denny et al. 2014).

2.2 Etudes des performances liées à l'émotion

2.2.1 *Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité de type anxiolytique*

2.2.1.1 *Le test du champ ouvert ou test de l'Open Field*

L'open field (OF, ou test de champ ouvert) est l'un des plus utilisés en psychopharmacologie. Il est réalisé en plaçant l'animal dans une cage de 40x40 cm, ouverte pendant 30 minutes. Les mouvements de l'animal sont mesurés par un système de suivi de l'animal par des capteurs infrarouge (Activity Monitor, MED associates, Georgia, VT, USA) (Figure 16). L'Open Field

est utilisé afin de prédire une activité de type. En général, les animaux présentent un haut degré d'évitement de l'aire centrale par rapport à la périphérie. L'administration unique d'un anxiolytique, comme une benzodiazépine ou chronique d'un antidépresseur augmentent le nombre d'entrées et le temps passé dans cette aire centrale (Prut and Belzung 2003). Au final, les variables mesurées dans l'OF sont l'activité ambulatoire totale, le nombre d'entrées dans l'aire centrale, le temps passé dans le centre de l'arène. Ce test peut être utilisé pour une mesure simple de l'activité locomotrice.

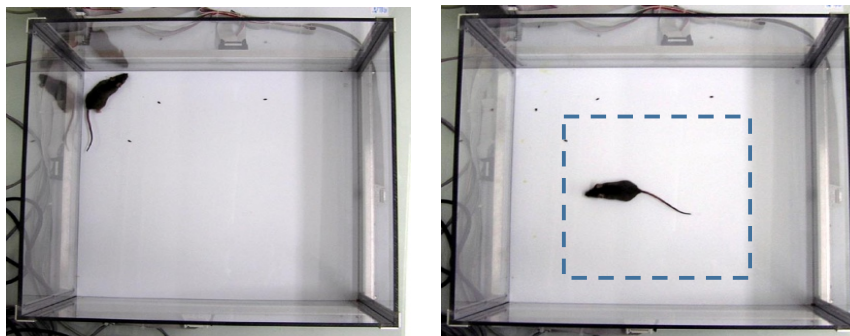


Figure 16: Test de Champ Ouvert chez la Souris.

Une administration unique d'anxiolytique ou chronique d'antidépresseur augmentent le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale de l'arène chez la Souris (photo gauche) tandis que classiquement les souris contrôles se déplacent à la périphérie de la cage (photo droite).

2.2.1.2 *Le test du labyrinthe en croix surélevé*

Ce paradigme développé afin de prédire une activité de type anxiolytique chez le Rat (Pellow and File 1986) puis chez la Souris, est aussi un test de mesure d'un comportement de type anxieux développé d'abord (Figure 17). Le labyrinthe est composé de 2 bras ouverts et 2 bras fermés reliés par une plateforme centrale, à 50 cm au-dessus du sol et éclairé par une lampe de faible puissance (20 watts). Les souris sont placées individuellement sur la plateforme centrale, face à un bras ouvert et peuvent explorer librement l'ensemble du labyrinthe pendant 5 minutes. Une caméra placée au-dessus du dispositif et reliée à un logiciel de suivi (EPM3C, Bioseb, France) permet l'enregistrement des déplacements. Afin de discriminer un effet anxiolytique d'un effet sédatif, le nombre total d'entrées dans les 4 bras est mesuré. Un phénotype anxieux se caractérise par une diminution du temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps passé dans les bras fermés.



Figure 17: Test du labyrinthe en croix surélevée.

Un traitement aigu par des anxiolytiques ou chronique d'antidépresseur augmentent le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts (photo gauche) et diminuent le temps passé dans les bras fermés (photo droite)

2.2.2 Test prédictif d'un phénotype ou d'une activité anxiolytique et antidépressive : le test d'alimentation supprimée par la nouveauté ou « novelty suppressed feeding »

Ce test induit une situation de motivations conflictuelles chez l'animal, entre celle dirigée vers la nourriture et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte fortement éclairée. Ce test a montré son aptitude à mettre en évidence des changements dans le comportement des rongeurs comme le Rat et la Souris, après un traitement anxiolytiques (traitement aigu) et antidépresseurs (traitement chronique) (Santarelli et al. 2003). L'animal à jeun depuis 24 heures est placé dans une cage rectangulaire de 2500 cm (50x40x20 cm). Au centre de cette cage est disposé un cercle blanc éclairé dans lequel sont déposés 2 granulés de nourriture.

L'animal est alors placé dans un coin du dispositif la tête face à la paroi, puis un chronomètre est immédiatement lancé. La latence pour mordre manifestement le granulé (croquer dans le granulé en utilisant ses pattes avant) est enregistrée. Les animaux sont testés individuellement pendant une période de 10 minutes (Santarelli et al. 2003, David et al. 2009). On mesure le temps de latence mis par l'animal pour aller se nourrir (Figure 18). A la suite de ce test, l'animal est replacé dans sa cage et on mesure sa consommation de nourriture pour vérifier que les variations du temps de latence entre des animaux traités et des animaux non traités sont dues à l'activité anxiolytique/antidépresseur des molécules étudiées et non à un appétit moindre.



Figure 18 : Test du Novelty Suppressed Feeding.

Un traitement aigu par des anxiolytiques ou chronique par antidépresseur diminuent le temps de latence des animaux pour se nourrir. Le dispositif est constitué d'une enceinte dont le sol est recouvert de sciure, et dans le centre duquel est placé de la nourriture sur un disque blanc cartonné (photo gauche). La latence de la prise

2.2.3 Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité de type antidépressive

2.2.3.1 Index d'état dépressif : quantification de l'état du pelage

Cette mesure est un indicateur de la dégradation de l'activité de toilettage chez la souris et par corrélation de son état « dépressif » (Figure 19) (Griebel et al. 2002, Ducottet et al. 2003). Le score du pelage est évalué dès le début de l'expérience et répété une fois par semaine, le même jour, jusqu'à la fin du protocole. Ce score est défini après l'évaluation par l'expérimentateur sur 5 zones du corps de l'animal : la tête, le cou, le dos, le ventre, les pattes. Un score de 0 est attribué pour un pelage en bon état, 0.5 si le pelage est peu dégradé, et 1 pour un pelage dégradé. Le score global est ensuite calculé.

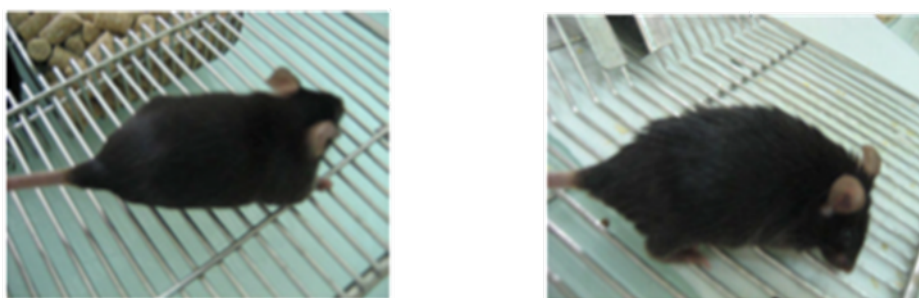


Figure 19 : Dégradation de l'état du pelage.

En conditions standards (photo gauche), l'animal présente un pelage lisse et brillant. Après 4 semaines d'exposition à la corticostérone dans l'eau de boisson, le pelage de l'animal se dégrade en paquets disparates (photo droite).

2.2.3.2 *Le splash test*

Ce test est assimilé au caractère dépressif puisqu'il met en œuvre la capacité de toilettage chez le rongeur. Les animaux d'une même cage sont placés 30-60 min dans une nouvelle cage (cage de pré-test). Au moment du test, on vaporise une fois et de façon modérée une solution de sucrose à 10% sur le cou de l'animal. Cette solution est non seulement collante, ce qui doit initier un toilettage chez le rongeur, mais également appétante. L'animal est directement introduit dans sa cage initiale sans nourriture ni eau pour la durée du test. Un chronomètre est lancé simultanément. Plusieurs paramètres sont mesurés : la latence à initier un toilettage (qui doit durer plus de deux secondes et comprend une action des pattes avant sur la face, ou un léchage du pelage ventral ou dorsal), le temps total ainsi que la fréquence des toilettages (sur une période de 5 minutes). A la fin du test, la souris est introduite dans une cage temporaire le temps que les souris de la même cage soient toutes passées dans le test.

2.2.4 « *L'emotionality score* », un outil d'analyse des résultats des tests comportementaux.

A l'image de l'échelle d'Hamilton, questionnaire composé de plusieurs items qui permet d'évaluer quantitativement la sévérité de la pathologie, « l'emotionality score » est un outil préclinique qui permet d'évaluer l'état anxio-dépressif de l'animal en prenant en compte l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude comportementale, et ce de façon à **diminuer la variabilité intrinsèque de chaque test** (Guilloux et al. 2011)

En effet, il existe plusieurs causes de variabilités des résultats : le jour ou le moment de la journée où le test est effectué, les conditions du test (bruit, etc...) qui peuvent influencer sur le comportement animal. Un animal peut présenter un phénotype anxieux fort dans un test, et un phénotype moins prononcé dans un second test réalisé quelques jours plus tard.

Cette méthode permet ainsi de normaliser les paramètres des différents tests correspondant au comportement d'anxiété-dépression, par une standardisation de type « z ». Cette normalisation des résultats obtenus à des moments différents et de différentes cohortes, **permet ainsi leur comparaison et leur compilation.**

La formule de normalisation des résultats par z-normalisation est la suivante :

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

- X : valeur du paramètre observé
- μ : moyenne du groupe véhicule (contrôle)
- σ : écart-type du groupe véhicule (contrôle)

On obtient de cette façon le z-score pour chaque paramètre considéré comme marqueur d'un phénotype anxio-dépressif dans chaque test (**OF** : temps dans le centre et distance ratio. **EPM** : Temps dans les bras ouverts, ratio d'entrées dans les bras ouverts/entrées totales. **NSF** : latence à aller se nourrir. **Splash Test** : Durée de toilettage). On moyenne ensuite tous les z-paramètres d'un test pour calculer le z-score du test considéré. Enfin, on réalise une moyenne tous les « z-scores » de chaque test (Z_{OF} , Z_{EPM} , Z_{NSF} et $Z_{Splash\ Test}$) pour obtenir l'*emotionality score* global de l'expérience.

Ce score nous permettra notamment d'évaluer si une souris présente un phénotype anxio-dépressif stable dans chaque test. Plus le score est élevé, plus le comportement des souris sera considéré comme anxio-dépressif. Nous considérerons que les souris ont répondu au traitement si on observe une **diminution d'au moins 50% du score après administration d'un antidépresseur**.

2.2.5 Vérification des étapes du cycle menstruel chez la femelle

Les altérations comportementales (anxiété-dépression) peuvent être associées à une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et donc une augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone chez les animaux (Grippe et al. 2005). Une partie de notre étude étant réalisée chez la femelle, il est important d'évaluer l'état du cycle menstruel chez ces animaux afin d'exclure des variations de comportement interindividuelles qui pourraient être dues à la variation du cycle. En effet, le comportement chez la souris peut varier en fonction des états de leur cycle ovarien, celui-ci pouvant être sujet à des changements liés à l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (ter Horst et al. 2012)

Une façon d'évaluer le cycle ovarien de manière non-invasive est d'observer les changements de la structure des cellules épithéliales vaginales. Des frottis vaginaux sont ainsi réalisés en introduisant une pipette contenant 15 µl de NaCl 0.9% dans l'orifice vaginal de la souris (Figure 20). Le frottis ainsi obtenu est déposé sur une lame, recouvert d'une lamelle avant d'être observé au microscope (grossissement x10), sans coloration

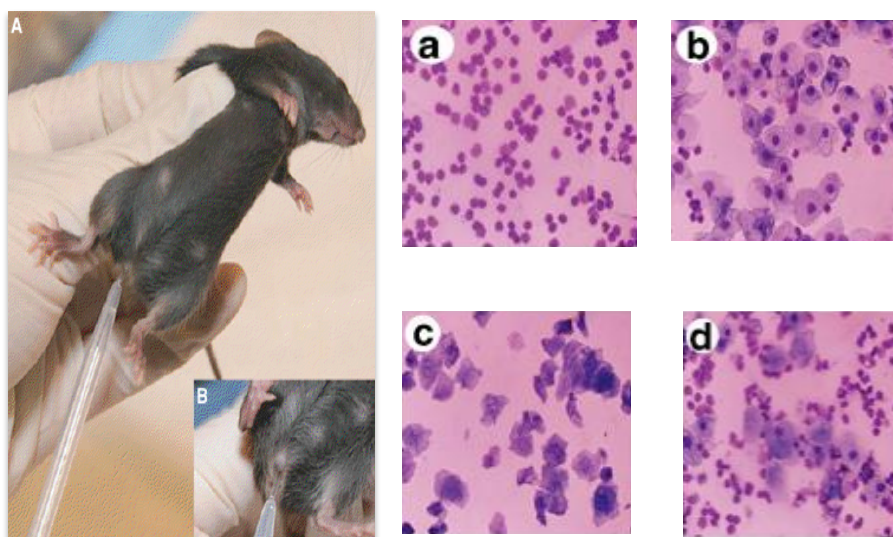


Figure 20 : Réalisation d'un frottis chez une souris femelle et étapes du cycle estrus chez la souris

(a) *Diestrus*, (b) *Proestrus*, (c) *Estrus*, (d) *Metestrus*

Chez les rongeurs, le cycle dure de 4 à 5 jours et comporte 4 stades qui se différencient par la proportion des 3 types de cellules observées (cellules cornées, cellules épithéliales et leucocytes) : *proestrus*, *estrus*, *metestrus* et *diestrus*.

L'état du cycle est vérifié après chaque test comportemental afin de l'intégrer comme facteur dans nos analyses statistiques. Ainsi, pour toute analyse chez les femelles, une ANOVA à 2 facteurs (facteurs traitements et cycles) a été réalisée.

2.3 Manipulations *ex vivo*

2.3.1 Administration des traitements

2.3.1.1 Préparation de la solution de CORT

Le protocole consiste en une administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson. De la corticostérone (4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21-hemisuccinate (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) est dissoute dans le véhicule (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France). La durée est la dose du traitement de corticostérone a été déterminée à partir de précédentes études réalisées au laboratoire (ref). Une dose de 35 g/ml/j est mise à disposition des souris *ad libitum* dans l'eau de boisson. La solution de corticostérone se dégrade au contact de la lumière, elle est donc mise dans des biberons opaques noirs. Les animaux contrôles reçoivent uniquement le véhicule (0.45 % β -cyclodextrin, β -CD).

2.3.1.2 *Préparation des traitements*

Les animaux ont reçu 2 traitement antidépresseurs successifs : la fluoxétine et l'imipramine. La fluoxétine hydrochloride (Anawa Trading, Zurich, Switzerland) (18 mg/kg/j), ainsi que l'imipramine hydrochloride (Sigma-Aldrich) (30 mg/kg/j) sont dissoutes dans la solution de corticostérone (35g/ml/j dans 0.45 % β -cyclodextrin). De la même façon que la corticostérone, les traitements sont administrés dans l'eau de boisson *ad libitum* aux animaux.

2.3.2 *Mesure de l'expression protéique par Western Blot*

2.3.2.1 *Prélèvement des PMBC du sang total*

Le sang a été prélevé des souris non-anesthésiées (Golde et al. 2005). Environ 0.4 ml de sang est prélevé dans un tube contenant du K₃EDTA au moyen d'une lame avec une pointe stérile de 5 mm (MediPoint, Mineola, NY, USA) au niveau sous-mandibulaire, à l'endroit où la veine orbitale et sous-mandibulaires se joignent pour former la veine jugulaire. Une légère pression sur la zone de ponction est appliquée avec une compresse pour l'homéostasie. La séparation et l'extraction des PBMCs est ensuite réalisée en utilisant la méthode du iodixanol mixer (Ford and Rickwood 1990). Les PBMCs des souris sont purifiés à partir du sang total par centrifugation (300 g à 20°C pendant 30min) en utilisant une solution B et une solution d'OptiPrep (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Après centrifugation, 3 couches superposées sont observées dans le tube, les PBMCs se trouvant dans la couche du milieu. Cette couche est soigneusement retirée et transférée dans un nouveau tube de 50 ml. Les PBMCs sont ensuite lavés 2 fois 1 minute avec la solution B. Après une autre centrifugation (150g à 20°C pendant 7 min) et 2 lavages, les PBMCs sont récupérés à l'aide d'une dernière centrifugation (1000g à 4°C pendant 5 minutes) et conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure (Figure 21).

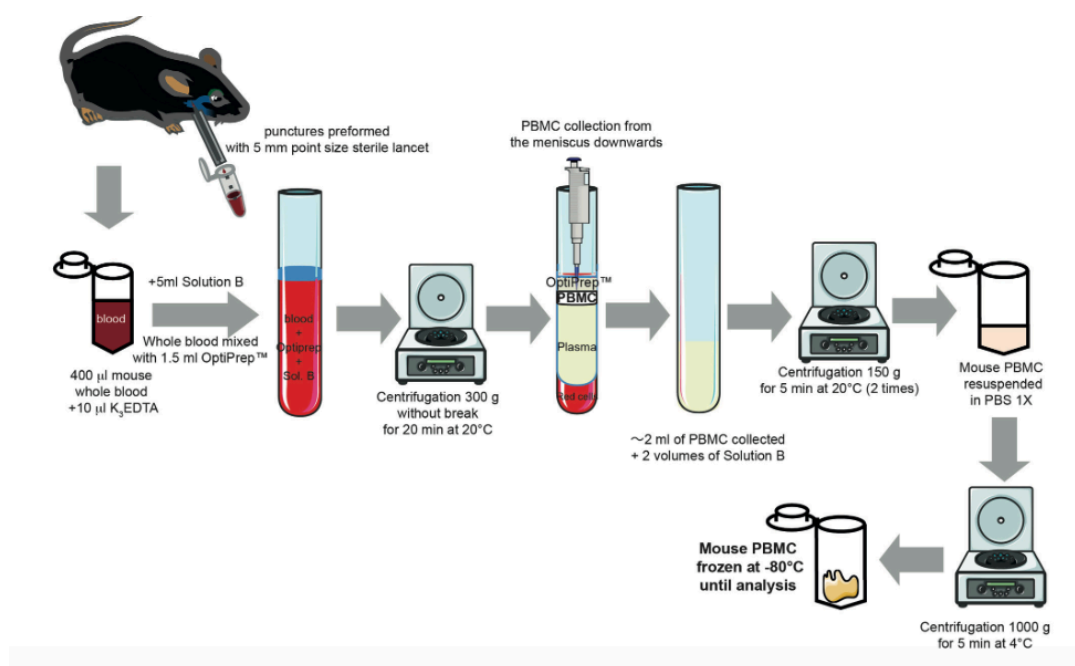


Figure 21 : Différentes étapes pour l'isolement des PBMCs à partir du sang total chez la souris

2.3.2.2 Dosage des protéines

La quantité de protéines présentes dans les différents échantillons est préalablement déterminée afin de déposer la même quantité de protéines dans chaque puit. La quantification des protéines a été effectuée en utilisant une technique combinant la réaction de Biuret (Gornall et al. 1949) avec une détection colorimétrique hautement sensible et sélective des ions cuivre, par un réactif contenant l'acide bicinchoninique (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology).

2.3.2.3 Technique du Western Blot

L'électrophorèse est réalisée dans un gel de polyacrylamide additionné de 10% de laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) pendant 1h à 160 V (Amersham ECL Gel Running®). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) (Amersham, Biosciences, Les Ulis, France) dans du tampon de transfert pendant 2h à 100V à 4°C. Après une série de rinçages et le blocage des sites non spécifiques, les membranes sont incubées avec des anticorps primaires pour détecter les quantités totales des protéines d'intérêts.

Anticorps primaires	Blocage	Dilution	Référence	Fournisseur	Poids (KDa)
β -arrestine 1	Lait	1 :500	D24H9	Becton Dickinson	50
β -actine (HRP)	BSA/Lait	1 :10000	SC47778	Santa Cruz Biotechnology	37

Tableau 10 : Anticorps utilisés en Western Blot

Les anticorps primaires (Tableau 10) sont détectés grâce aux anticorps secondaires appropriés couplés à la HRP (horseradish peroxydase), et le signal ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Belgique) est quantifié grâce au système ChemiDoc XRS (Bio-rad, Marnes-La-Coquette, France). Pour s'assurer qu'une quantité égale de protéines a été déposée dans chaque puit, les taux de β -actine ont été mesurés comme contrôle pour chaque échantillon. Les bandes sont ensuite quantifiées en utilisant le logiciel Image Lab. Lors de cette expérience, la même membrane a été utilisée pour révéler les différentes protéines. Le traitement de la membrane par une solution de Stripping pendant 30 minutes permet de « défixer » les complexes anticorps primaire-secondaire de la membrane et de réaliser un nouveau marquage.

2.3.2.4 *Traitement statistique des résultats*

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

2.4 Etude de la neurogenèse hippocampique adulte

2.4.1 *Préparation des tissus*

2.4.1.1 *Perfusions intra-cardiaque*

La souris est anesthésiée à l'aide d'un mélange kétamine/xylazine (120 mg/kg et 10 mg/kg, respectivement). On contrôle l'anesthésie en effectuant une pression sur la patte arrière de l'animal. L'absence de réaction permet d'entreprendre la chirurgie. L'animal est fixé sur une planche en liège, sur le dos. Une incision au niveau médian de l'abdomen permet d'introduire les ciseaux de chirurgie et de remonter jusqu'au diaphragme par les flancs de l'animal. Le diaphragme sectionné laisse entrevoir le cœur. La peau qui recouvrait l'abdomen est rabattue en arrière puis fixée, permettant un accès dégagé jusqu'au cœur. Il est primordial d'opérer

rapidement l'animal pour conserver la propriété pulsatile du cœur. Cette capacité va permettre de rincer et fixer les tissus cérébraux, ce qui est nécessaire pour obtenir des marquages sans pollution par des cellules sanguines résiduelles. Un cathéter relié à une pompe péristaltique (pompe péristaltique, W40578, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) est inséré dans le ventricule gauche du cœur. Cette pompe a pour fonction de perfuser en premier lieu une solution de NaCl 0.9% conservée dans la glace. Une fois le cathéter en place, une incision de l'oreillette droite va permettre au cœur et à la pompe d'évacuer le sang du corps de l'animal. Après 5 minutes, on peut constater une décoloration de certaines zones du corps de l'animal tels que : le foie, les pattes avant, la langue, les oreilles etc. Ces indicateurs permettent de poursuivre le processus de perfusion en changeant le NaCl 0.9% par une solution de paraformaldéhyde 4% dans 0,2M de solution de Sørensen pendant 10 minutes. Cette solution va permettre de fixer les tissus et de stopper toute activité cellulaire. Le cerveau est ensuite prélevé et conservé pendant la première journée dans une solution de paraformaldéhyde 4% à 4°C. Elle sera ensuite substituée par une solution de tampon phosphate (PBS) + sucrose 30% + azide 0.1% à 4° ce qui permettra de protéger et conserver les tissus jusqu'à leur prochaine utilisation.

2.4.1.2 *Préparation des cerveaux*

Les cerveaux sont placés à l'envers dans des blocs en plastique individuels préalablement remplis avec de l'OCT (Tissue-Tek, Optimal Cutting Temperature). Ainsi préparés, les blocs sont plongés dans une boîte en polystyrène contenant de la carboglace (-60 °C). La propriété de l'OCT à se solidifier à basse température va contenir le cerveau dans un bloc. Ils sont ensuite démoulés puis conservés au congélateur à -80°C. Le bloc d'OCT est fixé sur une platine amovible encore une fois à l'aide d'OCT, à l'intérieur d'un dispositif réfrigéré à -20°C (Leica CM 3000). Cet appareil va permettre de faire des sections du bloc, ici définies à 35 µm d'épaisseur. On équilibre ensuite le cerveau par rapport à la lame du couteau du cryostat de façon à obtenir une morphologie symétrique des structures cérébrales. Après l'identification du début de l'hippocampe à l'aide de l'atlas pour Souris (Bregma -1.20 to -3.80 mm; Franklin et Paxinos, 2007), chaque section de l'hippocampe est collectée.

Le stockage des coupes de cerveaux se fait à l'aide d'une boîte de 24 puits. Chaque ligne correspond à un cerveau. Les puits sont remplis par une solution de PBS + sodium azide (0.1%) qui préservera les tissus d'une éventuelle dégradation par les bactéries ou champignons. L'hippocampe se subdivisera par 13 séries de 6 coupes. Dans chaque puit, nous retrouverons 1/6 de l'hippocampe et chaque section est espacée de la suivante par 210 µm.

Cette méthode permet d'économiser le nombre d'animaux en utilisant différents marqueurs d'immunohistochimie pour le même cerveau.

2.4.2 Etude de la prolifération des cellules progénitrices

L'étude de la prolifération cellulaire est réalisée grâce à une technique d'immunohistochimie utilisant le marquage au Ki67. La protéine Ki67 est une protéine nucléaire exprimée par la cellule lorsqu'elle est entrée dans le cycle cellulaire. Son expression augmente progressivement au cours des phases de synthèse, G2 puis M du cycle (Cattoretti et al. 1992). Après avoir été rincées 3 fois 15 minutes dans une solution de tampon phosphate contenant du triton PBST (PBS+Triton 0,3%), les coupes de cerveaux sont plongées pendant deux heures dans une solution de 10% de sérum d'âne afin de bloquer les sites non spécifiques. Les coupes sont ensuite immédiatement incubées dans l'anticorps primaire anti-Ki67 fabriqué chez le lapin (Eurobio, France) le temps d'une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, après 3 rinçages de 15 minutes dans un tampon phosphate (PBS), les tissus reposent deux heures dans l'anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé à un fluorochrome Cy2 (Jackson, dilution 1 :500) (Sahay et al. 2011). Le marquage est visualisé grâce à un fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire. La fluorescence permet d'apprécier la proportion de cellules en cycle et donc la prolifération cellulaire.

2.4.3 Etude de la survie des cellules progénitrices

L'étude de la prolifération cellulaire dans l'hippocampe de la souris adulte nécessite un schéma spécial d'injection de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), 2 fois par jour pendant 3 jours 3 semaines avant le sacrifice de l'animal (100 mg/kg) (Cameron and McKay 2001 , Wang et al. 2015).

Le BrdU est un analogue synthétique de la thymine. Au moment de la réplication de l'ADN (pendant la phase S du cycle cellulaire) le BrdU va s'incorporer au nouveau brin formé et permet de marquer ainsi les cellules nouvellement formées. Les anticorps spécifiques anti-BrdU vont permettre de révéler ces jeunes cellules en suivant le protocole suivant. Les sections de cerveaux sont montées sur des lames (lames adhésives super Frost plus, Fischer Scientific SAS, Illkirch, France), puis placées pendant 5 minutes dans une solution d'acide citrique (pH 6.0) à 96°C. Après des rinçages successifs avec du PBS, les tissus sont traités avec de la trypsine (0.01%) dissoute dans du Tris/CaCl₂ pendant 10 minutes.

Suite à une nouvelle série de rinçage, du 2N HCl est déposé sur les lames pendant 30 minutes. Le blocage des lames est effectué à l'aide d'une préparation de sérum de Chèvre (normal goat serum, NGS) 5% dans du PBS. Pendant la nuit, on dépose sur les lames une solution d'anticorps anti-souris BrdU (1 :100). Après une série de rinçage au PBS, les lames sont recouvertes d'une solution d'anticorps secondaire (1:200 chèvre anti-souris biotinylé) pendant une heure, suivie d'une amplification par un complexe avidine/biotine. Le marquage est visualisé par le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Les tissus sont plongés dans des bains successifs permettant le contremarquage par FAST-RED (Vector Nuclear Fast Red H-3403, ABCYS, Paris, France) pendant 2 min puis un rinçage à l'eau ultra pure (1min) ainsi qu'une déshydratation progressive (dans de l'éthanol 70% puis 100% pendant 5 et 10 minutes, respectivement).

Les lames sont recouvertes par une lamelle entre lesquelles on dépose un milieu de montage qui permet de fixer définitivement les tissus. La quantification des cellules marquées se fait comme précédemment décrite par David et al., 2009 à l'aide d'un microscope (Olympus BX51 microscope, Allemagne) au grossissement 40X (Figure 22).

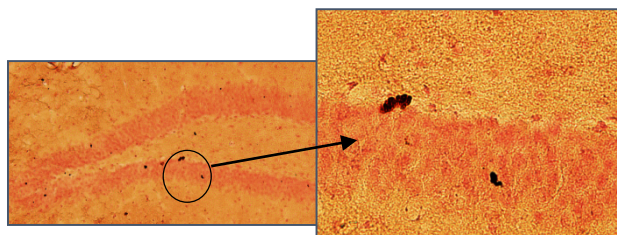


Figure 22 : Photographies de coupes histologiques du gyrus dentelé de l'hippocampe adulte après marquage au BrdU à différents grossissements

2.4.4 Etude de la maturation neuronale

L'étude de la maturation neuronale ne nécessite pas d'injecter un marqueur exogène. En effet, on utilise l'expression endogène d'un marqueur de neurone immature la Doublecortine (DCX) exprimé à la membrane des cellules neuronales, qui permet de révéler les neurones nouvellement formés dans la couche granulaire de l'hippocampe (Couillard-Despres et al. 2005).

La procédure suit celle décrite par Wang et collaborateurs, 2008 (Wang et al. 2008). Les sections de cerveaux sont rincées avec du tampon tri-phosphate (TBS), puis traitées dans une solution de H₂O₂ 1% (qsp TBS) pendant 15 minutes. Les tissus sont incubés dans une préparation à 10% de sérum d'âne avec 0.3% de Triton X- 100 pendant 30 minutes. Les tissus

sont maintenus toute la nuit avec l'anticorps primaire doublecortine (chèvre 1 :500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps secondaire est biotinylé selon la construction âne anti-chèvre (1 :500 ; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) dans du TBS pendant 2 heures à température ambiante.

Le marquage est révélé par un complexe avidine/biotine (Vector USA) et un kit DAB (SK-4100 DAB kit, Vector, USA). Une fois la révélation effectuée, les coupes de cerveaux sont montées sur lames et recouvertes par une lamelle. Les cellules marquées avec l'anticorps doublecortine (DCX+) sont catégorisées selon leur morphologie dendritique (Figure 23) : DCX+ sans arborisation tertiaire et celles avec une arborisation plus complexe. L'index de maturation est défini comme le ratio entre les cellules avec arborisation complexe sur le total des cellules DCX+ (Wang et al. 2008).

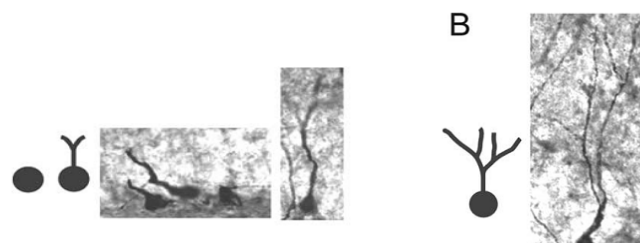


Figure 23: Caractérisation des neurones immatures marqués à la doublecortine en fonction de leur morphologie dendritique.

A : cellules doublecortine positives sans dendrites tertiaires (neurone immature) ; B : cellule doublecortine positive avec arborisation tertiaire (neurone mature). D'après Wang et al., 2008

Le Tableau 11 ci-dessous récapitule les anticorps utilisés pour les techniques d'immunohistochimie.

Anticorps	Source	Dilution	Référence	Fournisseur
Anticorps primaires				
Ki-67	Monoclonal lapin	1 :100	VP-RM04	Eurobio
BrdU	Souris	1 :100	347850	Becton Dickinson
DCX	Polyclonal chèvre	1 :500	C-18 (H2812)	Santa Cruz Biotechnology
Anticorps secondaires				
Biotine	Chèvre anti-souris	1 :200	BA-9200	Vector Labs
	Âne anti-chèvre	1 :500	705-065-003	Jackson ImmunoResearch
Cy2	Âne anti-lapin	1 :500	715-175-150	Jackson ImmunoResearch

Tableau 11: Récapitulatif des anticorps utilisés en immunohistochimie.

2.4.5 Triple marquage BrdU+/DCX+/Neun+

Un triple marquage BrdU+/DCX+/Neun+ a été réalisé selon le protocole suivant. Les coupes sont placées pendant 2h dans une solution de 1:1 formamide/2xSSC à 65°C. Elles sont ensuite rincées pendant 5 min dans du 2xSSC, incubées pendant 30 minutes dans du 2N HCl à 37°C, rincées pendant 10 min dans une solution de 0.1 M d'acide borique (pH 8.5) puis incubées dans du PBS à 0.1M avec 0.3% de triton X-100 et 5% de Donkey Serum. Les coupes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires de la doublecortine, la bromodeoxyuridine (chèvre; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) et la protéine neuronal-specific nuclear (NeuN) (souris; 1:500; Chemicon, Temecula, CA).

Des anticorps secondaires sont ensuite utilisés. Tous les anticorps secondaires ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch (Beckman, France). Parmi les cellules BrdU+, le pourcentage de cellules BrdU+/DCX+/NeuN-, BrdU+/DCX+/NeuN+ et BrdU+/DCX-/NeuN+ est évalué pour chaque groupe. Tous les comptages de cellules ont été réalisés à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510

PROBLEMATIQUES & OBJECTIFS DE LA THESE

3 Problématiques et objectifs de la thèse

Malgré les avancées de ces dernières décennies, la dépression reste un vaste champ de recherche. De la pathogénèse à la réponse au traitement, nombreuses questions restent non résolues.

Pour traiter les patients dépressifs, de nouvelles classes d'antidépresseurs avec des mécanismes d'action toujours plus innovants sont régulièrement mises sur le marché, mais les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (ISRS), dont fait partie la fluoxétine (Prozac®) restent les plus couramment prescrits en France. Cependant, deux inconvénients non négligeables sont liés à la prise de ces traitements :

- D'une part, **le long délai d'action** du traitement (4 à 6 semaines) est un inconvénient majeur pour les patients.
- D'autre part, les nouvelles molécules mises sur le marché restent toutes en partie inefficaces puisqu'un grand nombre de patients, environ 30%, **ne répond pas à la thérapeutique administrée**. On observe ainsi chez certains patients une absence d'amélioration, voire une aggravation de l'état dépressif après la mise en place du traitement, ce qui pose un réel problème dans la prise en charge de la maladie.

Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquelles se mettent en place la résistance est nécessaire afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques visant à traiter les patients récalcitrants au traitement. Afin d'expliquer l'absence de réponse, plusieurs hypothèses ont été avancées. Il semble néanmoins impossible d'incriminer un seul facteur déclencheur d'une non-réponse, et la communauté scientifique s'accorde à considérer la résistance comme une conséquence de l'altération de plusieurs voies biologiques.

Pour traiter cette pathologie, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été évaluées et bien que certaines soient efficaces, atteindre une efficacité du traitement chez des patients résistants n'est jamais simple. Prédire l'efficacité d'un traitement donné en amont de sa prise par le patient serait donc un avantage considérable dans la prise en charge des patients dépressifs et ceci nécessite l'identification de biomarqueurs prédictifs d'une résistance. Ces biomarqueurs permettraient d'identifier *a priori* les patients ayant le moins de chances de répondre au traitement, et ainsi d'adopter une prise en charge personnalisée de la pathologie. En ciblant dès la prise en charge des patients les traitements qui ont le plus de chances d'être efficaces, nous serions en capacité de diminuer le nombre de différents médicaments pris par le patient

et donc le risque de développer une résistance. En effet, enchaîner des traitements infructueux diminue la probabilité de réponse aux traitements ultérieurs, en plus d'avoir des conséquences sur l'adhérence du patient qui peut être découragé par les échecs thérapeutiques successifs.

Pour étudier les mécanismes de la résistance et identifier des biomarqueurs pertinents, il faut avant tout des modèles animaux appropriés. Ces modèles sont supposés mimer certains aspects de la pathologie afin de devenir des outils expérimentaux pour améliorer la compréhension de la pathologie humaine. Pour étudier la dépression, il existe pléthore de modèles à disposition, dont les plus utilisés cités précédemment. Ils permettent principalement d'explorer les différents aspects de la pathologie, les modifications neuro-anatomiques et neurochimiques liées, et d'évaluer l'efficacité psychothérapeutique de nouvelles molécules. Cependant les modèles d'anxiété-dépression ne sont pas efficace dans le cadre d'études sur la dépression résistante au traitement. Willner et al. (Willner and Belzung 2015) ont proposé 3 critères pour valider un modèle de résistance : une sensibilité au stress accrue, la résistance à une administration chronique d'antidépresseurs dits « classiques », et une bonne réponse aux nouveaux antidépresseurs. Plusieurs modèles animaux de résistance existent déjà mais beaucoup d'entre eux présentent plusieurs inconvénients qui empêchent l'entière validation de ces modèles et qui limitent l'utilisation translationnelle des données obtenues lors des études. L'inconvénient majeur à souligner est que tous les modèles de résistance actuellement utilisés ne respectent pas les différents critères cliniques proposés pour définir la résistance. En effet, bien qu'il existe plusieurs définitions de la résistance toutes s'accordent à dire qu'un patient ne peut être considéré comme résistant que lorsqu'il n'a pas répondu à une thérapie adéquate avec au moins 2 traitements différents. Si on s'en tient à cette définition, aucun modèle actuellement disponible ne peut être considéré comme un modèle de résistance puisque aucune administration séquentielle d'antidépresseurs n'a été testé pour réverser le phénotype anxio-dépressif des animaux.

Par ailleurs, la grande majorité des études de non-réponse incluent uniquement des mâles dans les protocoles principalement pour des raisons de facilité et de coût. L'expérimentation sur les femelles est en effet plus compliquée car présentant plus de variabilité, en raison notamment des variations hormonales cycliques. Ce choix d'exclure les femelles ne semble pas être judicieux puisque la dépression est une maladie qui touche principalement les femmes. Mener des études sur les femelles permettrait d'une part de mieux comprendre les raisons pour lesquelles les femmes sont plus sujettes à cette pathologie, mais également de déterminer quels sont les traitements qui seront les plus efficaces sur cette population. Il a été montré que

les différences de comportement observées entre mâles et femelles étaient dues à plusieurs facteurs : les hormones sexuelles circulantes, les différences anatomiques et fonctionnelles du cerveau, des facteurs génétiques, et probablement des facteurs environnementaux (Palanza 2001). A l'heure actuelle, les conclusions des études sont tirées à partir des résultats obtenus uniquement chez les mâles et sont généralisés à l'ensemble de la population. Pour les raisons évoquées précédemment, cette méthodologie nous a donc semblé manquer de rigueur.

Mon projet de thèse portant sur la modélisation de la résistance dans un modèle murin s'est donc articulé autour de trois principaux objectifs.

Le premier objectif est la modélisation de la non-réponse à un antidépresseur dans le modèle CORT chez la souris mâle et la souris femelle. En effet, si le modèle CORT a été développé chez le mâle, peu de données sont disponibles chez la souris femelle. Dans un premier temps, nous avons donc déterminé les effets comportementaux d'une dose-réponse de corticostérone chez les femelles. Par la suite, nous avons caractérisé la réponse/non-réponse dans le modèle CORT, chez les mâles et les femelles, après traitement par de la fluoxétine, ce qui nous a permis de modéliser la non-réponse et la résistance chez ces animaux.

Le deuxième objectif est l'étude de comparaison de **la neurogenèse** entre les répondeurs et les non-répondeurs. Si le mécanisme d'action du traitement passe par une augmentation de la neurogenèse préalablement altérée par un EDM, il est donc intéressant de se pencher sur les éventuelles différences entre des répondeurs et des non-répondeurs à un antidépresseur, la fluoxétine. L'implication de la neurogenèse dans la réponse au traitement a déjà été démontrée (David et al. 2009) mais cette étude nous permettrait de déterminer si une absence de réponse est liée à une altération de la neurogenèse.

Le troisième objectif est l'étude de biomarqueurs chez les souris répondeuses et non-répondeuses. L'obtention d'un modèle de résistance aux antidépresseurs nous permet de réaliser une étude de biologie moléculaire sur des échantillons sanguins et cérébraux afin d'identifier d'éventuels biomarqueurs de réponse. Partant de l'observation d'une diminution de l'expression de β -arrestine dans les leucocytes de patients dépressifs, et d'une augmentation après traitement antidépresseur (Avissar et al. 2004, Matuzany-Ruban et al. 2005), nous avons postulé que l'expression de cette protéine était liée à la réponse au traitement, et qu'elle pouvait ainsi potentiellement être un biomarqueur de la réponse. Nous

avons donc mis au point une étude de western blot développée au laboratoire sur des échantillons de PBMCs (Mendez-David et al. 2013) afin de mesurer le niveau d'expression de β -arrestine 1 dans ces échantillons.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

4 RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE 1

Chronic corticosterone administration effects on emotionality in female C57BL6 mice.

Mekiri et al., *Article en révision (R2) dans Experimental and Clinical Psychopharmacology (Manuscrit PHA-2016-0217R2)*

ARTICLE 2

Treatment-resistant anxio-depressive like disorder in mice is associated with altered neurogenesis and differential peripheral expression of β -arrestin 1 in mice

Mekiri et al., *en preparation*

4.1 ARTICLE 1: Chronic corticosterone administration effects on emotionality in female C57BL6 mice.

Maryam Mekiri, Alain M Gardier, Denis J David, Jean-Philippe Guilloux

Article en révision (R2) dans Experimental and Clinical Psychopharmacology (Manuscrit PHA-2016-0217R2)

Question posée :

La modélisation d'un phénotype d'anxiété/dépression chez la souris par l'administration chronique de corticostérone (modèle CORT), telle qu'elle a été définie chez le mâle peut-elle être adaptée chez la souris femelle. Est-ce que cette administration induit des altérations de la neurogenèse?

Résumé de l'étude

Si la dépression présente une prévalence double dans la population féminine, encore trop peu d'études stratifient leur résultats cliniques ou précliniques en fonction du sexe (Howard et al. 2016). De plus, 70% des études précliniques en psychiatrie sont réalisées chez les animaux mâles, et ce pourcentage augmente dans la recherche en psychopharmacologie (Beery et Zucker, 2011). Si l'on retrouve de nombreuses publications sur le dimorphisme sexuel dans les effets du stress aigu ou chronique, peu d'étude se sont intéressées aux effets d'une administration chronique de corticostérone sur le comportement anxio-dépressif chez la femelle. Si le modèle CORT a démontré sa validité chez la souris C57BL6 mâle, nous souhaitons développer ce modèle chez la femelle permettant de générer un phénotype d'anxiété/dépression stable et robuste afin de pouvoir étudier les phénomènes de réponse/non-réponse et résistance au traitement antidépresseur.

Afin d'évaluer l'intensité du phénotype anxio-dépressif, nous nous sommes basés sur l'utilisation de « l'emotionality score » (Guilloux et al., 2011), un outil mathématique qui génère un score calculé après une analyse des comportements de type anxio-dépressif évalués dans 4 tests : leabyrinthe en croix surélevée (Elevated Plus Maze, EPM), le test de champ ouvert (Open Field, OF), le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Novelty Suppressed Feeding, NSF) et le Splash Test.

Dans la première cohorte, nous avons observé les effets d'une dose réponse de corticostérone administrée dans l'eau de boisson (7, 35 et 70µg/ml, 4 semaines) sur le comportement anxio-dépressif chez la souris femelle C57BL6. Comme chez la souris mâle, c'est la dose de 35µg/ml qui s'est révélée la plus efficace, cependant, la sévérité du phénotype était bien inférieure à celle observée dans nos études précédentes chez le mâle. Afin de potentialiser les effets de cette administration, nous avons testé différentes durées d'administration (8 et 12 semaines) dans de nouvelles cohortes de souris, et n'avons pu induire un phénotype anxio-dépressif chez la femelle stable malgré des durées de traitement plus longues.

Des altérations de la neurogenèse hippocampique adulte ayant été observées dans différents modèles de stress et après administration chronique de corticostérone, nous avons évalué les étapes de prolifération et survie cellulaire ainsi que de maturation neuronale dans l'hippocampe. Nous avons pu mesurer une absence d'altération de la neurogenèse chez la souris femelle après administration chronique de corticostérone.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

J'ai effectué le suivi des animaux incluant la préparation et l'administration du régime chronique de corticostérone.

J'ai réalisé l'ensemble des tests comportementaux émotionnels, biochimiques, et d'évaluation des stades d'estrus chez la femelle. J'ai également réalisé les expériences d'immunohistochimie et de comptage des cellules sous microscope.

J'ai analysé les résultats et rédigé l'intégralité de l'article sous la supervision du Dr Jean-Philippe Guilloux

Experimental and Clinical Psychopharmacology

Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female C57BL6 mice.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PHA-2016-0217R3
Full Title:	Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female C57BL6 mice.
Abstract:	Understanding the pathophysiology of affective disorders and their treatment relies on the availability of experimental models that mimic aspects of the disease. Most of the studies on depressive disorders are conducted with male rodents, mostly because including females in protocols is more difficult. Indeed, there is a complex series of changes in the brain of females due to estrous cycle, adding an important variability factor to the disease. However, twice as much women as men have a life time diagnosis of major depressive disorder (MDD), so we need to develop reliable female models of depression to improve our understanding of this disease. Here, we describe the effects of chronic corticosterone administration (CORT) in female mice, a procedure known to enhance behavioral emotionality in male mice. A dose-response study showed that 4 weeks of CORT exposure at 35 µg/ml in the drinking water enhanced the emotionality score of female mice, however with a very small size effect. Tests of longer duration of treatment failed to potentiate the behavioral effects of CORT. As some steps of adult hippocampal neurogenesis are known to be sensitive to chronic CORT exposure, cell proliferation and survival as well as neuronal maturation in the dentate gyrus of the hippocampus analyses revealed no effect of chronic CORT exposure in female mice. Overall, this study showed that female C57BL6 mice are insensitive to chronic CORT as a way to model anxiety-depressive like behavior.
Article Type:	Special Issue Article
Keywords:	females; emotionality; depression; neurogenesis; corticosterone
Corresponding Author:	Jean-Philippe Guilloux Universite Paris-Sud Chatenay-Malabry, FRANCE
Corresponding Author E-Mail:	jean-philippe.guilloux@u-psud.fr
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universite Paris-Sud
Other Authors:	Maryam Mekiri Alain M Gardier Denis J David
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Maryam Mekiri
Order of Authors Secondary Information:	
Suggested Reviewers:	Mounira Banasr Centre for Addiction and Mental Health mounira.banasr@camh.ca Specialist in the area Michael Drew, PhD University of Texas at Austin drew@mail.clm.utexas.edu Specialist in the area Antoine Besnard Massachusetts General Hospital

	besnard.antoine@mgh.harvard.edu Specialist in the area
	John Cryan University College Cork National University of Ireland j.cryan@ucc.ie Specialist in the area
	Guy Griebel Sanofi guy.griebel@sanofi.com Specialist in the area
Opposed Reviewers:	
Order of Authors:	Maryam Mekiri
	Alain M Gardier
	Denis J David
	Jean-Philippe Guilloux

Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female C57BL6 mice.

Authors: Maryam Mekiri (MSc, PharmD), Alain M Gardier (Pr, PhD, PharmD), Denis J David (Pr, PhD) and Jean-Philippe Guilloux (Assistant Pr, PhD)[§].

CESP/UMRS-1178, Univ. Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry, 92290, France

Disclosures

All authors report no potential conflicts of interest that might influence this research.

Acknowledgements

This work was supported by the technical assistance of Valerie Dupont-Domergue and the staff of the animal care facility of the SFR-UMS Institut Paris Saclay Innovation Thérapeutique. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche “DEPARREST” ANR-12-SAMA-0007, and by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR, Paris, France) Fellowship.

Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female C57BL6 mice.

Short Title: Chronic CORT administration in female mice

Authors: Maryam Mekiri (MSc), Alain M Gardier (Pr, PhD, PharmD), Denis J David (Pr, PhD) and Jean-Philippe Guilloux (Assistant Pr, PhD)[§].

CESP/UMRS-1178, Univ. Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry, 92290, France

[§] To whom correspondence should be sent:

Dr Jean-Philippe Guilloux

¹Université Paris-Saclay, Univ. Paris-Sud,
Faculté de Pharmacie, INSERM UMR-S 1178,
5, rue Jean-Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry
Tel: +33146835968
Fax: +33146835355
jean-philippe.guilloux@u-psud.fr

Statistical Summary

Abstract: 234 words

Manuscript: 4582 words

References: 67

Figures: 3

Supplementary Table: 1

Supplementary Figures: 5

Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female C57BL6 mice.

Short Title: Lack of effect of chronic CORT administration in female mice

Authors: Maryam Mekiri, Alain M Gardier, Denis J David, Jean-Philippe Guilloux[§].

CESP/UMRS-1178, Univ. Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay,
Chatenay-Malabry, 92290, France

[§] To whom correspondence should be sent:

Dr Jean-Philippe Guilloux
1Université Paris-Saclay, Univ. Paris-Sud,
Faculté de Pharmacie, CESP, INSERM UMR-S 1178,
5, rue Jean-Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry
Tel: +33146835968
Fax: +33146835355
jean-philippe.guilloux@u-psud.fr

Statistical Summary

Abstract: 234 words

Manuscript: 4582 words

References: 67

Figures: 3

Supplementary Table: 1

Supplementary Figures: 5

Abstract

Understanding the pathophysiology of affective disorders and their treatment relies on the availability of experimental models that mimic aspects of the disease. Most of the studies on depressive disorders are conducted with male rodents, mostly because including females in protocols is more difficult. Indeed, there is a complex series of changes in the brain of females due to estrous cycle, adding an important variability factor to the disease. However, twice as much women as men have a life time diagnosis of major depressive disorder (MDD), so we need to develop reliable female models of depression to improve our understanding of this disease. Here, we describe the effects of chronic corticosterone administration (CORT) in female mice, a procedure known to enhance behavioral emotionality in male mice. A dose-response study showed that 4 weeks of CORT exposure at 35 µg/ml in the drinking water enhanced the emotionality score of female mice, however with a very small size effect. Tests of longer duration of treatment failed to potentiate the behavioral effects of CORT. As some steps of adult hippocampal neurogenesis are known to be sensitive to chronic CORT exposure, cell proliferation and survival as well as neuronal maturation in the dentate gyrus of the hippocampus analyses revealed no effect of chronic CORT exposure in female mice. Overall, this study showed that female C57BL6 mice are insensitive to chronic CORT as a way to model anxiety-depressive like behavior.

Public Significance Statements

Major depressive disorders impact more women than men, however >70% of preclinical studies are performed in male animal models of the disease. We need to validate in females protocols known to induce anxio-depressive like behavior in males. Test of chronic corticosterone administration (a model for depression in males) in females revealed their less sensitivity to this procedure. This emphasizes the need for appropriate models and behavioral readouts allowing our study of female vulnerability to develop major depressive disorders.

Keywords

females; emotionality; depression; neurogenesis; sex; corticosterone

Conflicts of Interest

All authors report no potential conflicts of interest that might influence this research.

Authors' contribution

MM, DD, JPG designed the study.

MM and JPG conducted experiments.

MM performed data analysis.

All authors wrote or contributed to the writing of the manuscript.

1 Introduction

Sex differences in prevalence of major depressive disorder (MDD) have been well established, with twice as much women as men having a life time diagnosis of MDD in both community and clinical samples (Kessler et al., 1994). However, if some studies showed an obvious difference in clinical manifestation of depression between men and women, others observed no major differences (Kornstein, 1997). Thus, it remains unclear whether depressive symptoms differ systematically between men and women.

Gaining insights into sex differences in the stress response may contribute to the improvement of both diagnosis and treatment. However, despite the well-established sex-differentiated trend in major depression, research in males still dominates both clinical and preclinical investigations (Simpson & Kelly, 2012). To study the pathophysiology of depression and response to antidepressant drug treatment, several preclinical models are available, however most of them have been developed in male rodents (Blanchard, Griebel, & Blanchard, 1995). For example, in the social defeat model, sex differences have been understudied, as female aggression levels are low in most laboratory rodent species (Greenberg et al., 2013). In the unpredictable chronic mild stress (UCMS) model, males and females are differentially affected, with effects of UCMS showing strain and sex dependencies, but also test-dependent effects (Franceschelli, Herchick, Thelen, Papadopoulou-Daifoti, & Pitychoutis, 2014; Mineur, Belzung, & Crusio, 2006). Emotional behavior analyses using z-scoring methodology across behavioral tests showed a robust sexual dimorphism in the vulnerability to develop high behavioral emotionality, and higher susceptibility of C57BL6 female mice to UCMS (Guilloux, Seney, Edgar, & Sibille, 2011). The term of emotionality in rodents has been proposed for the first time in 1934 (Hall, 1934) and is still a matter of debate due to its anthropomorphic value. In rodents, it includes avoidance of a novel environment, activity/behavioral inhibition in highly or moderately threatening situations, and autonomic arousal (Toth & Zupan, 2007), which are dimensions covering anxiety-like and/or depressive-like behavior. By definition, behavioral emotionality can fluctuate in response to variable environmental and biological stimuli, and may manifest as different behaviors. In animal models, it is classically reflected by altered behavior and is difficult to assess by a single-test

paradigm (Ohl, Toschi, Wigger, Henniger, & Landgraf, 2001). Thus, use of emotionality z-scores (Guilloux, et al., 2011) can capture this multimodal behavioral states observed in various paradigms over several days of testing and across various neuroendocrine states.

Stress and depression behaviors are highly linked to the HPA axis and corticosterone excretion. Differences have been mainly attributed to the ability of gonadal steroids and stress hormones to regulate multiple aspects of behavioral, neuroendocrine, neurochemical, neuroimmune, and neurogenetic processes in a sex-dependent manner (Franceschelli, et al., 2014). Estrous cycle is thus widely recognized as influencing the behavior of female rodents, inducing a variability factor (Palanza, 2001). For these main reasons, few studies include female mice in their protocols.

Here, we used a neuroendocrine mouse model of depression based on a chronic corticosterone administration (David et al., 2009; Gourley et al., 2008). Chronic corticosterone (CORT) administration has an effect in males on anxiety-depressive like symptoms (Rainer, Gardier, Hen, & David, 2009), cognitive performances (Darcet et al., 2014) and sleep alterations (Le Dantec et al., 2014). However, as other models, the CORT model has mainly been performed in male mice and few data are available in females (Ardayfio & Kim, 2006; Guilloux, et al., 2011). The few data available showed that female mice seems less vulnerable to exogenous CORT administration, at least in the C57BL6 strain (Guilloux, et al., 2011).

Here, we hypothesize that chronic CORT exposure in female mice would induce similar behavioral alteration as in males, however, not necessarily at the same dose or treatment duration as those requested for males. As changes in some steps in adult hippocampal neurogenesis have been observed in animal model of anxiety-depressive-like disorders, and especially after chronic CORT exposure, we hypothesize that similar alterations would be observable in female mice.

2 Methods

2.1 Animals

Eight to 10-weeks old C57BL6/NTac female mice (Taconic Farms, Denmark) were maintained under standard conditions (12/12h light/dark cycle, lights on at 6AM, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, food and water *ad libitum*, 5 mice/cage). All tests were conducted in compliance with the laboratory animal care guidelines, with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEE26 authorization 2012-099) and with the European directive 2010/63/EU.

2.2 Drugs and treatment

Corticosterone (CORT, free-base, 4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21-hemisuccinate from Sigma-Aldrich (France) was dissolved in vehicle (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin (β -CD), Sigma-Aldrich, France) and administered in the drinking water from the beginning of the study to the sacrifice of the animals.

Cohort #1: Dose response study: Three doses of corticosterone (7, 35 and 70 $\mu\text{g/ml}$, denominated CORT⁷, CORT³⁵ and CORT⁷⁰) were tested in mice after 28 days of administration in various behavioral tests (**Supplementary Figure 1**).

Cohort #2 and #3: Effect of various duration of treatment of CORT³⁵: Corticosterone (35 $\mu\text{g/ml}$) behavioral effects were tested in mice after 8 or 12 weeks of treatment in separated cohorts (**Supplementary Figure 1**).

2.3 Behavioural analysis

For all behavioural and physiological measurements, experimenters were blind of treatment administered to mice.

2.3.1 The elevated plus maze (EPM)

Behavior in the EPM was measured using a cross maze with two open and two closed arms (30×5 cm arms). Entries ratio and time spent in the open arms during a 5 min test measured

anxiety-related behaviors. The distance travelled in the maze was used as an index of locomotor activity.

2.3.2 The open-field paradigm (OF)

Motor activity was quantified in Plexiglas OF boxes 43x43 cm (MED associates, Georgia, VT, USA) during a 10-min session (Popa et al., 2010). The centre was defined as a 32x32-cm central arena. Dependent measures were: total time spent in the centre and distance travelled in the centre divided by total distance travelled. Overall motor activity was quantified as the total distance travelled (cm).

2.3.3 The novelty-suppressed feeding test (NSF)

Animals were food-deprived for 24h prior to the test. Testing was performed in a 50x40x20 cm box covered with bedding during a 6-min period (Santarelli et al., 2003). At the time of testing, a single pellet of food was placed on a white paper platform at the centre of the box. The latency to eating was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage and the amount of food consumed during the subsequent 5 min was measured, serving as a control for change in appetite as a possible confounding factor.

2.3.4 Splash Test

This test consisted in squirting a 10% sucrose solution on the mouse's snout. This procedure induces grooming behaviors, due to the viscosity and palatability of the sucrose (Ducottet & Belzung, 2004). The grooming behavior is sensitive to chronic stress (Ducottet & Belzung, 2004) or chronic corticosterone exposure and antidepressant treatment (Darcet, Gardier, David, & Guilloix, 2016). Total time spent in different grooming behaviours (face, paws, hindquarter and shoulders) was directly recorded during 5 min in the home cage of the animals.

2.3.5 Behavioral emotionality Measurement

Four behavioral tests (OF, EPM, NSF and Splash test) were used to measure components of animal behavioral emotionality. Z-score methodology was used to investigate the potential of combining results within and across the different behavior tests for depressive/anxious-like

behaviors and investigate the treatment effects in the CORT model. The emotionality-related data was normalized as previously described (Guilloux, et al., 2011). Briefly, z-scores are standardized scores (by the group mean and group standard deviation). They indicate how many standard deviations (σ) an observation (X) is above or below the mean of a control group (μ).

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

Z-scores for behavioral measures were first averaged within test, and then across test for equal weighting of the four tests comprising the final emotionality-score.

The increased behavioral emotionality was defined as decreased normalized OF center activity, decreased activity in the open arms in the EPM, increased NSF latency and decreased grooming in the splash test compared to control group means. The vehicle group was defined as the control. Thus, the emotionality score is not based on a single consistent behavior, but rather by a set of converging behavioral observations that together define an anxio-depressive phenotype.

2.3.6 Physiological response to treatment

Each week, animals were monitored for their weight and fur coat state. Mice exposed to corticosterone display a progressive alteration of their fur coat state. This index was measured on seven body parts of the mouse: head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forepaws and hind paws. For each body part, a score 0 was given for good state (smooth fur), a score 0.5 was given for moderate degradation (fur with some spiky patches) and a score 1 for unkempt coat (bad fur). The total score given for coat state is the sum of scores obtained from the seven body parts. (Edgar, Touma, Palme, & Sibille, 2011).

2.4 Corticosterone Enzyme Immunoassay (EIA)

Mice were exposed to a forced swim for 10 min and then returned to their home cages. Blood was collected from awake mice 30 min after the start of the stressor from the retro-orbital sinus using a 5mm Lancet (Goldenrod, USA) (Golde, Gollobin, & Rodriguez, 2005). Blood was then transferred to Eppendorf tubes pre-coated with 5 μ l of 0.5 M K3-EDTA, placed on ice, and immediately spun down to obtain plasma for subsequent EIA. Plasma was stored at -80°C until

analysis. EIA was performed using a DetectX Corticosterone EIA Kit (#K014-H1, Arbor Assays).

2.5 Estrous cycle

Vaginal cytology was used to determine the stage of the estrus cycle after each behavioral test at the end of the day. Briefly, the tip of a plastic pipette filled with 20 µl of NaCl 0.9% was gently inserted into the vagina of the mice and flushed three times. The final flush was collected and placed on a glass slide and the estrous cycle stage was determined microscopically by the types and relative numbers of cells present (Caligioni, 2009; Goldman, Murr, & Cooper, 2007).

2.6 Immunohistochemistry

After anesthesia with ketamine and xylazine (100 mg/ml ketamine ; 20 mg/ml xylazine), mice were perfused transcardially (cold saline for 2 min, followed by 4% cold paraformaldehyde at 4°C). The brains were then removed and cryoprotected in 30% sucrose and stored at 4°C. Serial sections (35 µM) were cut through the entire hippocampus on a cryostat and stored in PBS with 0.1% NaN₃.

2.6.1 Cell proliferation and survival

We monitored the effects of chronic corticosterone administration on cell proliferation and survival in the dentate gyrus as both these steps of neurogenesis have been shown to be altered in models of stress (Miller & Hen, 2015; Yun, Reynolds, Masiulis, & Eisch, 2016)

Proliferation study: Proliferation of newborn cells was monitored using Ki-67 immunohistochemistry as described previously (Xia et al., 2012). Ki-67 is a nuclear protein expressed in all phases of the cell cycle except the resting phase. It is expressed within the proliferative zone of the dentate gyrus and it has been shown that its expression pattern mimicked that of BrdU when examined soon after exogenous BrdU administration. Sections were washed in PBS, blocked (PBS containing 0.3% Triton X-100 and 10% normal donkey serum (NDS)), and incubated with primary antibody overnight at 4°C (Ki67 rabbit, 1:100, Vector, Burlingame, CA). Following washes in PBS, sections were incubated with fluorescence-coupled rabbit secondary antibody (Jackson

ImmunoResearch, Beckman, France). Stereological quantification of Ki-67 labeling was performed using an Olympus BX51 microscope (Germany).

Survival study: Mice were administered with BrdU (150 mg/kg, i.p. dissolved in saline, twice a day during 3 days) before the start of the corticosterone treatment. BrdU has been a principal marker for mitotic cells in studies of adult neurogenesis, as it can be incorporated into DNA during the S-phase of the mitotic process (Gratzner, 1982). Thus its observation several weeks after administration allows the monitoring of survival of proliferating cells. For DAB staining, sections were mounted on slides and boiled in citric acid (pH 6.0) for 5 min, rinsed with PBS, and treated with 0.01% trypsin in Tris/CaCl₂ for 10 min. Brain sections were incubated for 30 min with 2N HCl and blocked with 5% NGS. Sections were then incubated overnight at room temperature with anti-mouse BrdU (1:100). After washing with PBS, sections were incubated for 1 hr with secondary antibody (1:200 biotinylated goat anti-mouse) followed by amplification with an avidin-biotin complex. The staining was visualized with DAB. For the quantification of BrdU labeling, a stereological procedure was used as previously described (Xia, et al., 2012).

2.6.2 Doublecortin (DCX) labelling for maturation index study

For doublecortin (DCX) staining, the procedure consisted of the following steps: 1 h incubation in 0.1 M TBS with 0.5% Triton X-100 and 10% NDS, followed by goat anti-DCX primary antibody (1:100) in TBS/Tx/NDS for 24 h at 4°C. Biotinylated secondary donkey anti-goat antibody (1:500) in TBS/NDS for 1 h at room temperature was used, followed by a 1 h amplification step using an avidin-biotin complex (Vector). The immunohistochemistry protocol was adapted from David et al., 2009 (David, et al., 2009). DCX-positive (DCX⁺) cells were subcategorized according to their dendritic morphology: DCX⁺ cells without and DCX⁺ cells with tertiary (or higher order) dendrites. The maturation index was defined as the ratio of DCX⁺ cells possessing tertiary dendrites to the total number of DCX⁺ cells, highlighting the complexity of the dendritic arborization. This procedure was performed as chronic stress has been shown to alter hippocampal neurogenesis and neuronal maturation (Lussier et al., 2013). In the adult brain, DCX expression is retained within areas of continuous neurogenesis, i.e. the hippocampus and the SVZ/olfactory bulb axis

(J. P. Brown et al., 2003), and rarely expressed outside these regions (Nacher, Crespo, & McEwen, 2001).

2.7 Statistical analysis

For all experiments, Student t-test or two-tailed one-way ANOVA was performed and results were expressed as mean $\pm$ SEM values. Estrous state was tested as a co-factor and, as no significant effect was observed, this factor was removed for further analyses. Moreover, we observed a similar proportion of mice in each phase of the estrous cycle after each behavioral analysis.

When a main effect was significant, treatment comparisons were analyzed using PLSD *post-hoc* test. Complete description of statistics can be found in the Supplementals (**Supplementary Table 1**). When appropriate, Student *t*-tests were used to determine statistical significance of planned comparisons. Differences were considered significant when $p < 0.05$. All analyses were conducted using Graphpad Prism v.6.

3 Results

3.1 Dose-response effects of chronic corticosterone administration

The effect of 3 doses of corticosterone (7, 35 and 70 $\mu\text{g/ml}$) were assessed in the Open Field (OF), in the Elevated Plus Maze (EPM), the Novelty Suppressed Feeding (NSF) and the splash test (ST) paradigms.

In the EPM a one-way ANOVA on the time spent and the number of entries in the open arms, revealed no significant effect of treatment factor (**Figure 1A**). In the OF, chronic exogenous corticosterone had a significant marked effect on the time spent in the centre resulting in a significant decrease ($p < 0.05$ for CORT⁷, $p < 0.05$ for CORT³⁵ and $p < 0.05$ for CORT⁷⁰, **Figure 1A**).

In the Splash test, a one-way ANOVA on the grooming duration revealed no significant effect of treatment factor (**Figure 1A**), but a planned comparison revealed a significant decrease in grooming after CORT³⁵ administration ($p < 0.05$). In the NSF, a one-way ANOVA showed also a significant effect of CORT³⁵ to increase latency to eat the pellet ($p < 0.05$). Analyses of test-specific

z-scores (**Figure 1B**) indicated a significant effect of CORT³⁵ on OF z-score, Splash Test Z-score and NSF Z-score using one-way ANOVA or planned comparison. Finally, these values were averaged to obtain a single emotionality score, describing the integrated output the whole behavioral analysis (**Figure 1C**). Overall, the emotionality score shows that CORT³⁵ showed the highest efficacy to alter female emotional behavior ($p < 0.01$). However the phenotype induced after 4 weeks of corticosterone was of low intensity compared to those usually observed in males (Edgar, et al., 2011; Guilloux, et al., 2011) (See also **Supplementary Figure 2**).

Physiological changes were also observed, as gain in weight was lower in CORT³⁵-treated animals, while an alteration in coat state was observed after either CORT³⁵ or CORT⁷⁰ treatment (**Supplementary Figure 3A-B**). We measured stress-induced (forced swim) elevation of corticosterone plasmatic concentrations as a way to monitor HPA-axis reactivity (**Supplementary Figure 3C**). While HPA-axis reactivity in CORT⁷-treated mice seemed similar to control mice, CORT³⁵ and CORT⁷⁰ treated mice displayed decreased reactivity. All doses tested were well tolerated by the animals.

3.2 Female mice are insensitive to chronic (8 or 12 weeks) administration of corticosterone.

In order to confirm the relative efficacy of chronic corticosterone to induce higher behavioral emotionality state in females, we tested various duration (8 and 12 weeks) of CORT³⁵ administration in larger cohort of female mice.

In cohort#2, CORT³⁵ effects on emotional behavior were tested after 8 weeks of administration. A t-test revealed no effect of CORT³⁵ treatment on behavioral emotionality ($p = 0.493$, **Figure 2A**). Analysis of emotionality score distribution did not reveal subgroup of animals showing high or low susceptibility to chronic CORT, but rather a normal distribution of values, with highest proportion of animals showing low values of emotionality score (-0.5 to 0.5, **Figure 2B**).

In cohort#3, CORT³⁵ effects were assessed after 12 weeks of administration. A t-test revealed no effect of treatment ($p = 0.693$, **Figure 2C**). Similarly, distribution of emotionality score revealed a

normal distribution of values (**Figure 2D**). Detailed behavioral results are provided in **Supplemental Figure 4**.

Physiological effects CORT³⁵ administration confirmed the weight loss after 12 weeks of treatment but no changes on fur coat was observed (**Supplementary Figure 5**).

3.3 Chronic CORT³⁵ administration did not change adult hippocampal neurogenesis

A neurogenesis study was carried out to assess cell proliferation and survival as well as neuronal maturation in the dentate gyrus of the hippocampus after 12 weeks of CORT³⁵ (**Figure 3A-D**). T-test analyses revealed no significant effect of CORT³⁵ on cell proliferation ($p=0.12$; **Figure 3A**), cell survival ($p=0.52$; **Figure 3B**). Neuronal maturation was unchanged as revealed by similar number of DCX⁺ cells ($p=0.35$; **Figure 3C**), or of DCX⁺ cells with tertiary dendrites ($p=0.20$; **Figure 3C**) or values of neuronal maturation index ($p=0.49$; **insert in Figure 3C**).

4 Discussion

Chronic corticosterone administration is known to alter emotional behavior in males, as previously observed in our lab (Darcet, et al., 2014; David, et al., 2009; Guilloux, et al., 2011; Le Dantec, et al., 2014; Rainer, et al., 2009) or by others (Gourley, Kiraly, Howell, Olausson, & Taylor, 2008; Kutiyanawalla, Terry, & Pillai, 2011; van Donkelaar et al., 2014; Wu et al., 2013; Zhang, Zhao, & Wang, 2015; Zhao et al., 2008), while its administration in adolescent male mice seems to attenuate depression-like behaviors (Xu et al., 2011).

Here, our study showed that chronic corticosterone administration in C57BL6/NTac females do not robustly increase anxio/depressive-like behavior as reports showed in males. Our dose-response study in the first cohort of females suggested that the dose of 35 µg/ml of CORT displays the highest efficacy to alter female emotional behavior. Interestingly, the same dose induces an anxio-depressive like phenotype in males (David, et al., 2009). However, the phenotype induced after 4 weeks of CORT was of low intensity compared to what is usually

observed in males, as observed by the low value of emotionality score obtained ($z\text{-score}=0.45\pm 0.17$) compared to what is observed in males ($z\text{-score} = 0.7\pm 0.09$ in (Guilloux, et al., 2011) or (Edgar, et al., 2011)). While CORT⁷ dosage may be too low to induce an anxio-depressive-like phenotype as it has been shown in male mice (David, et al., 2009), our finding that CORT⁷⁰ was ineffective was not expected, and suggests a U-shape effect of CORT on emotional behavior in females. An inverted U-shape effect has often been proposed to characterize the dose-response relationship between corticosterone levels and behavioral emotionality, based mostly on research performed in male rodents (McEwen et al., 2015). However, this relationship is not systematic (Joels, 2006), thus we may hypothesize that females developed a tolerance toward high dosages of CORT. Additionally, our plasmatic corticosterone dosage after acute stressor confirmed the lack of effect of CORT⁷ on this physiological response to stress, and no differences between CORT³⁵ and CORT⁷⁰ treated mice.

Thus, in order to potentiate the effects of CORT³⁵, we tested various duration of treatment in additional cohorts with a larger number of animals. After extending the treatment duration to 8 weeks (cohort #2) or to 12 weeks (cohort #3), emotionality scores remained low, and even non significantly different from vehicle-treated mice. We confirmed the smaller and variable effect size of corticosterone exposure in female C57BL6 mice even after extending the treatment duration. This is reflected by an overall less robust and stable anxious/depressive-like phenotype. Additionally, our study used emotionality score analysis, based on clinical meta-analysis Z-score principles, to obtain an individual and a group score helping in phenotyping animals' behavior not based on a solely task (Guilloux, et al., 2011). Here, emotionality score was calculated based on data obtained from Open Field, Elevated Plus Maze, Novelty Suppressed Feeding and Splash tests, which covers a large panel of distinct behaviours, that however all relate to behavioral emotionality.

Few studies report the behavioural effects of chronic corticosterone exposure in females. These studies differ in terms of species (rats in (Kalynchuk, Gregus, Boudreau, & Perrot-Sinal, 2004)) or

mouse background (Swiss Webster background in (Ardayfio & Kim, 2006; Rosa et al., 2014)) and CORT doses (35 µg/ml in drinking water in (Ardayfio & Kim, 2006), 20 mg/kg, p.o. in (Rosa, et al., 2014), and 40 mg/kg in (Kalynchuk, et al., 2004)) used. All studies report increased emotional behavior after CORT treatment, however Kalynchuk et al. (2004) also reported less vulnerability to develop depressive-like behavior in female rats compared to males.

The various phases of the estrus cycle do not seem to participate in our results as a confounding factor that may increase the variability of behavioral response to corticosterone. However, decrease in behavioral indices of anxiety of female rats has been reported during proestrus and estrus phases. Indeed, ovariectomized rats exhibit higher indices of anxiety than intact animals (Mora, Dussaubat, & Diaz-Veliz, 1996; Zimmerberg & Farley, 1993). In addition, estradiol and progesterone have anxiolytic-like effects in several experimental paradigms (Fernandez-Guasti & Picazo, 1997). Interestingly, increased vulnerability of female mice to UCMS was partially masculinized after exposure to neonatal testosterone exposure, suggesting a role for hormones during development in this susceptibility (Seney, Walsh, Stolakis, & Sibille, 2012).

Furthermore, female gonadal hormones effects leading to a different response to exogenous CORT administration may be due to their action toward anatomic or functional characteristics of several neurotransmitter and neuromodulatory systems, including noradrenaline and serotonin neurotransmissions (Blanchard, Shepherd, De Padua Carobrez, & Blanchard, 1991). These differences in the brain, and the sexual dimorphism of the hippocampus (Kelly, Ostrowski, & Wilson, 1999) may explain sex differences in behavior and brain functions.

There are complex interactions between temporary influences of fluctuating gonadal hormones and the permanent influences of steroid hormones (Kelly, et al., 1999). Females have naturally higher basal CORT levels in blood than males (Viau, 2002), and chronic CORT exposure in female rats induces less disruption of normal circadian rhythms of CORT and no change in adrenal weight compared to male rats (Young, 1998). Overall, this emphasizes that effects of exogenous CORT administration may differ depending on the sex of animals, and that increasing doses of CORT administered was ineffective in our study.

Other animal models of anxiety/depressive-like behavior also showed sex differences. For instance, impact of housing conditions appears to be more pronounced in females than in males. Individual housing induces higher level of anxiety in females compared to males (Palanza, 2001), associated with higher CORT levels (K. J. Brown & Grunberg, 1995), indicating that social isolation of female produces behavioral changes resembling symptoms of anxiety-depressive like disorders. Social defeat is notoriously known to induce a stressful phenotype only in male mice. However, because females have lower levels of female-female aggression compared to males, social defeat protocols in female mice or rats may need to be modified to allow the induction of an anxiety-depressive phenotype (Page, Opp, & Kozachik, 2016; Solomon, 2017). Some studies suggest that social instability could be a more valid social stressor in females, compared to social defeat in males (Haller, Fuchs, Halasz, & Makara, 1999; Herzog et al., 2009). In this regard, Schmidt et al. proposed a model based on the creation of an unstable social environment in a group-housed setting, which induces physiological changes associated with stress-response (Schmidt et al., 2010). Sex differences after chronic mild stress (CMS) procedures have been often reported (see (Franceschelli, et al., 2014) for a review). Females' greater sensitivity to CMS seems to be dependent on the strain and also the test used to define altered emotional behavior (Mineur, et al., 2006). One of the interests of this model is that differences in response to CMS exposure allow the study of biological factors related to susceptibility or resilience to develop altered emotionality. However, its use in psychopharmacological studies - where a large number of animals displaying robust depressive-like behavior is needed to observe a treatment effect - is hampered by its reproducibility and variability in behavioral responses. As pointed out by Kokras and Dalla, findings from animal models do not match or explain the sex differences in various aspects of psychiatric diseases in humans (Kokras & Dalla, 2014). Yet, while CMS is the most appropriate protocol to induce anxiety-depressive-like behavior in females, new directions to define robust female animal models of anxiety-depression may include combined behavioral stressors associated with neuroendocrine- or inflammatory-based manipulations, in order to generate larger cohorts of animals for psychotropic drug-response studies. Additionally,

behavioral readouts of effects of stress in females may request different paradigm than those classically used in males (Dalla et al., 2005).

Antidepressant action has been putatively associated with changes in adult hippocampal neurogenesis (Airan et al., 2007; Santarelli, et al., 2003; Wang, David, Monckton, Battaglia, & Hen, 2008). Increasing adult hippocampal neurogenesis promotes resilience to the effects of CORT³⁵ (Hill, Sahay, & Hen, 2015). However, not all antidepressant effects are related to neurogenesis (David, et al., 2009; Mendez-David et al., 2014). While we cannot ruled out changes in neurogenesis after 4 weeks of CORT³⁵ (for which we observed a small increase in behavioral emotionality), here, we found no changes in the various steps of adult hippocampal neurogenesis after chronic (12 weeks) exposure to CORT³⁵ in females, associated with no anxio-depressed phenotype. While direct comparison with males was not performed in this study, these results contrasts with the changes observed in males in which increased behavioral emotionality was associated with decreased cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus after chronic CORT³⁵ (David, et al., 2009; Rainer et al., 2012). This neurogenic effect was also observed after CMS procedures (Surget et al., 2008) or Social defeat for a short period (Lagace et al., 2010). However, there is little evidence yet showing that altered neurogenesis can precipitate anxio-depressive-like behavior in rodents, as well as in humans.

In summary, we showed, using a z-score methodology of animals' emotionality analysis along cohesive behavioral dimensions that chronic corticosterone is inefficient as a neuroendocrine model to induce vulnerability to mood disorders in C57BL6 female mice. These results emphasize the need for more robust and appropriate animal models, allowing the study of a pathology for which women display a twice more vulnerability.

Acknowledgements and disclosures

This work was supported by the technical assistance of Valerie Dupont-Domergue and the staff of the animal care facility of the SFR-UMS Institut Paris Saclay Innovation Thérapeutique. This work

was supported by the Agence Nationale de la Recherche “DEP-ARREST” and by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR, Paris, France) Fellowship.

5 References

- Airan, R. D., Meltzer, L. A., Roy, M., Gong, Y., Chen, H., & Deisseroth, K. (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science*, 317(5839), 819-823. doi: 10.1126/science.1144400
- Ardayfio, P., & Kim, K. S. (2006). Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice. *Behavioral Neuroscience*, 120(2), 249-256. doi: 10.1037/0735-7044.120.2.249
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (1995). Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. *Journal of Psychopharmacology*, 9(2), 79-82. doi: 10.1177/026988119500900201
- Blanchard, D. C., Shepherd, J. K., De Padua Carobrez, A., & Blanchard, R. J. (1991). Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 15(4), 461-468.
- Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., & Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 467(1), 1-10. doi: 10.1002/cne.10874
- Brown, K. J., & Grunberg, N. E. (1995). Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females. *Physiology and Behavior*, 58(6), 1085-1089.
- Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience, Appendix 4*, Appendix 4I. doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48
- Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005). Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience*, 135(3), 703-714. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.068
- Darcet, F., Gardier, A. M., David, D. J., & Guilloux, J. P. (2016). Chronic 5-HT4 receptor agonist treatment restores learning and memory deficits in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Neuroscience Letters*, 616, 197-203. doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.055
- Darcet, F., Mendez-David, I., Tritschler, L., Gardier, A. M., Guilloux, J. P., & David, D. J. (2014). Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 136. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00136
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., ...Hen, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62(4), 479-493. doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.017
- Ducottet, C., & Belzung, C. (2004). Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiology and Behavior*, 81(3), 417-426. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.01.013

- Edgar, N. M., Touma, C., Palme, R., & Sibille, E. (2011). Resilient emotionality and molecular compensation in mice lacking the oligodendrocyte-specific gene *Cnp1*. *Translational Psychiatry*, 1, e42. doi: 10.1038/tp.2011.40
- Fernandez-Guasti, A., & Picazo, O. (1997). Anxiolytic actions of diazepam, but not of buspirone, are influenced by gender and the endocrine stage. *Behavioural Brain Research*, 88(2), 213-218.
- Franceschelli, A., Herchick, S., Thelen, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Pitychoutis, P. M. (2014). Sex differences in the chronic mild stress model of depression. *Behavioural Pharmacology*, 25(5-6), 372-383. doi: 10.1097/FBP.0000000000000062
- Golde, W. T., Gollobin, P., & Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)*, 34(9), 39-43. doi: 10.1038/labani1005-39
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research. Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97. doi: 10.1002/bdrb.20106
- Gourley, S. L., Kiraly, D. D., Howell, J. L., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2008). Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biological Psychiatry*, 64(10), 884-890. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.06.016
- Gourley, S. L., Wu, F. J., Kiraly, D. D., Ploski, J. E., Kedves, A. T., Duman, R. S., & Taylor, J. R. (2008). Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biological Psychiatry*, 63(4), 353-359. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.07.016
- Gratzner, H. G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218(4571), 474-475.
- Greenberg, G. D., Laman-Maharg, A., Campi, K. L., Voigt, H., Orr, V. N., Schaal, L., & Trainor, B. C. (2013). Sex differences in stress-induced social withdrawal: role of brain derived neurotrophic factor in the bed nucleus of the stria terminalis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 223. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00223
- Guilloux, J. P., Seney, M., Edgar, N., & Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *Journal of Neuroscience Methods*, 197(1), 21-31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.019
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defaecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18, 385-403.
- Haller, J., Fuchs, E., Halasz, J., & Makara, G. B. (1999). Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. *Brain Research Bulletin*, 50(1), 33-39.
- Herzog, C. J., Czeh, B., Corbach, S., Wuttke, W., Schulte-Herbruggen, O., Hellweg, R., ...Fuchs, E. (2009). Chronic social instability stress in female rats: a potential animal model for female depression. *Neuroscience*, 159(3), 982-992. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.059
- Hill, A. S., Sahay, A., & Hen, R. (2015). Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 40(10), 2368-2378. doi: 10.1038/npp.2015.85
- Joels, M. (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(5), 244-250. doi: 10.1016/j.tips.2006.03.007

- Kalynchuk, L. E., Gregus, A., Boudreau, D., & Perrot-Sinal, T. S. (2004). Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. *Behavioral Neuroscience*, 118(6), 1365-1377. doi: 10.1037/0735-7044.118.6.1365
- Kelly, S. J., Ostrowski, N. L., & Wilson, M. A. (1999). Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 64(4), 655-664.
- Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Zhao, S., Nelson, C. B., Hughes, M., Eshleman, S., ...Kendler, K. S. (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Archives of General Psychiatry*, 51(1), 8-19.
- Kokras, N., & Dalla, C. (2014). Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *British Journal of Pharmacology*, 171(20), 4595-4619. doi: 10.1111/bph.12710
- Kornstein, S. G. (1997). Gender differences in depression: implications for treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*, 58 Suppl 15, 12-18.
- Kutiyawalla, A., Terry, A. V., Jr., & Pillai, A. (2011). Cysteamine attenuates the decreases in TrkB protein levels and the anxiety/depression-like behaviors in mice induced by corticosterone treatment. *PloS One*, 6(10), e26153. doi: 10.1371/journal.pone.0026153
- Lagace, D. C., Donovan, M. H., DeCarolis, N. A., Farnbauch, L. A., Malhotra, S., Berton, O., ...Eisch, A. J. (2010). Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4436-4441. doi: 10.1073/pnas.0910072107
- Le Dantec, Y., Hache, G., Guilloux, J. P., Guiard, B. P., David, D. J., Adrien, J., & Escourrou, P. (2014). NREM sleep hypersomnia and reduced sleep/wake continuity in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression based on chronic corticosterone administration. *Neuroscience*, 274, 357-368. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.050
- Lussier, A. L., Lebedeva, K., Fenton, E. Y., Guskjolen, A., Caruncho, H. J., & Kalynchuk, L. E. (2013). The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 71, 174-183. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.012
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1353-1363. doi: 10.1038/nn.4086
- Mendez-David, I., David, D. J., Darcet, F., Wu, M. V., Kerdine-Romer, S., Gardier, A. M., & Hen, R. (2014). Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology*, 39(6), 1366-1378. doi: 10.1038/npp.2013.332
- Miller, B. R., & Hen, R. (2015). The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Current Opinion in Neurobiology*, 30, 51-58. doi: 10.1016/j.conb.2014.08.012
- Mineur, Y. S., Belzung, C., & Crusio, W. E. (2006). Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*, 175(1), 43-50. doi: 10.1016/j.bbr.2006.07.029
- Mora, S., Dussaubat, N., & Diaz-Veliz, G. (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 21(7), 609-620.

- Nacher, J., Crespo, C., & McEwen, B. S. (2001). Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *European Journal of Neuroscience*, 14(4), 629-644.
- Ohl, F., Toschi, N., Wigger, A., Henniger, M. S., & Landgraf, R. (2001). Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 115(2), 429-436.
- Page, G. G., Opp, M. R., & Kozachik, S. L. (2016). Sex differences in sleep, anhedonia, and HPA axis activity in a rat model of chronic social defeat. *Neurobiology of Stress*, 3, 105-113. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.03.002
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3), 219-233.
- Popa, D., Cerdan, J., Reperant, C., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., David, D. J., & Gardier, A. M. (2010). A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *European Journal of Pharmacology*, 628(1-3), 83-90. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.11.037
- Rainer, Q., Gardier, A. M., Hen, R., & David, D. J. (2009). [Neurogenesis-dependent and independent effects of anti-depressant drugs]. *Médecine Sciences*, 25(10), 795-798. doi: 10.1051/medsci/20092510795
- Rainer, Q., Xia, L., Guilloux, J. P., Gabriel, C., Mocaer, E., Hen, R., ...David, D. J. (2012). Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(3), 321-335. doi: 10.1017/S1461145711000356
- Rosa, P. B., Ribeiro, C. M., Bettio, L. E., Colla, A., Lieberknecht, V., Moretti, M., & Rodrigues, A. L. (2014). Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 127, 1-6. doi: 10.1016/j.pbb.2014.10.003
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., ...Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301(5634), 805-809. doi: 10.1126/science.1083328
- Schmidt, M. V., Scharf, S. H., Liebl, C., Harbich, D., Mayer, B., Holsboer, F., & Müller, M. B. (2010). A novel chronic social stress paradigm in female mice. *Hormones and Behavior*, 57(4-5), 415-420. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.01.010
- Seney, M. L., Walsh, C., Stolakis, R., & Sibille, E. (2012). Neonatal testosterone partially organizes sex differences in stress-induced emotionality in mice. *Neurobiology of Disease*, 46(2), 486-496. doi: 10.1016/j.nbd.2012.02.014
- Simpson, J., & Kelly, J. P. (2012). An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 289-300. doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.036
- Solomon, M. B. (2017). Evaluating social defeat as a model for psychopathology in adult female rodents. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1-2), 763-776. doi: 10.1002/jnr.23971
- Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., ...Belzung, C. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biological Psychiatry*, 64(4), 293-301. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.02.022
- Toth, M., & Zupan, B. (2007). Neurobiology of Anxiety. doi: 10.1002/9780470101001.hcn023
- van Donkelaar, E. L., Vaessen, K. R., Pawluski, J. L., Sierksma, A. S., Blokland, A., Canete, R., & Steinbusch, H. W. (2014). Long-term corticosterone exposure decreases insulin sensitivity and induces depressive-like behaviour in the

- C57BL/6NCrI mouse. *PloS One*, 9(10), e106960. doi: 10.1371/journal.pone.0106960
- Viau, V. (2002). Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(6), 506-513.
- Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *Journal of Neuroscience*, 28(6), 1374-1384. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008
- Wu, T. C., Chen, H. T., Chang, H. Y., Yang, C. Y., Hsiao, M. C., Cheng, M. L., & Chen, J. C. (2013). Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 38(6), 871-883. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.011
- Xia, L., Delomenie, C., David, I., Rainer, Q., Marouard, M., Delacroix, H., ...Guilloux, J. P. (2012). Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1)A and 5-HT(1)B receptors disruption in mice. *Neuroscience Letters*, 521(1), 20-25. doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.046
- Xu, Z., Zhang, Y., Hou, B., Gao, Y., Wu, Y., & Zhang, C. (2011). Chronic corticosterone administration from adolescence through early adulthood attenuates depression-like behaviors in mice. *Journal of Affective Disorders*, 131(1-3), 128-135. doi: 10.1016/j.jad.2010.11.005
- Young, E. A. (1998). Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease. *Journal of Gender-Specific Medicine*, 1(1), 21-27.
- Yun, S., Reynolds, R. P., Masiulis, I., & Eisch, A. J. (2016). Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis. *Nature Medicine*, 22(11), 1239-1247. doi: 10.1038/nm.4218
- Zhang, H., Zhao, Y., & Wang, Z. (2015). Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice. *Neuroscience Letters*, 592, 76-81. doi: 10.1016/j.neulet.2015.03.006
- Zhao, Y., Shen, J., Su, H., Li, B., Xing, D., & Du, L. (2008). Chronic corticosterone injections induce a decrease of ATP levels and sustained activation of AMP-activated protein kinase in hippocampal tissues of male mice. *Brain Research*, 1191, 148-156. doi: 10.1016/j.brainres.2007.11.027
- Zimmerberg, B., & Farley, M. J. (1993). Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiology and Behavior*, 54(6), 1119-1124.

6 Legends

Figure 1: Dose-response effect of chronic administration of corticosterone at 7, 35 and 70 $\mu\text{g/ml}$

(A) Raw data obtained from four independent behavioral tests performed in the same animal (OF, EPM, NSF and Splash Test). Normalization of data using z-score method was performed for each parameter as described in Methods using the control group as the baseline. (B) Test z-values were then calculated by averaging individual z-scores, and (C) averaged to finally obtain emotionality z-score. Data represent mean $\pm$ S.E.M. (n=15/group). *p<0.05, **p<0.01 *versus* vehicle group using One-Way ANOVA, #p<0.05 *versus* vehicle group using planned comparison.

Figure 2: Emotionality score of CORT³⁵-treated mice during 8 or 12 weeks.

Effects of various duration of treatment of CORT³⁵ on behavioral emotionality (A) Emotionality score measurements after 8 weeks of CORT³⁵ administration (n=15 and n=30 in the vehicle and corticosterone-treated groups, respectively) (B) Emotionality score after a 12-weeks of CORT³⁵ administration. Data represent mean $\pm$ S.E.M. (n=15 in the vehicle group and n=30 in the corticosterone/treated group)

Figure 3: Administration of chronic CORT³⁵ treatment on various steps of neurogenesis.

Effect of 12 weeks of chronic corticosterone administration (35 $\mu\text{g/ml}$), (A) on cell proliferation, measured as mean number of Ki-67⁺ cells, (B) on cell survival, measured as mean number of BrdU⁺ cells and on (C) neuronal maturation measured as total number of DCX⁺ cells and on the DCX⁺ cells with tertiary dendrites. (D) Representative illustrations of Ki67, BrdU and DCX immunoreactivity (10 $\times$ magnification) in the dentate gyrus of vehicle and CORT treated mice. Data represent mean $\pm$ S.E.M (n=5 mice per/group).

Figure 1

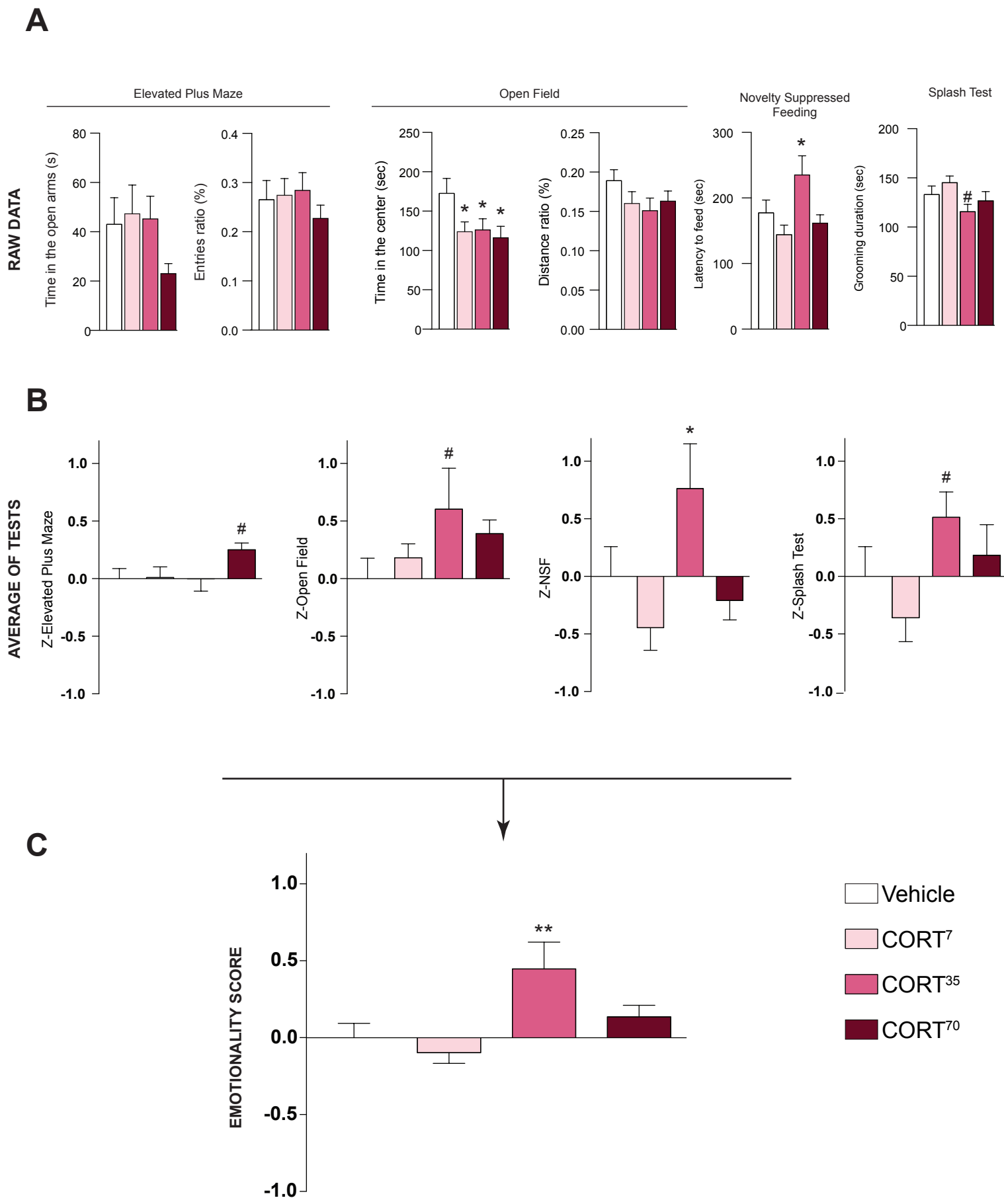


Figure 2

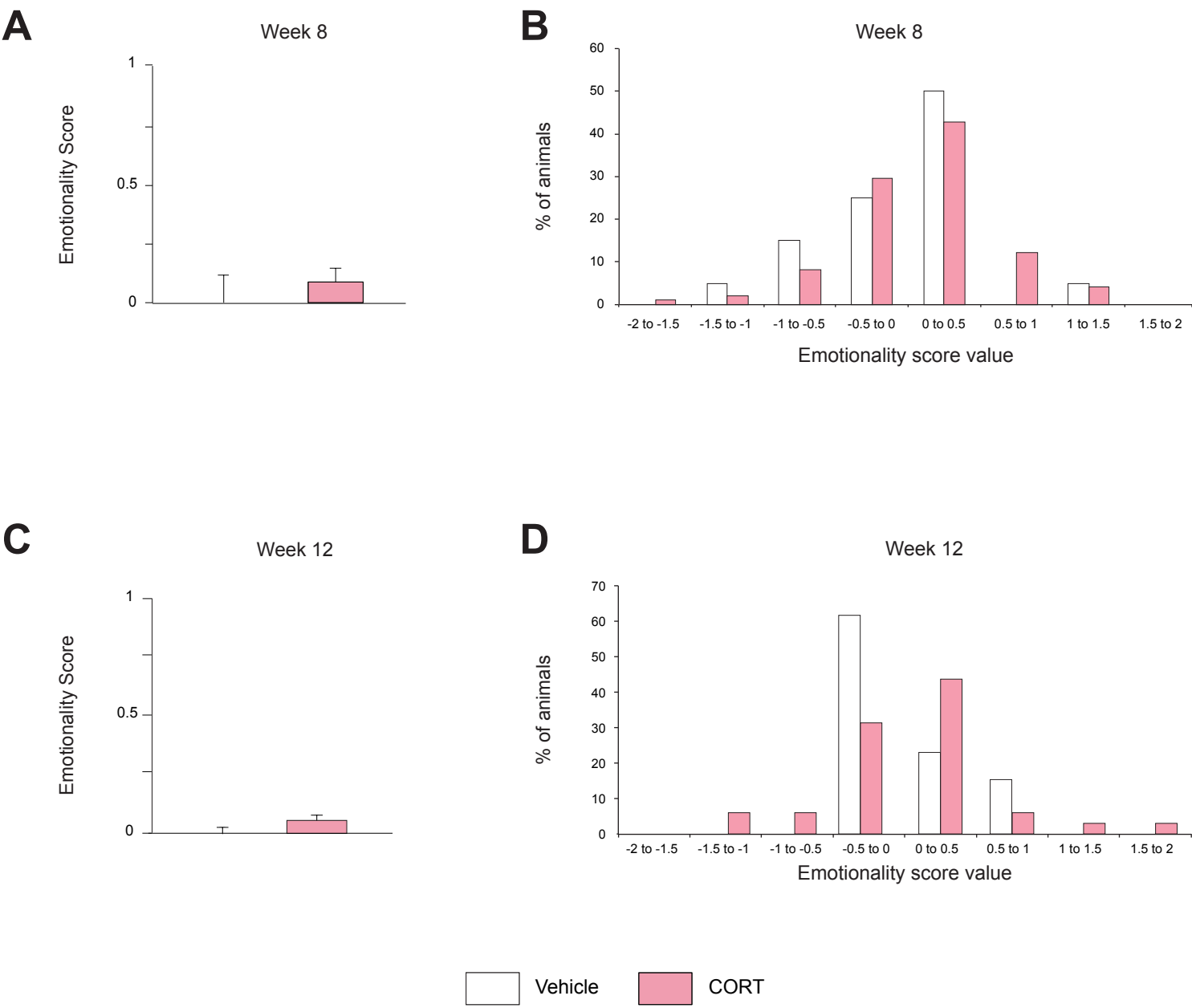
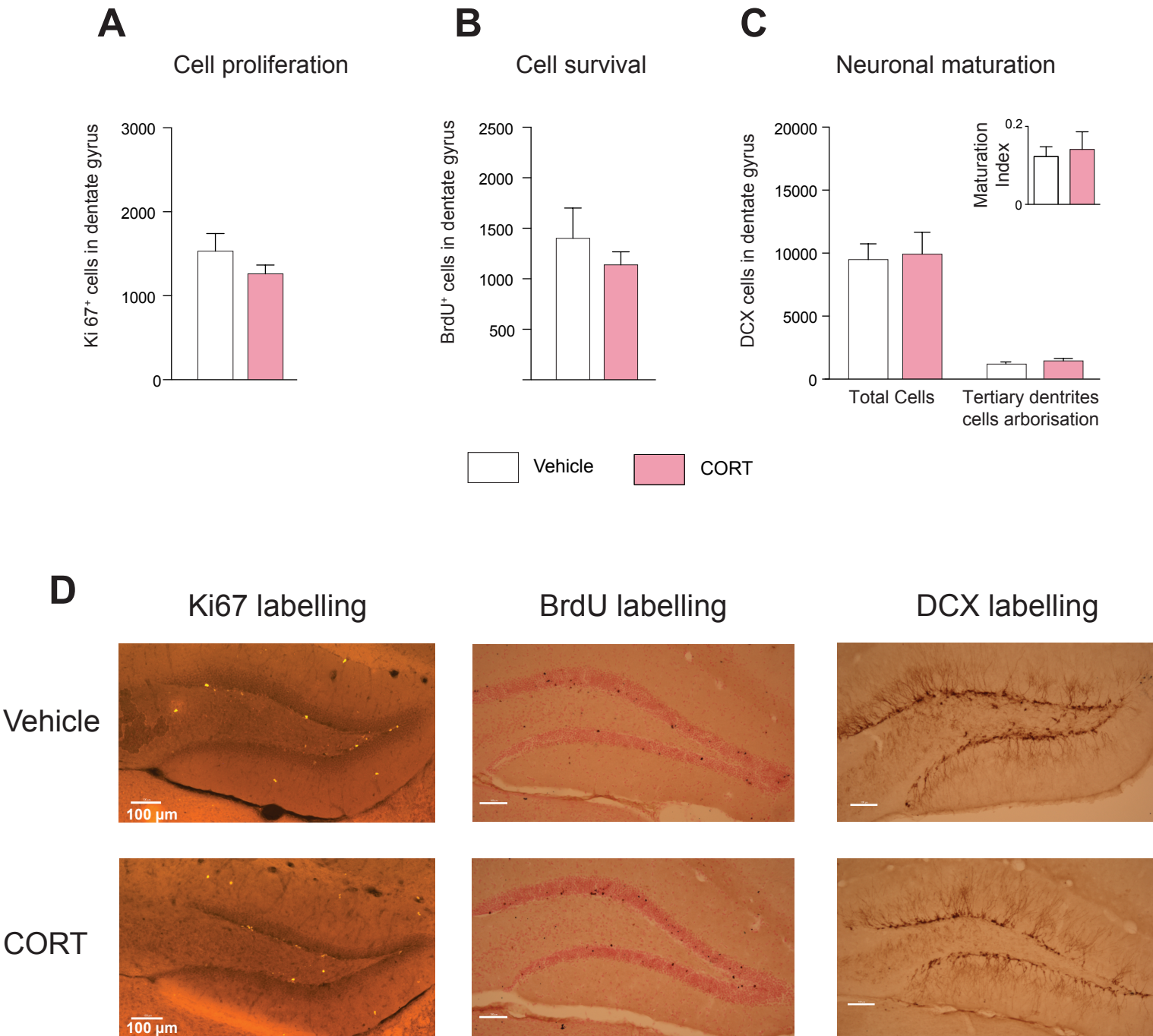


Figure 3



Vehicle

CORT

Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female C57BL6 mice.

Supplementary Materials

Authors: Maryam Mekiri, Alain M Gardier, Denis J David, Jean-Philippe Guilloux[§].

CESP/UMRS-1178, Univ. Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay,
Chatenay-Malabry, 92290, France

[§] To whom correspondence should be sent:

Dr Jean-Philippe Guilloux
¹Université Paris-Saclay, Univ. Paris-Sud,
Faculté de Pharmacie, INSERM UMR-S 1178,
5, rue Jean-Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry
Tel: +33146835968
Fax: +33146835355
jean-philippe.guilloux@u-psud.fr

Supplementary Table 1: Overall Statistical Results

Complete statistical summary analysis for behavioral and immunohistochemical data.

Supplementary Figure 1: Timeline of treatment protocols for cohort #1, cohort#2 and cohort#3

Protocols for a 4-week (**A**), 8-week (**B**) and 12-week (**C**) treatment with 7, 35 or 70 µg/ml (**A**) or 35µg/ml (**B-C**) of corticosterone administration in female C57BL6/NTac mice. EPM: Elevated Plus Maze, OF: Open Field, NSF: Novelty Suppressed Feeding, ST: Splash Test.

Supplementary Figure 2: Effects of 4 or 8 weeks CORT³⁵ administration on behavioral emotionality in male C57BL6/NTac mice

Effects of a 4-week (**A**), 8-week (**B**), or 10-week (**C**) CORT³⁵ administration on emotionality score in 8 weeks old C57BL6/NTac male mice. Emotionality score is significantly increased after the corticosterone treatment in male mice after 4 weeks or 8 weeks (**A, B**: Mekiri et al., 2014: n=15 in the vehicle group and n=120 in the CORT-treated group; **C**: Felice et al., 2015: n=15 in the vehicle or in the CORT-treated group) Data represent mean ± S.E.M. ***p<0.0001 *versus* vehicle group.

Supplementary Figure 3: Physiological effects of chronic CORT administration and corticosterone concentration in the plasma

Effects of chronic corticosterone (7, 35 and 70µg/ml) on animals' weight (**A**) and fur coat state (**B**) was monitored during the whole period of administration in cohort #1. CORT concentration was measured in the plasma after exposure to an acute stressor (**C**) and was significantly lower in CORT³⁵ and CORT⁷⁰ groups compared to vehicle group. No difference between CORT⁷ group and vehicle group was observed. *p<0.05,

p<0.01, *p<0.001 *versus* vehicle group (the color of symbols indicate which treated group is significantly different from the vehicle group)

Supplementary Figure 4: Detailed behavioral results of the effects of CORT³⁵ administration in cohort #2 and cohort #3 of female C57BL/6 mice.

Detailed data obtained from four independent behavioral tests performed in the same animal (OF, EPM, NSF and Splash Test) after 8 weeks of treatment in the cohort #2 study ((**A**) n=15 animals in the vehicle group and n=30 in corticosterone-treated group) and after 12 weeks of administration in the cohort #3 ((**B**) n=15 in the vehicle group and n=30 in the corticosterone group). Data represent mean $\pm$ S.E.M. *p<0.05 *versus* vehicle group.

Supplementary Figure 5: Physiological effects of 8 or 12 weeks of chronic CORT³⁵ administration.

Effects of chronic corticosterone (35 μ g/ml) on animals' weight (8 weeks: **A**, 12 weeks: **C**) and fur coat state (8 weeks: **B**, 12 weeks: **D**). ***p<0.001 *versus* vehicle group.

References

- Mekiri, M. (2014, October). *Resistance to chronic antidepressant treatment: A behavioural and neurogenic study in a neuroendocrine-based mice model of anxiety/depression*. Poster session presented at the 2014 Neuroscience Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, USA.
- Felice, D. (2015, May). *Pattern separation but not anxiety/depression-related behaviours are impaired in aging*. Poster session presented at the 2015 Society of Biological Psychiatry 69th Annual Scientific Meeting, New York, NY, USA.

Supplementary Table 1: Overall statistical results

Figure 1	Test	Parameter	Treatment groups		Cont' vs Vehicle			Cont' vs Cont'		Cont'70 vs Cont'35
			One-Way ANOVA F-value	One-Way ANOVA p-value	Cont'7 vs Vehicle	Cont'35 vs Vehicle	Cont'70 vs Vehicle			
								Cont'7 vs Cont'7		
1A	Elevated Plus Maze	Time in Open Arms	4	1.43	0.24					
1A	Elevated Plus Maze	Ratio of Entries	4	0.53	0.66					
1A	Open Field	Time in the centre	4	2.85	0.04	0.02	0.03	0.01	0.92	0.71
1A	Open Field	Distance Ratio	4	1.26	0.29					0.64
1A	Splash Test	Grooming duration	4	2.26	0.09					
1A	Novelty Suppressed Feeding	Latency to feed	4	3.80	0.01	0.24	0.04	0.58	0.002	0.53
1B	Elevated Plus Maze	z-EPM	4	2.06	0.11					
1B	Open Field	z-OF	4	1.53	0.21					
1B	Splash Test	z-SNF	4	2.26	0.09					
1B	Novelty Suppressed Feeding	z-NSF	4	3.80	0.01	0.24	0.04	0.58	0.002	0.53
1C	Emotionality Score	Emotionality Score	4	4.67	0.01	0.52	0.005	0.37	0.001	0.13

			Treatment groups	Student T-test p-value
Supplementary Figure 2				
Supplementary Figure 2A	Emotionality Score	Emotionality Score	2	<0.0001
Supplementary Figure 2B	Emotionality Score	Emotionality Score	2	<0.0001
Supplementary Figure 2C	Emotionality Score	Emotionality Score	2	<0.0001
Supplementary Figure 2D	Emotionality Score	Emotionality Score	2	<0.0001

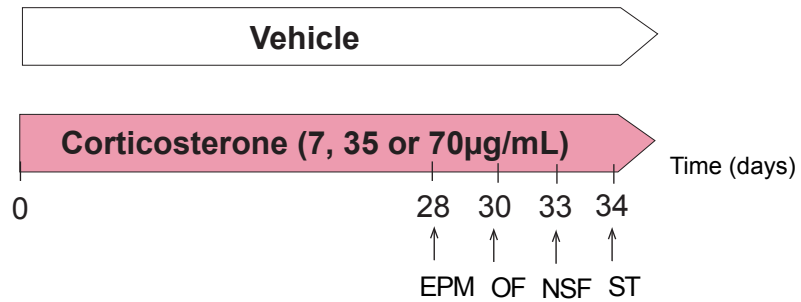
[illegible]

			Treatment groups	Student's t-test p-value
Figure 2				
2A	Emotionality Score	Emotionality Score	2	0.49
Supplementary Figure 4A	Elevated Plus Maze	Open Arm entries	2	0.84
Supplementary Figure 4A	Elevated Plus Maze	Time in Open Arms	2	0.88
Supplementary Figure 4A	Elevated Plus Maze	Ratio of Entries	2	>0.99
Supplementary Figure 4A	Open Field	Entries in centre	2	0.26
Supplementary Figure 4A	Open Field	Time in centre	2	0.27
Supplementary Figure 4A	Maturation	Distance Ratio	2	0.04
Supplementary Figure 4A	Maturation	Latency to feed	2	0.09
Supplementary Figure 4A	Maturation	Grooming duration	2	0.14
Supplementary Figure 5A	Weight	Weight	2	0.21
Supplementary Figure 5B	Fur coat state	Fur coat state	2	0.52
2C				
	Emotionality Score	Emotionality Score	2	0.69
Supplementary Figure 4B	Elevated Plus Maze	Open Arm entries	2	0.87
Supplementary Figure 4B	Elevated Plus Maze	Time in Open Arms	2	0.52
Supplementary Figure 4B	Elevated Plus Maze	Ratio of Entries	2	0.86
Supplementary Figure 4B	Open Field	Entries in centre	2	0.60
Supplementary Figure 4B	Open Field	Time in centre	2	0.74
Supplementary Figure 4B	Maturation	Distance Ratio	2	0.92
Supplementary Figure 4B	Maturation	Latency to feed	2	0.28
Supplementary Figure 4B	Maturation	Grooming duration	2	0.44
Supplementary Figure 5C	Weight	Weight	2	<0.0001
Supplementary Figure 5D	Fur coat state	Fur coat state	2	0.06
Figure 3				
3A	Cell proliferation	Ki67+ cells count in dentate gyrus	2	0.12
3B	Cell Survival	BrdU+ cells count in dentate gyrus	2	0.52
3C	Neuronal Maturation	Total DCX+ cells count in dentate gyrus	2	0.35
3C	Neuronal Maturation	DCX+ with tertiary dendrites count in dentate gyrus	2	0.20
3C	Neuronal Maturation	Maturation Index	2	0.49

Supplementary Figure 1

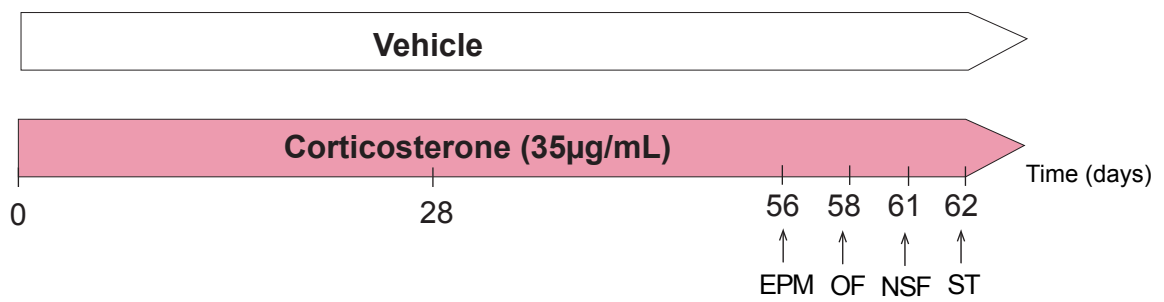
A

Cohort #1



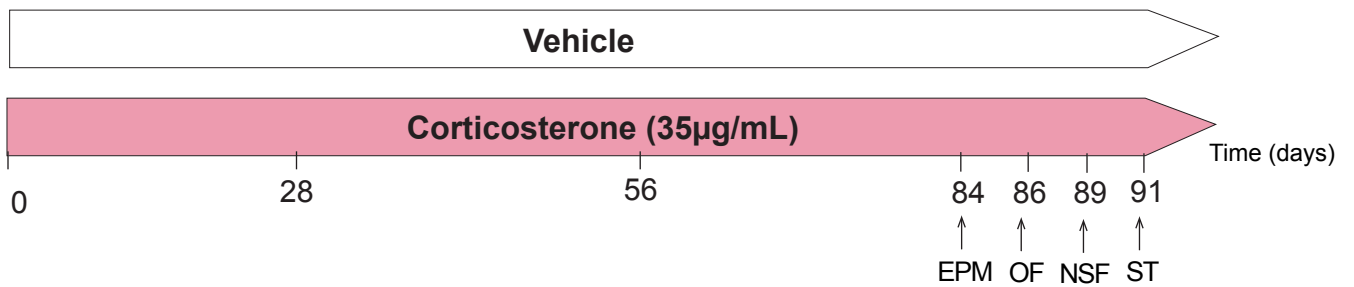
B

Cohort #2

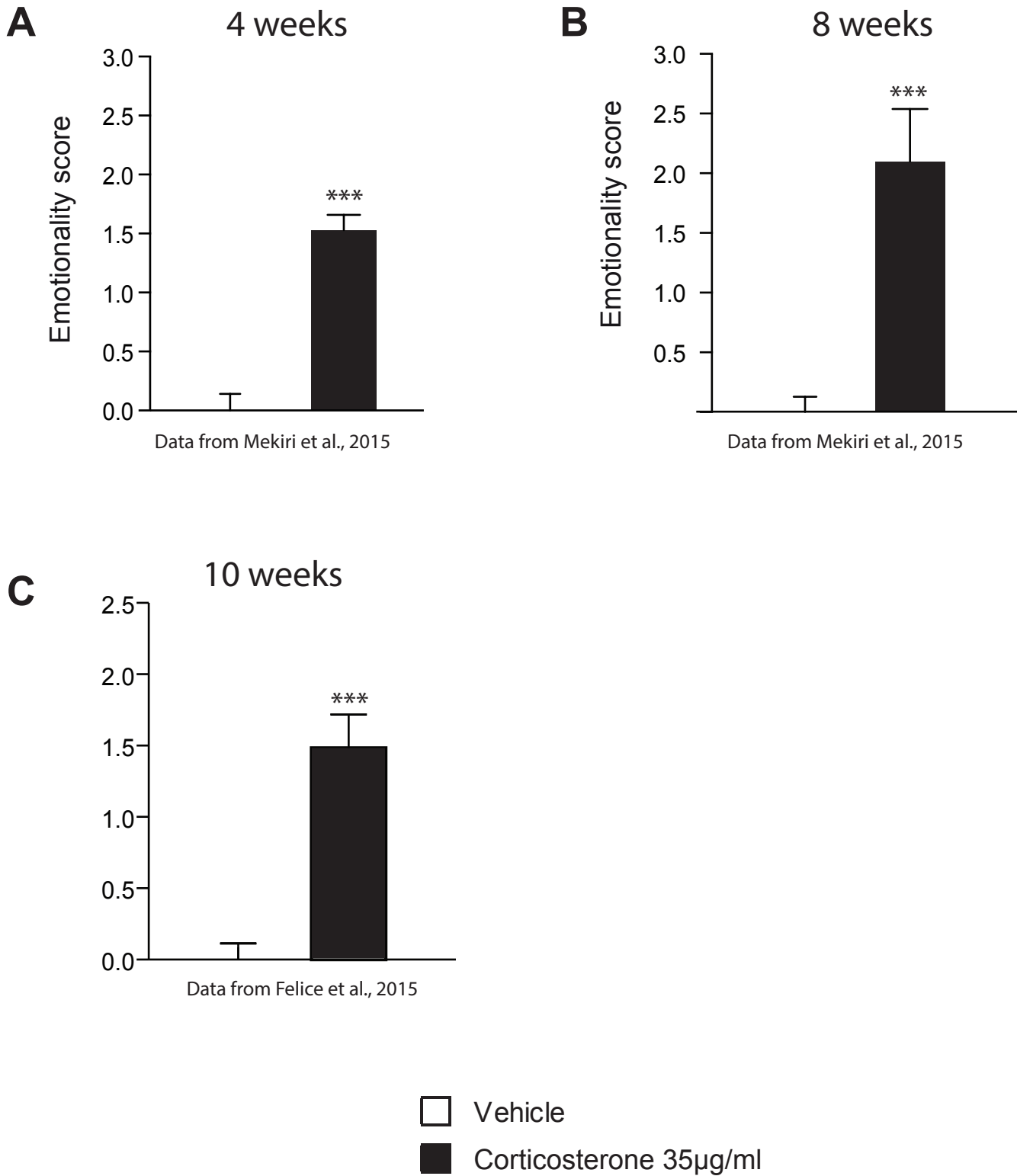


C

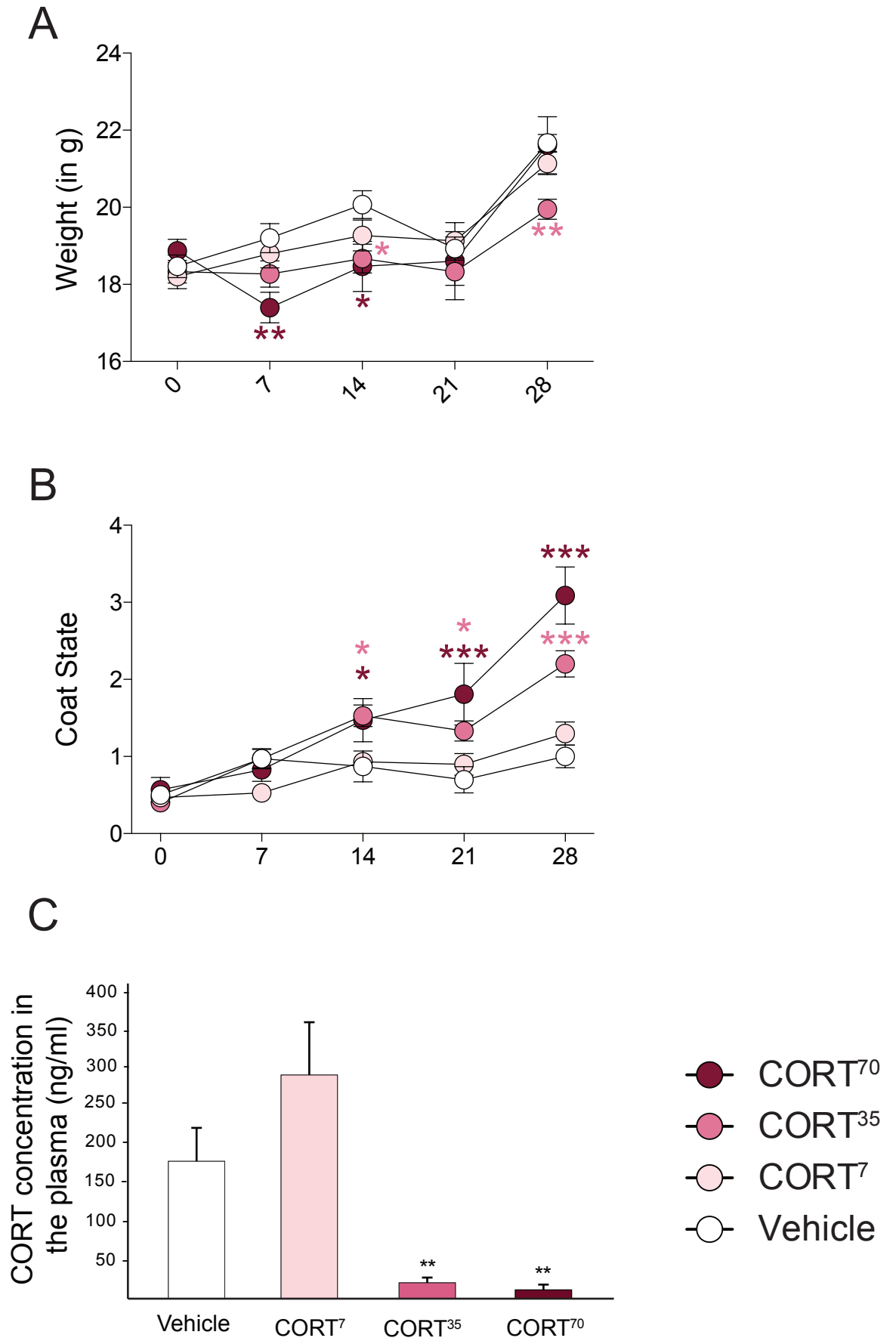
Cohort #3



Supplementary Figure 2



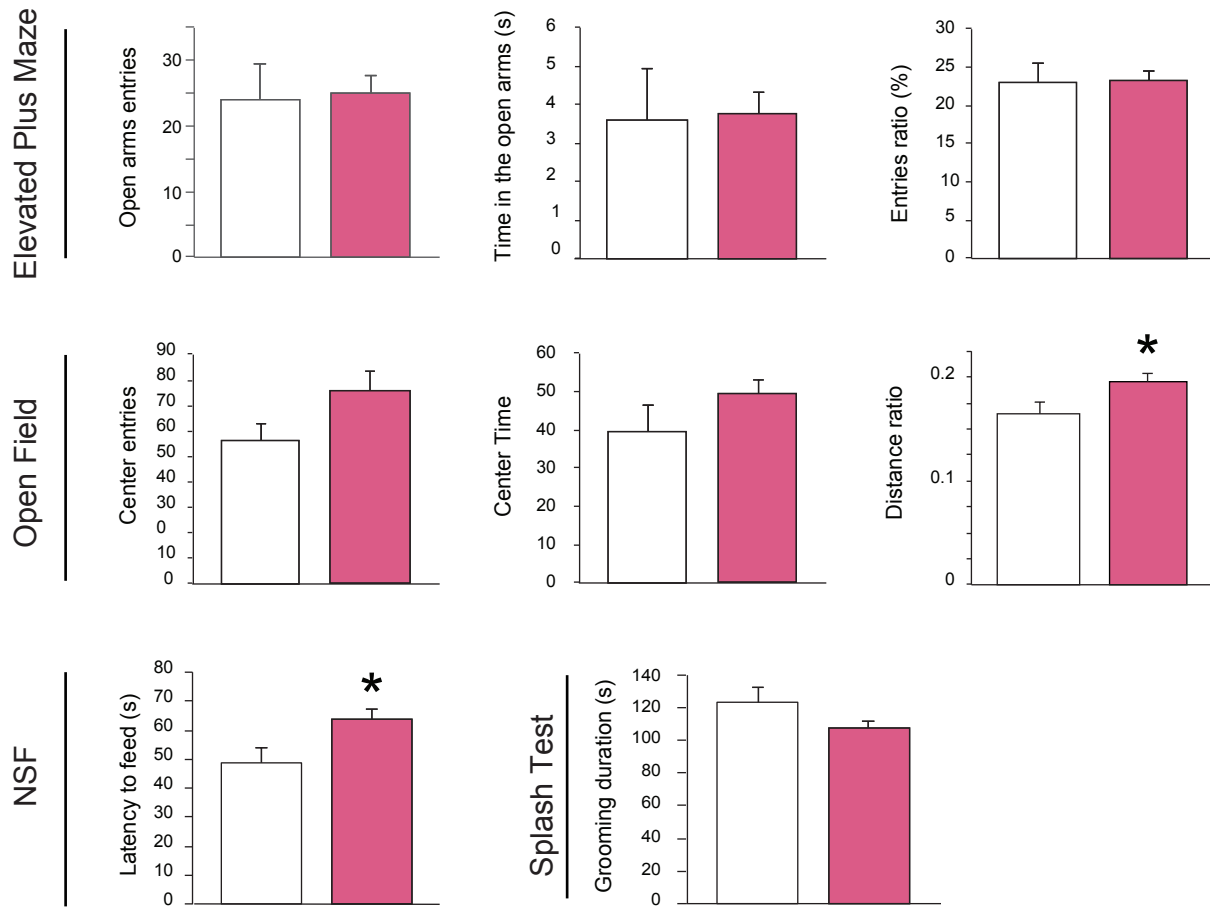
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

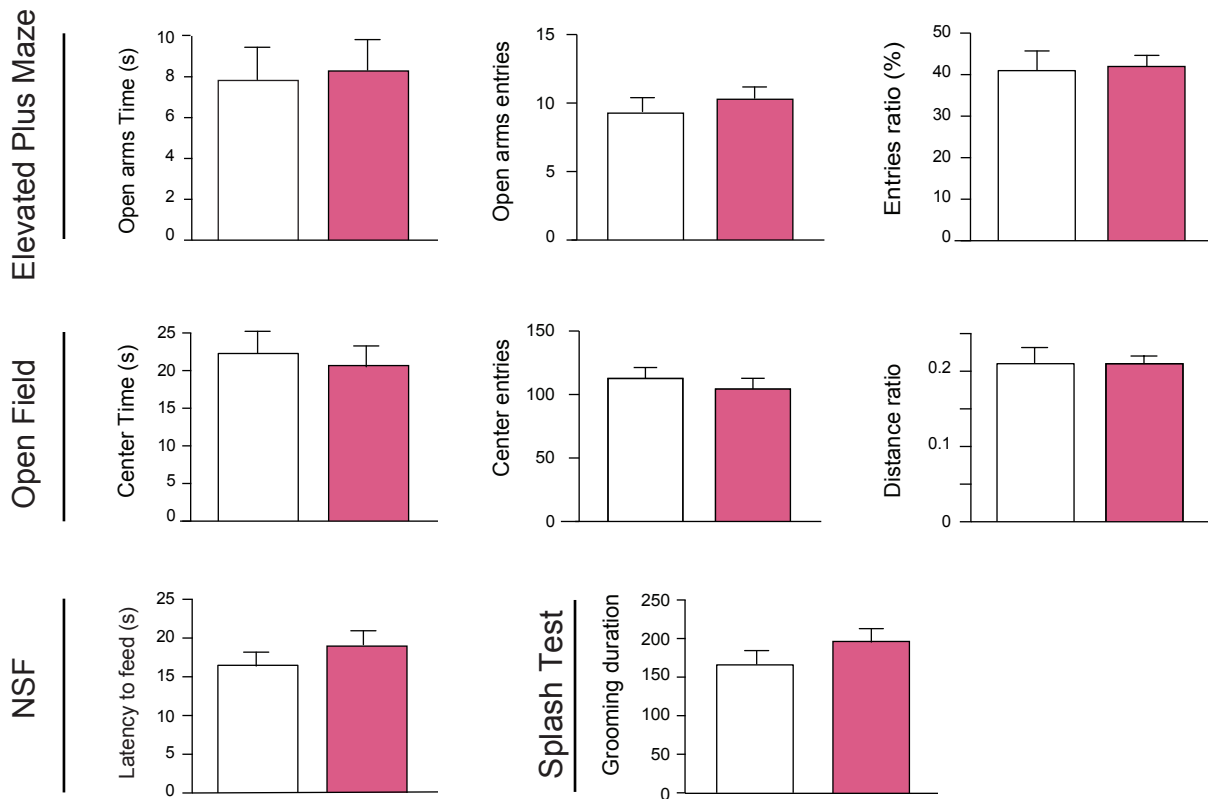
A

Cohort #2 : 8 weeks of corticosterone



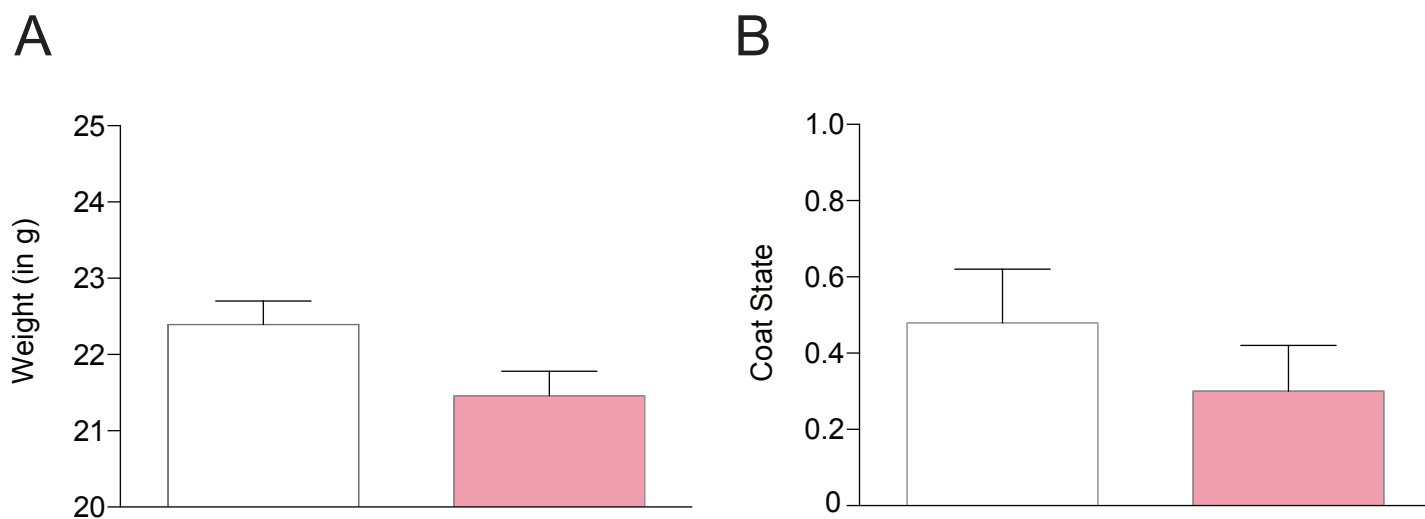
B

Cohort #3 : 12 weeks of corticosterone

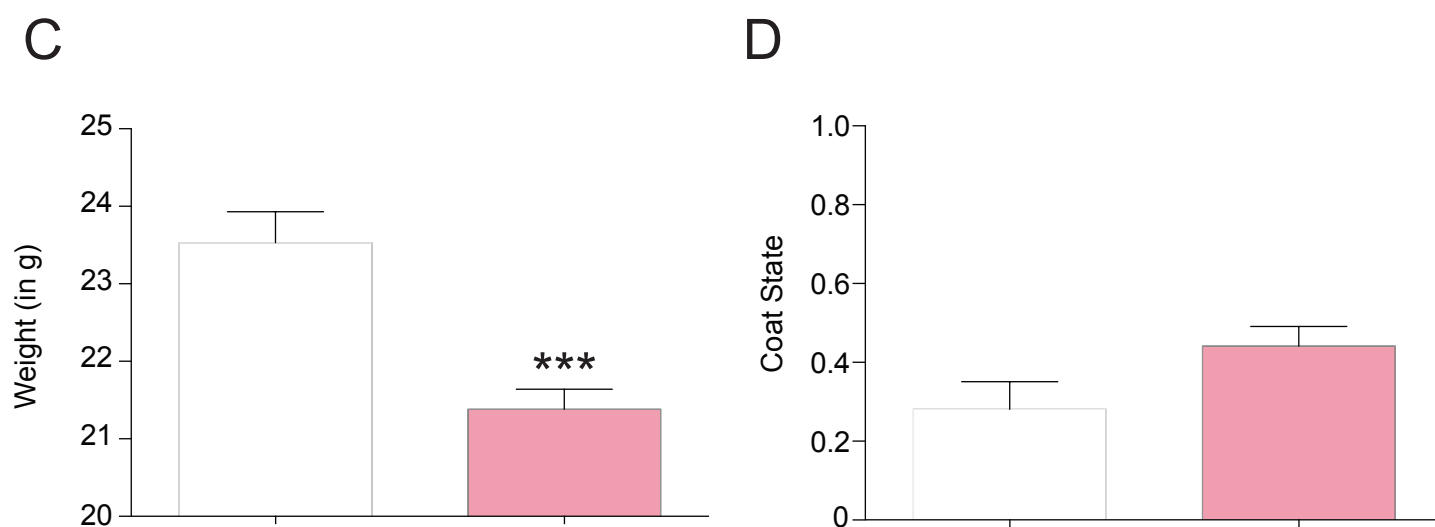


Supplementary Figure 5

COHORT 2
8 weeks of CORT³⁵ treatment



COHORT 3
12 weeks of CORT³⁵ treatment



Vehicle CORT

Commentaires sur Article 1 :

L'ensemble de ces résultats suggère que contrairement aux souris mâles, les souris femelles ne présentent pas de vulnérabilité à développer un phénotype anxio-dépressif après administration chronique de corticostérone, quelles que soient les doses testées ou la durée du traitement. Ces observations sont indépendantes d'un effet de l'estrus sur le comportement anxio-dépressif. De plus, aucune altération de la neurogenèse hippocampique n'a pu être observée dans ce modèle.

Ces résultats suggèrent donc la difficulté d'adapter chez la souris femelle, un modèle neuroendocrinien d'anxiété/dépression chez le mâle, et la nécessité de repenser la méthodologie permettant d'induire un phénotype stable chez la femelle et les tests permettant son évaluation.

La difficulté de mettre en place un modèle d'anxiété/dépression stable chez la femelle nous a amené à focaliser la suite de notre travail uniquement chez le mâle, afin de pouvoir mettre en évidence les phénomènes de non-réponse à un traitement antidépresseur dans un modèle d'anxiété-dépression.

4.2 ARTICLE 2: Treatment-resistant anxio-depressive like disorder in mice is associated with altered neurogenesis and differential peripheral expression of β -arrestin 1 in mice.

Maryam Mekiri, Lin Xia, Indira Mendez-David, Alain M Gardier, Denis J David, Jean-Philippe Guilloux

Article en préparation

Question posée :

Peut-on modéliser chez la souris, la résistance au traitement antidépresseur, dans sa définition clinique la plus répandue, i.e., l'absence de réponse à 2 stratégies thérapeutiques de mécanisme d'action pharmacologique différents. Cette non-réponse/résistance est-elle associée à des altérations de la neurogenèse hippocampique adulte ? Est-ce que l'expression de la β -arrestine 1, un marqueur clinique de la réponse au traitement antidépresseur, permet de séparer les souris répondeuses des souris résistantes à un traitement antidépresseur.

Résumé de l'étude

Si la dépression résistante est devenue un sujet de recherche d'actualité, que ce soit en clinique ou en préclinique (Willner et Belzung, 2015), peu d'étude précliniques ne se sont intéressées aux phénomènes de réponse/non réponse à un traitement dans des modèles animaux d'anxiété/dépression. De plus aucune étude n'a évalué la résistance au traitement antidépresseur, dans sa définition clinique, dans un modèle animal d'anxiété dépression.

En nous basant sur le modèle CORT (David et al., 2009) et sur des premières observations dans un test comportemental, le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Novelty Suppressed Feeding, NSF, Samuels et al., 2011), nous avons testé les phénomènes de réponse/non-réponse à la fluoxétine (18mg/kg/j, 4 semaines). Afin d'évaluer l'intensité du phénotype anxio-dépressif et la réponse au traitement antidépresseur, nous nous sommes basés sur une analyse comportementale globale en utilisant « l'emotionality score » (Guilloux et al., 2011), en utilisant les mêmes observations comportementales que celles réalisés dans l'Article 1.

Comme en clinique, on observe dans notre modèle qu'environ 30% des animaux ne présentent pas de réponse au traitement antidépresseur.

Afin d'étudier la résistance au traitement antidépresseur, nous avons dans une large cohorte de souris males, induit un phénotype anxio-dépressif par administration chronique de corticostérone (35µg/ml, 4 semaines), puis séparé les animaux répondeurs et non-répondeurs à la fluoxétine (18mg/kg/j, 4 semaines), et administrer un antidépresseur tricyclique, l'imipramine (40mg/kg/j, 4 semaines) afin d'évaluer la résistance pharmacologique au traitement. Ce protocole a été répété dans 2 cohortes afin de confirmer nos résultats.

A l'aide de ce protocole, nous avons pu mettre en évidence des phénomènes de résistance aux antidépresseurs dans un modèle d'anxiété dépression. La neurogenèse hippocampique adulte étant un processus participant à la réponse antidépressive (Santarelli et al., 2003, David et al., 2009), nous avons évalué les étapes de prolifération et survie cellulaire ainsi que de maturation neuronale dans l'hippocampe. Nous avons pu mesurer altération des étapes de prolifération, survie et maturation neuronale chez les souris résistantes au traitement antidépresseur en comparaison des souris répondeuses. Des études cliniques ont proposé que l'expression périphérique, dans les PBMCS, de la protéine β -arrestine 1 pourrait constituer un potentiel biomarqueur périphérique d'un état de type anxio/dépressif et de la réponse aux antidépresseurs (Avissar et al., 2004). Les variations d'expression ont pu être observées également dans le modèle CORT et après administration d'antidépresseur (Mendez-David et al., 2013, Mendez-David et al., 2015). Nous avons ici mesuré les variations de son expression chez les souris répondeuses et résistantes au traitement antidépresseur.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

J'ai effectué le suivi des animaux incluant la préparation et l'administration du régime chronique de corticostérone, ainsi que des traitements antidépresseurs.

J'ai réalisé l'ensemble des tests comportementaux émotionnels, de sélection des animaux répondeurs/non-répondeurs et des extractions de PBMC. J'ai également réalisé les expériences d'immunohistochimie, de comptage des cellules sous microscope, et les expériences de western-blot.

J'ai analysé les résultats et rédigé l'intégralité de l'article sous la supervision du Dr Jean-Philippe Guilloux

Commentaires sur Article 2 :

L'ensemble de ces résultats suggère que l'on peut établir un modèle de dépression résistante aux antidépresseurs chez la Souris. Nos résultats confirment que de manière similaire à ce qui est observé chez l'Homme, environ 30% des souris ne vont pas répondre à un premier traitement antidépresseur. Nos résultats suggèrent également que la neurogenèse hippocampique est un facteur discriminant de la réponse au traitement, car les différentes étapes sont altérées chez des souris résistantes en comparaison des souris répondeuses.

Nos résultats dans ce modèle de réponse/résistance au traitement antidépresseur montre une augmentation d'expression de β -arrestine 1 périphérique, dans les PBMCs, chez les souris répondeuses en comparaison des résistantes au traitement et confirme l'utilité de ce biomarqueur de la réponse antidépressive.

Treatment-resistant anxio-depressive like disorder in mice is associated with altered neurogenesis and differential peripheral expression of β -arrestin 1 in mice.

Maryam Mekiri, Lin Xia, Indira Mendez-David, Alain M Gardier, Denis J David, Jean-Philippe Guilloux[§]

CESP, Univ. Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry, 92290, France

[§] To whom correspondence should be addressed.:

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

Abstract

Major depressive disorders are highly prevalent and disabling conditions and still suffer from low rate of treatment response, as 60% of major depressive episodes do not respond adequately to pharmacological treatment. Preclinical studies suggest that suppressing neurogenesis impacts part of the effect of chronic antidepressant treatment. Yet, no studies observed whether lack of antidepressant treatment response is associated with altered neurogenesis. Furthermore, other studies showed that the expression of β -arrestins is decreased in leukocytes of depressed patients and a study carried out in our lab showed significantly reduced β -arrestin 1 levels in anxious/depressed mice and a restored β -arrestin 1 expression levels to normal levels with chronic fluoxetine treatment. Here, we measured treatment response in a neuroendocrine mouse model of depression based on a chronic corticosterone administration. Anxiety and depressive-like phenotypes (emotionality) as well as physiological changes were monitored after corticosterone administration and after chronic antidepressant treatment with fluoxetine and imipramine. Changes in behaviour were assessed using several paradigms (elevated plus maze, open field, novelty suppressed feeding test and splash test) and z-normalization across complementary measures of emotionality was performed to calculate the emotionality score. Chronic corticosterone administration in male mice increased the emotionality score as a reflect of an anxious/depressed phenotype in mice. Subsequently, chronic fluoxetine administration decreased emotionality, however not in all mice. Indeed, some mice showed no or low response to fluoxetine, with a rate similar to what is observed in humans ($\approx 30\%$). Interestingly, mice showing lack of treatment response had altered neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus, with lower cell survival, decreased neuronal maturation and dendritic arborisation compared to responders. To non-responders animals, chronic imipramine was administered and we showed that some animals ($\approx 4\%$) did not respond neither to fluoxetine nor to imipramine. Following one of the definition of resistance to treatment, we characterized these animals as resistant. Resistant mice have a lower cell survival and dendritic arborisation compared to non-responders, and lower cell survival, cell proliferation and decreased neuronal maturation compared to responders. Overall, our results support that altered response to chronic antidepressant treatment is associated with altered hippocampal neurogenesis and with a decreased expression of β -arrestin 1 in PBMC cells.

Keywords : fluoxetine, imipramine, treatment resistant depression, corticosterone, neurogenesis, β -arrestine

Introduction

Depression is a major psychiatric disease, with a $\approx 17\%$ lifetime prevalence (Kessler et al. 2005). Rates of response to initial pharmacotherapy can vary from 30 to 60% depending on the studies while remission rates in the first step of the STAR*D study was $\approx 37\%$ (Rush et al. 2008, Guilloux et al. 2012) about one-third of depressed patients show partial or no response to treatment. Furthermore, treatment resistant depression (TRD) - as defined by the lack of response to two consecutive and different antidepressant drugs prescribed at adequate dosages and for adequate durations (Connolly and Thase 2011, Ruhe et al. 2012) - occurs in 20% to 30% of MD patients (Gaynes et al. 2008).

To provide potential advances in the treatment of TRD, a critical first step is to create useful animal models with relevant phenotypic features to reveal treatment responsiveness. Despite no genetic variants with high penetrance that cause depression or treatment resistance are known yet (Hek et al. 2013, Li et al. 2016), most of the animal studies focused on the lack of antidepressant treatment response in genetic models (Heurteaux et al. 2006, Guiard et al. 2008). While these studies may help to determine the roles played by receptors, transcription or neurotrophin factors in treatment response, they may not fully explain the molecular and cellular mechanisms that occur in non-response to antidepressant. Thus, we have to rely on the different models based on chronic exposure to stressful experiences, pharmacological-induced alteration of HPA-axis function, or sensory tract lesions such as in olfactory bulbectomy. These models are well characterized for inducing behavioural states that present depression-like signs and are responsive to chronic antidepressant treatment. Some studies looked at the characteristics of non-response to antidepressant in such models, however the behavioural criteria for selecting responders vs non-responders is often based on one behavioural read-out such as sucrose consumption (Jayatissa et al. 2006, Bergstrom et al. 2007, Bisgaard et al. 2007). Isingrini et al. showed that adding a high fat diet in the UCMS model blocked the effect of chronic fluoxetine administration, however, they did not try to separate responders from non-responders animals to fluoxetine after UCMS alone (Isingrini et al. 2010). Besides, as defined in clinic, resistance to antidepressant treatment is a lack of response to two antidepressant drugs, and there is to our knowledge no research protocol that reproduces this definition in an animal model.

Here, we looked at chronic antidepressant treatment non-response and resistance in a neuroendocrine mouse model of depression based on a chronic corticosterone administration

(David et al. 2009). Behavioral characterization of mice was done in multiple (but complementary) behavioral tests aiming at assessing emotion-related behavior in mice: open-field, elevated plus maze, novelty suppressed feeding and splash test. We did not assess the altered behaviour and the treatment response based on a single consistent behavior, but rather by a set of converging behavioral observations that together can define anxio-depressed phenotype and treatment response (Guilloux et al. 2011). As part of the behavioural response may be associated with increase in several steps of neurogenesis (David et al. 2009), we hypothesized that responders would present differential neurogenic response compared to non-responders and treatment-resistant mice.

Additionally, clinical (Avissar et al. 2004, Golan et al. 2010) and preclinical (Mendez-David et al. 2013) studies suggest that β -arrestin levels in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) could be used as a biomarker of depression and antidepressant response. Here we hypothesize that responder mice to antidepressant would show increased peripheral β -arrestin 1 levels compared to non-responder and treatment-resistant mice.

Methods

Animals

Male C57BL6/Ntac mice (Taconic Farms; Denmark), 8 weeks old, were used for all experiments. Mice were maintained under standard conditions (12/12 h light/dark cycle, lights on at 7AM, $22\pm 1^\circ\text{C}$, food and water *ad libitum*, 5 mice/cage). All behavioral testing occurred during the light phase and were conducted in compliance with animal care guidelines and with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Protocol 2012#102, Commission Nationale de l'Expérimentation Animale).

Drugs and treatments

Corticosterone (4-pregnen-11 β -diol-3 20-dione 21 hemisuccinate, CORT from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in vehicle (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin, β -CD from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Two different protocols were carried out.

In the non-response study, 120 mice were separated in 2 groups: 20 mice of control group were treated by vehicle and 100 mice were treated by corticosterone (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$, equivalent to 5 mg/kg/day) in the drinking water during 4 weeks, before behavioral assessment (**Figure 1A**). Thereafter, corticosterone-treated mice were administrated with fluoxetine (18 mg/kg/d,

dissolved in 0.45% β -cyclodextrin, CORT/Flx) while corticosterone treatment was continued from the week 6 for 28 days, before a second behavioral assessment of the animals' behavior.

In the resistance study, 15 mice of control group were treated by vehicle and 125 mice were treated by corticosterone in the drinking water during 4 weeks, before a first behavioral assessment (**Figure 5**). Thereafter, while a corticosterone-only treatment was continued for 15 mice, the 110 other mice were administrated with fluoxetine while corticosterone treatment was continued from the week 6 for 28 days, before a second behavioral assessment of the animals' behavior. Finally, mice were either administered fluoxetine treatment, or switched to a chronic imipramine treatment (40 mg/kg/d dissolved in 0.45% β -cyclodextrin, CORT/Imi) from the week 12 for 28 days before the last behavioral assessment.

Physiological response to treatment

Each week, animals were monitored for their weight and fur coat state. For this latter, the score corresponding to the state of the coat resulted from the sum of the score of five different body parts: head, neck, dorsal/ventral coat, tail and fore-/hind paws. For each body area, a score of 0 was given for a well-groomed coat and 2 for an unkempt coat (Edgar et al. 2011).

Behavioral Analysis

Behavior was assessed with paradigms commonly used in the literature to measure components of emotionality: elevated plus-maze, open field, novelty suppressed feeding, and the splash test. Tests were performed between 7AM and 6PM starting at the week 5 and the week 10 and at least 2 days apart to minimize the impact of a previous test.

Elevated Plus Maze (EPM) test

Behavior in the EPM was measured using a cross maze with two open and two closed arms (30 cm $\times$ 5 cm arms). Time spent in the open arms and ratio of entries into the open arms (entries into open arms divided by total entries into any arm $\times$ 100) during a 5-min test measured anxiety-related behaviors. The total number of arm entries was used as an index of locomotor activity.

Open Field (OF) paradigm

The time and distance ratio spent in the center of a 43 cm $\times$ 43 cm open chamber (MED associates, Georgia, VT, USA) were recorded for 30 min to evaluate anxiety-related behaviors (center was defined as a 32 cm $\times$ 32 cm central arena). Here, we report time in the

center of the open field and ratio of distance traveled in the center (distance traveled in the center divided by the total distance traveled $\times 100$). The total distance traveled was used as an index of locomotor activity.

Novelty Suppressed Feeding (NSF) paradigm

As an index of emotionality, the latency to start eating a food pellet was monitored in food-deprived animals in a brightly illuminated chamber (Guilloux et al. 2011). Briefly, mice were food-deprived for 24 h prior to the test. Testing was performed in a 55 $\times$ 40 $\times$ 17 cm box covered with bedding and illuminated by a 70-W lamp. Mice were tested individually by placing them in the box for a period of 10 min. The latency to eat was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage and the time to reach the pellet and the amount of food consumed in the subsequent 5 min was measured, serving as a control for change in appetite as a possible confounding factor.

Splash Test

This test consisted in squirting a 10% sucrose solution on the mouse's snout. The grooming duration was then recorded over a 5 min period in the home cage of the animal (Ducottet and Belzung 2004).

Emotionality score

Z-score methodology was used to investigate the potential of combining results within and across the different behavior tests for depressive/anxious-like behaviors and evaluate the treatment response in the CORT model (Guilloux et al. 2011). The periphery distance, and the number of entries in center of first 10 min in OF; the latency to feed in NSF; the time spent in open arms and the ratio of entries number in open arms over total entries number in both open arms and closed arms in EPM and grooming duration in Splash test were considered as emotionality parameters. For each emotionality parameter, the Z-score value for individual mouse was calculated the formula below:

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

this indicated how many standard deviation (σ) an observation (X) is above or below the mean of a control group. The emotionality-related data was normalized as previously described (Guilloux et al. 2011), with the vehicle group was defined as the control. In each

test, individual Z-score value was calculated respectively for CORT, CORT/Flx and CORT/Imi groups using the means (μ) and standard deviation (σ) of the control group. The increased emotionality was defined as decreased normalized OF center activity, increased NSF latency, decreased open arms activity in EPM and decreased grooming in Splash test compared to control group means. The finally individual emotionality score across the tests and finally group emotionality score means were calculated.

We considered the corticosterone-treated mouse showing at least a 50% decrease in emotionality score after antidepressant treatment compared to their performance before as a responder to the treatment while the others with less than 20% of decrease in emotionality score were non-responders. Mice that did not respond to fluoxetine and imipramine treatment were considered as resistant. 7-8 mice of each group (responder, non-responder, resistant and control group) were used for Immunohistochemistry and Western Blot.

Collection of mouse blood and isolation of peripheral blood mononuclear cells

Blood was collected from unanesthetized mice as previously described (Golde et al. 2005, Joslin 2009). In compliance with the laboratory animal care guidelines, approximately 0.4 ml of blood per mouse was collected in K₃EDTA tubes with a sub-mandibular bleeding procedure. Five millimeters point size sterile lancets (MediPoint, Mineola, NY, USA) were used to puncture the location where the orbital vein and the sub-mandibular vein join to form the jugular vein (Joslin 2009). A light pressure with dry gauze was applied to the punctured area for hemostasis. Separation and extraction of PBMCs were performed using an iodixanol mixer technique (Ford and Rickwood 1990). Mouse PBMCs were purified from whole blood by density centrifugation (300 g at 20°C for 30 min) using solution B of the OptiPrep gradient solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Specifically, the OptiPrep gradient solution was used to separate blood into PBMC and plasma layers with centrifugation. The PBMC layers were then carefully removed from the tube and transferred to a new 50 ml conical tube. The PBMCs were then washed twice with solution B (1 min each). After another centrifugation (150 g at 20°C for 7 min) and two washing steps (1 min each), mouse PBMCs were recovered with a final centrifugation (1,000 g at 4°C for 5 min) and were stored at -80°C.

Protein extraction from PBMCs

Peripheral blood mononuclear cells were thawed and homogenized with cell lysis buffer containing [20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 7.4, 1% Triton X-100, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 10 μ g/ml pepstatin and 100 mM orthovanadate], were incubated on ice for 20 min, were then subjected to centrifugation (130 g at 4°C for 20 min) Protein concentrations were quantified using a BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology).

Western Blot

Equal amounts of proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences, Les Ulis, France). The membranes were then incubated overnight with a primary mouse monoclonal anti- β -arrestin 1 antibody (#610551, BD Biosciences Pharmingen, France; 1:100). In order to ensure that equal amounts of total protein (30 μ g) were loaded in each lane, β -actin protein levels were also assessed [β -actin (C4) horseradish peroxidase (HRP), Santa Cruz Biotechnology, Germany, 1:10,000]. Immune complexes were detected using appropriate peroxide-conjugated secondary antibodies and a chemiluminescent reagent kit (Pierce Biotechnology). Immunoblot quantifications were performed by densitometric scanning with Image Lab Software (Bio-Rad). Signals were in the linear range. The densitometry values were normalized against the β -actin values.

Immunohistochemistry

After anesthesia with ketamine/xylazine (100 and 7 mg/kg, respectively), mice were perfused transcardially (cold saline for 2 min, followed by 4% cold paraformaldehyde at 4°C). The brains were then removed and cryoprotected in 30% sucrose and stored at 4°C. Serial sections (35 μ M) were cut through the entire hippocampus (plate 41-61; (Paxinos and Franklin 2013)) on a cryostat and stored in PBS with 0.1% NaN₃ at 4 °C for immunohistochemistry studies.

Cell survival study: Mice were administered with BrdU (150 mg/kg, i.p. dissolved in saline, twice a day during 3 days) at week 6, prior to the fluoxetine treatment. We then proceeded as previously described (David et al. 2009). Brain sections were mounted on slides and boiled in citric acid (pH 6.0), rinsed with PBS, and treated with 0.01% trypsin in Tris/CaCl₂, then incubated with 2N HCl and blocked with 5% NGS. Sections were then incubated overnight at room temperature with anti-mouse BrdU (1:100). After washing with PBS, sections were

incubated with secondary antibody (1:200 biotinylated goat anti-mouse) followed by amplification with an avidinbiotin complex. The staining was visualized with DAB. BrdU-positive cells were counted under Olympus BX51 microscope.

Cell proliferation: For Ki67 immunohistochemistry, floating sections were washed in PBS buffer containing 0.3% TritonX-100, blocked and incubated with Ki67 primary antibody (1/100, Vector Labs, Burlingame, USA) overnight at 4°C (Xia et al. 2012). The next day, sections were washed in PBS and incubated with fluorescent-label-coupled secondary antibodies for 2hr at room. Ki67-positive cells were counted under Olympus BX51 microscope with Cy3-fluorescent.

Maturation index study: For doublecortin staining, the procedure consisted of the following steps (David et al. 2009). Sections were rinsed in TBS, treated with 1% H₂O₂ in TBS to quench endogenous peroxidase activity, incubated in 10% normal donkey serum and 0.3% Triton X- 100, and then incubated overnight at 4°C in primary antibody for DCX (goat;1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The secondary antibody was biotinylated donkey anti-goat (1:500) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in TBS at room temperature. Sections were developed using avidin-biotin complex (Vector, USA) and DAB kit. DCX-positive (DCX⁺) cells were subcategorized according to their dendritic morphology (Wang et al. 2008): DCX⁺ cells with no tertiary dendritic processes and DCX⁺ cells with tertiary or higher order dendrites. The maturation index was defined as the ratio of DCX⁺ cells possessing tertiary dendrites over the total DCX⁺ cells.

Immunohistochemistry and confocal imaging for maturation study

Immunohistochemistry was performed in the following steps: 2 h incubation in 1:1 formamide/2xSSC at 65°C, 5 min rinse in 2xSSC, 30 min incubation in 2N HCl at 37°C, and 10 min rinse in 0.1 M boric acid, pH 8.5, 2h incubation in 0.1 M PBS with 0.3% Triton X-100, and 5% normal donkey serum. Sections were then incubated overnight at 4°C in primary antibodies for doublecortin (goat 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), bromodeoxyuridine (BrdU; rat; 1:100; Serotec, Oxford, UK) and neuronal- specific nuclear protein (NeuN) (mouse; 1:500; Chemicon, Temecula, CA). Then fluorescent secondary antibodies were used. All secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (France). Approximately 6 sections per animal and 20-30 BrdU⁺ cells per treatment group were analysed (n= 4-5 animals per conditions). Among the BrdU⁺ cells, the

percentage of BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁻, BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺ and BrdU⁺/DCX⁻/NeuN⁺ cells were evaluated for each treatment group. All cell counting for triple-stained sections were done using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (X63 magnification).

Data analysis

Results from data analyses were expressed as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software. For all experiments, Student t-test or one-way ANOVA with or without repeated-measure were applied to the data as appropriate. Significant main effects and/or interactions were followed by Fisher's PLSD *post hoc* ANOVAs analysis or *post hoc* unpaired t-tests as appropriate.

Results

Non-response study

Behavioral analysis confirmed increased emotionality in the CORT model

We used emotionality score in the CORT model to allow selection of mice for which altered behavior was not observed specifically in one test, but in several paradigms. Results from independent tests were as follows: in the OF and the EPM, corticosterone administration did not affect time and relative distance traveled in the centre of the OF (**Figure 1A**); in the NSF, CORT-treated mice displayed increased latencies to eat the pellet ($p < 0.001$; **Figure 1A**); in the Splash Test, CORT-treated animals present a decreased grooming duration ($p < 0.001$; **Figure 1A**). Z-score normalization was performed within the respective behavioral parameters, hence transforming absolute values to numbers of standard deviations from the control means (**Figure 1B**). We then averaged these normalized behavioral parameter z-scores to obtain a single value per mouse and per behavioral test (**Figure 1C**). Analyses of test-specific z-scores indicated a significant effect of corticosterone on NSF and Splash Test ($p < 0.001$, **Figure 1C**), with CORT-treated mice displaying higher z-score values than controls. Finally, these values were averaged to obtain a single “emotionality score” for each mouse, describing the integrated output of that experiment (**Figure 1D**). Here, the analysis of the combined normalized measures of emotionality resulted in augmented statistical significance of the corticosterone main effect ($p < 0.001$).

In summary, we showed that CORT-treated mice treated have a higher emotionality score than the control mice and thus developed an anxious/depressive-like phenotype.

Antidepressant reversal of elevated emotionality scores

We then studied the reversal effects of chronic fluoxetine administration in mice with altered behavior induced by CORT. **Figure 2A** represents the color-coded score of each of the mice before and after fluoxetine treatment. As mentioned previously, most of the CORT-treated mice displayed high emotionality scores (red), while emotionality values in control mice showed a normal distribution (from blue to red). Chronic fluoxetine treatment induced a global decrease in emotionality score compared to the value measured at week 6 (**Figure 2B**), however not in all animals. As mentioned in the methods section (see **section 0**), our criterion for considering a mouse as responding to fluoxetine treatment was a 50% decrease in the initial value of the emotionality score obtained at week 6, after corticosterone treatment. Thus, 32% of the CORT-treated mice responded to chronic fluoxetine treatment using this criterion and showed a 50% decrease in emotionality (**Figure 2B**, green bar), while 42% showed an intermediate response (i.e., a decrease lower than 50% in the z-score value, not shown). Interestingly, some responder-mice still displayed an elevated emotionality, indicating that despite their higher anxious-depressive-like state, they were responding to the treatment (**Figure 2A**). A less than 20% decrease or an increase in the individual emotionality score value of a mouse was considered as a criterion of non-response to chronic fluoxetine administration. Here, 26% of the mice displayed no response to treatment or even an alteration of their phenotype (**Figure 2B**, blue bar).

Differential response to treatment is associated with variation in neurogenesis.

We investigated the various stages of hippocampal neurogenesis to observe if differences in either proliferation, survival or neuronal maturation of cells after fluoxetine administration were associated with differential treatment response of the mice.

For cell proliferation, a one-way ANOVA revealed no differences between groups ($F_{2,22}=2.58$, $p=0.098$, **Figure 3A-D**), however, we observed a higher number of cells in responders compared to vehicles (planned comparison, $p<0.05$, **Figure 3D**), but no difference between responders and non-responders ($p=0.20$).

A one-way ANOVA performed on cell survival by exploring the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus showed a differential response depending on the group ($F_{2,20}=4.64$,

$p=0.022$, **Figure 3-E-H**). No difference between vehicle and fluoxetine-treated mice was observed whether they were responders ($p=0.26$) or non-responders ($p=0.091$). However, number of BrdU⁺ cells is significantly higher in responder mice than in non-responders ($p=0.0067$, **Figure 3H**).

Finally, neuronal maturation was assessed using DCX immunohistochemistry. Total number of DCX⁺ cells and number of DCX⁺ neurons with tertiary dendrites were counted. A one-way ANOVA confirmed the differences observed between groups in terms of total DCX⁺ cells ($F_{2,19}=15.72$, $p<0.0001$, **Figure 3I-L**) but also on the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites ($F_{2,19}=17.11$, $p<0.0001$, **Figure 3L**). Chronic fluoxetine administration strongly increased the total number of DCX⁺ cells in the dentate gyrus in both responders and non-responders mice ($p<0.0001$ and $p<0.05$, respectively), with a greater increase in responders (compared to vehicle treated animals: 150 and 63% in responders and non-responders, respectively). Chronic fluoxetine increase more specifically the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites in responder animals compared to vehicle treated mice ($p<0.0001$) or to non-responder mice ($p<0.001$). Number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites were also higher in non-responder mice, showing a trend for significance compared to the vehicle treated group ($p=0.065$).

The maturation index, which reflects the percentage of maturing neurons that develops complex arborization was also >40% higher in responder mice compared to vehicle-treated mice or non-responding mice ($p<0.001$ and $p=0.29$, respectively, **Figure 3M**). As previously shown, this index of maturation closely correlate to behavioral results in neurogenesis-dependent tasks such as the novelty suppressed feeding, where the latency to feed inversely correlates with the maturation index in fluoxetine-treated animals ($R=0.77$, $p<0.01$, **Figure 3N**).

These observations showed that not only chronic fluoxetine treatment stimulates cell proliferation and neuronal maturation in the dentate gyrus of the hippocampus of adult male mice, but that effects of fluoxetine are greater in responder mice, and confirms the correlation between effects of fluoxetine on neuronal maturation and behavioral response in the NSF.

Physiological response to treatments

As previously observed, chronic corticosterone treatment induces a significant increase in the weight of the animals ($p < 0.01$, **Figure 4A**) and in the state of the fur coat of mice ($p < 0.001$, **Figure 4B**).

After a 4-weeks treatment with fluoxetine, this increase was still statistically significant compared to vehicle treated animals ($p < 0.001$, **Figure 4C**), with no difference between responders vs non responders to fluoxetine treatment. Fluoxetine treatment did not reverse the corticosterone-induced alteration in fur coat state, independently to response to treatment (**Figure 4D**).

Resistance study

Corticosterone-treated mice display resistance to two antidepressant treatments

We then studied the effects of two consecutive antidepressant treatments (fluoxetine and imipramine) in mice with altered behavior induced by corticosterone treatment (**Figure 5A**). We first administered chronic fluoxetine to mice previously treated by corticosterone and emotionality scores were calculated. Chronic fluoxetine treatment induced a global decrease in emotionality score compared to the value measured at week 6 (**Figure 5B**) and as previously observed in the non-response study, we observed responder mice (43%) and non-responder mice (26%). Then animals were administered either a chronic imipramine treatment or fluoxetine treatment for 28 more days. For mice that did respond to the first fluoxetine treatment, we evaluated if the response was maintained (M) or non-maintained (NM) (**Figure 5C and 5D**). No change or a decrease of the emotionality score was considered as a maintained antidepressant response, while an increase in its value was considered as non-maintained antidepressant response. Response was maintained for 6% of the animals treated by imipramine, and for 4% of the animals treated by fluoxetine. It was non-maintained for 12% of the animals treated by imipramine and for 10% of the animals treated by fluoxetine. 4 % of the animals did not respond to fluoxetine and to imipramine and were considered as resistant mice (**Figure 5E**).

Differential response to treatment is associated with variation in neurogenesis.

As for the non-response study, we investigated the various stages of hippocampal neurogenesis to observe if differences in either proliferation, survival or neuronal maturation of cells after the different treatments were associated with differential treatment response of the animals (**Figure 6A-H**).

For cell proliferation, a one-way ANOVA revealed a difference between responders and non-responders ($F_{5,55}=1.65$, $p<0.05$, **Figure 6A, C**), however, we observed no difference between the responders group and the resistant group ($p=0.064$).

A one-way ANOVA performed on cell survival by exploring the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus showed a differential response depending on the group ($F_{5,58}=72.23$, **Figure 6B, D**). A difference between CORT mice and responder mice was observed ($p<0.0001$). We also observed a significant difference between responder mice and non-responder mice ($p<0.0001$), and between responder and resistant mice ($p<0.0001$). Number of BrdU+ cells was significantly higher in responder than in non-responder or resistant mice.

Finally, we assessed neuronal maturation status depending on the response to antidepressant. A one-way ANOVA confirmed the differences observed between groups in terms of total DCX⁺ cells ($F_{5,41}=4.78$, **Figure 6E, F**): between responder and non-responder mice ($p<0.001$) and between responders and resistant mice ($p<0.01$). A difference on the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites ($F_{4,29}=54.29$, **Figure 6G**): between responders and non-responders ($p<0.0001$) and between responder and resistant mice ($p<0.0001$) was observed. Chronic antidepressant administration strongly increased the total number of DCX⁺ cells in the dentate gyrus in responders (75% compared to vehicle treated animals; $p<0.01$, **Figure 6F**) but not in non-responders and resistant animals. Chronic treatment increases more specifically the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites in responder animals compared to vehicle treated mice (363%; $p<0.0001$).

The maturation index was also 113% higher in responder animals compared to vehicle-treated mice ($F_{5,41}=524.8$, $p<0.0001$, **Figure 6H**). Besides, differences in the maturation index between responder and non-responder ($p<0.0001$), between responder and resistant ($p<0.0001$) and between non-responder and resistant mice ($p<0.0001$) were observed. Non-responder mice displayed higher maturation index compared to resistant mice ($p<0.0001$).

These observations showed that effects of fluoxetine and imipramine treatment are greater in responder mice compared to non-responders. It appears also that the maturation index is higher in non-responder than in resistant mice.

The maturation of newborn neurons is increased in responders compared to resistant (BrdU⁺/NeunN⁺) ($p<0.05$, **Figure 6I**). The numbers of BrdU⁺ cells, which likely represents astrocytes, did not change across responders and resistant ($p=0.11$).

Resistance to treatment is associated with decreased β -arrestin1 levels in PBMCs

We investigated the peripheral (PBMCs) expression of the β -arrestin1 in the PBMCs depending in the treatment response (**Figure 7**). A one-way ANOVA revealed a significantly higher expression of peripheral β -arrestin1 in responder compared to vehicle-treated mice ($F_{3,20} = 27.3$; +320%; $p < 0.0001$) and a difference between responder and resistant mice ($p < 0.0001$). Resistant mice have approximately the same levels of expression that CORT-treated mice in the PBMCs.

DISCUSSION

One of the major inconvenient of antidepressant treatments is that more of half of the patients do not respond to treatment and do not show a clinical improvement of their depressive state after treatment. (Gaynes et al. 2008, Guilloux et al. 2012). Mechanisms of this resistance to treatment is not yet fully understood. As a consequence, animal models are necessary for a better understanding of the cellular mechanisms that underlie major depressive disorder. Here, we report that non-response to chronic antidepressant treatment can be observed in a neuroendocrine-based animal model of anxiety/depression in males, with similar rates to what is observed in humans (~30%) and that this lack of response is associated with altered neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus.

Several animal models of TRD have been proposed. As proposed by Willner and Belzung, valid preclinical model of depression should: 1) be vulnerable to stress 2) show a decreased response to conventional antidepressant treatments and 3) ideally respond to new therapeutics used for TRD (Willner and Belzung 2015).

Different approaches have been used to model TRD. For example, chronic ACTH treatment has been shown to alter imipramine response in the FST and proposed to induce treatment-resistance (Walker et al. 2013). Chronic high fat diet in the UCMS model has also been shown to induce fluoxetine resistance in mice (Isingrini et al. 2010). However, most of the preclinical studies showing lack of antidepressant treatment response have been performed in genetically engineered models. For instance, models in which BDNF expression has been altered have shown partial response to antidepressant in behavioral paradigms (Adachi et al. 2008) or neurochemical response (Deltheil et al. 2008). However, there are some limitations to these models. Indeed, non-response and resistance to treatment are heterogeneous processes and various causes may lead to develop resistance to antidepressant treatment. As a

consequence, it is hard to represent all the aspects of TRD in a single model. Additionally, the definition of treatment resistance in preclinical studies is as diverse as in clinic. While numerous clinical studies defined resistance differently based on the duration of the illness, use of augmentation strategies or extent of treatment (Souery et al., 1999; Sackeim, 2001; Fagiolini and Kupfer, 2003). The simplest and most widely used definition of resistance is when a current episode of depression has not benefited from at least 2 adequate trials (i.e. appropriate dose, duration and extent) of different classes of antidepressants (Ananth, 1998; Rush et al., 2003; Keller, 2005). Furthermore, this definition benefits from the strong support brought by the STAR*D study, where response rates after failure to 2 antidepressant strategies dramatically decrease (Ruhé et al., 2006; Rush et al., 2006). Unfortunately, yet no preclinical studies used either of these strategies to model TRD in mice.

Another limitation that we can highlight is the fact that most of the protocols used in preclinical studies of TRD are short-term protocols, where animals are tested after an acute or a short-term administration of treatment (Lopez-Rubalcava and Lucki 2000, Cryan et al. 2004). Moreover, classification of responder vs non-responder animals to antidepressant is often based on one single behavioural – i.e., mostly the forced swimming test - and thus do not capture the complexity of emotional behavior response. Instead, antidepressant treatment resistance involves a long-term process, where several therapeutic trials were tested and failed. Thus, it appears that current published studies may not be fully relevant in terms of understanding of TRD mechanisms.

Here, our aim was to mimic the clinical and progressive pathogenesis of TRD. After inducing an anxio-depressed like phenotype in male C57BL6 mice using a chronic corticosterone administration, 30% of the animals were non-responders to an initial fluoxetine treatment. Interestingly, the percentage of mice non-responding to chronic fluoxetine was in the range of those observed in clinical practice (Guilloux et al., 2012, Rush et al., 2008). In the resistance study, fluoxetine-treated mice were either maintained under the same condition of treatment or switched to chronic imipramine administration. 4% of the mice were resistant to fluoxetine and imipramine and no significant response improvement was observed when animals were switched to imipramine compared to pursuing chronic fluoxetine. In the common practice, switching treatment is the most used strategy by psychiatrists. However, there is no clear evidence in the literature that switching treatment is an effective strategy for TRD and our results tend to confirm this observation (Nelson 2003). Recently, a study showed that

switching from an SSRI or SNRI to vortioxetine may increase therapeutic response and symptom remission (Montgomery et al. 2014).

Lack of neurogenesis has been historically associated with altered response to treatment. Indeed, in the first papers associating neurogenesis to antidepressant response, Santarelli et al. showed that ablation of neurogenesis using X-rays was able to block response to various antidepressants (Santarelli et al. 2003). This hypothesis has been refined in various animal models (Holick et al. 2008), genetic modification (Jedynak et al. 2014, Hill et al. 2015) or using comprehensive battery of behavioral tasks allowing to dissect which behavioral task would allow to reveal the neurogenesis-dependent effect of antidepressant (David et al. 2009). Here, we show that the lack of response to fluoxetine alone or fluoxetine/imipramine is associated with altered neurogenesis. Yet, the biological mechanisms that leads to this disrupt neurogenesis are unknown. While the role of neurogenesis is not the primary pathology leading to an anxio-depressive phenotype (Sahay et al. 2011), our series of experiments confirms that complete remission requires an improved neurogenesis. Interestingly, responders display a higher index maturation than non-responders and non-responders displayed a higher maturation index than resistant mice. This data suggest a direct relationship between the maturation index and the response to the treatment. Dendritic arborization has important functional implications in determining what signals a neuron receives and how signals coming from individual synapses are integrated (Segev and London 2000, Gullledge et al. 2005). Besides, animal studies reveal that prolonged stress can induce the shrinkage of hippocampal dendritic fields, dendritic regression and loss of dendritic spines (Wood et al. 2004, Chen et al. 2008). Yet, what remained to be explored is the biological mechanisms associated with hippocampal neurogenesis underpinning treatment response vs resistance. One hypothesis suggested by Surget et al., 2011 is that antidepressant-induced neurogenesis participate in restoration of the HPA axis negative feedback (Surget et al. 2011). Indeed, clinical data showed that improvement of HPA axis functioning is associated with remission and decreased risk of relapse (Holsboer-Trachsler et al. 1991, Kunugi et al. 2006). The mechanisms by which some animals/patients display non-response/resistance remains to be discovered.

Finally, we took advantage of this resistance model to research TRD biomarkers. Here, we focused on the peripheral expression of the β -arrestin 1 protein to study its reliability as a potential biomarker for treatment response. β -arrestin 1 levels in PBMCs have been shown to

be decreased in depressed patients and corrected after monoaminergic antidepressant treatment (Avissar et al. 2004, Golan et al. 2010). In our model, we confirmed clinical observations of these variations in peripheral β -arrestin 1 levels depending on treatment response. However, anxio-depressive like phenotype was not associated with decrease in β -arrestin 1 levels as observed in clinic. Thus, these data also differ from previous observations published by our team showing a decrease in peripheral β -arrestin 1 levels after chronic corticosterone exposure (Mendez-David et al. 2013). This may be due to the duration of CORT exposure that differ between studies.

Limitations of the study

As all preclinical studies, ours have some limitations that it is important to highlight. First, the duration of the protocol is long, and requires a lot of animals to include and several behavioral testing/retesting. As a consequence, the number of animals qualified as “treatment-resistant” is of small amplitude. However, we overcome this by repeating this protocol in an additional cohort that generates similar amounts of responder, non-responder and treatment resistant mice.

The mouse CORT model is a chronic exposure method optimized for use in modeling the persistent anxiety/depression-like state in rodents. However, it does not fully replicate the core pathology of MDD, as animals in this model are not facing environmental stressors, or the greater female susceptibility observed in the disease (Guilloux et al., 2011, Mekiri et al., 2017). Although, in this type of long protocol, it benefits from its reliability and repeatability compared to stress-based models of depression. Indeed, we observed that >85% of mice displayed higher emotionality after chronic CORT exposure, which allows then to study antidepressant response or resistance, which would not be feasible using UCMS or Learned Helplessness models.

While multiple testing at several time points during a protocol can impact the behaviour of our animals, the use of emotionality scores diminishes this impact of test/retest in group comparison. Another criticism of this study may be the pharmacological definitions of response, non-response and resistance, that may not fully correspond to the clinic reality. However, the use of these stringent threshold to define responders vs. resistant animals helped in separating these two populations.

Overall, we developed a model that display construct and predictive validity for treatment resistant depression, for which peripheral biomarkers of treatment response in clinics displayed similar directional changes. A full validation of this model would be to test whether these treatment-resistant mice may benefit from acute ketamine administration or electro-convulsive seizures which are reference treatment in this pathology [Kellner, 2012 #52; Murrough, 2013 #51]. The yet unanswered question is the hippocampal cellular events that are responsible for this lower cell survival, cell proliferation and altered maturation of neurons.

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research and an Agence Nationale de La Recherche GRANT for Santé Mentale (ANR SAMENTA DEPARREST). We thank the Animal Care Facility of the IFR141 & University Paris-Sud for their technical support.

Figure 1

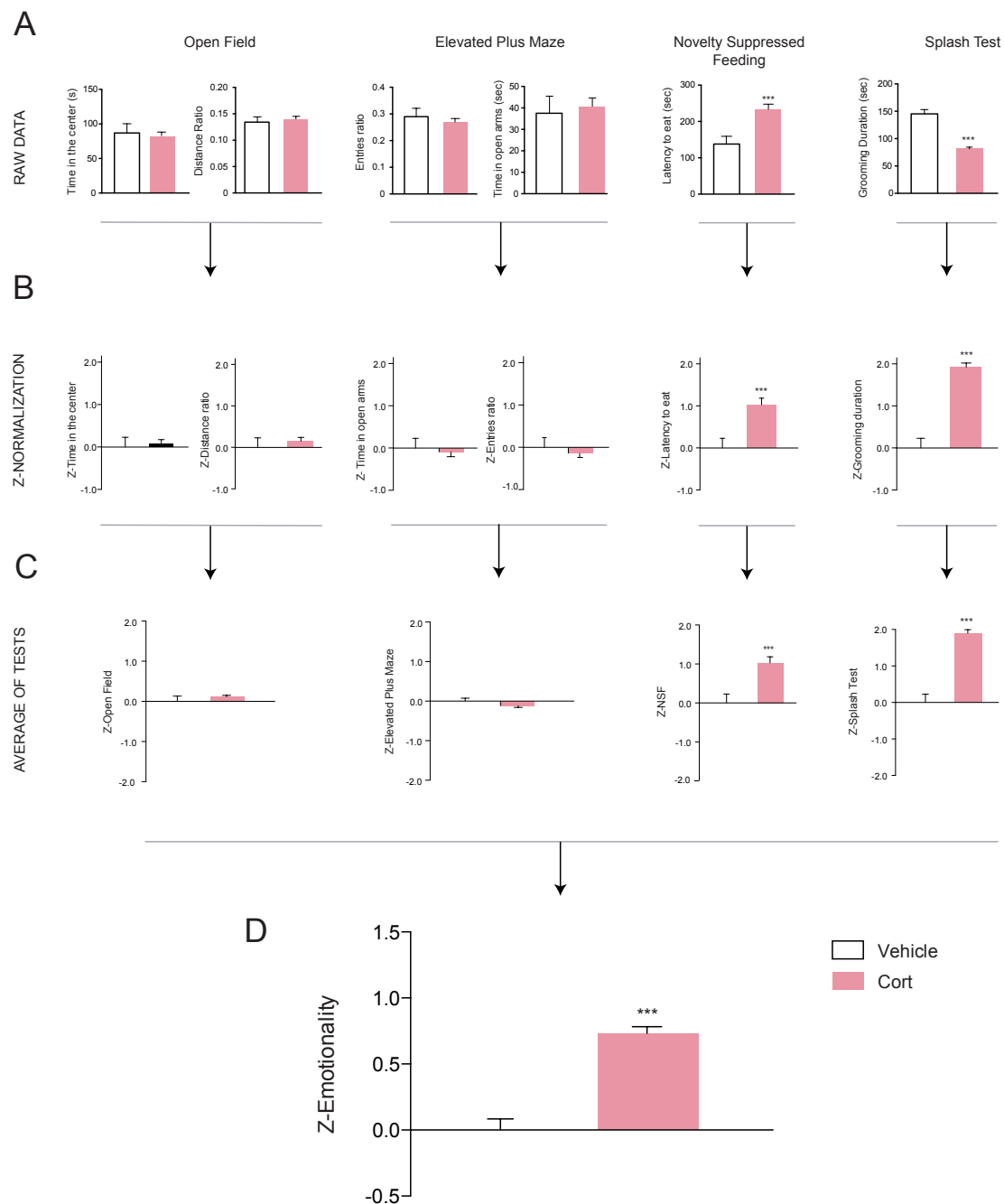


Figure 1: Administration of chronic corticosterone at 35 µg/ml induced an increase of the global emotionality score (A) Raw data obtained from four independent behavioral tests performed in the same animal (OF, EPM, NSF and Splash Test; n =15 animals/ control group and n=125 in the corticosterone-treated group). Normalization of data using z-score method was performed for each parameter as described using the control group as the baseline. And (B) test z-values were then calculated by averaging individual z-scores, and (C) averaged to obtain a z-score per test. (D) Finally, these values were averaged to obtained a global emotionality score. Data represent mean $\pm$ S.E.M. (n =15/ control group and n=125/CORT group). A–D: ***p<0.001 versus vehicle group

Figure 2

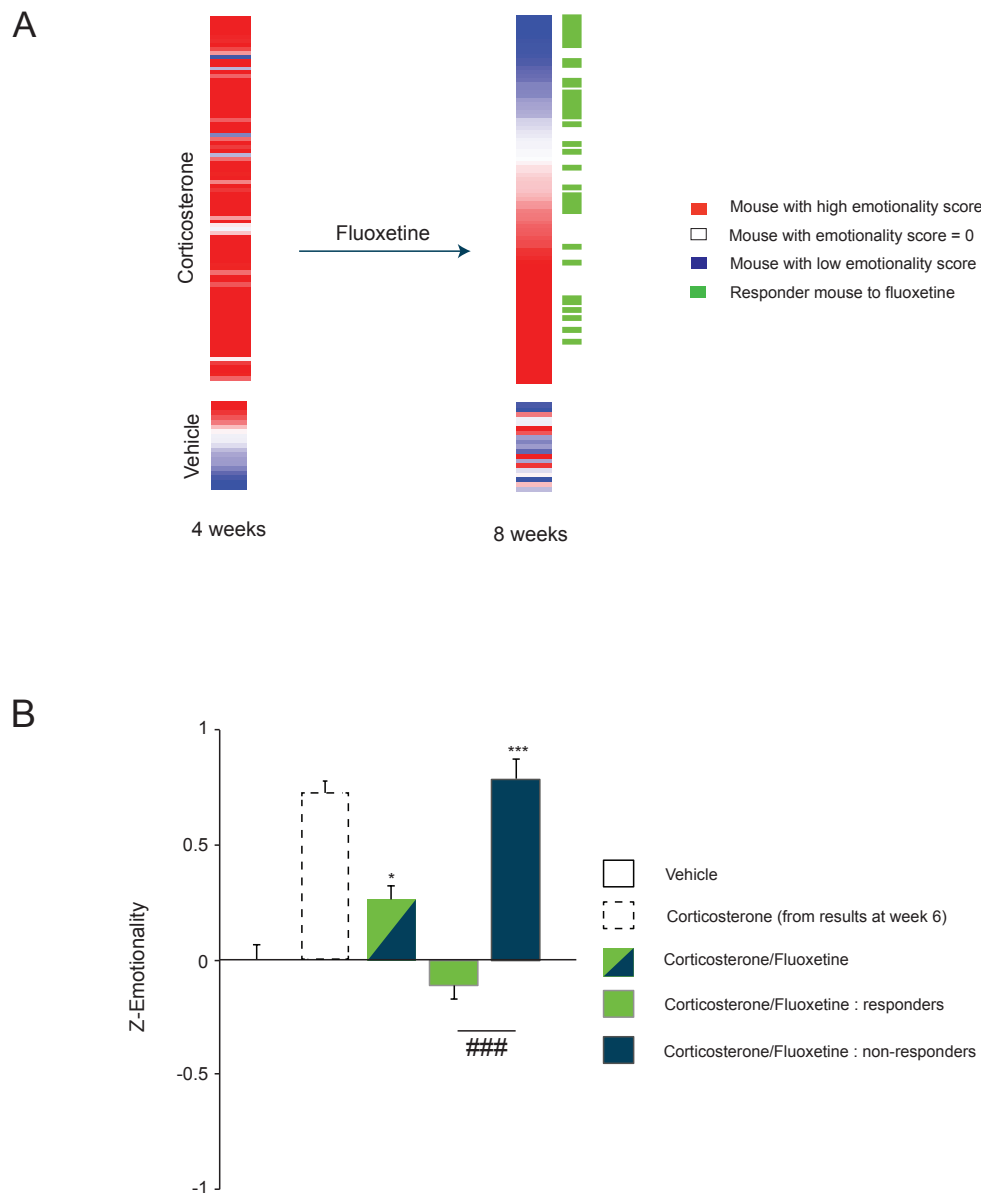


Figure 2: Administration of chronic fluoxetine reversed the anxio-depressive phenotype of approximately 30% of the mice. (A) Each square represents the anxio-depressive state of a mice, a red colour stand for a high emotionality score while a blue colour stand for a low emotionality score. Mice that responded to fluoxetine are represented by a green colour. (B) Global emotionality score decreased significantly after a chronic fluoxetine treatment. 2 groups could be separated based on the evolution of the emotionality score (see Methods): a group with a drop decrease of the emotionality score, approximately 30% of the animals (responders) and another group with no significant changes compared to corticosterone animals from the previous study (non-responders). Data represent mean $\pm$ S.E.M. (n =15/ control group and n=110/fluoxetine-treated group). A–D: * $p < 0.05$ versus vehicle group; *** $p < 0.001$ versus vehicle group; ### $p < 0.001$ responders versus non-responders.

Figure 3

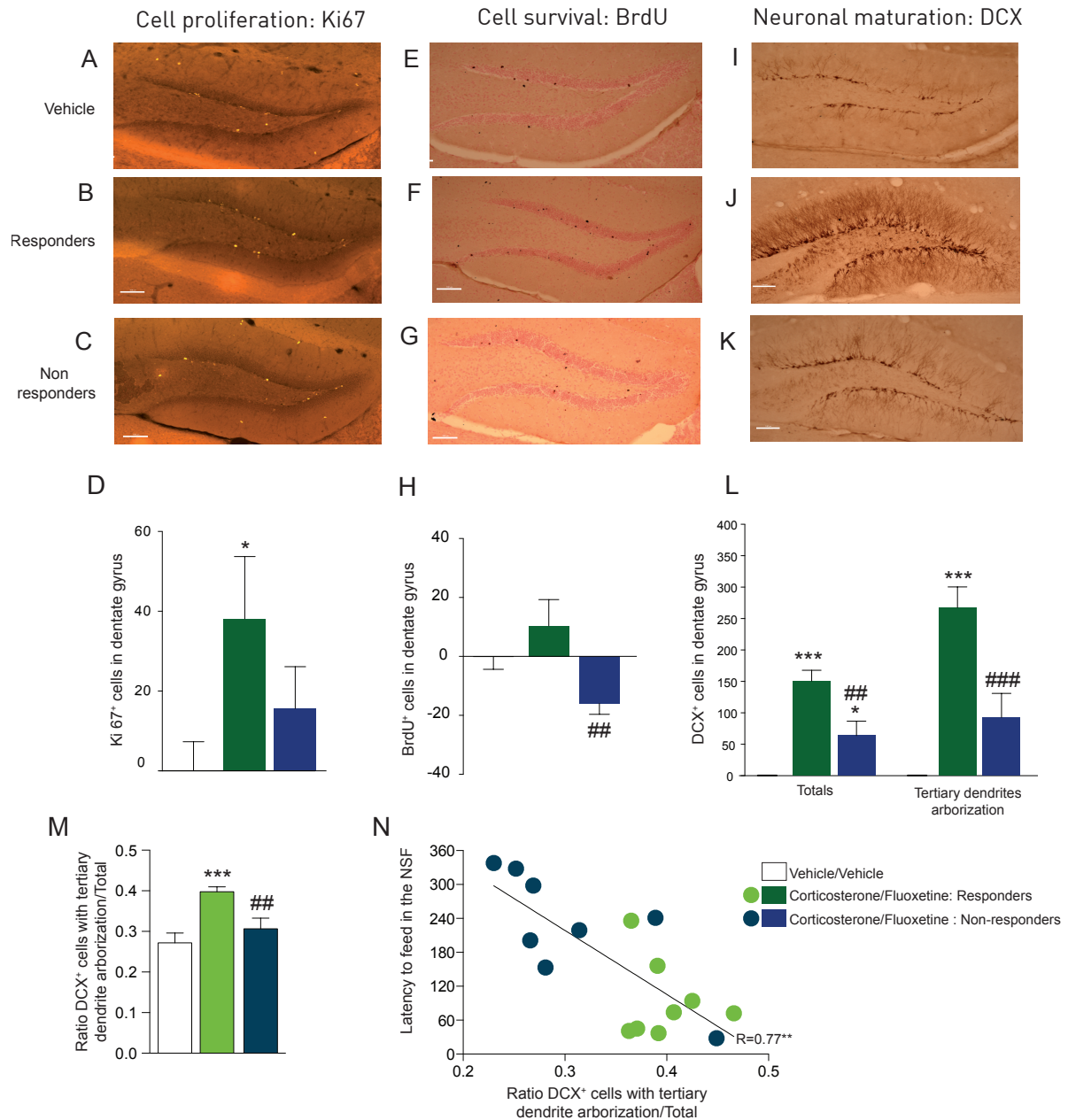


Figure 3: Administration of chronic fluoxetine induced an increased cell proliferation and maturation and an increased cell survival and neuronal maturation in responders compared to non-responders Data obtained from an immunocytochemistry study. (A-D) Effect of chronic treatment with fluoxetine, starting after 4 weeks of corticosterone (35 μ g/ml), on cell proliferation. Cell number is measured as mean number of Ki-67+ cells. (E-H) Effect of chronic fluoxetine on cell survival. Cell number is measured as mean number of BrdU-positive cells (I-M) Effect of chronic treatment with fluoxetine on total number of doublecortine-positive (DCX+) cells and on the DCX+ cells with tertiary dendrites. (N) Positive inverse correlation of maturation index with latency in the NSF test, a neurogenesis dependent test. Data represent percentage of variation compared to controls $\pm$ S.E.M (n=7 in the control group and n=8 in the responders and the non-responders group) * $p<0.05$; *** $p<0.001$ versus vehicle group; # $p<0.05$ responders versus non-responders; ## $p<0.01$ responders versus non-responders; ### $p<0.001$ responders versus non-responders

Figure 4

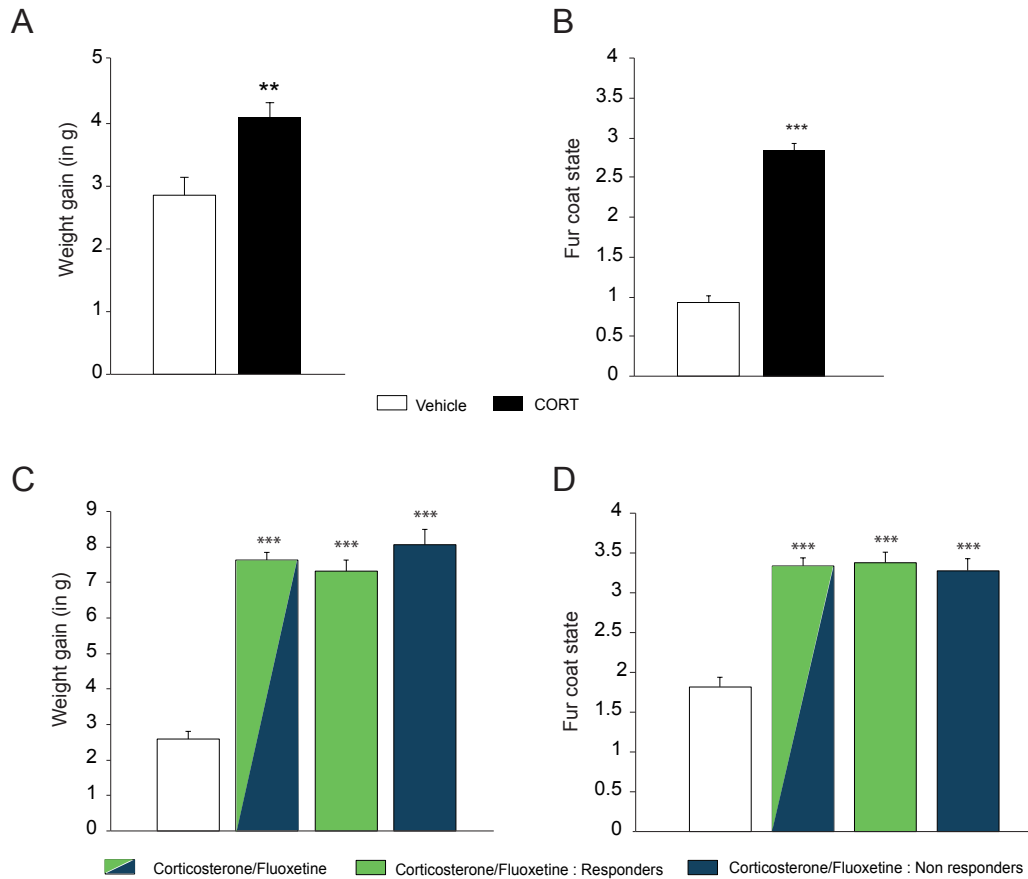


Figure 4: Weight gain and fur coat state in CORT, responders and non-responders to fluoxetine.

(A) We observed that chronic corticosterone treatment induces a significant increase in the weight of the animals and (B) in the state of the fur coat of mice. (C) After a 4-weeks treatment with fluoxetine, this increase was still statistically significant compared to vehicle treated animals, with no difference between responders vs non responders to fluoxetine treatment. (D) Fluoxetine treatment did not reverse the corticosterone-induced alteration in fur coat state, independently to response to treatment.

** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus vehicle group

Figure 5

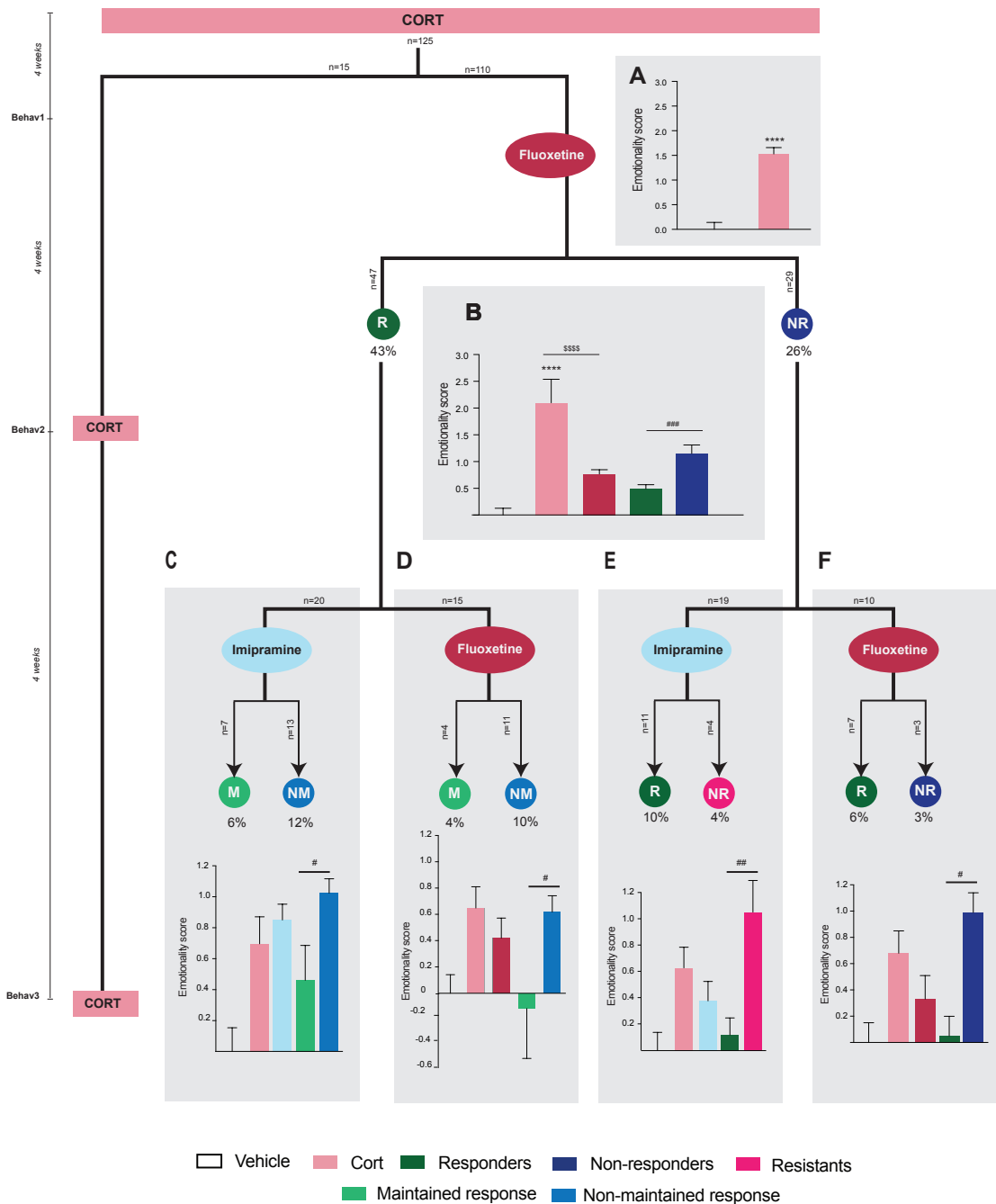


Figure 5: Emotionality score evolution in CORT-treated animals after fluoxetine and/or imipramine administration. (A) Emotionality score was calculated after administration of a 4-week corticosterone treatment. We observed a significant increase of the score in the CORT mice compared to controls. (B) Z-score was then calculated after a chronic fluoxetine treatment and we observed 2 groups: responders and non-responders. Non-responders represented approximately 26% of the animals. Finally, emotionality score was calculated after a 12-week fluoxetine treatment in responders (D) and non-responders (F), and after a 4-week imipramine treatment in responders (C) and non-responders (E). 4% of the total mice were resistant to treatment, that is not responders to either fluoxetine nor imipramine. Data represent mean $\pm$ S.E.M **** $p < 0.0001$ versus vehicle group; # $p < 0.05$ responders versus non-responders; ## $p < 0.01$ responders versus non-responders; ### $p < 0.001$ responders versus non-responders; \$\$\$\$ $p < 0.0001$ CORT vs fluoxetine group

Figure 6

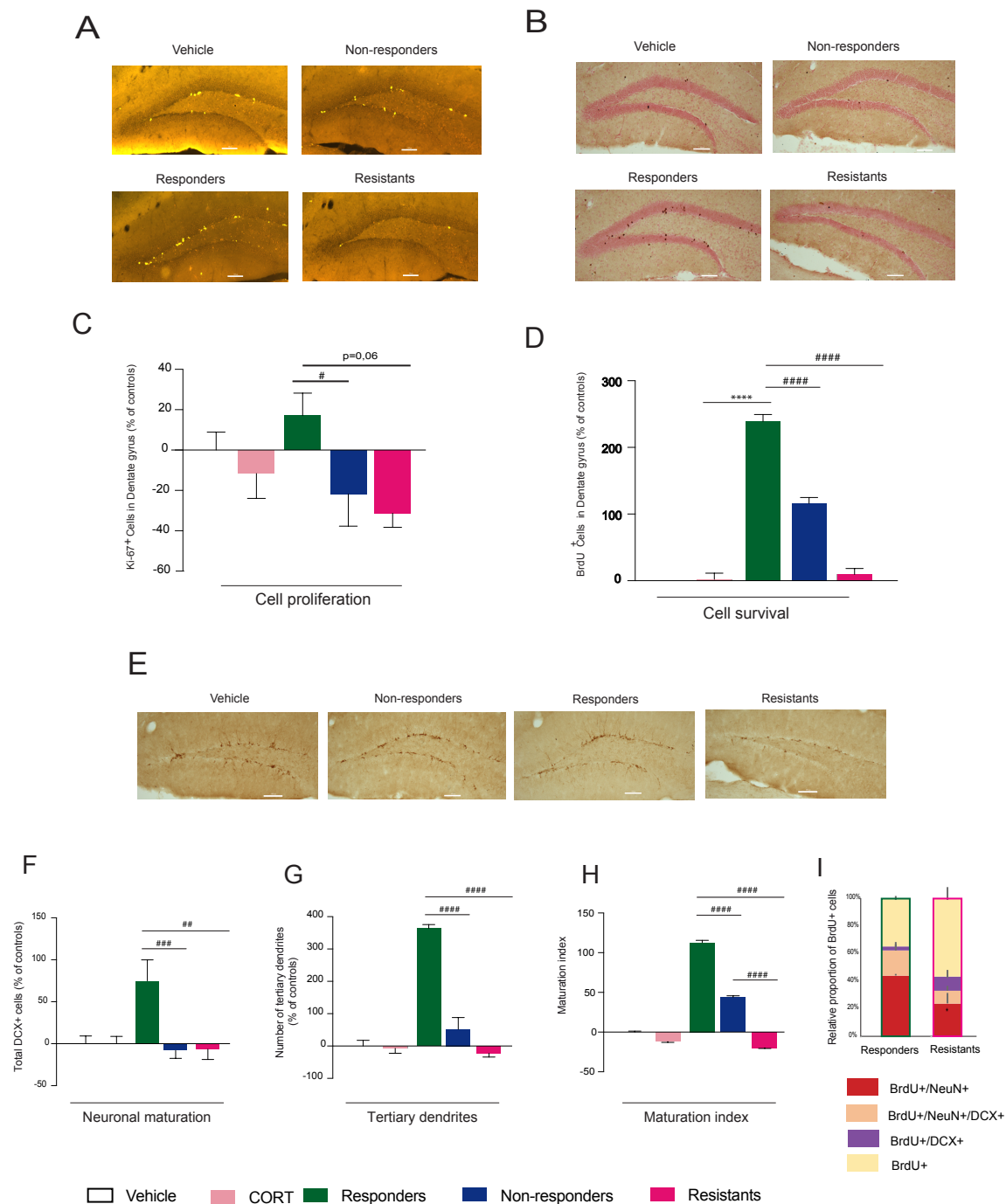


Figure 6: Antidepressant-treatment responders display increased neurogenesis compared to non-responders and treatment resistant mice. (A-B) Effect of chronic treatment with fluoxetine and imipramine, starting after 4 weeks of corticosterone (35 µg/ml), on cell proliferation. Cell number is measured as mean number of Ki-67-positive cells. (C-D) Effect of chronic fluoxetine and imipramine on cell survival. Cell number is measured as mean number of BrdU-positive cells (E-F) Effect of chronic treatment with fluoxetine on total number of doublecortine-positive (DCX+) cells and on the DCX+ cells with tertiary dendrites. Data represent percentage of variation compared to controls $\pm$ S.E.M (n=5 in the control group, n=5 in the CORT group, n=14 in the responders group, n=16 in the non-responders group and n=4 in the resistant group) ****p<0.0001 *versus* vehicle group; #p<0.05 responders *versus* non-responders; ##p<0.01 responders *versus* non-responders; #####p<0.0001 responders *versus* non-responders

Figure 7

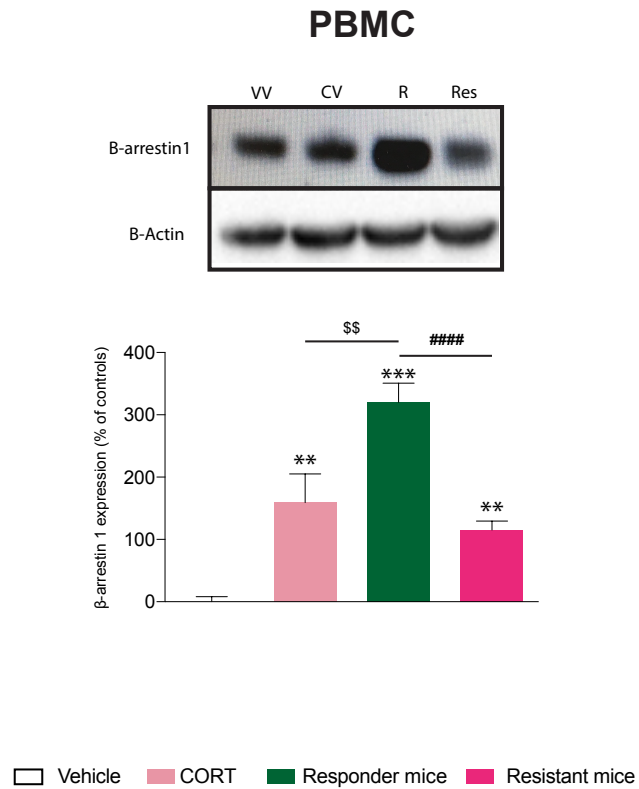
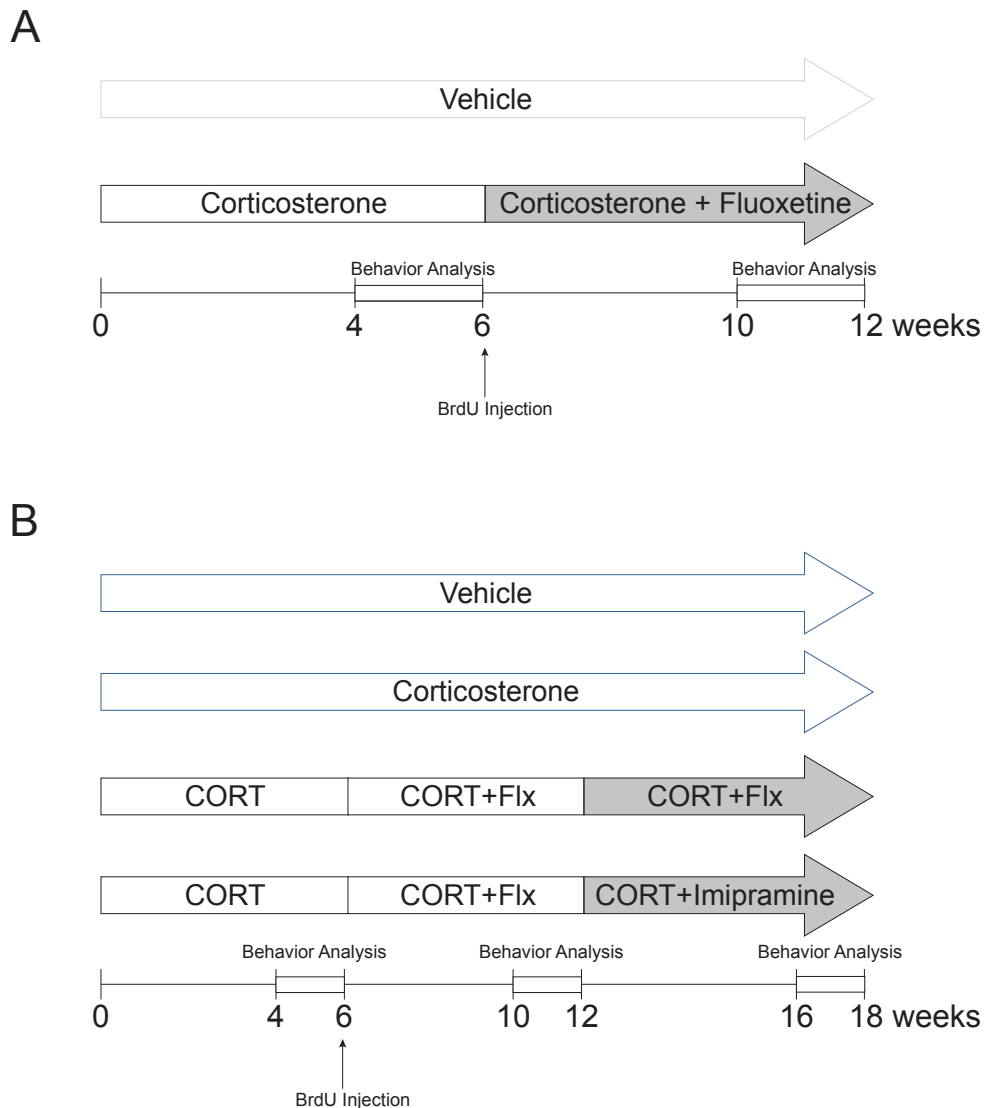


Figure 6: Differential β -arrestin 1 expression levels in PBMCs responders compared to resistant mice
Ratio of expression of β -arrestin 1 compared to β -actin in the PBMCs * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ versus vehicle group; \$\$ $p < 0.01$ CORT versus responders; # $p < 0.05$ and #### $p < 0.0001$ responders versus resistant mice.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: Integrated emotionality z-scores in mice treated with corticosterone. Raw data obtained from four independent behavioral tests performed in the same animal (OF, EPM, NSF and Splash Test $n = 19$ in the vehicle group and $n=99$ in the corticosterone-treated group). (B) Normalization of data using z-score method was performed for each parameter using the control male group as the baseline. (C) Test z-values were then calculated by averaging individual z-scores, and (D) averaged to obtain emotionality z-score. Data represent mean $\pm$ S.E.M. ($n = 19$ in the vehicle group and $n=99$ in the corticosterone-treated group).

A–D: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for effects of corticosterone treatment compared to the no-stress group.

5 REFERENCES:

- Adachi, M., M. Barrot, A. E. Autry, D. Theobald and L. M. Monteggia (2008). "Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy." Biol Psychiatry **63**(7): 642-649.
- Avissar, S., A. Matuzany-Ruban, K. Tzukert and G. Schreiber (2004). "Beta-arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain." Am J Psychiatry **161**(11): 2066-2072.
- Bergstrom, A., M. N. Jayatissa, T. Thykjaer and O. Wiborg (2007). "Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study." J Mol Neurosci **33**(2): 201-215.
- Bisgaard, C. F., M. N. Jayatissa, J. J. Enghild, C. Sanchez, R. Artemychyn and O. Wiborg (2007). "Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression." J Mol Neurosci **32**(2): 132-144.
- Chen, Y., C. M. Dube, C. J. Rice and T. Z. Baram (2008). "Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone." J Neurosci **28**(11): 2903-2911.
- Connolly, K. R. and M. E. Thase (2011). "If at first you don't succeed: a review of the evidence for antidepressant augmentation, combination and switching strategies." Drugs **71**(1): 43-64.
- Cryan, J. F., O. F. O'Leary, S. H. Jin, J. C. Friedland, M. Ouyang, B. R. Hirsch, M. E. Page, A. Dalvi, S. A. Thomas and I. Lucki (2004). "Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8186-8191.
- David, D. J., B. A. Samuels, Q. Rainer, J. W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J. P. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijevic, E. D. Leonardo and R. Hen (2009). "Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression." Neuron **62**(4): 479-493.
- Deltheil, T., B. P. Guiard, J. Cerdan, D. J. David, K. F. Tanaka, C. Reperant, J. P. Guilloux, F. Coudore, R. Hen and A. M. Gardier (2008). "Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice." Neuropharmacology **55**(6): 1006-1014.
- Ducottet, C. and C. Belzung (2004). "Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice." Physiol Behav **81**(3): 417-426.
- Edgar, N. M., C. Touma, R. Palme and E. Sibille (2011). "Resilient emotionality and molecular compensation in mice lacking the oligodendrocyte-specific gene Cnp1." Transl Psychiatry **1**: e42.

Ford, T. C. and D. Rickwood (1990). "A new one-step method for the isolation of human mononuclear cells." J Immunol Methods **134**(2): 237-241.

Gaynes, B. N., A. J. Rush, M. H. Trivedi, S. R. Wisniewski, D. Spencer and M. Fava (2008). "The STAR*D study: treating depression in the real world." Cleve Clin J Med **75**(1): 57-66.

Golan, M., G. Schreiber and S. Avissar (2010). "Antidepressants increase beta-arrestin 2 ubiquitinylation and degradation by the proteasomal pathway in C6 rat glioma cells." J Pharmacol Exp Ther **332**(3): 970-976.

Golde, W. T., P. Gollobin and L. L. Rodriguez (2005). "A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet." Lab Anim (NY) **34**(9): 39-43.

Guiard, B. P., D. J. David, T. Deltheil, F. Chenu, E. Le Maitre, T. Renoir, I. Leroux-Nicollet, P. Sokoloff, L. Lanfumey, M. Hamon, A. M. Andrews, R. Hen and A. M. Gardier (2008). "Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype." Int J Neuropsychopharmacol **11**(1): 79-92.

Guilloux, J. P., D. J. David, B. A. Samuels, I. David, A. M. Gardier and B. P. Guiard (2012). Non-response to initial antidepressant therapy. Psychology. Rijeka, Croatia, InTech.

Guilloux, J. P., M. Seney, N. Edgar and E. Sibille (2011). "Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex." J Neurosci Methods **197**(1): 21-31.

Gulledge, A. T., B. M. Kampa and G. J. Stuart (2005). "Synaptic integration in dendritic trees." J Neurobiol **64**(1): 75-90.

Hek, K., A. Demirkan, J. Lahti, A. Terracciano, A. Teumer, M. C. Cornelis, N. Amin, E. Bakshis, J. Baumert, J. Ding, Y. Liu, K. Marcante, O. Meirelles, M. A. Nalls, Y. V. Sun, N. Vogelzangs, L. Yu, S. Bandinelli, E. J. Benjamin, D. A. Bennett, D. Boomsma, A. Cannas, L. H. Coker, E. de Geus, P. L. De Jager, A. V. Diez-Roux, S. Purcell, F. B. Hu, E. B. Rimm, D. J. Hunter, M. K. Jensen, G. Curhan, K. Rice, A. D. Penman, J. I. Rotter, N. Sotoodehnia, R. Emeny, J. G. Eriksson, D. A. Evans, L. Ferrucci, M. Fornage, V. Gudnason, A. Hofman, T. Illig, S. Kardia, M. Kelly-Hayes, K. Koenen, P. Kraft, M. Kuningas, J. M. Massaro, D. Melzer, A. Mulas, C. L. Mulder, A. Murray, B. A. Oostra, A. Palotie, B. Penninx, A. Petersmann, L. C. Pilling, B. Psaty, R. Rawal, E. M. Reiman, A. Schulz, J. M. Shulman, A. B. Singleton, A. V. Smith, A. R. Sutin, A. G. Uitterlinden, H. Volzke, E. Widen, K. Yaffe, A. B. Zonderman, F. Cucca, T. Harris, K. H. Ladwig, D. J. Llewellyn, K. Raikonen, T. Tanaka, C. M. van Duijn, H. J. Grabe, L. J. Launer, K. L. Lunetta, T. H. Mosley, Jr., A. B. Newman, H. Tiemeier and J. Murabito (2013). "A genome-wide association study of depressive symptoms." Biol Psychiatry **73**(7): 667-678.

Heurteaux, C., G. Lucas, N. Guy, M. El Yacoubi, S. Thummler, X. D. Peng, F. Noble, N. Blondeau, C. Widmann, M. Borsotto, G. Gobbi, J. M. Vaugeois, G. Debonnel and M. Lazdunski (2006). "Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype." Nat Neurosci **9**(9): 1134-1141.

- Hill, A. S., A. Sahay and R. Hen (2015). "Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors." Neuropsychopharmacology **40**(10): 2368-2378.
- Holick, K. A., D. C. Lee, R. Hen and S. C. Dulawa (2008). "Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor." Neuropsychopharmacology **33**(2): 406-417.
- Holsboer-Trachsler, E., R. Stohler and M. Hatzinger (1991). "Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression." Psychiatry Res **38**(2): 163-171.
- Isingrini, E., V. Camus, A. M. Le Guisquet, M. Pingaud, S. Devers and C. Belzung (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**(4): e10404.
- Jayatissa, M. N., C. Bisgaard, A. Tingstrom, M. Papp and O. Wiborg (2006). "Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression." Neuropsychopharmacology **31**(11): 2395-2404.
- Jedynak, P., T. Kos, C. Sandi, L. Kaczmarek and R. K. Filipkowski (2014). "Mice with ablated adult brain neurogenesis are not impaired in antidepressant response to chronic fluoxetine." J Psychiatr Res **56**: 106-111.
- Joslin, J. O. (2009). "Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals." Journal of Exotic Pet Medicine **18**(2): 117-139.
- Kessler, R. C., W. T. Chiu, O. Demler, K. R. Merikangas and E. E. Walters (2005). "Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication." Arch Gen Psychiatry **62**(6): 617-627.
- Kunugi, H., I. Ida, T. Owashi, M. Kimura, Y. Inoue, S. Nakagawa, T. Yabana, T. Urushibara, R. Kanai, M. Aihara, N. Yuuki, T. Otsubo, A. Oshima, K. Kudo, T. Inoue, Y. Kitaichi, O. Shirakawa, K. Isogawa, H. Nagayama, K. Kamijima, S. Nanko, S. Kanba, T. Higuchi and M. Mikuni (2006). "Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: a Multicenter Study." Neuropsychopharmacology **31**(1): 212-220.
- Li, Q. S., C. Tian, G. R. Seabrook, W. C. Drevets and V. A. Narayan (2016). "Analysis of 23andMe antidepressant efficacy survey data: implication of circadian rhythm and neuroplasticity in bupropion response." Transl Psychiatry **6**(9): e889.
- Lopez-Rubalcava, C. and I. Lucki (2000). "Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test." Neuropsychopharmacology **22**(2): 191-199.
- Mendez-David, I., Z. El-Ali, R. Hen, B. Falissard, E. Corruble, A. M. Gardier, S. Kerdine-Romer and D. J. David (2013). "A method for biomarker measurements in peripheral blood mononuclear cells isolated from anxious and depressed mice: beta-arrestin 1 protein levels in depression and treatment." Front Pharmacol **4**: 124.

- Montgomery, S. A., R. Z. Nielsen, L. H. Poulsen and L. Haggstrom (2014). "A randomised, double-blind study in adults with major depressive disorder with an inadequate response to a single course of selective serotonin reuptake inhibitor or serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor treatment switched to vortioxetine or agomelatine." Hum Psychopharmacol **29**(5): 470-482.
- Nelson, J. C. (2003). "Managing treatment-resistant major depression." J Clin Psychiatry **64 Suppl 1**: 5-12.
- Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2013). Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam, Elsevier/AP.
- Ruhe, H. G., G. van Rooijen, J. Spijker, F. P. Peeters and A. H. Schene (2012). "Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review." J Affect Disord **137**(1-3): 35-45.
- Rush, A. J., S. R. Wisniewski, D. Warden, J. F. Luther, L. L. Davis, M. Fava, A. A. Nierenberg and M. H. Trivedi (2008). "Selecting among second-step antidepressant medication monotherapies: predictive value of clinical, demographic, or first-step treatment features." Arch Gen Psychiatry **65**(8): 870-880.
- Sahay, A., K. N. Scobie, A. S. Hill, C. M. O'Carroll, M. A. Kheirbek, N. S. Burghardt, A. A. Fenton, A. Dranovsky and R. Hen (2011). "Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation." Nature **472**(7344): 466-470.
- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-809.
- Segev, I. and M. London (2000). "Untangling dendrites with quantitative models." Science **290**(5492): 744-750.
- Surget, A., A. Tanti, E. D. Leonardo, A. Laugeray, Q. Rainer, C. Touma, R. Palme, G. Griebel, Y. Ibarguen-Vargas, R. Hen and C. Belzung (2011). "Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation." Mol Psychiatry **16**(12): 1177-1188.
- Walker, A. J., S. A. Burnett, K. Hasebe, J. A. McGillivray, L. J. Gray, S. L. McGee, K. Walder, M. Berk and S. J. Tye (2013). "Chronic adrenocorticotrophic hormone treatment alters tricyclic antidepressant efficacy and prefrontal monoamine tissue levels." Behav Brain Res **242**: 76-83.
- Wang, J. W., D. J. David, J. E. Monckton, F. Battaglia and R. Hen (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." J Neurosci **28**(6): 1374-1384.
- Willner, P. and C. Belzung (2015). "Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose?" Psychopharmacology (Berl) **232**(19): 3473-3495.

Wood, G. E., L. T. Young, L. P. Reagan, B. Chen and B. S. McEwen (2004). "Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3973-3978.

Xia, L., C. Delomenie, I. David, Q. Rainer, M. Marouard, H. Delacroix, D. J. David, A. M. Gardier and J. P. Guilloux (2012). "Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1)A and 5-HT(1)B receptors disruption in mice." Neurosci Lett **521**(1): 20-25.

DISCUSSION

6 DISCUSSION

Les phénomènes de non-réponse/résistance touchent 30% des patients traités par un antidépresseur, quelle que soit sa classe thérapeutique. La résistance au traitement antidépresseur (TRD) est un problème de santé publique majeur, par son caractère invalidant pour le patient, et son coût sociétal (Mrazek et al. 2014). De plus, le risque suicidaire s'en trouve multiplié (Olin et al. 2012). De ce fait, deux enjeux majeurs sont au cœur de la recherche en pharmacologie psychiatrique : 1) parvenir à cibler la stratégie thérapeutique la plus efficace chez un patient afin d'éviter le développement d'une TRD, et 2) trouver des traitements plus efficaces pour traiter la TRD. Ceci passe par une meilleure compréhension des mécanismes en jeu dans la résistance.

Cibler une efficacité du traitement nécessite également de mettre en évidence des biomarqueurs permettant de **prédire l'efficacité et la réponse au traitement**.

Par ailleurs, la compréhension des mécanismes de la résistance passe par l'élaboration de modèles fiables et fidèles à la pathogenèse humaine.

Notre travail de recherche a permis :

- De montrer la complexité de modéliser un phénotype anxio/dépressif chez la souris C57BL6/NTac femelle de façon stable et robuste afin de pouvoir travailler ensuite sur une réponse à l'antidépresseur
- De modéliser la résistance au traitement antidépresseur dans le modèle CORT chez les mâles C57BL6/NTac.
- De mettre en évidence des marqueurs biologiques de la réponse/non-réponse/résistance à la fluoxétine chez la Souris.

Nous avons ainsi mis en place un protocole basé sur la séparation après traitement en deux groupes de souris, **les répondeurs et les non-répondeurs**. Ces deux groupes nous ont permis d'étudier les différences de réponse concernant **la neurogenèse hippocampique** et la différence d'expression de **la protéine β -arrestine 1** dans des échantillons de sang.

6.1 Modélisation de la non-réponse dans le modèle CORT chez les femelles

Dans ce travail de mise en évidence des phénomènes de non-réponse/résistance au traitement antidépresseur, il était nécessaire d'avoir une approche qui inclus une analyse chez des souris femelles. Cette nécessité se justifie par la prévalence plus élevée de la dépression chez la femme (Kessler et al. 2005), et par le fait que encore trop peu d'études stratifient leur résultats cliniques ou précliniques en fonction du sexe (pour information, voir l'éditorial de (Eliot and Richardson 2016, Howard et al. 2016, Shansky and Woolley 2016, Bale and Epperson 2017, Joel and McCarthy 2017)).

Dans un premier temps, nous avons voulu adapter le modèle CORT chez les souris C57BL6/NTac femelles (**Article 1**). Le modèle CORT a historiquement été développé chez les souris femelles de souche Swiss Webster (Ardayfio and Kim 2006). Dans cette étude, les effets anxio-dépressifs d'une administration exogène de corticostérone ont été évalués dans des tests d'anxiété chez des souris de fond Swiss Webster (tests du *Light Dark*, de la « *Home Cage Latency* » et de « *Startle* »). Nos résultats obtenus chez les souris C57BL6/NTac femelles montrent qu'une administration chronique de corticostérone ne permettait pas d'augmenter de façon **robuste et significative** le phénotype anxio-dépressif, contrairement à ce que nous avons pu observer chez les souris C57BL6/NTac mâles.

La première étude de dose-réponse nous a montré que, comme chez les souris mâles, la dose de **35 µg/ml** est la dose la plus efficace pour induire une altération de l'état émotionnel des animaux. Cependant, le score obtenu après 4 semaines de traitement avec la corticostérone reste en deçà de ce qui a pu être observé par ailleurs chez les mâles ($z\text{-score}=0.45\pm0.17$ versus $z\text{-score} = 0.7\pm0.09$). Comme observé chez le mâle, la dose de 7µg/ml n'est pas suffisante pour induire un comportement anxio-dépressif, ce qui est confirmé par un dosage de la corticostérone indiquant une absence de dérégulation de l'axe HPA. Le résultat le plus surprenant est l'absence d'effet significatif chez les femelles de la dose supérieure (70 µg/ml).

Afin de potentialiser les effets de la corticostérone, nous avons donc décidé de prolonger la durée du traitement de corticostérone (35µg/ml) à 8 puis 12 semaines. Néanmoins, ces ajustements ne nous ont pas permis d'induire un phénotype stable et l'*Emotionality score* est resté faible et non significativement différent de celui des souris contrôles. Les femelles semblant plus sensibles aux effets d'un stress comportemental, nous avons également testé des combinaisons d'isolement social (cage individuelle) avec un traitement chronique de

CORT (4 semaines, isolement + CORT 35µg/ml) afin d'induire un phénotype anxio-dépressif plus intense, mais cette stratégie s'est également révélée inefficace (données non présentées).

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude indiquent que **les souris femelles C57BL6/NTac présentent une moindre vulnérabilité à développer un phénotype anxio-dépressif suite à un traitement chronique de corticostérone par rapport aux souris mâles**. Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer cette différence :

- 1) Contrairement aux mâles, les femelles sont soumises à un cycle estrus comportant plusieurs phases, et entraînant des variations hormonales importantes chez les animaux, et ceci sur des périodes très courtes de 4 jours (Goldman et al. 2007). Bien que certaines études aient montré une diminution de l'anxiété chez des rats femelles pendant les phases *proestrus* et *estrus*, nous n'avons observé **aucun effet significatif du cycle**, et donc des variations hormonales sur le comportement des animaux.
- 2) Les hormones sexuelles des femelles ont **des effets sur le fonctionnement de plusieurs systèmes de neurotransmetteurs**, dont le système noradrénergique et sérotoninergique. Il a par exemple été montré que l'œstradiol augmentait la densité des récepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex et le nucleus accumbens (Blanchard et al. 1991, Fink et al. 1996 , Palanza 2001)
- 3) Les femelles ont un niveau de corticostérone basal dans le sang qui est naturellement plus élevé que chez les mâles (Viau 2002, Aoki et al. 2010), ce qui amènerait à une sensibilité moindre à une élévation des taux de corticostérone circulant.
- 4) Il existe un dimorphisme sexuel de l'hippocampe, sur le plan anatomique et du fonctionnement neurochimique (Kelly et al. 1999, Goldstein 2001)
- 5) Une exposition chronique à la CORT chez des rats femelles entraîne des perturbations du rythme circadien de la corticostérone et une modification du poids de la glande surrénale moindre par rapport à ce qui a été observé chez les souris mâles (Young 1998).

Ces différentes observations permettent peut-être d'expliquer une partie du dimorphisme sexuel observé dans la réponse à un traitement chronique de corticostérone.

Différents travaux ont montré les effets du stress chronique sur les différentes étapes de la neurogenèse hippocampique adulte : prolifération cellulaire (Jayatissa et al. 2006, David et al. 2009, Oomen et al. 2010, Surget et al. 2011, Nollet et al. 2012, Siopi et al. 2016), survie cellulaire (Oomen et al. 2010, Nollet et al. 2012) et maturation neuronale (Oomen et al. 2010, Nollet et al. 2012, Lussier et al. 2013). Ces altérations de la neurogenèse se retrouvent également au niveau des bulbes olfactifs (Siopi et al. 2016). Chez le mâle (souris C57BL6/NTac), l'administration chronique de corticostérone induit une diminution de la prolifération cellulaire hippocampique sans altérer les autres étapes de la neurogenèse (David et al. 2009, Rainer et al. 2012). C'est pourquoi nous avons étudié les effets d'un traitement chronique de corticostérone sur les différentes étapes de neurogenèse chez les souris femelles C57BL6/NTac, afin de confirmer si l'absence d'effet comportemental était associée à une absence d'effet neurogénique. Confirmant cette hypothèse, nous n'avons observé aucune variation des différentes étapes de la neurogenèse hippocampique chez ces animaux suite à l'administration de CORT. (**Article 1**)

Nos résultats confirment la difficulté de mettre en place un modèle animal de dépression chez la souris femelle permettant de générer suffisamment d'animaux présentant un phénotype stable afin d'observer l'efficacité des traitements. Si le modèle CORT ne semble pas adapté, d'autres modèles existent, comme l'isolation sociale, ou encore le UCMS, qui ont démontré leur efficacité chez les souris femelles (Schmidt et al. 2010, Franceschelli et al. 2014). Néanmoins, l'utilisation de ces modèles dans le cadre d'une étude sur la dépression résistante au traitement est difficilement envisageable car le nombre d'animaux vulnérables au stress est trop faible, excluant ainsi un nombre important d'animaux de l'étude. Etant donné la faible proportion d'animaux résistants à la fin du protocole, l'utilisation de ces modèles n'est donc pas préférable.

6.2 Modélisation de la résistance dans le modèle CORT chez les souris mâles

Plusieurs approches ont été abordées pour mettre en évidence les phénomènes de résistance au traitement antidépresseur chez la souris. La plus répandue est le recours à des **animaux génétiquement modifiés** pour des gènes cibles, induisant une réponse comportementale altérée à l'antidépresseur. En cela, ces modèles se rapprochent de la responsabilité causale de certains polymorphismes humains sur la réponse antidépressive. Par exemple, des polymorphismes du gène codant pour le BDNF ont été associés à un défaut de réponse aux

ISRS chez l'Homme (Fabbri et al. 2014, Colle et al. 2015), effet qui a pu être également observé chez la souris (Bath et al. 2012, Yu et al. 2012). En effet Bath et al. a observé chez des souris BDNF^{Met/Met} une incapacité d'un traitement chronique avec la fluoxétine (16 mg/kg, dans l'eau de boisson) à restaurer la survie neuronale et la plasticité synaptique dans le gyrus dentelé. Yu et al. a montré une absence de réponse comportementale dans le FST chez les souris BDNF^{Met/Met} après injection de fluoxétine (10 mg/kg, i.p.). Si ces études peuvent identifier des pistes biologiques participant à la résistance au traitement, elles ne reflètent probablement pas la réalité clinique. En effet, aucune analyse d'association pangénomique (GWAS) n'a pu mettre en évidence un polymorphisme associé à l'absence de réponse à un traitement antidépresseur (Biernacka et al. 2016, Li et al. 2016). Ces dernières études suggèrent donc que les patients non-répondeurs/résistants ne sont pas porteurs de l'une de ces mutations génétiques. Par conséquent, ne se focaliser que sur l'une des causes probables de la TRD pour modéliser la pathologie et étudier les altérations biologiques qui la sous-tendent n'est pas une approche rigoureuse.

Ainsi, notre approche sans *a priori* biologique causatif, a consisté en la séparation des animaux répondeurs et non-répondeurs après administration chronique de fluoxétine. En utilisant des critères stricts de sélection et équivalent à ceux utilisés chez l'Homme (i.e., est considérée comme réponse thérapeutique une diminution >50% du score de l'échelle de dépression), Après administration de fluoxétine et calcul de *l'emotionality score*, **30% des animaux ont été classés comme non-répondeurs au traitement (Article 2)**. De manière intéressante, on remarque que cette proportion est similaire à celle reportée dans certaines études effectuées chez l'Homme (Trivedi et al. 2006).

Par la suite, j'ai séparé les animaux en 2 groupes. Les souris ont été soit maintenues sous fluoxétine (18 mg/kg/j, 4 semaines), soit, comme cela est réalisé en clinique, leur traitement a été modifié et les souris ont reçu un antidépresseur appartenant à une autre classe pharmacologique (imipramine, 40mg/kg, 4 semaines). En termes de pratique clinique, le changement de traitement antidépresseur est l'alternative thérapeutique la plus couramment utilisée et préconisée par les guidelines (Nutt et al. 2010), bien que les bénéfices de cette stratégie ne soient pas démontrés (Gaynes et al. 2012). Notre étude semble confirmer cette observation clinique, car nous n'avons observé **aucune différence significative en termes de réponse au traitement entre les souris maintenues sous fluoxétine (pendant 8 semaines) et les souris ayant été traitées avec la fluoxétine (4 semaines) puis l'imipramine (4 semaines)**.

A l'issue de ce protocole, nous avons obtenu des animaux résistants aux traitements antidépresseurs et des animaux répondeurs, ce qui nous a permis de comparer ces 2 groupes.

Pour récapituler les informations concernant notre modèle et discuter sa validité, le **Tableau 12** suivant reprend les critères cités plus haut (section 1.2.2.1)

Séparation en répondeurs et non répondeurs					
Modèle	Mécanisme	Phénotype anxio-dépressif ?	Résistance aux traitements antidépresseurs conventionnels	Test	Réponse aux nouvelles stratégies
CORT	Administration chronique de CORT à des souris C57BL6/NTac	Oui	Fluoxétine Imipramine	EPM OF NSF Splash Test	Ø

Tableau 12 : Critères de validation dans notre modèle de TRD

- Le modèle utilisé pour étudier la réponse au traitement est bien **un modèle d'anxiété-dépression validé**, le modèle CORT.
- Une absence de réponse à la fluoxétine et l'imipramine a été observée dans ce modèle, traitements couramment prescrits chez l'Homme pour un état dépressif. Par ailleurs, contrairement à tous les modèles de TRD actuellement utilisés, notre modèle est le seul qui **respecte la définition de la résistance à un traitement antidépresseur**, à savoir une absence de réponse à au moins 2 traitements antidépresseurs administrés **de manière séquentielle, à posologie et durée adéquates**. En effet, les modèles existants évaluent la réponse après administration, parfois aigue, d'un antidépresseur. Une administration aigue n'est pas appropriée à ce type d'études qui nécessite de laisser un temps suffisant au traitement pour agir et pour en apprécier les effets dans les conditions normales de prescription.
- En revanche, la mesure d'une réponse avec un traitement appartenant aux nouvelles stratégies thérapeutiques pour la TRD n'a pas été évaluée. Afin de valider entièrement ce modèle de TRD, une étude supplémentaire est donc requise.

L'une des grandes forces de ce modèle, est **la méthode d'évaluation de la réponse**. En effet, dans la majorité des travaux, la réponse est évaluée à l'aide d'un seul test comportemental, souvent le FST. Or, nous estimons d'une part qu'un seul test n'est pas suffisant pour apprécier

l'ensemble des effets des traitements antidépresseurs chroniques, et d'autre part que le FST n'est pas le test le plus approprié pour évaluer le phénotype anxio-dépressif (de Kloet and Molendijk 2016). Afin de le quantifier, nous avons utilisé l'*emotionality score*, ce qui nous a permis de préciser le phénotype de l'animal à travers plusieurs tests, et également d'utiliser un outil comparable aux échelles de dépression en clinique. Le *cut-off* que nous avons choisi, similaire à celui utilisé chez les patients dépressifs, est assez strict pour garantir une bonne séparation des répondeurs et non-répondeurs, renforçant ainsi la solidité de notre évaluation de la non-réponse.

Il est important toutefois de souligner ici les limites de notre modèle. Tout d'abord, comme illustré sur la figure 5 (**Article 2**), notre protocole est long et s'étend sur 18 semaines de traitement et de tests comportementaux. Plusieurs conséquences en découlent :

- **Le nombre d'animaux résistants obtenu à la fin du protocole est faible.** Ceci est un inconvénient majeur, car la plupart des études de biologie moléculaire ou de neurogenèse nécessite d'avoir un nombre d'animaux par groupe suffisant (>6 animaux) pour observer une différence significative. Pour pallier à cette difficulté, nous avons donc reproduit cette étude dans une seconde cohorte afin d'obtenir un nombre suffisant d'animaux pour mener à bien nos expérimentations.
- Nous avons répété à plusieurs reprises les tests de comportement sur les mêmes animaux. Lors des premiers tests, les animaux explorent un environnement nouveau et inédit. Lors de leur deuxième passage, le temps d'exploration est plus court, et leur connaissance du test peut influencer nos résultats (par exemple, le temps de latence dans le NSF). Nous avons ainsi observé une diminution progressive des paramètres des tests lors de la deuxième, puis de la troisième session de tests comportementaux (Figure 24), ce que nous avons qualifié d'**effet re-test sur les résultats obtenus**. Dans la figure présentée, nous avons représenté les paramètres de chaque test pris en compte dans le calcul du score chez les souris contrôles, et nous observons pour la plupart une diminution significative de la valeur de ces paramètres au fil des sessions de comportement réalisées. La normalisation des valeurs par rapport aux souris contrôle permet de s'affranchir de l'impact de cet effet re-test. En revanche, il est important de normaliser par rapport au groupe contrôle de la même expérience (normalisation des animaux à B1 avec les contrôles à B1, des animaux à B2 avec les contrôles à B2...), afin que tous les animaux soient dans les mêmes conditions expérimentales, et que

l'effet re-test soit le même pour tous les animaux. Une méthode que nous pourrions néanmoins envisager pour nous affranchir totalement de l'impact de cet effet re-test a été développée par (Misquita et al. 2014). En observant le comportement de l'animal pendant 24h dans un appareil Noldus Phenotyper[®], ils ont noté qu'il était possible d'évaluer le phénotype anxio-dépressif des animaux sans réaliser de tests comportementaux, et ainsi de suivre semaine après semaine l'évolution du phénotype des animaux, sans intervention extérieure. Ainsi, dans notre étude, cette approche permettrait d'estimer la réponse antidépressive au cours du temps sans évaluation par les tests de comportement. Une seule évaluation pourrait être réalisée en fin d'étude.

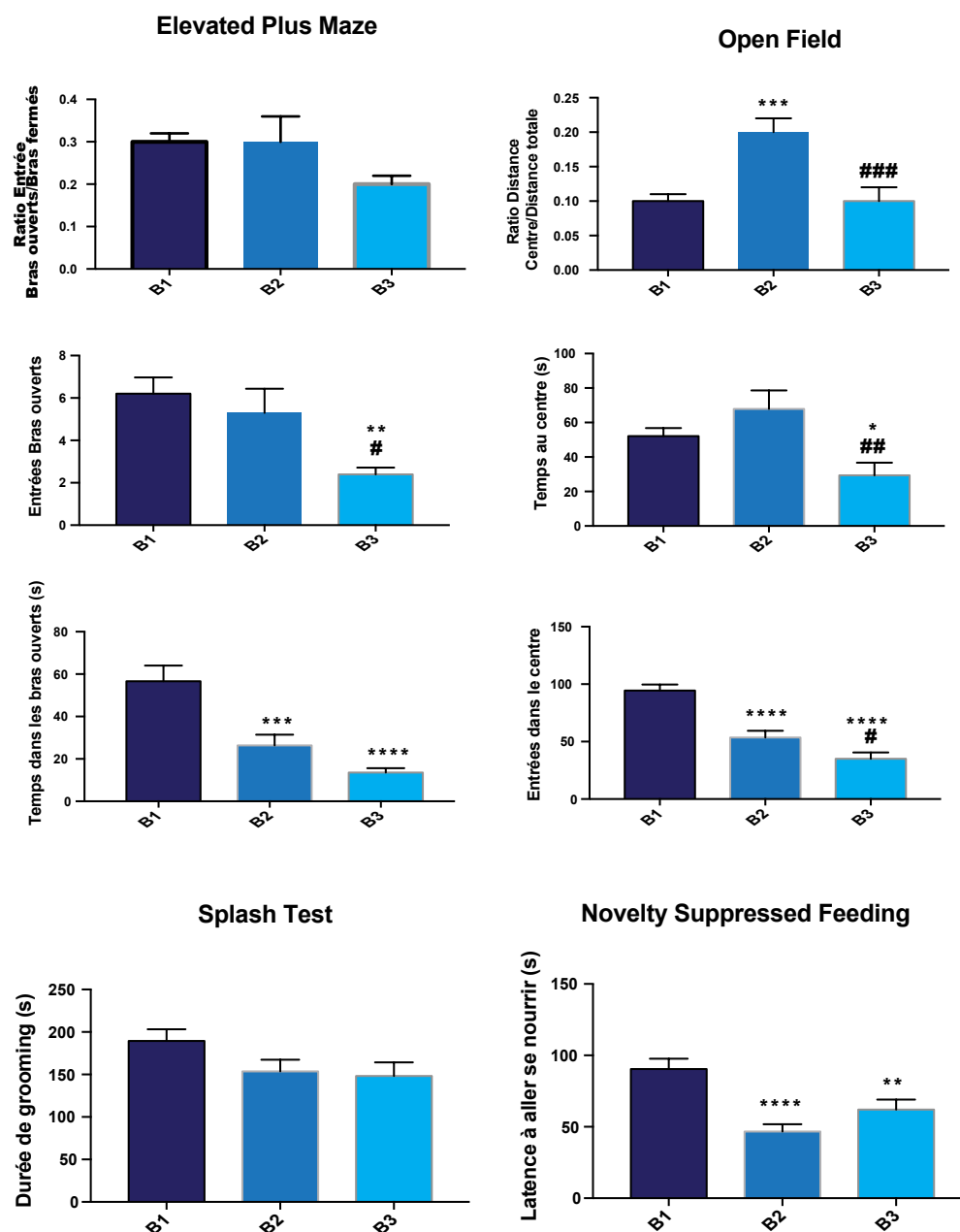


Figure 24: Variation des résultats comportementaux chez les animaux contrôle au cours des différentes évaluations comportementales.

Les paramètres sont ceux pris en compte pour le calcul de l'emotionality score. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs B1 ; #p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs B2

- Une autre limite de notre étude est **l'administration du traitement antidépresseur dans l'eau de boisson**. Cette voie d'administration est la moins invasive et la moins stressante pour l'animal, ainsi que la moins contraignante d'un point de vue expérimental au vu du nombre élevé d'animaux impliqué dans ce type de protocole et de la durée de traitement (18 semaines). Notre suivi de la consommation de la boisson par cage (5 souris par cage) ne montre pas de différence de consommation inter-cages

et inter-groupes quant à la prise de boisson. Néanmoins, sans doser directement la concentration circulante de l'antidépresseur et de ses métabolites, il est compliqué de s'assurer que tous les animaux reçoivent exactement la même posologie, et ceci constitue une limite à notre étude. En revanche, cette limite n'est pas inhérente aux études précliniques, puisqu'elle existe également en clinique, où un phénomène de *pseudorésistance* est observé (Nierenberg and Amsterdam 1990, Kornstein and Schneider 2001). En effet, comme mentionné auparavant (section 1.2.1.2) certains patients sont non-observants au traitement antidépresseur prescrit ce qui participe à l'absence de réponse au traitement.

Pour conclure sur la modélisation chez les souris mâles, le tableau ci-dessous (Tableau 13) récapitule tous les avantages et inconvénients des modèles de TRD les plus couramment utilisés en comparaison avec notre modèle de séparation en 2 groupes de répondeurs et non-répondeurs.

	Avantages	Limites
Modèles existants	○ Utiles pour identifier les médicaments avec des nouveaux mécanismes d'action non-sérotoninergiques et non-noradrénergiques (Caldarone et al. 2015) ○ Souches résistantes : bons outils pour l'identification de gènes sous-tendant la réponse à l'antidépresseur (congéniques) et screening de médicaments avec des nouveaux mécanismes d'action (congénique et non-congéniques) (Caldarone et al. 2015) ○ Protocoles de traitement courts	○ Ne modélisent pas la complexité de la pathologie TRD chez les patients dépressifs ○ Administration aiguë du traitement ○ Les animaux ne présentent pas toujours un phénotype anxio-dépressif avant traitement ○ Evaluation du phénotype anxio-dépressif à l'aide d'un seul test (FST dans la majorité des cas) ○ Pas de femelles incluses dans les protocoles
Notre modèle	○ Animaux présentent un phénotype anxio-dépressif avant traitement ○ Administration chronique du traitement et plusieurs traitements successifs ○ Evaluation de la réponse antidépressive à l'aide de plusieurs tests et d'un emotionality score avec un <i>cut-off</i> similaire à la clinique ○ Pourcentage de non-répondeurs similaires à celui obtenu en pratique clinique	○ Protocoles de traitement long ○ Nombre d'animaux résistants à la fin de l'étude faible et difficile à prédire ○ Administration dans l'eau de boisson : « <i>pseudorésistance</i> » ○ Pas de femelles incluses dans les protocoles ○ Pas d'évaluation avec un antidépresseur avec un nouveau mécanisme d'action

Tableau 13 : Avantages et inconvénients des modèles couramment utilisés et de notre modèle de TRD

6.3 La non-réponse/résistance aux antidépresseurs est associée à des altérations de la neurogenèse hippocampique adulte

Les perturbations de la neurogenèse hippocampique sont reliées à une altération de la réponse aux antidépresseurs. Les premiers travaux associant neurogenèse et réponse à un traitement antidépresseur ont montré qu'une suppression de la neurogenèse par une irradiation aux rayons X induisait un blocage de la réponse à la fluoxétine et l'imipramine (Santarelli et al. 2003). Des études ultérieures ont affiné cette observation, en précisant le caractère souche-dépendant (Holick et al. 2008) et test-dépendant de cette observation (David et al. 2009, Mendez-David et al. 2014). De façon générale, les différentes approches thérapeutiques à visée antidépressive ont des effets pro-neurogéniques dans de l'hippocampe, qu'elles soient pharmacologiques ((David et al. 2010, Miller and Hen 2015, Yun et al. 2016), pour revue), électro-stimulatrice (Schloesser et al. 2015), ou comportementale (Tanti and Belzung 2013).

Notre étude a montré qu'une altération de la réponse à la fluoxétine était liée à un dysfonctionnement de plusieurs étapes du processus neurogénique hippocampique. En effet, les animaux non-répondeurs présentent **une survie cellulaire et une maturation neuronale inférieures à celles des animaux répondeurs à un premier traitement antidépresseur (Figure 3, Article 2)**. Les animaux résistants, i.e., non répondeurs à 2 stratégies thérapeutiques antidépressives de classe pharmacologique différente présentent **une diminution de la prolifération, de la survie et de la maturation des neurones**, par rapport aux animaux répondeurs (**Figure 6, Article 2**).

La deuxième observation de notre étude est **l'index de maturation neuronale qui est supérieur chez les répondeurs par rapport aux non-répondeurs ou aux animaux résistants au traitement**. Ces données suggèrent une corrélation entre l'index de maturation et le niveau de réponse antidépressive. En cela, nos travaux confirment les observations réalisées dans le laboratoire montrant une corrélation entre cet index et la réponse comportementale dans le NSF, un test considéré comme neurogenèse-dépendant (David et al., 2009, Guilloux et al., 2013). Cette corrélation a pu être retrouvée ici entre les animaux répondeurs et non-répondeurs (**Figure 3, Article 2**).

L'arborisation dendritique a d'importantes implications fonctionnelles, dans l'intégration par le neurone des signaux provenant de différentes synapses et constitue un marqueur fiable de l'intégrité fonctionnelle et structurelle des neurones (Segev and London 2000) (Gulledge et al. 2005). En effet, la complexité de cette arborisation est bien corrélée avec la plasticité

synaptique neuronale. De nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques sont caractérisées par des anomalies de structure de l'arborisation dendritique (syndrome de Down et de Rett (Kaufmann and Moser 2000), la schizophrénie (Yun et al. 2016), et les maladies neurodégénératives (Anderton et al. 1998). Par ailleurs, des études précliniques ont montré qu'un stress prolongé pouvait entraîner une diminution de la complexité dendritique dans l'hippocampe (Wood et al. 2004, Chen et al. 2008)

Ces résultats indiquent que la réponse au traitement antidépresseur, en plus d'être liée à une stimulation des étapes de prolifération et de survie de la neurogenèse, est aussi associée à **une augmentation de la complexité dendritique**, et que la résistance au traitement pourrait être due à des altérations de l'arborisation dendritique. Notre séparation des animaux étant basée sur une analyse globale du comportement, nos résultats confirment qu'une élévation de la neurogenèse ne participe pas uniquement à une réponse antidépressive dans les tests neurogenèse-dépendants, mais participe probablement plus largement à la réponse antidépressive (Hill et al. 2015).

Bien que nous n'ayons pas directement vérifié cette hypothèse, il est plausible que ces différences de réponse neurogénique hippocampique puissent être responsables d'une **restauration différentielle des déficits cognitifs** observés après traitement chronique de corticostérone (Darcet et al. 2016). En effet, des études récentes ont montré que les jeunes neurones de 4 à 6 semaines participaient aux processus cognitifs (Sahay et al. 2011, Denny et al. 2014).

Cependant, si nos observations indiquent que la stimulation de la neurogenèse hippocampique adulte entraîne une réponse au traitement, ce n'est pas le seul mécanisme responsable de la réponse. En effet, chez des souris ayant subi une ablation de la neurogenèse, il est aussi possible d'induire une réponse avec des composés ciblant directement le circuit de réponse au stress (Surget et al. 2008). La stimulation de la neurogenèse hippocampique adulte serait une étape cruciale dans la réponse aux antidépresseurs, mais resterait **une voie indirecte par laquelle ces derniers exercent leur action**. Une étude a proposé que les nouveaux neurones formés après stimulation de la neurogenèse par un traitement chronique antidépresseur contribueraient **à rétablir la régulation du système HPA**, préalablement perturbé par l'état dépressif (Surget et al. 2008). Cette étude a montré que sans neurogenèse hippocampique, les médicaments monoaminergiques (fluoxétine et imipramine) ne peuvent restaurer la rétro-inhibition de l'axe HPA par l'hippocampe et corriger les altérations physiologiques et

comportementales induites par l'état anxio-dépressif. En revanche un effet antidépresseur pouvait être observé avec d'autres molécules qui ciblent directement l'axe HPA tels que des antagonistes des récepteurs CRF₁ (corticotropin-releasing factor 1) et V_{1b} (vasopressine 1b) (Surget et al. 2008). Ainsi, les antidépresseurs monoaminergiques stimuleraient la neurogenèse hippocampique, tandis que les antagonistes CRF₁ et V_{1b} agiraient directement sur l'axe HPA en restaurant des taux normaux de glucocorticoïdes (Figure 25). La stimulation de la neurogenèse hippocampique par les antidépresseurs monoaminergiques est par contre nécessaire à la réponse au traitement uniquement pour les patients dépressifs présentant un dérèglement de l'axe HPA (Surget et al. 2008).

L'application de ces résultats à notre étude reste à vérifier, i.e., est-ce que les phénomènes de réponse à un traitement antidépresseur s'accompagnent d'une régulation de l'axe HPA en comparaison des non-répondeurs ou résistants au traitement ?

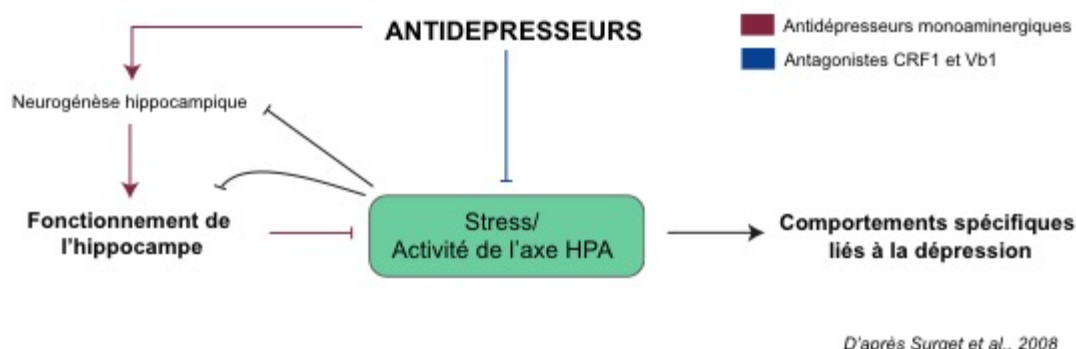


Figure 25 : La réponse aux antidépresseurs peut être ciblée par des mécanismes dépendants ou indépendants de la neurogenèse.

Le stress et une importante sollicitation de l'axe HPA induisent des changements de comportement spécifiques à la dépression ainsi qu'une diminution de la neurogenèse hippocampique. L'hippocampe participe à la régulation négative des réponses au stress par le biais de la neurogenèse. En revanche, cette action n'est pas directe, puisque l'administration de molécules ciblant directement l'axe HPA induit également une réponse comportementale. Flèches = activation, Barres = Inhibition. D'après (Surget et al. 2008)

L'administration chronique d'antidépresseur monoaminergique entraîne une cascade de signalisation induisant une augmentation de l'expression de BDNF, ce qui aura pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire hippocampique (Quesseveur et al. 2013), de la survie cellulaire (Quesseveur et al. 2013) de la complexité dendritique (Waterhouse et al. 2012). Cette stimulation de la neurogenèse hippocampique, par le biais des

neurones nouvellement formés permettrait ainsi une restauration de la régulation de l'axe HPA, en exerçant à nouveau un rétrocontrôle négatif sur cet axe (notre hypothèse est illustrée dans la Figure 26).

Bien que nous n'ayons pas encore élucidé l'association entre neurogenèse hippocampique et réponse au traitement et que les mécanismes de la non-réponse restent méconnus, notre observation selon laquelle une diminution de la neurogenèse hippocampique et de l'arborisation dendritique est observée chez les animaux non-répondeurs et résistants nous permet de proposer que d'éventuelles mutations d'éléments impliqués dans cette voie de réponse seraient impliquées dans la non-réponse. La littérature rassemble effectivement de nombreuses études qui associent ces mutations et la réponse au traitement. Une récente méta-analyse a par exemple montré que les patients porteurs hétérozygotes de l'allèle **Val66Met** du BDNF présentaient une meilleure réponse que les patients homozygotes (Zou et al. 2010) et que cette mutation Val66Met entraînait une résistance au traitement antidépresseur. D'autres études se sont penchées sur **le rôle du récepteur TrkB du BDNF** et ont rapporté que les souris mutées pour le gène codant pour TrkB sont insensibles à l'administration chronique d'antidépresseurs (cf (Lindholm and Castr  n 2014) pour revue). Les mécanismes directs de ces associations restent néanmoins à mettre en lumière. Notre modèle de TRD s'avérera très utile pour élucider ces mécanismes, puisqu'il nous permettra de comparer les profils d'expressions de gènes d'intérêt et participant à cette cascade entre les répondeurs et les non-répondeurs.

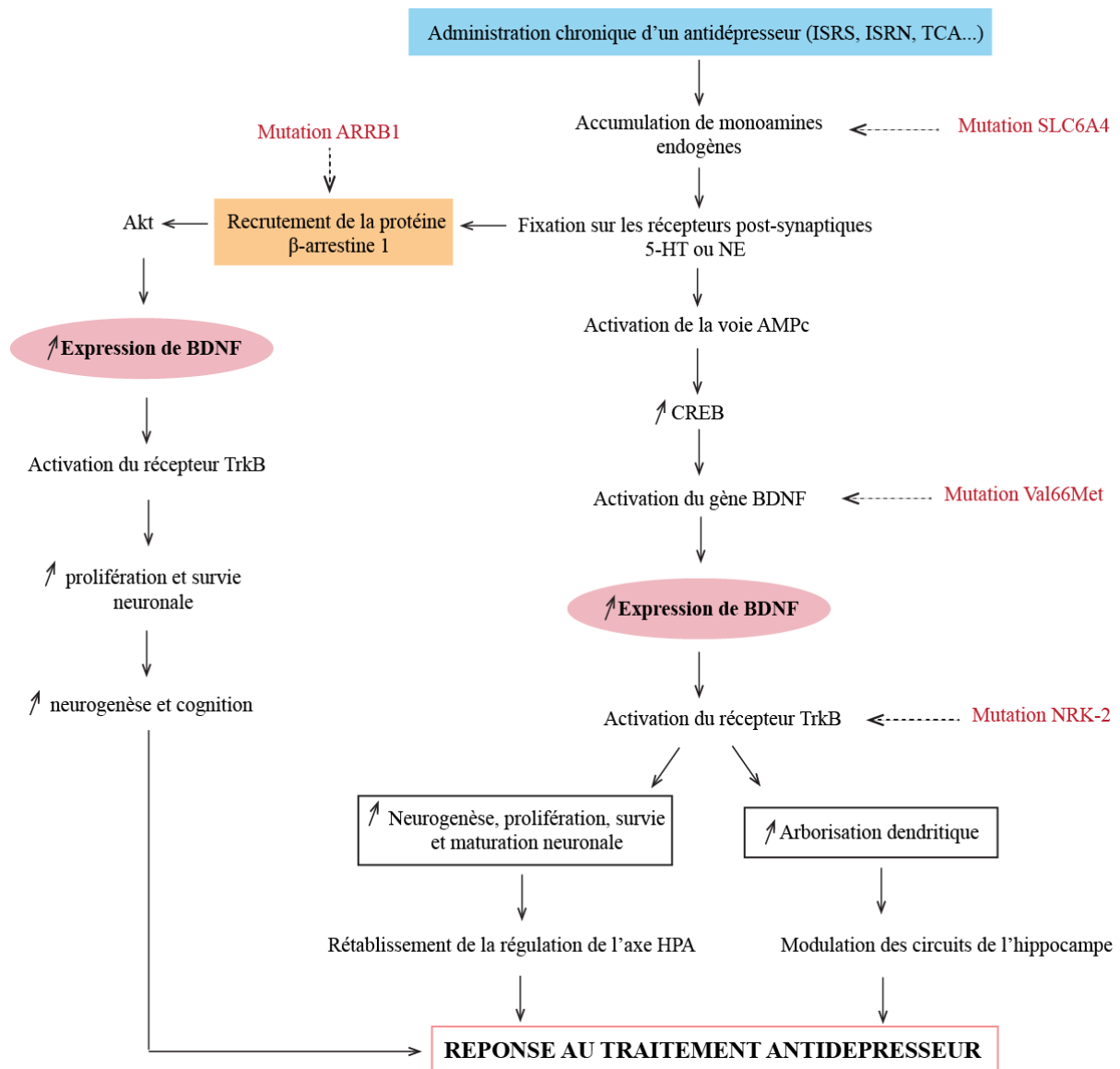


Figure 26 : Voie reliant une administration chronique d'un antidépresseur à la réponse au traitement.

Des mutations d'éléments impliqués dans cette voie pourraient potentiellement être associées à la non-réponse au traitement antidépresseur. Les mutations citées correspondent à quelques-unes des nombreuses mutations possibles d'éléments des voies menant à la réponse au traitement

6.4 La différence de réponse au traitement antidépresseur est associée à des variations d'expression périphérique de la protéine β-arrestine 1

La connaissance des mécanismes qui sous-tendent la dépression résistante aux antidépresseurs est primordiale pour la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques et le dépistage de cette pathologie. La mise en évidence d'une TRD se base sur l'évaluation clinique des patients à travers des échelles de dépression. Les méthodes d'imagerie cérébrale sont également utilisées pour cette évaluation (Mayberg et al. 2005) mais présentent plusieurs inconvénients : elles ne permettent pas d'obtenir des informations de biologie cellulaire et le

nombre de scanner par patient est limité. Ainsi, des marqueurs biologiques facilement quantifiables et variables en fonction de l'état clinique du patient permettraient d'optimiser la définition biologique de la TRD.

Les protéines β -arrestines ont une expression ubiquitaire, mais leur rôle dans différentes physiopathologies du SNC (maladie d'Alzheimer : (Liu et al. 2013) ou de Parkinson (Wu et al. 2013)) suggère qu'elles peuvent représenter une nouvelle cible thérapeutique potentielle (Latapy and Beaulieu 2013). En psychiatrie, une diminution d'expression périphérique de β -arrestine 1 a été observée chez les patients dépressifs (Avissar et al. 2004), et son utilisation comme biomarqueur de la réponse aux traitements antidépresseurs a été proposée (Avissar et al. 2004, Matuzany-Ruban et al. 2005). Des résultats précliniques de notre équipe suggèrent que ces variations d'expression de β -arrestine 1 en fonction de l'état anxio-dépressif et de la réponse antidépressive peuvent être observées dans le modèle CORT (Mendez-David et al. 2013). Ces mesures ont été réalisées dans les cellules mononuclées du sang périphérique (**PBMCs**). Les études transcriptomiques ont montré que les variations d'expressions géniques présentent une bonne corrélation avec les variations centrales de l'expression génique (Liew et al. 2006, Sullivan et al. 2006). De plus, il a été montré que ces cellules répondent aux stimuli internes et externes de manière similaire aux neurones du SNC en termes de profil d'expression de gènes et de modifications épigénétiques (Rao et al. 2013). La dépression étant une pathologie avec une composante neuro-immunologique, avec des relations entre l'axe HPA et les lymphocytes, cette population de cellules périphériques est affectée par l'état du patient, et reflèterait donc les variations dans le SNC (Gladkevich et al. 2004). Cette variation d'expression de β -arrestine 1 a également été retrouvée dans des modèles de cellules (Golan et al. 2009). Enfin, la délétion sélective de β -arrestine 1 dans les cellules granulaires de l'hippocampe bloque partiellement les effets antidépresseurs d'un traitement chronique de fluoxétine (Données non publiées, thèse de Flavie Darcet, 2016).

Nos travaux dans le modèle CORT confirment les résultats cliniques de l'équipe d'Avissar, montrant que l'expression périphérique de β -arrestine 1 est supérieure chez les souris répondeuses à un traitement antidépresseur par rapport aux souris résistantes (**Article 2, Figure 7**), suggérant la potentialité de biomarqueur de cette molécule.

L'intérêt de l'utilisation de l'expression de β -arrestine 1 dans les PBMCs comme biomarqueur de la réponse antidépressive sont les suivantes (

Tableau 14) :

- **Une facilité de collection** de l'échantillon par prélèvement sanguin, et une quantification peu onéreuse.
- **La robustesse des résultats obtenus** : les variations d'expression de β -arrestine 1 ont été préalablement décrites dans notre modèle d'anxiété-dépression (Mendez-David et al. 2013). De plus, l'analyse des résultats est facilement quantifiable.
- **Validité translationnelle** : mes résultats précliniques confirment les résultats observés en clinique par l'équipe d'Avissar.

En terme de sélectivité de réponse pharmacologique, les augmentations d'expression de β -arrestine 1 semblent restreintes aux molécules présentant un mécanisme d'action monoaminergique (Inhibiteur de recapture de sérotonine et/ou de noradrénaline), alors que le lithium, le valproate de sodium ou l'halopéridol sont sans effets (Golan et al. 2010). Les paramètres de **spécificité et de sensibilité** des taux de β -arrestine 1 étaient estimés supérieurs à 90% en clinique (Avissar et al. 2004). Cependant, ces différents paramètres n'ont pas pu être calculés dans notre cohorte de souris étant donné le faible nombre d'échantillons recueillis. Enfin, le caractère prédictif de ces variations d'expression de β -arrestine 1 périphérique quant à la réponse thérapeutique n'a pas pu être évaluée.

Caractéristique pour un biomarqueur idéal	Question dans le cadre d'un biomarqueur TRD ?	β -arrestine ?
Spécificité	La variation du biomarqueur est-elle spécifique à la TRD ?	NON
Sensibilité	Est-il facilement quantifiable ?	OUI
Prédictibilité	La variation du biomarqueur varie-t-elle en fonction de l'état pathologique et de la réponse au traitement ?	OUI
Robuste	Est-ce que l'analyse est simple, rapide et reproductible ?	OUI
Stable	Est-ce que la concentration varie au cours de la journée ?	A déterminer
Méthode non-invasive	Est-ce que l'échantillon est facilement collecté ?	OUI
Validité préclinique et clinique	Est-ce que les résultats sont obtenus sont validés chez l'animal et l'humain ?	OUI
Coût	Est-ce que la quantification est onéreuse ?	NON

Tableau 14 : Critères d'un biomarqueur de réponse au traitement antidépresseur

Tous les prélèvements ont été réalisés le matin, afin d'éviter une variation circadienne possible de l'expression de β -arrestine 1 périphérique. Cependant, si cette variation d'expression a été mise en évidence dans l'œil (Agarwal et al. 1994), aucune étude n'a été réalisée au niveau central ou périphérique chez la souris. Nous n'avons donc encore aucune idée sur la stabilité de la β -arrestine 1 en tant que biomarqueur.

Par ailleurs, si l'évaluation des taux de β -arrestine 1 périphérique peut-être un moyen biologique de confirmation de la pathologie dépressive et de la réponse au traitement, aucune étude n'a montré si les variations de ce biomarqueur pouvaient être observées dans d'autres pathologies psychiatriques. De plus, l'hétérogénéité de la population dépressive du fait de sa définition catégorielle par le DSM-5 ou le CIM10, suggère des mécanismes qui peuvent être pluri-factoriels. Partant de cette observation, il est aisé de comprendre que **définir un biomarqueur spécifique de la pathologie s'avère probablement utopique**. L'une des alternatives qui a été proposée est de remplacer l'idée d'un biomarqueur unique par le concept de **biosignature**, qui inclurait un ensemble de paramètres, tels que des polymorphismes génétiques, des niveaux d'expression de protéines ou d'ARNm, des paramètres physiologiques (axe HPA), des données d'imagerie cérébrale liés au phénotype de la dépression. Dans le contexte de maladies polygéniques avec un phénotype hautement variable comme la dépression, la combinaison de plusieurs biomarqueurs spécifiques, est considérée comme une l'alternative au manque de spécificité d'un seul biomarqueur. En effet, une étude

récente a montré que l'utilisation d'un panel de biomarqueurs combinés en un « MDD score » permettait d'élever la sensibilité à 90% et la spécificité à plus de 80%. (Papakostas et al. 2013). Le projet « *Establishing Moderators and Biosignatures of Antidepressant Response for Clinical care for Depression* » (EMBARC), conduit par Trivedi (Trivedi et al. 2016) est à ce jour l'initiative la plus ambitieuse allant dans le sens du développement de biosignatures, avec le recueil chez 400 patients de données d'IRM structurelle et fonctionnelle ainsi que d'échantillons biologiques (ADN, ARN et plasma) avant et pendant le cours du traitement antidépresseur.

D'autre part, la recherche s'est concentrée sur la recherche de phénotypes intermédiaires (Leuchter et al. 2014). L'usage de phénotypes intermédiaires permet de répartir la population hétérogène de patients dépressifs dans des sous-groupes plus homogènes, avec des caractéristiques physiologiques similaires et qui pourraient répondre ainsi sans doute de manière similaire au traitement. Les mesures recueillies dans ces sous-groupes serviront de base de données pour l'identification de potentiels biomarqueurs, ce qui permettrait ainsi d'associer ces biomarqueurs à chaque sous-groupe et d'orienter la sélection du traitement. L'initiative de l'institut national de la santé mentale (NIMH) sur *Research Domain Criteria* (RDoc) va dans ce sens, et est une tentative pour identifier les phénotypes intermédiaires utiles pour une meilleure homogénéité diagnostique des patients psychiatriques en prenant en compte tous les aspects de la maladie du versant génétique à celui du phénotype clinique (Leuchter et al. 2014).

Dans une certaine mesure, ce concept peut être transposé dans des études précliniques. En effet, de manière générale, on parle de modèle d'anxiété-dépression, en incluant dans cette catégorie tous les animaux présentant un phénotype de type anxio-dépressif. Néanmoins, certains paramètres génomiques, protéomiques et phénotypiques diffèrent selon les modèles considérés. En réalisant les études de biomarqueurs sans prendre en compte les caractéristiques du modèle, et en transposant les résultats directement dans la population hétérogène de patients dépressifs, le risque est d'obtenir des biomarqueurs peu robustes et peu fiables. Une solution que nous pourrions envisager pour pallier à ce problème est d'avoir à disposition pour chaque phénotype intermédiaire un modèle préclinique approprié. Ceci implique une étude approfondie de chaque modèle pour acquérir le maximum d'informations sur les paramètres cognitifs, comportementaux, d'imagerie, concernant l'axe HPA etc... A l'heure actuelle, nous sommes encore loin de cet objectif, puisque d'une part, tous les phénotypes intermédiaires ne sont pas identifiés, et d'autre part il paraît assez compliqué de

transposer dans un modèle animal la complexité de chaque phénotype intermédiaire. Néanmoins, nous pouvons dès à présent envisager d'associer certains modèles avec un sous-groupe de patients dépressifs. Par exemple, certains patients dépressifs présentent une dérégulation de l'axe HPA, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres. Pour étudier ce sous-groupe de patients, il faudrait par conséquent choisir un modèle animal présentant également une dérégulation de l'axe HPA, ce que nous avons pu faire avec le modèle CORT. Autre exemple, pour les patients résistants présentant un polymorphisme du récepteur 5-HT_{1A}, les souris 5-HT_{1A} KO pourraient sans doute représenter le modèle le plus approprié.

7 Perspectives

Ce travail nous a permis de développer un modèle de résistance chez les souris mâles de fond génétique C57. Ce modèle présente plusieurs atouts par rapport aux modèles préclinique de TRD existants et nous a permis d'identifier un potentiel biomarqueur de réponse, la protéine β -arrestine 1. Néanmoins, plusieurs questions restent en suspens et nous pouvons proposer plusieurs travaux qui viendront compléter et confirmer nos résultats.

En ce qui concerne la modélisation de la résistance chez les animaux :

- **Chez les femelles**, nous nous sommes malheureusement heurté à un échec de la modélisation de la dépression, et nous avons dû laisser de côté cette partie de l'étude. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné à plusieurs occurrences dans cette thèse, les femmes représentent la population la plus affectée par cette pathologie, et le dimorphisme sexuel de la dépression a clairement été démontré. Dans la majorité des cas, les expérimentations incluent uniquement des rongeurs mâles dans les protocoles, et les données obtenues chez les animaux mâles sont ensuite généralisés aux animaux femelles, engendrant ainsi un biais important dans les études. Inclure des femelles dans les études de modélisation reste une nécessité. Le modèle CORT, pour toutes les raisons évoquées ci-dessus n'est sans doute pas le plus pertinent, mais on peut envisager de reproduire cette étude avec un autre modèle d'anxiété-dépression. Plusieurs observations indiquent que les femelles sont sensibles aux stress sociaux et à l'isolation sociale (Haller et al. 1999 , Palanza 2001) et que les séparer les unes des autres semble produire des changements comportementaux similaires à certains symptômes de la dépression, comme la diminution de l'exploration et l'augmentation de l'anxiété. Cependant au laboratoire, nous avons observé un faible effet de l'isolation sur *l'emotionality score*. Les modèles génétiques, malgré toutes les limites évoquées plus haut, peuvent donc être la meilleure alternative chez les femelles pour ce type d'étude.
- **Chez les mâles**, nous avons modélisé la résistance aux antidépresseurs et plusieurs perspectives peuvent être envisagées afin d'améliorer ce modèle. (Tableau 16)

- Comme proposé dans la discussion, nous pourrions évaluer le comportement des animaux avec la cage Noldus Phenotyper® afin **de limiter la répétition des tests de comportement**.
- Il serait également intéressant d'élargir le panel d'antidépresseurs testé afin de mieux caractériser ce modèle de résistance aux antidépresseurs.
- Afin de valider le modèle, nous devons encore tester des molécules connues pour leur efficacité chez les patients résistants, comme **la kétamine** par exemple, pour évaluer leurs effets dans ce modèle de résistance.
- **Des tests de cognition** ont été développés et validés au laboratoire chez les C57BL/6J dans le modèle CORT (Darcet et al. 2014). Il serait extrêmement intéressant de tester l'état cognitif des souris résistantes et de le comparer à celui des souris répondeuses, afin d'observer si les altérations de comportement et de neurogenèse observées sont associées à une altération de la cognition. Ceci nous permettrait d'approfondir l'étude et la compréhension des mécanismes de la résistance au traitement antidépresseur.

Enfin, des perspectives concernant l'investigation de biomarqueurs sont également envisageables. Nous avons identifié **β -arrestine 1** comme un potentiel biomarqueur de la résistance mais des travaux sont encore nécessaires pour totalement valider cette molécule en tant que biomarqueur.

- Etant donné que les tissus humains sont difficilement accessibles pour les études de génomique et protéomique, le sang est souvent utilisé en tant que substitut d'échantillons cérébraux, l'hypothèse étant que l'expression des gènes dans le sang serait le reflet de celle des tissus cérébraux. Cependant, il n'existe pas de consensus clair au sujet de l'utilisation du sang pour l'étude de l'expression de gènes ou de protéines dans les pathologies neurologiques. Une étude de *microarray* a comparé l'expression de gènes entre le sang, l'hippocampe et le cortex préfrontal de rats à l'état basal afin de répondre à cette question (Witt et al. 2013). Elle a montré que pour certains gènes, il y avait une co-expression entre les structures cérébrales et les PBMCs du sang, alors que ce n'était pas le cas pour d'autres gènes. Une autre étude se basant sur des résultats obtenus dans des échantillons de cerveau post-mortem et PBMCs chez l'humain et le Rat a montré que 4013 sur 17859 analysés sont co-exprimés dans le cerveau et les PBMCs, soit environ 22% du transcriptome (Rollins et

al. 2010). Ces résultats sont importants à prendre à compte, car cela signifie que pour la majorité des gènes étudiés, l'expression dans le sang et dans le cerveau est différente, et que le dosage de biomarqueurs à la périphérie ne reflète pas forcément les variations d'expression au niveau central. Notre travail nécessite donc **d'évaluer l'expression de β -arrestine 1 au niveau central**, dans les différentes structures cérébrales (hippocampe, cortex, amygdale). Nous disposons des échantillons cérébraux des animaux ayant servis pour mes travaux de thèse (analyse en cours).

- Notre étude, comme la majorité des études concernant la recherche de biomarqueurs de réponse/non-réponse à un traitement antidépresseur est une étude *post-hoc*, puisque nous avons quantifié la β -arrestine 1 après l'administration du traitement antidépresseur, au moment où nous avons catégorisé les animaux en répondeurs ou non-répondeurs. Afin de déterminer si la quantité de β -arrestine 1 est prédictive de la réponse, il faudrait réaliser la quantification en amont du traitement, et évaluer à la fin de l'étude si les animaux qui présentaient un faible taux de β -arrestine 1 circulante initiale se sont avérés être non-répondeurs.
- Comme mentionné précédemment, les variations de la protéine β -arrestine 1 ne sont pas suffisantes pour constituer un biomarqueur. Cette protéine nécessite d'être incluse dans un panel de biomarqueurs, pour constituer une **biosignature de la résistance au traitement**. La suite de ce projet consiste donc à doser d'autres molécules impliquées dans les mécanismes de la dépression. Plusieurs molécules peuvent susciter l'intérêt :
 - Voie du BDNF : pro-BDNF, BDNF mature et récepteur du BDNF Trk-B (Nibuya et al. 1995)
 - Cascade de signalisation de la β -arrestine : Akt et phospho-Akt, GSK3 et phospho-GSK3 (Kaidanovich-Beilin et al. 2004, Li and Jope 2010)
- Enfin, notre projet s'inscrit dans le cadre d'un projet ANR translationnel incluant une partie préclinique et une partie clinique. L'objectif de **ce projet translationnel** est d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des ISRS et des ISRN, de proposer de nouveaux traitements efficaces pour la TRD et d'améliorer la prise en charge des patients dépressifs via l'identification de biomarqueurs prédictifs de la non-réponse et de la résistance. Le projet se focalise notamment sur la voie de signalisation

de la β -arrestine. Une cohorte de patients résistants, **la cohorte METADAP** incluant 600 patients dépressifs est à notre disposition. Cette cohorte comprend des patients qui n'ont soit reçu aucun traitement pendant les 2 années précédant l'inclusion soit des patients traités par citalopram, escitalopram ou venlafaxine. La réponse ou l'absence de réponse a été évaluée chez ces patients afin de constituer 2 groupes (60 répondeurs et 130 non-répondeurs). Pour chaque patient, une banque d'ADN, de plasma et de sérum est disponible. Une fois le panel de biomarqueurs validé dans notre modèle CORT, il pourra être ensuite testé sur cette cohorte. L'objectif est d'une part d'étudier les variations de β -arrestine chez les souris et d'autre part d'étudier l'impact de ces variations sur les effets des antidépresseurs sur les patients dépressifs. L'approche de ce projet est globale puisqu'elle comporte une étude d'expression de gènes, une étude de biomarqueurs au niveau central et périphérique, et de l'imagerie cérébrale. L'étude se fait ainsi à plusieurs niveaux (Tableau 15) :

	Préclinique	Clinique
Au niveau génétique	Evaluation de la réponse chez des animaux génétiquement modifiés mutés pour les éléments appartenant à appartenant à la voie de signalisation de β -arrestine	Evaluation des polymorphismes d'éléments appartenant à la voie de signalisation de β -arrestine
Au niveau moléculaire	Etude de l'expression et de l'activité des éléments appartenant à la voie de signalisation de β -arrestine au niveau périphérique (PBMCs) et cérébral (hippocampe)	Etude de l'expression et de l'activité des éléments appartenant à appartenant à la voie de signalisation de β -arrestine au niveau périphérique (PBMCs)
Au niveau cellulaire	Evaluation de la neurogenèse dans l'hippocampe	—
Au niveau cérébral	—	Evaluation du volume de l'hippocampe et des anomalies de morphologie associées à la non-réponse/résistance aux traitements antidépresseurs
Au niveau comportemental	Evaluation comportementale et cognitive	—

Tableau 15 : Différentes tâches du projet translationnel ANR en préclinique et en clinique

		Répondeurs	Non-répondeurs	Résistants
Emotionality score		↓	↑	↑↑
Neurogénèse hippocampique	Prolifération	↑	↓	↓
	Survie	↑↑	↓	↓↓
	Maturation	↑↑	↓	↓
β-arrestine 1	Périphérique	↑↑	ND	↓
BDNF	Central	A déterminer dans des études ultérieures		
	Périphérique			
Axe HPA				
Dosage corticostérone				
Etat cognitif				
β-arrestine dans la cohorte METADAP				

Tableau 16 : Paramètres caractérisant les répondeurs et résistants.

Les variations sont exprimées en prenant le groupe CORT comme référence

La stratégie de recherche pour la découverte de biomarqueurs proposée est résumée par la figure suivante (Figure 27). Elle commence par les problématiques cliniques de diagnostic et de prescription rencontrés par les praticiens au quotidien. Des modèles animaux d'anxiété-dépression appropriés sont dans un premier temps utilisés pour tenter de répondre à ces problématiques. Cette démarche permet ainsi d'identifier de potentiels candidats biomarqueurs prédisant la réponse au traitement dans le modèle animal. Afin de consolider la robustesse de ces biomarqueurs, de multiples techniques doivent être utilisées : *microarray*, qPCR, western blot, immunohistochimie, imagerie cérébrale... Des approches *in vitro*, avec transfection dans des cultures cellulaires du gène d'intérêt humain peuvent également être envisagées. Les données animales sont par la suite intégrées avec des données obtenues chez des patients pour générer des candidats robustes et des investigations plus poussées vont venir analyser la capacité du candidat à prédire la réponse au traitement. Pour optimiser cette translation de la préclinique à la clinique, il est important de privilégier des approches méthodologiques qui peuvent réalisées à la fois chez l'Homme et chez l'animal. Par exemple le dosage dans les PBMCs chez les animaux naïfs vs patients sains et dans le modèle d'anxiété-dépression vs patient dépressif, le

dosage sanguin de l'antidépresseur, le test CRH/DEX ou encore l'imagerie cérébrale (encore en cours de mise au point chez l'animal).

L'étape suivante va consister à développer **un kit de diagnostic** basé sur l'évaluation quantitative du taux de protéine ou d'expression de gènes dans le sang du patient avant ou dès la mise en place du traitement. Les résultats de ce test prédiront si le traitement serait efficace chez le patient, et aideront le praticien dans sa stratégie thérapeutique.

Si nous transposons cette stratégie à notre étude, nous en sommes à l'étape 3, l'identification de potentiels candidats.

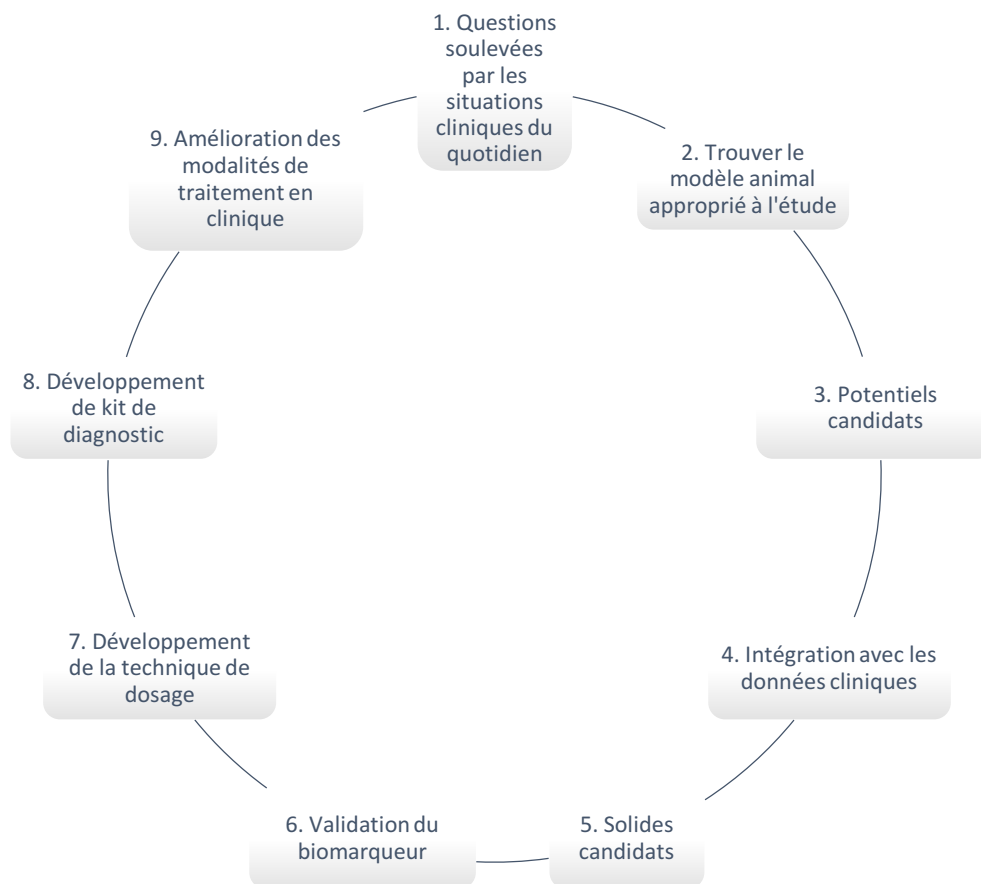


Figure 27 : Approche translationnelle pour la découverte de biosignatures prédictives de la réponse au traitement antidépresseur.

REFERENCES

8 Références

- aan het Rot, M., K. A. Collins, J. W. Murrough, A. M. Perez, D. L. Reich, D. S. Charney and S. J. Mathew (2010). "Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression." Biol Psychiatry **67**(2): 139-145.
- Abraham, G., R. Milev and J. Stuart Lawson (2006). "T3 augmentation of SSRI resistant depression." J Affect Disord **91**(2-3): 211-215.
- Adachi, M., M. Barrot, A. E. Autry, D. Theobald and L. M. Monteggia (2008). "Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy." Biol Psychiatry **63**(7): 642-649.
- Adli, M., M. Pilhatsch, M. Bauer, U. Koberle, R. Ricken, G. Janssen, S. Ulrich and T. Bschor (2008). "Safety of high-intensity treatment with the irreversible monoamine oxidase inhibitor tranylcypromine in patients with treatment-resistant depression." Pharmacopsychiatry **41**(6): 252-257.
- Agarwal, N., I. Nir and D. S. Papermaster (1994). "Loss of diurnal arrestin gene expression in rds mutant mouse retinas." Exp Eye Res **58**(1): 1-8.
- Ago, Y., S. Arikawa, M. Yata, K. Yano, M. Abe, K. Takuma and T. Matsuda (2008). "Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression." Neuropharmacology **55**(8): 1355-1363.
- Akiskal, H. S., D. King, T. L. Rosenthal, D. Robinson and A. Scott-Strauss (1981). "Chronic depressions. Part 1. Clinical and familial characteristics in 137 probands." J Affect Disord **3**(3): 297-315.
- Aklillu, E., S. Karlsson, O. O. Zachrisson, V. Ozdemir and H. Agren (2009). "Association of MAOA gene functional promoter polymorphism with CSF dopamine turnover and atypical depression." Pharmacogenet Genomics **19**(4): 267-275.
- Alam, F., S. Nayyar, W. Richie, A. Archibong and T. Nayyar (2015). "Beta-Arrestin1 Levels in Mononuclear Leukocytes Support Depression Scores for Women with Premenstrual Dysphoric Disorder." Int J Environ Res Public Health **13**(1).
- Almeida, J. R., A. Versace, A. Mechelli, S. Hassel, K. Quevedo, D. J. Kupfer and M. L. Phillips (2009). "Abnormal amygdala-prefrontal effective connectivity to happy faces differentiates bipolar from major depression." Biol Psychiatry **66**(5): 451-459.
- American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. Washington, D.C., American Psychiatric Association.
- Anderton, B. H., L. Callahan, P. Coleman, P. Davies, D. Flood, G. A. Jicha, T. Ohm and C. Weaver (1998). "Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes." Prog Neurobiol **55**(6): 595-609.
- Angoa-Perez, M., M. J. Kane, D. I. Briggs, N. Herrera-Mundo, C. E. Sykes, D. M. Francescutti and D. M. Kuhn (2014). "Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype." ACS Chem Neurosci **5**(10): 908-919.

- Angst, J., A. Gamma, M. Gastpar, J. P. Lepine, J. Mendlewicz, A. Tylee and S. Depression Research in European Society (2002). "Gender differences in depression. Epidemiological findings from the European DEPRES I and II studies." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **252**(5): 201-209.
- Anttila, S., K. Huuhka, M. Huuhka, R. Rontu, M. Hurme, E. Leinonen and T. Lehtimäki (2007). "Interaction between 5-HT1A and BDNF genotypes increases the risk of treatment-resistant depression." J Neural Transm (Vienna) **114**(8): 1065-1068.
- Aoki, M., M. Shimozuru, T. Kikusui, Y. Takeuchi and Y. Mori (2010). "Sex differences in behavioral and corticosterone responses to mild stressors in ICR mice are altered by ovariectomy in peripubertal period." Zoolog Sci **27**(10): 783-789.
- Ardayfio, P. and K. S. Kim (2006). "Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice." Behav Neurosci **120**(2): 249-256.
- Aronson, R., H. J. Offman, R. T. Joffe and C. D. Naylor (1996). "Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis." Arch Gen Psychiatry **53**(9): 842-848.
- Austin, M. C., J. E. Janosky and H. A. Murphy (2003). "Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men." Mol Psychiatry **8**(3): 324-332.
- Avissar, S., A. Matuzany-Ruban, K. Tzukert and G. Schreiber (2004). "Beta-arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain." Am J Psychiatry **161**(11): 2066-2072.
- Bacq, A., L. Balasse, G. Biala, B. Guiard, A. M. Gardier, A. Schinkel, F. Louis, V. Vialou, M. P. Martres, C. Chevarin, M. Hamon, B. Giros and S. Gautron (2012). "Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response." Mol Psychiatry **17**(9): 926-939.
- Baker, M. (2005). "In biomarkers we trust?" Nat Biotechnol **23**(3): 297-304.
- Bale, T. L. and C. N. Epperson (2017). "Sex as a Biological Variable: Who, What, When, Why, and How." Neuropsychopharmacology **42**(2): 386-396.
- Ballesteros, J. and L. F. Callado (2004). "Effectiveness of pindolol plus serotonin uptake inhibitors in depression: a meta-analysis of early and late outcomes from randomised controlled trials." J Affect Disord **79**(1-3): 137-147.
- Barowsky, J. and T. L. Schwartz (2006). "An Evidence-Based Approach to Augmentation and Combination Strategies for: Treatment-Resistant Depression." Psychiatry (Edgmont) **3**(7): 42-61.
- Bath, K. G., D. Q. Jing, I. Dincheva, C. C. Neeb, S. S. Pattwell, M. V. Chao, F. S. Lee and I. Ninan (2012). "BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity." Neuropsychopharmacology **37**(5): 1297-1304.
- Bauer, M. (2007). "Updated WFSBP Guidelines for the Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders in Primary Care." World J Biol Psychiatry **8**(2): 66.
- Bauer, M. and S. Dopfmer (1999). "Lithium augmentation in treatment-resistant depression: meta-analysis of placebo-controlled studies." J Clin Psychopharmacol **19**(5): 427-434.

- Bauer, M., H. W. Pretorius, E. L. Constant, W. R. Earley, J. Szamosi and M. Brecher (2009). "Extended-release quetiapine as adjunct to an antidepressant in patients with major depressive disorder: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind study." *J Clin Psychiatry* **70**(4): 540-549.
- Bauer, M. E., A. Papadopoulos, L. Poon, P. Perks, S. L. Lightman, S. Checkley and N. Shanks (2002). "Dexamethasone-induced effects on lymphocyte distribution and expression of adhesion molecules in treatment-resistant depression." *Psychiatry Res* **113**(1-2): 1-15.
- Baumann, P., R. Nil, A. Souche, S. Montaldi, D. Baettig, S. Lambert, C. Uehlinger, A. Kasas, M. Amey and M. Jonzier-Perey (1996). "A double-blind, placebo-controlled study of citalopram with and without lithium in the treatment of therapy-resistant depressive patients: a clinical, pharmacokinetic, and pharmacogenetic investigation." *J Clin Psychopharmacol* **16**(4): 307-314.
- Beaulieu, J. M., S. Marion, R. M. Rodriguiz, I. O. Medvedev, T. D. Sotnikova, V. Ghisi, W. C. Wetsel, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2008). "A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior." *Cell* **132**(1): 125-136.
- Becking, K., L. Boschloo, N. Vogelzangs, B. C. Haarman, R. Riemersma-van der Lek, B. W. Penninx and R. A. Schoevers (2013). "The association between immune activation and manic symptoms in patients with a depressive disorder." *Transl Psychiatry* **3**: e314.
- Belujon, P. and A. A. Grace (2014). "Restoring mood balance in depression: ketamine reverses deficit in dopamine-dependent synaptic plasticity." *Biol Psychiatry* **76**(12): 927-936.
- Belzeaux, R., C. Formisano-Treziny, A. Loundou, L. Boyer, J. Gabert, J. C. Samuelian, F. Feron, J. Naudin and E. C. Ibrahim (2010). "Clinical variations modulate patterns of gene expression and define blood biomarkers in major depression." *J Psychiatr Res* **44**(16): 1205-1213.
- Bergstrom, A., M. N. Jayatissa, T. Thykjaer and O. Wiborg (2007). "Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study." *J Mol Neurosci* **33**(2): 201-215.
- Berlim, M. T. and G. Turecki (2007). "Definition, assessment, and staging of treatment-resistant refractory major depression: a review of current concepts and methods." *Can J Psychiatry* **52**(1): 46-54.
- Berman, R. M., A. M. Darnell, H. L. Miller, A. Anand and D. S. Charney (1997). "Effect of pindolol in hastening response to fluoxetine in the treatment of major depression: a double-blind, placebo-controlled trial." *Am J Psychiatry* **154**(1): 37-43.
- Berman, R. M., M. Narasimhan and D. S. Charney (1997). "Treatment-refractory depression: definitions and characteristics." *Depress Anxiety* **5**(4): 154-164.
- Bernard, R., I. A. Kerman, R. C. Thompson, E. G. Jones, W. E. Bunney, J. D. Barchas, A. F. Schatzberg, R. M. Myers, H. Akil and S. J. Watson (2011). "Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression." *Mol Psychiatry* **16**(6): 634-646.
- Biernacka, J. M., K. Sangkuhl, G. Jenkins, R. M. Whaley, P. Barman, A. Batzler, R. B. Altman, V. Arolt, J. Brockmoller, C. H. Chen, K. Domschke, D. K. Hall-Flavin, C. J. Hong, A. Illi, Y. Ji, O. Kampman, T. Kinoshita, E. Leinonen, Y. J. Liou, T. Mushiroda, S. Nonen, M. K. Skime, L. Wang, B. T. Baune, M. Kato, Y. L. Liu, V. Praphanphoj, J. C. Stingl, S. J. Tsai, M. Kubo, T. E. Klein and R. Weinshilboum (2016). "The

- International SSRI Pharmacogenomics Consortium (ISPC): a genome-wide association study of antidepressant treatment response." Transl Psychiatry **6**(11): e937.
- Bierut, L. J., A. C. Heath, K. K. Bucholz, S. H. Dinwiddie, P. A. Madden, D. J. Statham, M. P. Dunne and N. G. Martin (1999). "Major depressive disorder in a community-based twin sample: are there different genetic and environmental contributions for men and women?" Arch Gen Psychiatry **56**(6): 557-563.
- Biomarkers Definitions Working, G. (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 89-95.
- Bisgaard, C. F., M. N. Jayatissa, J. J. Enghild, C. Sanchez, R. Artemychyn and O. Wiborg (2007). "Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression." J Mol Neurosci **32**(2): 132-144.
- Blanchard, D. C., J. K. Shepherd, A. De Padua Carobrez and R. J. Blanchard (1991). "Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions." Neurosci Biobehav Rev **15**(4): 461-468.
- Bocchio-Chiavetto, L., R. Zanardini, M. Bortolomasi, M. Abate, M. Segala, M. Giacomuzzi, M. A. Riva, E. Marchina, P. Pasqualetti, J. Perez and M. Gennarelli (2006). "Electroconvulsive Therapy (ECT) increases serum Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in drug resistant depressed patients." Eur Neuropsychopharmacol **16**(8): 620-624.
- Bodkin, J. A., R. A. Lasser, J. D. Wines, Jr., D. M. Gardner and R. J. Baldessarini (1997). "Combining serotonin reuptake inhibitors and bupropion in partial responders to antidepressant monotherapy." J Clin Psychiatry **58**(4): 137-145.
- Boldrini, M., A. N. Santiago, R. Hen, A. J. Dwork, G. B. Rosoklija, H. Tamir, V. Arango and J. John Mann (2013). "Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression." Neuropsychopharmacology **38**(6): 1068-1077.
- Branchi, I., S. Santarelli, S. Capoccia, S. Poggini, I. D'Andrea, F. Cirulli and E. Alleva (2013). "Antidepressant treatment outcome depends on the quality of the living environment: a pre-clinical investigation in mice." PLoS One **8**(4): e62226.
- Brown, W. A. and W. Harrison (1992). "Are patients who are intolerant to one SSRI intolerant to another?" Psychopharmacol Bull **28**(3): 253-256.
- Brunoni, A. R., M. Lopes and F. Fregni (2008). "A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression." Int J Neuropsychopharmacol **11**(8): 1169-1180.
- Bschor, T. and M. Adli (2008). "Treatment of depressive disorders." Dtsch Arztebl Int **105**(45): 782-792.
- Bschor, T. and C. Baethge (2010). "No evidence for switching the antidepressant: systematic review and meta-analysis of RCTs of a common therapeutic strategy." Acta Psychiatr Scand **121**(3): 174-179.
- Bschor, T., M. Bauer and M. Adli (2014). "Chronic and treatment resistant depression: diagnosis and stepwise therapy." Dtsch Arztebl Int **111**(45): 766-775; quiz 775.

- Buwalda, B., M. H. Kole, A. H. Veenema, M. Huininga, S. F. de Boer, S. M. Korte and J. M. Koolhaas (2005). "Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning." Neurosci Biobehav Rev **29**(1): 83-97.
- Caldarone, B. J., V. Zachariou and S. L. King (2015). "Rodent models of treatment-resistant depression." Eur J Pharmacol **753**: 51-65.
- Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." J Comp Neurol **435**(4): 406-417.
- Carpenter, L. L., S. Yasmin and L. H. Price (2002). "A double-blind, placebo-controlled study of antidepressant augmentation with mirtazapine." Biol Psychiatry **51**(2): 183-188.
- Carroll, B. J., F. Cassidy, D. Naftolowitz, N. E. Tatham, W. H. Wilson, A. Iranmanesh, P. Y. Liu and J. D. Veldhuis (2007). "Pathophysiology of hypercortisolism in depression." Acta Psychiatr Scand Suppl(433): 90-103.
- Carvalho, A. F., M. Berk, T. N. Hyphantis and R. S. McIntyre (2014). "The integrative management of treatment-resistant depression: a comprehensive review and perspectives." Psychother Psychosom **83**(2): 70-88.
- Carvalho, A. F., J. L. Cavalcante, M. S. Castelo and M. C. Lima (2007). "Augmentation strategies for treatment-resistant depression: a literature review." J Clin Pharm Ther **32**(5): 415-428.
- Carvalho, L. A., J. P. Torre, A. S. Papadopoulos, L. Poon, M. F. Juruena, K. Markopoulou, A. J. Cleare and C. M. Pariante (2013). "Lack of clinical therapeutic benefit of antidepressants is associated overall activation of the inflammatory system." J Affect Disord **148**(1): 136-140.
- Cattaneo, A., M. Gennarelli, R. Uher, G. Breen, A. Farmer, K. J. Aitchison, I. W. Craig, C. Anacker, P. A. Zunsztain, P. McGuffin and C. M. Pariante (2013). "Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'." Neuropsychopharmacology **38**(3): 377-385.
- Cattoretti, G., M. H. Becker, G. Key, M. Duchrow, C. Schluter, J. Galle and J. Gerdes (1992). "Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections." J Pathol **168**(4): 357-363.
- Cervo, L., A. Canetta, E. Calcagno, S. Burbassi, G. Sacchetti, S. Caccia, C. Fracasso, D. Albani, G. Forloni and R. W. Invernizzi (2005). "Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression." J Neurosci **25**(36): 8165-8172.
- Chang, H. S., E. S. Won, H. Y. Lee, B. J. Ham, Y. G. Kim and M. S. Lee (2015). "Association of ARRB1 polymorphisms with the risk of major depressive disorder and with treatment response to mirtazapine." J Psychopharmacol **29**(5): 615-622.
- Chen, B., D. Dowlathshahi, G. M. MacQueen, J. F. Wang and L. T. Young (2001). "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication." Biol Psychiatry **50**(4): 260-265.
- Chen, Y., C. M. Dube, C. J. Rice and T. Z. Baram (2008). "Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone." J Neurosci **28**(11): 2903-2911.

- Chen, Z. Y., D. Jing, K. G. Bath, A. Ieraci, T. Khan, C. J. Siao, D. G. Herrera, M. Toth, C. Yang, B. S. McEwen, B. L. Hempstead and F. S. Lee (2006). "Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior." Science **314**(5796): 140-143.
- Chourbaji, S., C. Zacher, C. Sanchis-Segura, C. Dormann, B. Vollmayr and P. Gass (2005). "Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 70-78.
- Christensen, T., C. F. Bisgaard and O. Wiborg (2011). "Biomarkers of anhedonic-like behavior, antidepressant drug refractoriness, and stress resilience in a rat model of depression." Neuroscience **196**: 66-79.
- Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1992). "The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis." JAMA **267**(9): 1244-1252.
- Colle, R., E. Deflesselle, S. Martin, D. J. David, P. Hardy, A. Taranu, B. Falissard, C. Verstyft and E. Corruble (2015). "BDNF/TRKB/P75NTR polymorphisms and their consequences on antidepressant efficacy in depressed patients." Pharmacogenomics **16**(9): 997-1013.
- Connolly, K. R. and M. E. Thase (2011). "If at first you don't succeed: a review of the evidence for antidepressant augmentation, combination and switching strategies." Drugs **71**(1): 43-64.
- Coryell, W. (2007). "The facets of melancholia." Acta Psychiatr Scand Suppl(433): 31-36.
- Couillard-Despres, S., B. Winner, S. Schaubeck, R. Aigner, M. Vroemen, N. Weidner, U. Bogdahn, J. Winkler, H. G. Kuhn and L. Aigner (2005). "Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis." Eur J Neurosci **21**(1): 1-14.
- Coupland, C., P. Dhiman, R. Morriss, A. Arthur, G. Barton and J. Hippisley-Cox (2011). "Antidepressant use and risk of adverse outcomes in older people: population based cohort study." BMJ **343**: d4551.
- Courousse, T., A. Bacq, C. Belzung, B. Guiard, L. Balasse, F. Louis, A. M. Le Guisquet, A. M. Gardier, A. H. Schinkel, B. Giros and S. Gautron (2015). "Brain organic cation transporter 2 controls response and vulnerability to stress and GSK3beta signaling." Mol Psychiatry **20**(7): 889-900.
- Coyle, C. M. and K. R. Laws (2015). "The use of ketamine as an antidepressant: a systematic review and meta-analysis." Hum Psychopharmacol **30**(3): 152-163.
- Craft, C. M., D. H. Whitmore and A. F. Wiechmann (1994). "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." J Biol Chem **269**(6): 4613-4619.
- Crismon, M. L., M. Trivedi, T. A. Pigott, A. J. Rush, R. M. Hirschfeld, D. A. Kahn, C. DeBattista, J. C. Nelson, A. A. Nierenberg, H. A. Sackeim and M. E. Thase (1999). "The Texas Medication Algorithm Project: report of the Texas Consensus Conference Panel on Medication Treatment of Major Depressive Disorder." J Clin Psychiatry **60**(3): 142-156.
- Crossley, N. A. and M. Bauer (2007). "Acceleration and augmentation of antidepressants with lithium for depressive disorders: two meta-analyses of randomized, placebo-controlled trials." J Clin Psychiatry **68**(6): 935-940.
- Cryan, J. F., A. Dalvi, S. H. Jin, B. R. Hirsch, I. Lucki and S. A. Thomas (2001). "Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs." J Pharmacol Exp Ther **298**(2): 651-657.

- Cryan, J. F., O. F. O'Leary, S. H. Jin, J. C. Friedland, M. Ouyang, B. R. Hirsch, M. E. Page, A. Dalvi, S. A. Thomas and I. Lucki (2004). "Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8186-8191.
- Czeh, B., A. Stuchlik, M. Wesierska, J. M. Cimadevilla, J. Pokorny, L. Seress and J. Bures (2001). "Effect of neonatal dentate gyrus lesion on allothetic and idiothetic navigation in rats." Neurobiol Learn Mem **75**(2): 190-213.
- D'Addario, C., B. Dell'Osso, D. Galimberti, M. C. Palazzo, B. Benatti, A. Di Francesco, E. Scarpini, A. C. Altamura and M. Maccarrone (2013). "Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder." Biol Psychiatry **73**(2): e6-7.
- Damoiseaux, V. A., J. H. Proost, V. C. Jiawan and B. N. Melgert (2014). "Sex differences in the pharmacokinetics of antidepressants: influence of female sex hormones and oral contraceptives." Clin Pharmacokinet **53**(6): 509-519.
- Dantzer, R. (2009). "Cytokine, sickness behavior, and depression." Immunol Allergy Clin North Am **29**(2): 247-264.
- Darcet, F., A. M. Gardier, D. J. David and J. P. Guilloux (2016). "Chronic 5-HT₄ receptor agonist treatment restores learning and memory deficits in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression." Neurosci Lett **616**: 197-203.
- Darcet, F., I. Mendez-David, L. Tritschler, A. M. Gardier, J. P. Guilloux and D. J. David (2014). "Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression." Front Behav Neurosci **8**: 136.
- David, D. J., C. E. Renard, P. Joliet, M. Hascoet and M. Bourin (2003). "Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test." Psychopharmacology (Berl) **166**(4): 373-382.
- David, D. J., B. A. Samuels, Q. Rainer, J. W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J. P. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijevic, E. D. Leonardo and R. Hen (2009). "Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression." Neuron **62**(4): 479-493.
- David, D. J., J. Wang, B. A. Samuels, Q. Rainer, I. David, A. M. Gardier and R. Hen (2010). "Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders." Neuroscientist **16**(5): 578-591.
- de Kloet, E. R. and M. L. Molendijk (2016). "Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism." Neural Plast **2016**: 6503162.
- de Montigny, C., P. H. Silverstone, G. Debonnel, P. Blier and D. Bakish (1999). "Venlafaxine in treatment-resistant major depression: a Canadian multicenter, open-label trial." J Clin Psychopharmacol **19**(5): 401-406.
- DeBattista, C., K. Doghramji, M. A. Menza, M. H. Rosenthal, R. R. Fieve and G. Modafinil in Depression Study (2003). "Adjunct modafinil for the short-term treatment of fatigue and sleepiness in patients with major depressive disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled study." J Clin Psychiatry **64**(9): 1057-1064.

- DeBattista, C., H. B. Solvason, J. Poirier, E. Kendrick and A. F. Schatzberg (2003). "A prospective trial of bupropion SR augmentation of partial and non-responders to serotonergic antidepressants." J Clin Psychopharmacol **23**(1): 27-30.
- Dedovic, K., A. Duchesne, J. Andrews, V. Engert and J. C. Pruessner (2009). "The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress." Neuroimage **47**(3): 864-871.
- Delaloye, S. and P. E. Holtzheimer (2014). "Deep brain stimulation in the treatment of depression." Dialogues Clin Neurosci **16**(1): 83-91.
- Deligiannidis, K. M., A. J. Rothschild, B. A. Barton, A. R. Kroll-Desrosiers, B. S. Meyers, A. J. Flint, E. M. Whyte, B. H. Mulsant and S.-P. S. Group (2013). "A gender analysis of the study of pharmacotherapy of psychotic depression (STOP-PD): gender and age as predictors of response and treatment-associated changes in body mass index and metabolic measures." J Clin Psychiatry **74**(10): 1003-1009.
- Deltheil, T., B. P. Guiard, J. Cerdan, D. J. David, K. F. Tanaka, C. Reperant, J. P. Guilloux, F. Coudore, R. Hen and A. M. Gardier (2008). "Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice." Neuropharmacology **55**(6): 1006-1014.
- Denny, C. A., M. A. Kheirbek, E. L. Alba, K. F. Tanaka, R. A. Brachman, K. B. Laughman, N. K. Tomm, G. F. Turi, A. Losonczy and R. Hen (2014). "Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis." Neuron **83**(1): 189-201.
- Der-Avakian, A., M. S. Mazei-Robison, J. P. Kesby, E. J. Nestler and A. Markou (2014). "Enduring deficits in brain reward function after chronic social defeat in rats: susceptibility, resilience, and antidepressant response." Biol Psychiatry **76**(7): 542-549.
- DeWire, S. M., S. Ahn, R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." Annu Rev Physiol **69**: 483-510.
- Diaz, S. L., S. Doly, N. Narboux-Neme, S. Fernandez, P. Mazot, S. M. Banas, K. Boutourlinsky, I. Moutkine, A. Belmer, A. Roumier and L. Maroteaux (2012). "5-HT(2B) receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions." Mol Psychiatry **17**(2): 154-163.
- Dodd, S., D. Horgan, G. S. Malhi and M. Berk (2005). "To combine or not to combine? A literature review of antidepressant combination therapy." J Affect Disord **89**(1-3): 1-11.
- Domschke, K., C. Hohoff, L. S. Mortensen, T. Roehrs, J. Deckert, V. Arolt and B. T. Baune (2008). "Monoamine oxidase A variant influences antidepressant treatment response in female patients with Major Depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **32**(1): 224-228.
- Dournes, C., S. Beeske, C. Belzung and G. Griebel (2013). "Deep brain stimulation in treatment-resistant depression in mice: comparison with the CRF1 antagonist, SSR125543." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **40**: 213-220.
- Dowlati, Y., N. Herrmann, W. Swardfager, H. Liu, L. Sham, E. K. Reim and K. L. Lanctot (2010). "A meta-analysis of cytokines in major depression." Biol Psychiatry **67**(5): 446-457.
- Ducottet, C. and C. Belzung (2004). "Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice." Physiol Behav **81**(3): 417-426.

- Ducottet, C., G. Griebel and C. Belzung (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**(4): 625-631.
- Dulawa, S. C., K. A. Holick, B. Gundersen and R. Hen (2004). "Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression." Neuropsychopharmacology **29**(7): 1321-1330.
- Duman, R. S., G. R. Heninger and E. J. Nestler (1997). "A molecular and cellular theory of depression." Arch Gen Psychiatry **54**(7): 597-606.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." Biol Psychiatry **59**(12): 1116-1127.
- Dusi, N., S. Barlati, A. Vita and P. Brambilla (2015). "Brain Structural Effects of Antidepressant Treatment in Major Depression." Curr Neuropsychopharmacol **13**(4): 458-465.
- Dwivedi, Y., J. S. Rao, H. S. Rizavi, J. Kotowski, R. R. Conley, R. C. Roberts, C. A. Tamminga and G. N. Pandey (2003). "Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects." Arch Gen Psychiatry **60**(3): 273-282.
- Dwivedi, Y., H. S. Rizavi, R. R. Conley, R. C. Roberts, C. A. Tamminga and G. N. Pandey (2003). "Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects." Arch Gen Psychiatry **60**(8): 804-815.
- Edgar, N. M., C. Touma, R. Palme and E. Sibille (2011). "Resilient emotionality and molecular compensation in mice lacking the oligodendrocyte-specific gene Cnp1." Transl Psychiatry **1**: e42.
- Ehlert, U., J. Gaab and M. Heinrichs (2001). "Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis." Biol Psychol **57**(1-3): 141-152.
- El Yacoubi, M., S. Bouali, D. Popa, L. Naudon, I. Leroux-Nicollet, M. Hamon, J. Costentin, J. Adrien and J. M. Vaugeois (2003). "Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6227-6232.
- Eliot, L. and S. S. Richardson (2016). "Sex in Context: Limitations of Animal Studies for Addressing Human Sex/Gender Neurobehavioral Health Disparities." J Neurosci **36**(47): 11823-11830.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.
- Fabbri, C., S. Porcelli and A. Serretti (2014). "From pharmacogenetics to pharmacogenomics: the way toward the personalization of antidepressant treatment." Can J Psychiatry **59**(2): 62-75.
- Fabrazzo, M., F. Perris, P. Monteleone, G. Esposito, F. Catapano and M. Maj (2012). "Aripiprazole augmentation strategy in clomipramine-resistant depressive patients: an open preliminary study." Eur Neuropsychopharmacol **22**(2): 132-136.
- Fava, M. (2003). "Diagnosis and definition of treatment-resistant depression." Biol Psychiatry **53**(8): 649-659.

- Fava, M., D. L. Dunner, J. H. Greist, S. H. Preskorn, M. H. Trivedi, J. Zajecka and M. Cohen (2001). "Efficacy and safety of mirtazapine in major depressive disorder patients after SSRI treatment failure: an open-label trial." J Clin Psychiatry **62**(6): 413-420.
- Fava, M., W. V. McCall, A. Krystal, T. Wessel, R. Rubens, J. Caron, D. Amato and T. Roth (2006). "Eszopiclone co-administered with fluoxetine in patients with insomnia coexisting with major depressive disorder." Biol Psychiatry **59**(11): 1052-1060.
- Fava, M., J. F. Rosenbaum, P. J. McGrath, J. W. Stewart, J. D. Amsterdam and F. M. Quitkin (1994). "Lithium and tricyclic augmentation of fluoxetine treatment for resistant major depression: a double-blind, controlled study." Am J Psychiatry **151**(9): 1372-1374.
- Fava, M., M. E. Thase and C. DeBattista (2005). "A multicenter, placebo-controlled study of modafinil augmentation in partial responders to selective serotonin reuptake inhibitors with persistent fatigue and sleepiness." J Clin Psychiatry **66**(1): 85-93.
- Fekadu, A., S. Wooderson, C. Donaldson, K. Markopoulou, B. Masterson, L. Poon and A. J. Cleare (2009). "A multidimensional tool to quantify treatment resistance in depression: the Maudsley staging method." J Clin Psychiatry **70**(2): 177-184.
- Ferrari, A. J., A. J. Somerville, A. J. Baxter, R. Norman, S. B. Patten, T. Vos and H. A. Whiteford (2013). "Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature." Psychol Med **43**(3): 471-481.
- Finamore, T. L. and R. L. Port (2000). "Developmental stress disrupts habituation but spares prepulse inhibition in young rats." Physiol Behav **69**(4-5): 527-530.
- Fink, G., B. E. H. Sumner, R. Rosie, O. Grace and J. P. Quinn (1996). "Estrogen control of central neurotransmission: Effect on mood, mental state, and memory." Cellular and Molecular Neurobiology **16**(3): 325-344.
- Fond, G., A. Loundou, C. Rabu, A. Macgregor, C. Lancon, M. Brittner, J. A. Micoulaud-Franchi, R. Richieri, P. Courtet, M. Abbar, M. Roger, M. Leboyer and L. Boyer (2014). "Ketamine administration in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis." Psychopharmacology (Berl) **231**(18): 3663-3676.
- Ford, T. C. and D. Rickwood (1990). "A new one-step method for the isolation of human mononuclear cells." J Immunol Methods **134**(2): 237-241.
- Franceschelli, A., S. Herchick, C. Thelen, Z. Papadopoulou-Daifoti and P. M. Pitychoutis (2014). "Sex differences in the chronic mild stress model of depression." Behav Pharmacol **25**(5-6): 372-383.
- Fredman, S. J., M. Fava, A. S. Kienke, C. N. White, A. A. Nierenberg and J. F. Rosenbaum (2000). "Partial response, nonresponse, and relapse with selective serotonin reuptake inhibitors in major depression: a survey of current "next-step" practices." J Clin Psychiatry **61**(6): 403-408.
- Fujioka, H. and T. Akema (2010). "Lipopolysaccharide acutely inhibits proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus in adult rats." Brain Res **1352**: 35-42.
- Gassen, N. C., J. Hartmann, J. Zschocke, J. Stepan, K. Hafner, A. Zellner, T. Kirmeier, L. Kollmannsberger, K. V. Wagner, N. Dedic, G. Balsevich, J. M. Deussing, S. Kloiber, S. Lucae, F. Holsboer, M. Eder, M. Uhr, M. Ising, M. V. Schmidt and T. Rein (2014). "Association of FKBP51 with

- priming of autophagy pathways and mediation of antidepressant treatment response: evidence in cells, mice, and humans." *PLoS Med* **11**(11): e1001755.
- Gaynes, B. N., S. B. Dusetzina, A. R. Ellis, R. A. Hansen, J. F. Farley, W. C. Miller and T. Sturmer (2012). "Treating depression after initial treatment failure: directly comparing switch and augmenting strategies in STAR*D." *J Clin Psychopharmacol* **32**(1): 114-119.
- Gaynes, B. N., A. J. Rush, M. H. Trivedi, S. R. Wisniewski, D. Spencer and M. Fava (2008). "The STAR*D study: treating depression in the real world." *Cleve Clin J Med* **75**(1): 57-66.
- Gelenberg, A. J. (2010). "Using assessment tools to screen for, diagnose, and treat major depressive disorder in clinical practice." *J Clin Psychiatry* **71 Suppl E1**: e01.
- Gladkevich, A., H. F. Kauffman and J. Korf (2004). "Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**(3): 559-576.
- Golan, M., G. Schreiber and S. Avissar (2009). "Antidepressants, beta-arrestins and GRKs: from regulation of signal desensitization to intracellular multifunctional adaptor functions." *Curr Pharm Des* **15**(14): 1699-1708.
- Golan, M., G. Schreiber and S. Avissar (2010). "Antidepressants increase beta-arrestin 2 ubiquitinylation and degradation by the proteasomal pathway in C6 rat glioma cells." *J Pharmacol Exp Ther* **332**(3): 970-976.
- Golde, W. T., P. Gollobin and L. L. Rodriguez (2005). "A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet." *Lab Anim (NY)* **34**(9): 39-43.
- Goldman, J. M., A. S. Murr and R. L. Cooper (2007). "The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **80**(2): 84-97.
- Goldstein, J. M. (2001). "Normal Sexual Dimorphism of the Adult Human Brain Assessed by In Vivo Magnetic Resonance Imaging." *Cerebral Cortex* **11**(6): 490-497.
- Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." *J Biol Chem* **177**(2): 751-766.
- Gorzalka, B. B., L. A. Hanson and J. J. Hong (2001). "Ketanserin attenuates the behavioural effects of corticosterone: implications for 5-HT(2A) receptor regulation." *Eur J Pharmacol* **428**(2): 235-240.
- Gourley, S. L., A. T. Kedves, P. Olausson and J. R. Taylor (2009). "A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF." *Neuropsychopharmacology* **34**(3): 707-716.
- Gourley, S. L., D. D. Kiraly, J. L. Howell, P. Olausson and J. R. Taylor (2008). "Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone." *Biol Psychiatry* **64**(10): 884-890.
- Gourley, S. L. and J. R. Taylor (2009). "Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents." *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 9**: Unit 9 32.
- Green, S. M. and J. Li (2000). "Ketamine in adults: what emergency physicians need to know about patient selection and emergence reactions." *Acad Emerg Med* **7**(3): 278-281.

- Gregus, A., A. J. Wintink, A. C. Davis and L. E. Kalynchuk (2005). "Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats." Behav Brain Res **156**(1): 105-114.
- Griebel, G., J. Simiand, C. Serradeil-Le Gal, J. Wagnon, M. Pascal, B. Scatton, J. P. Maffrand and P. Soubrie (2002). "Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6370-6375.
- Grippe, A. J., T. G. Beltz, R. M. Weiss and A. K. Johnson (2006). "The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia." Biol Psychiatry **59**(4): 309-316.
- Grippe, A. J., N. R. Sullivan, K. J. Damjanoska, J. W. Crane, G. A. Carrasco, J. Shi, Z. Chen, F. Garcia, N. A. Muma and L. D. Van de Kar (2005). "Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats." Psychopharmacology (Berl) **179**(4): 769-780.
- Guiard, B. P., D. J. David, T. Deltheil, F. Chenu, E. Le Maitre, T. Renoir, I. Leroux-Nicollet, P. Sokoloff, L. Lanfumey, M. Hamon, A. M. Andrews, R. Hen and A. M. Gardier (2008). "Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype." Int J Neuropsychopharmacol **11**(1): 79-92.
- Guilloux, J. P., D. J. David, B. A. Samuels, I. David, A. M. Gardier and B. P. Guiard (2012). Non-response to initial antidepressant therapy. Psychology. Rijeka, Croatia, InTech.
- Guilloux, J. P., G. Douillard-Guilloux, R. Kota, X. Wang, A. M. Gardier, K. Martinowich, G. C. Tseng, D. A. Lewis and E. Sibille (2012). "Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression." Mol Psychiatry **17**(11): 1130-1142.
- Guilloux, J. P., M. Seney, N. Edgar and E. Sibille (2011). "Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex." J Neurosci Methods **197**(1): 21-31.
- Gulledge, A. T., B. M. Kampa and G. J. Stuart (2005). "Synaptic integration in dendritic trees." J Neurobiol **64**(1): 75-90.
- Gururajan, A., G. Clarke, T. G. Dinan and J. F. Cryan (2016). "Molecular biomarkers of depression." Neurosci Biobehav Rev **64**: 101-133.
- Gurvits, T. V., M. E. Shenton, H. Hokama, H. Ohta, N. B. Lasko, M. W. Gilbertson, S. P. Orr, R. Kikinis, F. A. Jolesz, R. W. McCarley and R. K. Pitman (1996). "Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder." Biol Psychiatry **40**(11): 1091-1099.
- Gwirtsman, H. E., M. P. Szuba, L. Toren and M. Feist (1994). "The antidepressant response to tricyclics in major depressives is accelerated with adjunctive use of methylphenidate." Psychopharmacol Bull **30**(2): 157-164.
- Haile, C. N., J. W. Murrough, D. V. Iosifescu, L. C. Chang, R. K. Al Jurdi, A. Foulkes, S. Iqbal, J. J. Mahoney, 3rd, R. De La Garza, 2nd, D. S. Charney, T. F. Newton and S. J. Mathew (2014). "Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression." Int J Neuropsychopharmacol **17**(2): 331-336.

- Hajszan, T., A. Dow, J. L. Warner-Schmidt, K. Szigeti-Buck, N. L. Sallam, A. Parducz, C. Leranth and R. S. Duman (2009). "Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression." Biol Psychiatry **65**(5): 392-400.
- Haller, J., E. Fuchs, J. Halasz and G. B. Makara (1999). "Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats." Brain Res Bull **50**(1): 33-39.
- Halmai, Z., P. Dome, J. Dobos, X. Gonda, A. Szekely, M. Sasvari-Szekely, G. Faludi and J. Lazary (2013). "Peripheral vascular endothelial growth factor level is associated with antidepressant treatment response: results of a preliminary study." J Affect Disord **144**(3): 269-273.
- Hamilton, M. (1967). "Development of a rating scale for primary depressive illness." Br J Soc Clin Psychol **6**(4): 278-296.
- Hariri, A. R. and A. Holmes (2006). "Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function." Trends Cogn Sci **10**(4): 182-191.
- Hashimoto, K. (2016). "Ketamine's antidepressant action: beyond NMDA receptor inhibition." Expert Opin Ther Targets **20**(11): 1389-1392.
- Heilig, M., O. Zachrisson, A. Thorsell, A. Ehnvall, S. Mottagui-Tabar, M. Sjogren, M. Asberg, R. Ekman, C. Wahlestedt and H. Agren (2004). "Decreased cerebrospinal fluid neuropeptide Y (NPY) in patients with treatment refractory unipolar major depression: preliminary evidence for association with preproNPY gene polymorphism." J Psychiatr Res **38**(2): 113-121.
- Heimann, H. (1974). "Therapy-resistant depressions: symptoms and syndromes. Contributions to symptomatology and syndromes." Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol **7**(3): 139-144.
- Heisler, L. K., H. M. Chu, T. J. Brennan, J. A. Danao, P. Bajwa, L. H. Parsons and L. H. Tecott (1998). "Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 15049-15054.
- Hek, K., A. Demirkan, J. Lahti, A. Terracciano, A. Teumer, M. C. Cornelis, N. Amin, E. Bakshis, J. Baumert, J. Ding, Y. Liu, K. Marciante, O. Meirelles, M. A. Nalls, Y. V. Sun, N. Vogelzangs, L. Yu, S. Bandinelli, E. J. Benjamin, D. A. Bennett, D. Boomsma, A. Cannas, L. H. Coker, E. de Geus, P. L. De Jager, A. V. Diez-Roux, S. Purcell, F. B. Hu, E. B. Rimm, D. J. Hunter, M. K. Jensen, G. Curhan, K. Rice, A. D. Penman, J. I. Rotter, N. Sotoodehnia, R. Emeny, J. G. Eriksson, D. A. Evans, L. Ferrucci, M. Fornage, V. Gudnason, A. Hofman, T. Illig, S. Kardia, M. Kelly-Hayes, K. Koenen, P. Kraft, M. Kuningas, J. M. Massaro, D. Melzer, A. Mulas, C. L. Mulder, A. Murray, B. A. Oostra, A. Palotie, B. Penninx, A. Petersmann, L. C. Pilling, B. Psaty, R. Rawal, E. M. Reiman, A. Schulz, J. M. Shulman, A. B. Singleton, A. V. Smith, A. R. Sutin, A. G. Uitterlinden, H. Volzke, E. Widen, K. Yaffe, A. B. Zonderman, F. Cucca, T. Harris, K. H. Ladwig, D. J. Llewellyn, K. Raikonen, T. Tanaka, C. M. van Duijn, H. J. Grabe, L. J. Launer, K. L. Lunetta, T. H. Mosley, Jr., A. B. Newman, H. Tiemeier and J. Murabito (2013). "A genome-wide association study of depressive symptoms." Biol Psychiatry **73**(7): 667-678.
- Herman, J. P., M. M. Ostrander, N. K. Mueller and H. Figueiredo (2005). "Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(8): 1201-1213.
- Heurteaux, C., G. Lucas, N. Guy, M. El Yacoubi, S. Thummler, X. D. Peng, F. Noble, N. Blondeau, C. Widmann, M. Borsotto, G. Gobbi, J. M. Vaugeois, G. Debonnel and M. Lazdunski (2006). "Deletion of

- the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype." Nat Neurosci **9**(9): 1134-1141.
- Heuser, I., A. Yassouridis and F. Holsboer (1994). "The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders." J Psychiatr Res **28**(4): 341-356.
- Hill, A. S., A. Sahay and R. Hen (2015). "Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors." Neuropsychopharmacology **40**(10): 2368-2378.
- Hirschfeld, R. M. (2000). "History and evolution of the monoamine hypothesis of depression." J Clin Psychiatry **61 Suppl 6**: 4-6.
- Holden, C. (2009). "Depression gene. Back to the drawing board for psychiatric genetics." Science **324**(5935): 1628.
- Holick, K. A., D. C. Lee, R. Hen and S. C. Dulawa (2008). "Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor." Neuropsychopharmacology **33**(2): 406-417.
- Holmes, A., R. J. Yang, D. L. Murphy and J. N. Crawley (2002). "Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter." Neuropsychopharmacology **27**(6): 914-923.
- Holsboer, F. (2000). "The corticosteroid receptor hypothesis of depression." Neuropsychopharmacology **23**(5): 477-501.
- Holsboer-Trachsler, E., R. Stohler and M. Hatzinger (1991). "Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression." Psychiatry Res **38**(2): 163-171.
- Howard, L. M., A. M. Ehrlich, F. Gamlen and S. Oram (2016). "Gender-neutral mental health research is sex and gender biased." Lancet Psychiatry.
- Iacob, E., K. C. Light, S. C. Tadler, H. R. Weeks, A. T. White, R. W. Huguen, T. A. Vanhaitsma, L. Bushnell and A. R. Light (2013). "Dysregulation of leukocyte gene expression in women with medication-refractory depression versus healthy non-depressed controls." BMC Psychiatry **13**: 273.
- Iacob, E., S. C. Tadler, K. C. Light, H. R. Weeks, K. W. Smith, A. T. White, R. W. Huguen, T. A. VanHaitsma, L. A. Bushnell and A. R. Light (2014). "Leukocyte Gene Expression in Patients with Medication Refractory Depression before and after Treatment with ECT or Isoflurane Anesthesia: A Pilot Study." Depress Res Treat **2014**: 582380.
- Ibarguen-Vargas, Y., A. Surget, P. Vourc'h, S. Leman, C. R. Andres, A. M. Gardier and C. Belzung (2009). "Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress." Behav Brain Res **202**(2): 245-251.
- Institut national de prévention et d'éducation pour la santé, F. M. p. l. s. publique and I. d. v. sanitaire (2009). La dépression en France enquête Anadep 2005 [en partenariat avec la Fondation MGEN pour la santé publique, l'Institut de veille sanitaire] sous la direction de Christine Chan Chee, François Beck, David Sapinho... [et al.]. Saint-Denis, Inpes.
- Ionescu, D. F., J. F. Rosenbaum and J. E. Alpert (2015). "Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression." Dialogues Clin Neurosci **17**(2): 111-126.

- Iosifescu, D. V., A. A. Nierenberg, D. Mischoulon, R. H. Perlis, G. I. Papakostas, J. L. Ryan, J. E. Alpert and M. Fava (2005). "An open study of triiodothyronine augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in treatment-resistant major depressive disorder." J Clin Psychiatry **66**(8): 1038-1042.
- Ising, M., S. Horstmann, S. Kloiber, S. Lucae, E. B. Binder, N. Kern, H. E. Kunzel, A. Pfennig, M. Uhr and F. Holsboer (2007). "Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker?" Biol Psychiatry **62**(1): 47-54.
- Isingrini, E., V. Camus, A. M. Le Guisquet, M. Pingaud, S. Devers and C. Belzung (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**(4): e10404.
- Ivarsson, M., L. M. Paterson and P. H. Hutson (2005). "Antidepressants and REM sleep in Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats." Eur J Pharmacol **522**(1-3): 63-71.
- Iwai, T., T. Ohnuki, S. Sasaki-Hamada, A. Saitoh, A. Sugiyama and J. Oka (2013). "Glucagon-like peptide-2 but not imipramine exhibits antidepressant-like effects in ACTH-treated mice." Behav Brain Res **243**: 153-157.
- Jacobsen, J. P. and A. Mork (2006). "Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat." Brain Res **1110**(1): 221-225.
- Jacobson, L. and R. Sapolsky (1991). "The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis." Endocr Rev **12**(2): 118-134.
- Jacobson, L. H. and J. F. Cryan (2007). "Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review." Behav Genet **37**(1): 171-213.
- Jayatissa, M. N., C. Bisgaard, A. Tingstrom, M. Papp and O. Wiborg (2006). "Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression." Neuropsychopharmacology **31**(11): 2395-2404.
- Jedynak, P., T. Kos, C. Sandi, L. Kaczmarek and R. K. Filipkowski (2014). "Mice with ablated adult brain neurogenesis are not impaired in antidepressant response to chronic fluoxetine." J Psychiatr Res **56**: 106-111.
- Jentsch, M. C., E. M. Van Buel, F. J. Bosker, A. V. Gladkevich, H. C. Klein, R. C. Oude Voshaar, E. G. Ruhe, U. L. Eisel and R. A. Schoevers (2015). "Biomarker approaches in major depressive disorder evaluated in the context of current hypotheses." Biomark Med **9**(3): 277-297.
- Joel, D. and M. M. McCarthy (2017). "Incorporating Sex As a Biological Variable in Neuropsychiatric Research: Where Are We Now and Where Should We Be?" Neuropsychopharmacology **42**(2): 379-385.
- Joffe, R. T., S. T. Sokolov and A. J. Levitt (2006). "Lithium and triiodothyronine augmentation of antidepressants." Can J Psychiatry **51**(12): 791-793.
- Joslin, J. O. (2009). "Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals." Journal of Exotic Pet Medicine **18**(2): 117-139.

- Juruena, M. F., C. M. Pariante, A. S. Papadopoulos, L. Poon, S. Lightman and A. J. Cleare (2013). "The role of mineralocorticoid receptor function in treatment-resistant depression." J Psychopharmacol **27**(12): 1169-1179.
- Kaidanovich-Beilin, O., A. Milman, A. Weizman, C. G. Pick and H. Eldar-Finkelman (2004). "Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus." Biol Psychiatry **55**(8): 781-784.
- Kalynchuk, L. E., A. Gregus, D. Boudreau and T. S. Perrot-Sinal (2004). "Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats." Behav Neurosci **118**(6): 1365-1377.
- Kaplan, E. M. (2002). "Efficacy of venlafaxine in patients with major depressive disorder who have unsustained or no response to selective serotonin reuptake inhibitors: an open-label, uncontrolled study." Clin Ther **24**(7): 1194-1200.
- Karlovic, D., A. Serretti, S. Jevtovic, N. Vrkic, V. Seric and A. M. Peles (2013). "Diagnostic accuracy of serum brain derived neurotrophic factor concentration in antidepressant naive patients with first major depression episode." J Psychiatr Res **47**(2): 162-167.
- Kato, M., T. Fukuda, A. Serretti, M. Wakeno, G. Okugawa, Y. Ikenaga, Y. Hosoi, Y. Takekita, L. Mandelli, J. Azuma and T. Kinoshita (2008). "ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **32**(2): 398-404.
- Kaufmann, W. E. and H. W. Moser (2000). "Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation." Cereb Cortex **10**(10): 981-991.
- Kellner, C. H., R. M. Greenberg, J. W. Murrough, E. O. Bryson, M. C. Briggs and R. M. Pasculli (2012). "ECT in treatment-resistant depression." Am J Psychiatry **169**(12): 1238-1244.
- Kelly, S. J., N. L. Ostrowski and M. A. Wilson (1999). "Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases." Pharmacol Biochem Behav **64**(4): 655-664.
- Kelly, T. F. and D. Z. Lieberman (2009). "Long term augmentation with T3 in refractory major depression." J Affect Disord **115**(1-2): 230-233.
- Kendler, K. S. and C. A. Prescott (1999). "A population-based twin study of lifetime major depression in men and women." Arch Gen Psychiatry **56**(1): 39-44.
- Kennedy, S. H., P. Giacobbe, S. J. Rizvi, F. M. Placenza, Y. Nishikawa, H. S. Mayberg and A. M. Lozano (2011). "Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: follow-up after 3 to 6 years." Am J Psychiatry **168**(5): 502-510.
- Kessler, D., D. Sharp and G. Lewis (2005). "Screening for depression in primary care." Br J Gen Pract **55**(518): 659-660.
- Kessler, R. C., G. P. Amminger, S. Aguilar-Gaxiola, J. Alonso, S. Lee and T. B. Ustun (2007). "Age of onset of mental disorders: a review of recent literature." Curr Opin Psychiatry **20**(4): 359-364.
- Kessler, R. C., W. T. Chiu, O. Demler, K. R. Merikangas and E. E. Walters (2005). "Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication." Arch Gen Psychiatry **62**(6): 617-627.

- Kim, J. H., M. J. Cho, J. P. Hong, J. N. Bae, S. J. Cho, B. J. Hahm, D. W. Lee, J. I. Park, J. Y. Lee, H. J. Jeon and S. M. Chang (2015). "Gender Differences in Depressive Symptom Profile: Results from Nationwide General Population Surveys in Korea." J Korean Med Sci **30**(11): 1659-1666.
- Kitamura, Y., H. Araki and Y. Gomita (2002). "Influence of ACTH on the effects of imipramine, desipramine and lithium on duration of immobility of rats in the forced swim test." Pharmacol Biochem Behav **71**(1-2): 63-69.
- Klok, M. D., S. R. Alt, A. J. Irurzun Lafitte, J. D. Turner, E. A. Lakke, I. Huitinga, C. P. Muller, F. G. Zitman, E. R. de Kloet and R. H. Derijk (2011). "Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA and its splice variants in postmortem brain regions of patients with major depressive disorder." J Psychiatr Res **45**(7): 871-878.
- Kobayashi, T., E. Hayashi, M. Shimamura, M. Kinoshita and N. P. Murphy (2008). "Neurochemical responses to antidepressants in the prefrontal cortex of mice and their efficacy in preclinical models of anxiety-like and depression-like behavior: a comparative and correlational study." Psychopharmacology (Berl) **197**(4): 567-580.
- Kolber, B. J., L. Wiczorek and L. J. Muglia (2008). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function." Stress **11**(5): 321-338.
- Konarski, J. Z., R. S. McIntyre, S. H. Kennedy, S. Rafi-Tari, J. K. Soczynska and T. A. Ketter (2008). "Volumetric neuroimaging investigations in mood disorders: bipolar disorder versus major depressive disorder." Bipolar Disord **10**(1): 1-37.
- Kornstein, S. G. (2006). "Beyond remission: rationale and design of the Prevention of Recurrent Episodes of Depression with Venlafaxine for Two Years (PREVENT) Study." CNS Spectr **11**(12 Suppl 15): 28-34.
- Kornstein, S. G. (2010). "Gender issues and DSM-V." Arch Womens Ment Health **13**(1): 11-13.
- Kornstein, S. G., R. S. McIntyre, M. E. Thase and M. Boucher (2014). "Desvenlafaxine for the treatment of major depressive disorder." Expert Opin Pharmacother **15**(10): 1449-1463.
- Kornstein, S. G., R. D. Pedersen, P. J. Holland, C. B. Nemeroff, A. J. Rothschild, M. E. Thase, M. H. Trivedi, P. T. Ninan and M. B. Keller (2014). "Influence of sex and menopausal status on response, remission, and recurrence in patients with recurrent major depressive disorder treated with venlafaxine extended release or fluoxetine: analysis of data from the PREVENT study." J Clin Psychiatry **75**(1): 62-68.
- Kornstein, S. G., A. F. Schatzberg, M. E. Thase, K. A. Yonkers, J. P. McCullough, G. I. Keitner, A. J. Gelenberg, S. M. Davis, W. M. Harrison and M. B. Keller (2000). "Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression." Am J Psychiatry **157**(9): 1445-1452.
- Kornstein, S. G., A. F. Schatzberg, M. E. Thase, K. A. Yonkers, J. P. McCullough, G. I. Keitner, A. J. Gelenberg, C. E. Ryan, A. L. Hess, W. Harrison, S. M. Davis and M. B. Keller (2000). "Gender differences in chronic major and double depression." J Affect Disord **60**(1): 1-11.
- Kornstein, S. G. and R. K. Schneider (2001). "Clinical features of treatment-resistant depression." J Clin Psychiatry **62 Suppl 16**: 18-25.

- Kornstein, S. G., M. M. Wohlreich, C. H. Mallinckrodt, J. G. Watkin and D. E. Stewart (2006). "Duloxetine efficacy for major depressive disorder in male vs. female patients: data from 7 randomized, double-blind, placebo-controlled trials." J Clin Psychiatry **67**(5): 761-770.
- Krishnan, V., M. H. Han, D. L. Graham, O. Berton, W. Renthal, S. J. Russo, Q. Laplant, A. Graham, M. Lutter, D. C. Lagace, S. Ghose, R. Reister, P. Tannous, T. A. Green, R. L. Neve, S. Chakravarty, A. Kumar, A. J. Eisch, D. W. Self, F. S. Lee, C. A. Tamminga, D. C. Cooper, H. K. Gershenfeld and E. J. Nestler (2007). "Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions." Cell **131**(2): 391-404.
- Kunugi, H., I. Ida, T. Owashi, M. Kimura, Y. Inoue, S. Nakagawa, T. Yabana, T. Urushibara, R. Kanai, M. Aihara, N. Yuuki, T. Otsubo, A. Oshima, K. Kudo, T. Inoue, Y. Kitaichi, O. Shirakawa, K. Isogawa, H. Nagayama, K. Kamijima, S. Nanko, S. Kanba, T. Higuchi and M. Mikuni (2006). "Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: a Multicenter Study." Neuropsychopharmacology **31**(1): 212-220.
- Kupfer, D. J. (1991). "Long-term treatment of depression." J Clin Psychiatry **52 Suppl**: 28-34.
- Lam, R. W., H. Hossie, K. Solomons and L. N. Yatham (2004). "Citalopram and bupropion-SR: combining versus switching in patients with treatment-resistant depression." J Clin Psychiatry **65**(3): 337-340.
- Lamers, F., P. de Jonge, W. A. Nolen, J. H. Smit, F. G. Zitman, A. T. Beekman and B. W. Penninx (2010). "Identifying depressive subtypes in a large cohort study: results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA)." J Clin Psychiatry **71**(12): 1582-1589.
- Lapin, I. P. (2003). "Neurokynurenines (NEKY) as common neurochemical links of stress and anxiety." Adv Exp Med Biol **527**: 121-125.
- Latapy, C. and J. M. Beaulieu (2013). "beta-Arrestins in the central nervous system." Prog Mol Biol Transl Sci **118**: 267-295.
- Lavretsky, H., M. D. Kim, A. Kumar and C. F. Reynolds, 3rd (2003). "Combined treatment with methylphenidate and citalopram for accelerated response in the elderly: an open trial." J Clin Psychiatry **64**(12): 1410-1414.
- Lefkowitz, R. J. and E. J. Whalen (2004). "beta-arrestins: traffic cops of cell signaling." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 162-168.
- Lehmann, H. E. (1974). "Therapy-resistant depressions - a clinical classification." Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol **7**(3): 156-163.
- Leuchter, A. F., A. M. Hunter, D. E. Krantz and I. A. Cook (2014). "Intermediate phenotypes and biomarkers of treatment outcome in major depressive disorder." Dialogues Clin Neurosci **16**(4): 525-537.
- Levitt, A. J., R. T. Joffe, R. Kamil and R. McIntyre (1999). "Do depressed subjects who have failed both fluoxetine and a tricyclic antidepressant respond to the combination?" J Clin Psychiatry **60**(9): 613-616.
- Li, B., L. Liu, K. J. Friston, H. Shen, L. Wang, L. L. Zeng and D. Hu (2013). "A treatment-resistant default mode subnetwork in major depression." Biol Psychiatry **74**(1): 48-54.

- Li, B., K. Suemaru, R. Cui, Y. Kitamura, Y. Gomita and H. Araki (2006). "Repeated electroconvulsive stimuli increase brain-derived neurotrophic factor in ACTH-treated rats." Eur J Pharmacol **529**(1-3): 114-121.
- Li, Q. S., C. Tian, G. R. Seabrook, W. C. Drevets and V. A. Narayan (2016). "Analysis of 23andMe antidepressant efficacy survey data: implication of circadian rhythm and neuroplasticity in bupropion response." Transl Psychiatry **6**(9): e889.
- Li, X. and R. S. Jope (2010). "Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation?" Neuropsychopharmacology **35**(11): 2143-2154.
- Licht, R. W. and S. Qvitzau (2002). "Treatment strategies in patients with major depression not responding to first-line sertraline treatment. A randomised study of extended duration of treatment, dose increase or mianserin augmentation." Psychopharmacology (Berl) **161**(2): 143-151.
- Liew, C. C., J. Ma, H. C. Tang, R. Zheng and A. A. Dempsey (2006). "The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool." J Lab Clin Med **147**(3): 126-132.
- Lindholm, J. S., H. Autio, L. Vesa, H. Antila, L. Lindemann, M. C. Hoener, P. Skolnick, T. Rantamäki and E. Castren (2012). "The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in bdnf(+)/(-) heterozygous null mice." Neuropharmacology **62**(1): 391-397.
- Lindholm, J. S. O. and E. Castrén (2014). "Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects." Frontiers in Behavioral Neuroscience **8**.
- Liu, F., W. Guo, D. Yu, Q. Gao, K. Gao, Z. Xue, H. Du, J. Zhang, C. Tan, Z. Liu, J. Zhao and H. Chen (2012). "Classification of different therapeutic responses of major depressive disorder with multivariate pattern analysis method based on structural MR scans." PLoS One **7**(7): e40968.
- Liu, X., X. Zhao, X. Zeng, K. Bossers, D. F. Swaab, J. Zhao and G. Pei (2013). "beta-arrestin1 regulates gamma-secretase complex assembly and modulates amyloid-beta pathology." Cell Res **23**(3): 351-365.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-1550.
- Lopez, J. F., D. T. Chalmers, K. Y. Little and S. J. Watson (1998). "A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression." Biol Psychiatry **43**(8): 547-573.
- Lopez-Rubalcava, C. and I. Lucki (2000). "Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test." Neuropsychopharmacology **22**(2): 191-199.
- Lucki, I. (2001). "A prescription to resist proscriptions for murine models of depression." Psychopharmacology (Berl) **153**(3): 395-398.
- Lussier, A. L., K. Lebedeva, E. Y. Fenton, A. Guskjolen, H. J. Caruncho and L. E. Kalynchuk (2013). "The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus." Neuropharmacology **71**: 174-183.

- Maccari, S. and S. Morley-Fletcher (2007). "Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations." Psychoneuroendocrinology **32 Suppl 1**: S10-15.
- Maes, M. (1995). "Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **19**(1): 11-38.
- Maes, M., E. Bosmans, E. Suy, C. Vandervorst, C. De Jonckheere and J. Raus (1990). "Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors." Neuropsychobiology **24**(3): 115-120.
- Maes, M., M. Kubera and J. C. Leunis (2008). "The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression." Neuro Endocrinol Lett **29**(1): 117-124.
- Maes, M., B. E. Leonard, A. M. Myint, M. Kubera and R. Verkerk (2011). "The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(3): 702-721.
- Maes, M., R. Smith and S. Scharpe (1995). "The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression." Psychoneuroendocrinology **20**(2): 111-116.
- Magarinos, A. M., A. Deslandes and B. S. McEwen (1999). "Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress." Eur J Pharmacol **371**(2-3): 113-122.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler and R. S. Duman (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." J Neurosci **20**(24): 9104-9110.
- Malykhin, N. V. and N. J. Coupland (2015). "Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder." Neuroscience **309**: 200-213.
- Marcus, S. M., K. B. Kerber, A. J. Rush, S. R. Wisniewski, A. Nierenberg, G. K. Balasubramani, L. Ritz, S. Kornstein, E. A. Young and M. H. Trivedi (2008). "Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study." Compr Psychiatry **49**(3): 238-246.
- Marcus, S. M., E. A. Young, K. B. Kerber, S. Kornstein, A. H. Farabaugh, J. Mitchell, S. R. Wisniewski, G. K. Balasubramani, M. H. Trivedi and A. J. Rush (2005). "Gender differences in depression: findings from the STAR*D study." J Affect Disord **87**(2-3): 141-150.
- Markopoulou, K., A. Papadopoulos, M. F. Juruena, L. Poon, C. M. Pariante and A. J. Cleare (2009). "The ratio of cortisol/DHEA in treatment resistant depression." Psychoneuroendocrinology **34**(1): 19-26.
- Martenyi, F., M. Dossenbach, K. Mraz and S. Metcalfe (2001). "Gender differences in the efficacy of fluoxetine and maprotiline in depressed patients: a double-blind trial of antidepressants with serotonergic or norepinephrinergic reuptake inhibition profile." Eur Neuropsychopharmacol **11**(3): 227-232.

- Martinez, D., A. Broft and M. Laruelle (2000). "Pindolol augmentation of antidepressant treatment: recent contributions from brain imaging studies." *Biol Psychiatry* **48**(8): 844-853.
- Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." *PLoS Med* **3**(11): e442.
- Mathew, S. J., A. Shah, K. Lapidus, C. Clark, N. Jarun, B. Ostermeyer and J. W. Murrough (2012). "Ketamine for treatment-resistant unipolar depression: current evidence." *CNS Drugs* **26**(3): 189-204.
- Matuzany-Ruban, A., S. Avissar and G. Schreiber (2005). "Dynamics of beta-arrestin1 protein and mRNA levels elevation by antidepressants in mononuclear leukocytes of patients with depression." *J Affect Disord* **88**(3): 307-312.
- Mayberg, H. S., A. M. Lozano, V. Voon, H. E. McNeely, D. Seminowicz, C. Hamani, J. M. Schwalb and S. H. Kennedy (2005). "Deep brain stimulation for treatment-resistant depression." *Neuron* **45**(5): 651-660.
- Mayorga, A. J., A. Dalvi, M. E. Page, S. Zimov-Levinson, R. Hen and I. Lucki (2001). "Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice." *J Pharmacol Exp Ther* **298**(3): 1101-1107.
- McEwen, B. S., C. D. Conrad, Y. Kuroda, M. Frankfurt, A. M. Magarinos and C. McKittrick (1997). "Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences." *Eur Neuropsychopharmacol* **7 Suppl 3**: S323-328.
- McGirr, A. and M. T. Berlim (2014). "A comment on Fond and colleagues' systematic review and meta-analysis of ketamine in the treatment of depressive disorders (Psychopharmacology 2014; Jul 20 [Epub ahead of print])." *Psychopharmacology (Berl)* **231**(19): 3907-3908.
- Mendez-David, I., D. J. David, F. Darcet, M. V. Wu, S. Kerdine-Romer, A. M. Gardier and R. Hen (2014). "Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism." *Neuropsychopharmacology* **39**(6): 1366-1378.
- Mendez-David, I., Z. El-Ali, R. Hen, B. Falissard, E. Corruble, A. M. Gardier, S. Kerdine-Romer and D. J. David (2013). "A method for biomarker measurements in peripheral blood mononuclear cells isolated from anxious and depressed mice: beta-arrestin 1 protein levels in depression and treatment." *Front Pharmacol* **4**: 124.
- Mendez-David, I., L. Tritschler, Z. E. Ali, M. H. Damiens, M. Pallardy, D. J. David, S. Kerdine-Romer and A. M. Gardier (2015). "Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression." *Neurosci Lett* **597**: 121-126.
- Menza, M. A., K. R. Kaufman and A. Castellanos (2000). "Modafinil augmentation of antidepressant treatment in depression." *J Clin Psychiatry* **61**(5): 378-381.
- Merali, Z., L. Du, P. Hrdina, M. Palkovits, G. Faludi, M. O. Poulter and H. Anisman (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**(6): 1478-1485.
- Miller, B. R. and R. Hen (2015). "The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety." *Curr Opin Neurobiol* **30**: 51-58.

- Miller, M. D., E. J. Lenze, M. A. Dew, E. Whyte, E. Weber, A. E. Begley and C. F. Reynolds, 3rd (2002). "Effect of cerebrovascular risk factors on depression treatment outcome in later life." Am J Geriatr Psychiatry **10**(5): 592-598.
- Mineka, S., D. Watson and L. A. Clark (1998). "Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders." Annu Rev Psychol **49**: 377-412.
- Minelli, A., R. Zanardini, M. Abate, M. Bortolomasi, M. Gennarelli and L. Bocchio-Chiavetto (2011). "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) serum concentration during electroconvulsive therapy (ECT) in treatment resistant depressed patients." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(5): 1322-1325.
- Mineur, Y. S., D. J. Prasol, C. Belzung and W. E. Crusio (2003). "Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice." Behav Genet **33**(5): 513-519.
- Misquita, K., M. Basnar, Y. Nikolova and E. Sibille (2014). Light-induced anxiety-like behavior in the unpredictable chronic mild stress model in mice: a time-dependent trajectory based-approach. SFN 2014, Washington.
- Mitra, R. and R. M. Sapolsky (2008). "Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(14): 5573-5578.
- Molendijk, M. L., P. Spinhoven, M. Polak, B. A. Bus, B. W. Penninx and B. M. Elzinga (2014). "Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484)." Mol Psychiatry **19**(7): 791-800.
- Monje, M. L., H. Toda and T. D. Palmer (2003). "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis." Science **302**(5651): 1760-1765.
- Monteggia, L. M., B. Luikart, M. Barrot, D. Theobald, I. Malkovska, S. Nef, L. F. Parada and E. J. Nestler (2007). "Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors." Biol Psychiatry **61**(2): 187-197.
- Montgomery, S. A. and M. Asberg (1979). "A new depression scale designed to be sensitive to change." Br J Psychiatry **134**: 382-389.
- Montgomery, S. A., R. Z. Nielsen, L. H. Poulsen and L. Haggstrom (2014). "A randomised, double-blind study in adults with major depressive disorder with an inadequate response to a single course of selective serotonin reuptake inhibitor or serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor treatment switched to vortioxetine or agomelatine." Hum Psychopharmacol **29**(5): 470-482.
- Moreno, F. A., A. J. Gelenberg, K. Bachar and P. L. Delgado (1997). "Pindolol augmentation of treatment-resistant depressed patients." J Clin Psychiatry **58**(10): 437-439.
- Mrazek, D. A., J. M. Biernacka, D. J. O'Kane, J. L. Black, J. M. Cunningham, M. S. Drews, K. A. Snyder, S. R. Stevens, A. J. Rush and R. M. Weinshilboum (2011). "CYP2C19 variation and citalopram response." Pharmacogenet Genomics **21**(1): 1-9.
- Mrazek, D. A., J. C. Hornberger, C. A. Altar and I. Degtiar (2014). "A review of the clinical, economic, and societal burden of treatment-resistant depression: 1996-2013." Psychiatr Serv **65**(8): 977-987.
- Muller, J. M., E. Morelli, M. Ansorge and J. A. Gingrich (2011). "Serotonin transporter deficient mice are vulnerable to escape deficits following inescapable shocks." Genes Brain Behav **10**(2): 166-175.

- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1996). "Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study." Science **274**(5288): 740-743.
- Murray, F., D. W. Smith and P. H. Hutson (2008). "Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice." Eur J Pharmacol **583**(1): 115-127.
- Murrough, J. W., D. V. Iosifescu, L. C. Chang, R. K. Al Jurdi, C. E. Green, A. M. Perez, S. Iqbal, S. Pillemer, A. Foulkes, A. Shah, D. S. Charney and S. J. Mathew (2013). "Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial." Am J Psychiatry **170**(10): 1134-1142.
- Murrough, J. W., A. M. Perez, S. Pillemer, J. Stern, M. K. Parides, M. aan het Rot, K. A. Collins, S. J. Mathew, D. S. Charney and D. V. Iosifescu (2013). "Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression." Biol Psychiatry **74**(4): 250-256.
- Naish, J. H., R. C. Baldwin, T. Patankar, S. Jeffries, A. S. Burns, C. J. Taylor, J. C. Waterton and A. Jackson (2006). "Abnormalities of CSF flow patterns in the cerebral aqueduct in treatment-resistant late-life depression: a potential biomarker of microvascular angiopathy." Magn Reson Med **56**(3): 509-516.
- Nakagawa, S., J. E. Kim, R. Lee, J. E. Malberg, J. Chen, C. Steffen, Y. J. Zhang, E. J. Nestler and R. S. Duman (2002). "Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein." J Neurosci **22**(9): 3673-3682.
- National Collaborating Centre for Mental Health (Great Britain) and Royal College of Psychiatrists. (2010). Depression : the treatment and management of depression in adults. London, Royal College of Psychiatrists.
- Nelson, J. C. (2003). "Managing treatment-resistant major depression." J Clin Psychiatry **64 Suppl 1**: 5-12.
- Nelson, J. C. and G. I. Papakostas (2009). "Atypical antipsychotic augmentation in major depressive disorder: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials." Am J Psychiatry **166**(9): 980-991.
- Nestler, E. J. and S. E. Hyman (2010). "Animal models of neuropsychiatric disorders." Nat Neurosci **13**(10): 1161-1169.
- Nibuya, M., S. Morinobu and R. S. Duman (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." J Neurosci **15**(11): 7539-7547.
- Nierenberg, A. A. and J. D. Amsterdam (1990). "Treatment-resistant depression: definition and treatment approaches." J Clin Psychiatry **51 Suppl**: 39-47; discussion 48-50.
- Nierenberg, A. A., M. Fava, M. H. Trivedi, S. R. Wisniewski, M. E. Thase, P. J. McGrath, J. E. Alpert, D. Warden, J. F. Luther, G. Niederehe, B. Lebowitz, K. Shores-Wilson and A. J. Rush (2006). "A comparison of lithium and T(3) augmentation following two failed medication treatments for depression: a STAR*D report." Am J Psychiatry **163**(9): 1519-1530; quiz 1665.

- Nierenberg, A. A., N. E. McLean, J. E. Alpert, J. J. Worthington, J. F. Rosenbaum and M. Fava (1995). "Early nonresponse to fluoxetine as a predictor of poor 8-week outcome." Am J Psychiatry **152**(10): 1500-1503.
- Nierenberg, A. A., G. I. Papakostas, T. Petersen, K. E. Kelly, B. M. Iacoviello, J. J. Worthington, J. Tedlow, J. E. Alpert and M. Fava (2003). "Nortriptyline for treatment-resistant depression." J Clin Psychiatry **64**(1): 35-39.
- Nolen, W. A., P. M. Haffmans, P. F. Bouvy and H. J. Duivenvoorden (1993). "Hypnotics as concurrent medication in depression. A placebo-controlled, double-blind comparison of flunitrazepam and lormetazepam in patients with major depression, treated with a (tri)cyclic antidepressant." J Affect Disord **28**(3): 179-188.
- Nollet, M., P. Gaillard, A. Tanti, V. Girault, C. Belzung and S. Leman (2012). "Neurogenesis-independent antidepressant-like effects on behavior and stress axis response of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression." Neuropsychopharmacology **37**(10): 2210-2221.
- Nordanskog, P., M. R. Larsson, E. M. Larsson and A. Johanson (2014). "Hippocampal volume in relation to clinical and cognitive outcome after electroconvulsive therapy in depression." Acta Psychiatr Scand **129**(4): 303-311.
- Nutt, D. J., J. R. Davidson, A. J. Gelenberg, T. Higuchi, S. Kanba, O. Karamustafalioglu, G. I. Papakostas, K. Sakamoto, T. Terao and M. Zhang (2010). "International consensus statement on major depressive disorder." J Clin Psychiatry **71 Suppl E1**: e08.
- O'Brien, S. M., P. Scully, P. Fitzgerald, L. V. Scott and T. G. Dinan (2007). "Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy." J Psychiatr Res **41**(3-4): 326-331.
- O'Leary, O. F. and J. F. Cryan (2013). "Towards translational rodent models of depression." Cell Tissue Res **354**(1): 141-153.
- Oh, Y. S., P. Gao, K. W. Lee, I. Ceglia, J. S. Seo, X. Zhang, J. H. Ahn, B. T. Chait, D. J. Patel, Y. Kim and P. Greengard (2013). "SMARCA3, a chromatin-remodeling factor, is required for p11-dependent antidepressant action." Cell **152**(4): 831-843.
- Olin, B., A. K. Jayewardene, M. Bunker and F. Moreno (2012). "Mortality and suicide risk in treatment-resistant depression: an observational study of the long-term impact of intervention." PLoS One **7**(10): e48002.
- Oomen, C. A., H. Soeters, N. Audureau, L. Vermunt, F. N. van Hasselt, E. M. Manders, M. Joels, P. J. Lucassen and H. Krugers (2010). "Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood." J Neurosci **30**(19): 6635-6645.
- Oquendo, M. A., K. M. Malone, S. P. Ellis, H. A. Sackeim and J. J. Mann (1999). "Inadequacy of antidepressant treatment for patients with major depression who are at risk for suicidal behavior." Am J Psychiatry **156**(2): 190-194.
- Oresic, M., Z. Yu, G. Kastenmüller, Y. He, P. Belcredi, G. Möller, C. Prehn, J. Mendes, S. Wahl, W. Roemisch-Margl, U. Ceglarek, A. Polonikov, N. Dahmen, H. Prokisch, L. Xie, Y. Li, H. E. Wichmann, A.

- Peters, F. Kronenberg, K. Suhre, J. Adamski, T. Illig and R. Wang-Sattler (2011). "Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles." PLoS ONE **6**(7): e21230.
- Ostroff, R. B. and J. C. Nelson (1999). "Risperidone augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in major depression." J Clin Psychiatry **60**(4): 256-259.
- Owens, M., J. Herbert, P. B. Jones, B. J. Sahakian, P. O. Wilkinson, V. J. Dunn, T. J. Croudace and I. M. Goodyer (2014). "Elevated morning cortisol is a stratified population-level biomarker for major depression in boys only with high depressive symptoms." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(9): 3638-3643.
- Palanza, P. (2001). "Animal models of anxiety and depression: how are females different?" Neurosci Biobehav Rev **25**(3): 219-233.
- Pampallona, S., P. Bollini, G. Tibaldi, B. Kupelnick and C. Munizza (2004). "Combined pharmacotherapy and psychological treatment for depression: a systematic review." Arch Gen Psychiatry **61**(7): 714-719.
- Pandey, G. N., Y. Dwivedi, H. S. Rizavi, X. Ren, H. Zhang and M. N. Pavuluri (2010). "Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **34**(4): 645-651.
- Papakostas, G. I., M. Fava and M. E. Thase (2008). "Treatment of SSRI-resistant depression: a meta-analysis comparing within- versus across-class switches." Biol Psychiatry **63**(7): 699-704.
- Papakostas, G. I., R. C. Shelton, G. Kinrys, M. E. Henry, B. R. Bakow, S. H. Lipkin, B. Pi, L. Thurmond and J. A. Bilello (2013). "Assessment of a multi-assay, serum-based biological diagnostic test for major depressive disorder: a pilot and replication study." Mol Psychiatry **18**(3): 332-339.
- Parruti, G., F. Peracchia, M. Sallese, G. Ambrosini, M. Masini, D. Rotilio and A. De Blasi (1993). "Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing." J Biol Chem **268**(13): 9753-9761.
- Patkar, A. A. and C. U. Pae (2013). "Atypical antipsychotic augmentation strategies in the context of guideline-based care for the treatment of major depressive disorder." CNS Drugs **27 Suppl 1**: S29-37.
- Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2013). Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam, Elsevier/AP.
- Pego, J. M., P. Morgado, L. G. Pinto, J. J. Cerqueira, O. F. Almeida and N. Sousa (2008). "Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear." Eur J Neurosci **27**(6): 1503-1516.
- Pellow, S. and S. E. File (1986). "Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat." Pharmacol Biochem Behav **24**(3): 525-529.
- Perez, V., D. Puiigdemont, I. Gilaberte, E. Alvarez, F. Artigas and A. Grup de Recerca en Trastorns (2001). "Augmentation of fluoxetine's antidepressant action by pindolol: analysis of clinical, pharmacokinetic, and methodologic factors." J Clin Psychopharmacol **21**(1): 36-45.
- Pérez-Wehbe, A. I., L. Perestelo-Pérez, J. M. Bethencourt-Pérez, L. Cuéllar-Pompa and W. Peñate-Castro (2014). "Treatment-resistant depression: A systematic review of systematic reviews." International Journal of Clinical and Health Psychology **14**(2): 145-153.

- Perry, E. B., R. M. Berman, G. Sanacora, A. Anand, K. Lynch-Colonese and D. S. Charney (2004). "Pindolol augmentation in depressed patients resistant to selective serotonin reuptake inhibitors: a double-blind, randomized, controlled trial." J Clin Psychiatry **65**(2): 238-243.
- Perry, E. B., Jr., J. A. Cramer, H. S. Cho, I. L. Petrakis, L. P. Karper, A. Genovese, E. O'Donnell, J. H. Krystal, D. C. D'Souza and G. Yale Ketamine Study (2007). "Psychiatric safety of ketamine in psychopharmacology research." Psychopharmacology (Berl) **192**(2): 253-260.
- Perugi, G., L. Musetti, E. Simonini, F. Piagentini, G. B. Cassano and H. S. Akiskal (1990). "Gender-mediated clinical features of depressive illness. The importance of temperamental differences." Br J Psychiatry **157**: 835-841.
- Pfister, C., M. Chabre, J. Plouet, V. V. Tuyen, Y. De Kozak, J. P. Faure and H. Kuhn (1985). "Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods." Science **228**(4701): 891-893.
- Philip, N. S., L. L. Carpenter, A. R. Tyrka and L. H. Price (2010). "Pharmacologic approaches to treatment resistant depression: a re-examination for the modern era." Expert Opin Pharmacother **11**(5): 709-722.
- Pittenger, C. and R. S. Duman (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." Neuropsychopharmacology **33**(1): 88-109.
- Pothion, S., J. C. Bizot, F. Trovero and C. Belzung (2004). "Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress." Behav Brain Res **155**(1): 135-146.
- Prange, A. J., Jr., I. C. Wilson, A. M. Rabon and M. A. Lipton (1969). "Enhancement of imipramine antidepressant activity by thyroid hormone." Am J Psychiatry **126**(4): 457-469.
- Price, A., L. Rayner, E. Okon-Rocha, A. Evans, K. Valsraj, I. J. Higginson and M. Hotopf (2011). "Antidepressants for the treatment of depression in neurological disorders: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(8): 914-923.
- Prut, L. and C. Belzung (2003). "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 3-33.
- Quesseveur, G., D. J. David, M. C. Gaillard, P. Pla, M. V. Wu, H. T. Nguyen, V. Nicolas, G. Auregan, I. David, A. Dranovsky, P. Hantraye, R. Hen, A. M. Gardier, N. Deglon and B. P. Guiard (2013). "BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities." Transl Psychiatry **3**: e253.
- Rainer, Q., L. Xia, J. P. Guilloux, C. Gabriel, E. Mocaer, R. Hen, E. Enhamre, A. M. Gardier and D. J. David (2012). "Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety." Int J Neuropsychopharmacol **15**(3): 321-335.
- Raison, C. L., R. E. Rutherford, B. J. Woolwine, C. Shuo, P. Schettler, D. F. Drake, E. Haroon and A. H. Miller (2013). "A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers." JAMA Psychiatry **70**(1): 31-41.
- Ramasubbu, R., S. Beaulieu, V. H. Taylor, A. Schaffer, R. S. McIntyre, M. Canadian Network for and F. Anxiety Treatments Task (2012). "The CANMAT task force recommendations for the management of

- patients with mood disorders and comorbid medical conditions: diagnostic, assessment, and treatment principles." *Ann Clin Psychiatry* **24**(1): 82-90.
- Ramboz, S., R. Oosting, D. A. Amara, H. F. Kung, P. Blier, M. Mendelsohn, J. J. Mann, D. Brunner and R. Hen (1998). "Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14476-14481.
- Rao, P., E. Benito and A. Fischer (2013). "MicroRNAs as biomarkers for CNS disease." *Frontiers in Molecular Neuroscience* **6**.
- Ridder, S., S. Chourbaji, R. Hellweg, A. Urani, C. Zacher, W. Schmid, M. Zink, H. Hortaogl, H. Flor, F. A. Henn, G. Schutz and P. Gass (2005). "Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions." *J Neurosci* **25**(26): 6243-6250.
- Riso, L. P., M. E. Thase, R. H. Howland, E. S. Friedman, A. D. Simons and X. M. Tu (1997). "A prospective test of criteria for response, remission, relapse, recovery, and recurrence in depressed patients treated with cognitive behavior therapy." *J Affect Disord* **43**(2): 131-142.
- Rocha, R. B., E. R. Dondossola, A. J. Grande, T. Colonetti, L. B. Ceretta, I. C. Passos, J. Quevedo and M. I. da Rosa (2016). "Increased BDNF levels after electroconvulsive therapy in patients with major depressive disorder: A meta-analysis study." *J Psychiatr Res* **83**: 47-53.
- Rollins, B., M. V. Martin, L. Morgan and M. P. Vawter (2010). "Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(4): 919-936.
- Ruhe, H. G., J. Huyser, J. A. Swinkels and A. H. Schene (2006). "Switching antidepressants after a first selective serotonin reuptake inhibitor in major depressive disorder: a systematic review." *J Clin Psychiatry* **67**(12): 1836-1855.
- Ruhe, H. G., G. van Rooijen, J. Spijker, F. P. Peeters and A. H. Schene (2012). "Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review." *J Affect Disord* **137**(1-3): 35-45.
- Rush, A. J., M. H. Trivedi, S. R. Wisniewski, A. A. Nierenberg, J. W. Stewart, D. Warden, G. Niederehe, M. E. Thase, P. W. Lavori, B. D. Lebowitz, P. J. McGrath, J. F. Rosenbaum, H. A. Sackeim, D. J. Kupfer, J. Luther and M. Fava (2006). "Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report." *Am J Psychiatry* **163**(11): 1905-1917.
- Rush, A. J., S. R. Wisniewski, D. Warden, J. F. Luther, L. L. Davis, M. Fava, A. A. Nierenberg and M. H. Trivedi (2008). "Selecting among second-step antidepressant medication monotherapies: predictive value of clinical, demographic, or first-step treatment features." *Arch Gen Psychiatry* **65**(8): 870-880.
- Saarelainen, T., P. Hendolin, G. Lucas, E. Koponen, M. Sairanen, E. MacDonald, K. Agerman, A. Haapasalo, H. Nawa, R. Aloyz, P. Ernfors and E. Castren (2003). "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." *J Neurosci* **23**(1): 349-357.
- Sackeim, H. A., J. Prudic, D. P. Devanand, P. Decina, B. Kerr and S. Malitz (1990). "The impact of medication resistance and continuation pharmacotherapy on relapse following response to electroconvulsive therapy in major depression." *J Clin Psychopharmacol* **10**(2): 96-104.
- Sahay, A., K. N. Scobie, A. S. Hill, C. M. O'Carroll, M. A. Kheirbek, N. S. Burghardt, A. A. Fenton, A. Dranovsky and R. Hen (2011). "Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation." *Nature* **472**(7344): 466-470.

- Samuels, B. A., E. D. Leonardo, R. Gadiant, A. Williams, J. Zhou, D. J. David, A. M. Gardier, E. H. Wong and R. Hen (2011). "Modeling treatment-resistant depression." *Neuropharmacology* **61**(3): 408-413.
- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* **301**(5634): 805-809.
- Sartori, S. B., M. Hauschild, M. Bunck, S. Gaburro, R. Landgraf and N. Singewald (2011). "Enhanced fear expression in a psychopathological mouse model of trait anxiety: pharmacological interventions." *PLoS One* **6**(2): e16849.
- Sartorius, A., M. M. Mahlstedt, B. Vollmayr, F. A. Henn and G. Ende (2007). "Elevated spectroscopic glutamate/gamma-amino butyric acid in rats bred for learned helplessness." *Neuroreport* **18**(14): 1469-1473.
- Scherrer, J. F., T. Chrusciel, L. D. Garfield, K. E. Freedland, R. M. Carney, P. J. Hauptman, K. K. Bucholz, R. Owen and P. J. Lustman (2012). "Treatment-resistant and insufficiently treated depression and all-cause mortality following myocardial infarction." *Br J Psychiatry* **200**(2): 137-142.
- Schloesser, R. J., S. Orvoen, D. V. Jimenez, N. F. Hardy, K. R. Maynard, M. Sukumar, H. K. Manji, A. M. Gardier, D. J. David and K. Martinowich (2015). "Antidepressant-like Effects of Electroconvulsive Seizures Require Adult Neurogenesis in a Neuroendocrine Model of Depression." *Brain Stimul* **8**(5): 862-867.
- Schmidt, M. V., S. H. Scharf, C. Liebl, D. Harbich, B. Mayer, F. Holsboer and M. B. Muller (2010). "A novel chronic social stress paradigm in female mice." *Horm Behav* **57**(4-5): 415-420.
- Schmuckermair, C., S. Gaburro, A. Sah, R. Landgraf, S. B. Sartori and N. Singewald (2013). "Behavioral and neurobiological effects of deep brain stimulation in a mouse model of high anxiety- and depression-like behavior." *Neuropsychopharmacology* **38**(7): 1234-1244.
- Schramm, N. L., M. P. McDonald and L. E. Limbird (2001). "The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety." *J Neurosci* **21**(13): 4875-4882.
- Schreiber, G., M. Golan and S. Avissar (2009). "Beta-arrestin signaling complex as a target for antidepressants and as a depression marker." *Drug News Perspect* **22**(8): 467-480.
- Schuch, J. J., A. M. Roest, W. A. Nolen, B. W. Penninx and P. de Jonge (2014). "Gender differences in major depressive disorder: results from the Netherlands study of depression and anxiety." *J Affect Disord* **156**: 156-163.
- Segev, I. and M. London (2000). "Untangling dendrites with quantitative models." *Science* **290**(5492): 744-750.
- Seib, L. M. and C. L. Wellman (2003). "Daily injections alter spine density in rat medial prefrontal cortex." *Neurosci Lett* **337**(1): 29-32.
- Sen, S., R. Duman and G. Sanacora (2008). "Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications." *Biol Psychiatry* **64**(6): 527-532.
- Seth, R., A. L. Jennings, J. Bindman, J. Phillips and K. Bergmann (1992). "Combination treatment with noradrenalin and serotonin reuptake inhibitors in resistant depression." *Br J Psychiatry* **161**: 562-565.

- Shah, P. J., K. P. Ebmeier, M. F. Glabus and G. M. Goodwin (1998). "Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study." Br J Psychiatry **172**: 527-532.
- Shansky, R. M. and C. S. Woolley (2016). "Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research." J Neurosci **36**(47): 11817-11822.
- Shapira-Lichter, I., B. Beilin, K. Ofek, H. Bessler, M. Gruberger, Y. Shavit, D. Seror, G. Grinevich, E. Posner, A. Reichenberg, H. Soreq and R. Yirmiya (2008). "Cytokines and cholinergic signals co-modulate surgical stress-induced changes in mood and memory." Brain Behav Immun **22**(3): 388-398.
- Sheline, Y. I., M. H. Gado and H. C. Kraemer (2003). "Untreated depression and hippocampal volume loss." Am J Psychiatry **160**(8): 1516-1518.
- Sheline, Y. I., B. L. Mittler and M. A. Mintun (2002). "The hippocampus and depression." Eur Psychiatry **17 Suppl 3**: 300-305.
- Sheline, Y. I., M. Sanghavi, M. A. Mintun and M. H. Gado (1999). "Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression." J Neurosci **19**(12): 5034-5043.
- Shelton, R. C., O. Osuntokun, A. N. Heinloth and S. A. Corya (2010). "Therapeutic options for treatment-resistant depression." CNS Drugs **24**(2): 131-161.
- Shelton, R. C., G. D. Tollefson, M. Tohen, S. Stahl, K. S. Gannon, T. G. Jacobs, W. R. Buras, F. P. Bymaster, W. Zhang, K. A. Spencer, P. D. Feldman and H. Y. Meltzer (2001). "A novel augmentation strategy for treating resistant major depression." Am J Psychiatry **158**(1): 131-134.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2011). "beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction." Trends Pharmacol Sci **32**(9): 521-533.
- Shiroma, P. R., B. Johns, M. Kuskowski, J. Wels, P. Thuras, C. S. Albott and K. O. Lim (2014). "Augmentation of response and remission to serial intravenous subanesthetic ketamine in treatment resistant depression." J Affect Disord **155**: 123-129.
- Shukla, A. K., A. Manglik, A. C. Kruse, K. Xiao, R. I. Reis, W. C. Tseng, D. P. Staus, D. Hilger, S. Uysal, L. Y. Huang, M. Paduch, P. Tripathi-Shukla, A. Koide, S. Koide, W. I. Weis, A. A. Kossiakoff, B. K. Kobilka and R. J. Lefkowitz (2013). "Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide." Nature **497**(7447): 137-141.
- Silverstein, B. (2002). "Gender differences in the prevalence of somatic versus pure depression: a replication." Am J Psychiatry **159**(6): 1051-1052.
- Simpson, S., R. C. Baldwin, A. Jackson and A. S. Burns (1998). "Is subcortical disease associated with a poor response to antidepressants? Neurological, neuropsychological and neuroradiological findings in late-life depression." Psychol Med **28**(5): 1015-1026.
- Siopi, E., M. Denizet, M. M. Gabellec, F. de Chaumont, J. C. Olivo-Marin, J. P. Guilloux, P. M. Lledo and F. Lazarini (2016). "Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice." J Neurosci **36**(2): 518-531.

- Smith, D. F. (2013). "Quest for biomarkers of treatment-resistant depression: shifting the paradigm toward risk." Front Psychiatry **4**: 57.
- Smith, D. F., B. S. Stork, G. Wegener, M. Ashkanian, S. Jakobsen, D. Bender, H. Audrain, K. H. Vase, S. B. Hansen, P. Videbech and R. Rosenberg (2009). "[11C]Mirtazapine binding in depressed antidepressant nonresponders studied by PET neuroimaging." Psychopharmacology (Berl) **206**(1): 133-140.
- Smith, W. T., P. D. Lundborg, V. Glaudin, J. R. Painter and N. Summit Research (2002). "Is extended clonazepam cotherapy of fluoxetine effective for outpatients with major depression?" J Affect Disord **70**(3): 251-259.
- Sotsky, S. M., D. R. Glass, M. T. Shea, P. A. Pilkonis, J. F. Collins, I. Elkin, J. T. Watkins, S. D. Imber, W. R. Leber, J. Moyer and et al. (1991). "Patient predictors of response to psychotherapy and pharmacotherapy: findings in the NIMH Treatment of Depression Collaborative Research Program." Am J Psychiatry **148**(8): 997-1008.
- Souery, D., J. Amsterdam, C. de Montigny, Y. Lecrubier, S. Montgomery, O. Lipp, G. Racagni, J. Zohar and J. Mendlewicz (1999). "Treatment resistant depression: methodological overview and operational criteria." Eur Neuropsychopharmacol **9**(1-2): 83-91.
- Souery, D., P. Oswald, I. Massat, U. Bailer, J. Bollen, K. Demyttenaere, S. Kasper, Y. Lecrubier, S. Montgomery, A. Serretti, J. Zohar, J. Mendlewicz and D. Group for the Study of Resistant (2007). "Clinical factors associated with treatment resistance in major depressive disorder: results from a European multicenter study." J Clin Psychiatry **68**(7): 1062-1070.
- Souery, D., G. I. Papakostas and M. H. Trivedi (2006). "Treatment-resistant depression." J Clin Psychiatry **67 Suppl 6**: 16-22.
- Southwick, S. M., M. Vythilingam and D. S. Charney (2005). "The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment." Annu Rev Clin Psychol **1**: 255-291.
- Spalding, K. L., O. Bergmann, K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, H. B. Huttner, E. Bostrom, I. Westerlund, C. Vial, B. A. Buchholz, G. Possnert, D. C. Mash, H. Druid and J. Frisen (2013). "Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans." Cell **153**(6): 1219-1227.
- Steen, N. E., P. Methlie, S. Lorentzen, I. Dieset, M. Aas, M. Nerhus, M. Haram, I. Agartz, I. Melle, J. P. Berg and O. A. Andreassen (2014). "Altered systemic cortisol metabolism in bipolar disorder and schizophrenia spectrum disorders." J Psychiatr Res **52**: 57-62.
- Steptoe, A., M. Hamer and Y. Chida (2007). "The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis." Brain Behav Immun **21**(7): 901-912.
- Stetler, C. and G. E. Miller (2011). "Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research." Psychosom Med **73**(2): 114-126.
- Sugimoto, Y., Y. Kajiwara, K. Hirano, S. Yamada, N. Tagawa, Y. Kobayashi, Y. Hotta and J. Yamada (2008). "Mouse strain differences in immobility and sensitivity to fluvoxamine and desipramine in the forced swimming test: analysis of serotonin and noradrenaline transporter binding." Eur J Pharmacol **592**(1-3): 116-122.

- Sugimoto, Y., M. Yamamoto, N. Tagawa, Y. Kobayashi, K. Mitsui-Saitoh, Y. Hotta and J. Yamada (2011). "Differences between mice strains in response to paroxetine in the forced swimming test: involvement of serotonergic or noradrenergic systems." Eur J Pharmacol **672**(1-3): 121-125.
- Sukoff Rizzo, S. J., S. J. Neal, Z. A. Hughes, M. Beyna, S. Rosenzweig-Lipson, S. J. Moss and N. J. Brandon (2012). "Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes." Transl Psychiatry **2**: e199.
- Sullivan, P. F., C. Fan and C. M. Perou (2006). "Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141B**(3): 261-268.
- Surget, A., M. Saxe, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, S. Chalon, G. Griebel, R. Hen and C. Belzung (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." Biol Psychiatry **64**(4): 293-301.
- Surget, A., A. Tanti, E. D. Leonardo, A. Laugeray, Q. Rainer, C. Touma, R. Palme, G. Griebel, Y. Ibarguen-Vargas, R. Hen and C. Belzung (2011). "Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation." Mol Psychiatry **16**(12): 1177-1188.
- Svenningsson, P., K. Chergui, I. Rachleff, M. Flajolet, X. Zhang, M. El Yacoubi, J. M. Vaugeois, G. G. Nomikos and P. Greengard (2006). "Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states." Science **311**(5757): 77-80.
- Tammiste, A., T. Jiang, K. Fischer, R. Magi, K. Krjutskov, K. Pettai, T. Esko, Y. Li, K. E. Tansey, L. S. Carroll, R. Uher, P. McGuffin, U. Vosa, N. Tsernikova, A. Saria, P. C. Ng, T. Eller, V. Vasar, D. J. Nutt, E. Maron, J. Wang and A. Metspalu (2013). "Whole-exome sequencing identifies a polymorphism in the BMP5 gene associated with SSRI treatment response in major depression." J Psychopharmacol **27**(10): 915-920.
- Tanti, A. and C. Belzung (2013). "Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific?" Neuroscience **252**: 234-252.
- Tedeschini, E., Y. Levkovitz, N. Iovieno, V. E. Ameral, J. C. Nelson and G. I. Papakostas (2011). "Efficacy of antidepressants for late-life depression: a meta-analysis and meta-regression of placebo-controlled randomized trials." J Clin Psychiatry **72**(12): 1660-1668.
- ter Horst, J. P., E. R. de Kloet, H. Schachinger and M. S. Oitzl (2012). "Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition." Cell Mol Neurobiol **32**(5): 725-735.
- Thase, M. E. (2014). "Using biomarkers to predict treatment response in major depressive disorder: evidence from past and present studies." Dialogues Clin Neurosci **16**(4): 539-544.
- Thase, M. E. and A. J. Rush (1997). "When at first you don't succeed: sequential strategies for antidepressant nonresponders." J Clin Psychiatry **58 Suppl 13**: 23-29.
- Thase, M. E., A. J. Rush, R. H. Howland, S. G. Kornstein, J. H. Kocsis, A. J. Gelenberg, A. F. Schatzberg, L. M. Koran, M. B. Keller, J. M. Russell, R. M. Hirschfeld, L. M. LaVange, D. N. Klein, J. Fawcett and W. Harrison (2002). "Double-blind switch study of imipramine or sertraline treatment of antidepressant-resistant chronic depression." Arch Gen Psychiatry **59**(3): 233-239.
- Thase, M. E., M. H. Trivedi, J. C. Nelson, M. Fava, R. Swanink, Q. V. Tran, A. Pikalov, H. Yang, B. X. Carlson, R. N. Marcus and R. M. Berman (2008). "Examining the efficacy of adjunctive aripiprazole in

- major depressive disorder: a pooled analysis of 2 studies." Prim Care Companion J Clin Psychiatry **10**(6): 440-447.
- Thase, M. E., M. H. Trivedi and A. J. Rush (1995). "MAOIs in the contemporary treatment of depression." Neuropsychopharmacology **12**(3): 185-219.
- Thiels, C., M. Linden, F. Grieger and J. Leonard (2005). "Gender differences in routine treatment of depressed outpatients with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline." Int Clin Psychopharmacol **20**(1): 1-7.
- Trillat, A. C., I. Malagie, M. Bourin, C. Jacquot, R. Hen and A. M. Gardier (1998). "[Homozygote mice deficient in serotonin 5-HT1B receptor and antidepressant effect of selective serotonin reuptake inhibitors]." C R Seances Soc Biol Fil **192**(6): 1139-1147.
- Tripp, A., H. Oh, J. P. Guilloux, K. Martinowich, D. A. Lewis and E. Sibille (2012). "Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder." Am J Psychiatry **169**(11): 1194-1202.
- Tritschler, L., D. Felice, R. Colle, J. P. Guilloux, E. Corruble, A. M. Gardier and D. J. David (2014). "Vortioxetine for the treatment of major depressive disorder." Expert Rev Clin Pharmacol **7**(6): 731-745.
- Trivedi, M. H., M. Fava, S. R. Wisniewski, M. E. Thase, F. Quitkin, D. Warden, L. Ritz, A. A. Nierenberg, B. D. Lebowitz, M. M. Biggs, J. F. Luther, K. Shores-Wilson, A. J. Rush and S. D. S. Team (2006). "Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression." N Engl J Med **354**(12): 1243-1252.
- Trivedi, M. H., P. J. McGrath, M. Fava, R. V. Parsey, B. T. Kurian, M. L. Phillips, M. A. Oquendo, G. Bruder, D. Pizzagalli, M. Toups, C. Cooper, P. Adams, S. Weyandt, D. W. Morris, B. D. Grannemann, R. T. Ogden, R. Buckner, M. McInnis, H. C. Kraemer, E. Petkova, T. J. Carmody and M. M. Weissman (2016). "Establishing moderators and biosignatures of antidepressant response in clinical care (EMBARC): Rationale and design." J Psychiatr Res **78**: 11-23.
- Trivedi, M. H., A. J. Rush, S. R. Wisniewski, A. A. Nierenberg, D. Warden, L. Ritz, G. Norquist, R. H. Howland, B. Lebowitz, P. J. McGrath, K. Shores-Wilson, M. M. Biggs, G. K. Balasubramani, M. Fava and S. D. S. Team (2006). "Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice." Am J Psychiatry **163**(1): 28-40.
- Tundo, A., R. de Filippis and L. Proietti (2015). "Pharmacologic approaches to treatment resistant depression: Evidences and personal experience." World J Psychiatry **5**(3): 330-341.
- Uher, R., R. H. Perlis, N. Henigsberg, A. Zobel, M. Rietschel, O. Mors, J. Hauser, M. Z. Dernovsek, D. Souery, M. Bajs, W. Maier, K. J. Aitchison, A. Farmer and P. McGuffin (2012). "Depression symptom dimensions as predictors of antidepressant treatment outcome: replicable evidence for interest-activity symptoms." Psychol Med **42**(5): 967-980.
- van Waarde, J. A., H. S. Scholte, L. J. van Oudheusden, B. Verwey, D. Denys and G. A. van Wingen (2015). "A functional MRI marker may predict the outcome of electroconvulsive therapy in severe and treatment-resistant depression." Mol Psychiatry **20**(5): 609-614.
- Viau, V. (2002). "Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes." J Neuroendocrinol **14**(6): 506-513.

- Vinkers, C. H., L. Groenink, T. Pattij, B. Olivier and J. A. Bouwknecht (2011). "5-HT(1A) receptor sensitivity in 5-HT(1B) receptor KO mice is unaffected by chronic fluvoxamine treatment." Eur J Pharmacol **667**(1-3): 250-257.
- Violin, J. D. and R. J. Lefkowitz (2007). "Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 416-422.
- Wade, T. J., J. Cairney and D. J. Pevalin (2002). "Emergence of gender differences in depression during adolescence: national panel results from three countries." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **41**(2): 190-198.
- Walker, A. J., S. A. Burnett, K. Hasebe, J. A. McGillivray, L. J. Gray, S. L. McGee, K. Walder, M. Berk and S. J. Tye (2013). "Chronic adrenocorticotrophic hormone treatment alters tricyclic antidepressant efficacy and prefrontal monoamine tissue levels." Behav Brain Res **242**: 76-83.
- Wang, H., J. Warner-Schmidt, S. Varela, G. Enikolopov, P. Greengard and M. Flajolet (2015). "Norbin ablation results in defective adult hippocampal neurogenesis and depressive-like behavior in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(31): 9745-9750.
- Wang, J. W., D. J. David, J. E. Monckton, F. Battaglia and R. Hen (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." J Neurosci **28**(6): 1374-1384.
- Wang, Y., T. Chang, Y. C. Chen, R. G. Zhang, H. N. Wang, W. J. Wu, Z. W. Peng and Q. R. Tan (2013). "Quetiapine add-on therapy improves the depressive behaviors and hippocampal neurogenesis in fluoxetine treatment resistant depressive rats." Behav Brain Res **253**: 206-211.
- Wang, Y., X. L. Cui, Y. F. Liu, F. Gao, D. Wei, X. W. Li, H. N. Wang, Q. R. Tan and W. Jiang (2011). "LPS inhibits the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal neurogenesis in rats." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(8): 1831-1835.
- Watanabe, Y., E. Gould, H. A. Cameron, D. C. Daniels and B. S. McEwen (1992). "Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons." Hippocampus **2**(4): 431-435.
- Waterhouse, E. G., J. J. An, L. L. Orefice, M. Baydyuk, G. Y. Liao, K. Zheng, B. Lu and B. Xu (2012). "BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission." J Neurosci **32**(41): 14318-14330.
- Whiteford, H. A., M. G. Harris, G. McKeon, A. Baxter, C. Pennell, J. J. Barendregt and J. Wang (2013). "Estimating remission from untreated major depression: a systematic review and meta-analysis." Psychol Med **43**(8): 1569-1585.
- Willner, P. (1984). "The validity of animal models of depression." Psychopharmacology (Berl) **83**(1): 1-16.
- Willner, P. (2005). "Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS." Neuropsychobiology **52**(2): 90-110.
- Willner, P. and C. Belzung (2015). "Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose?" Psychopharmacology (Berl) **232**(19): 3473-3495.

- Witt, S. H., W. H. Sommer, A. C. Hansson, C. Sticht, M. Rietschel and C. C. Witt (2013). "Comparison of gene expression profiles in the blood, hippocampus and prefrontal cortex of rats." In Silico Pharmacol **1**: 15.
- Wood, G. E., L. T. Young, L. P. Reagan, B. Chen and B. S. McEwen (2004). "Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3973-3978.
- Wu, N., L. Song, X. Yang, W. Yuan and Z. Liu (2013). "NMDA receptor regulation of levodopa-induced behavior and changes in striatal G protein-coupled receptor kinase 6 and beta-arrestin-1 expression in parkinsonian rats." Clin Interv Aging **8**: 347-352.
- Xia, L., C. Delomenie, I. David, Q. Rainer, M. Marouard, H. Delacroix, D. J. David, A. M. Gardier and J. P. Guilloux (2012). "Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1)A and 5-HT(1)B receptors disruption in mice." Neurosci Lett **521**(1): 20-25.
- Xie, C., W. Li, G. Chen, B. D. Ward, M. B. Franczak, J. L. Jones, P. G. Antuono, S. J. Li and J. S. Goveas (2013). "Late-life depression, mild cognitive impairment and hippocampal functional network architecture." Neuroimage Clin **3**: 311-320.
- Yang, J. J., N. Wang, C. Yang, J. Y. Shi, H. Y. Yu and K. Hashimoto (2015). "Serum interleukin-6 is a predictive biomarker for ketamine's antidepressant effect in treatment-resistant patients with major depression." Biol Psychiatry **77**(3): e19-20.
- Yoshimura, R., T. Kishi, H. Hori, A. Ikenouchi-Sugita, A. Katsuki, W. Umene-Nakano, N. Iwata and J. Nakamura (2012). "Comparison of the efficacy between paroxetine and sertraline augmented with aripiprazole in patients with refractory major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **39**(2): 355-357.
- Young, A. S., R. Klap, R. Shoaib and K. B. Wells (2008). "Persistent depression and anxiety in the United States: prevalence and quality of care." Psychiatr Serv **59**(12): 1391-1398.
- Young, E. A. (1998). "Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease." J Genet Specif Med **1**(1): 21-27.
- Yu, H., D. D. Wang, Y. Wang, T. Liu, F. S. Lee and Z. Y. Chen (2012). "Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism alters vulnerability to stress and response to antidepressants." J Neurosci **32**(12): 4092-4101.
- Yun, S., R. P. Reynolds, I. Masiulis and A. J. Eisch (2016). "Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis." Nat Med **22**(11): 1239-1247.
- Zarate, C. A., Jr., J. B. Singh, P. J. Carlson, N. E. Brutsche, R. Ameli, D. A. Luckenbaugh, D. S. Charney and H. K. Manji (2006). "A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression." Arch Gen Psychiatry **63**(8): 856-864.
- Zarate, C. A., J. C. Kando, M. Tohen, M. K. Weiss and J. O. Cole (1996). "Does intolerance or lack of response with fluoxetine predict the same will happen with sertraline?" J Clin Psychiatry **57**(2): 67-71.
- Zhang, J., M. V. Mathis, J. W. Sellers, G. Kordachia, A. J. Jackson, A. Dow, P. Yang, L. Fossom, H. Zhu, H. Patel, E. F. Unger and R. J. Temple (2015). "The US Food and Drug Administration's perspective on the new antidepressant vortioxetine." J Clin Psychiatry **76**(1): 8-14.

Zou, Y. F., D. Q. Ye, X. L. Feng, H. Su, F. M. Pan and F. F. Liao (2010). "Meta-analysis of BDNF Val66Met polymorphism association with treatment response in patients with major depressive disorder." Eur Neuropsychopharmacol **20**(8): 535-544.

ARTICLES ANNEXES SANS RELATION AVEC LE SUJET DE RECHERCHE

9 ARTICLES ANNEXES SANS RELATION AVEC LE SUJET DE THESE

9.1 Article annexe n°1

S 38093, a histamine H3 antagonist/inverse agonist, promotes hippocampal neurogenesis and improves context discrimination task in aged mice.

Jean-Philippe Guilloux, Benjamin A Samuels, Indira Mendez-David, Alice Hu, Marjorie Levinstein, Charlène Faye, **Maryam Mekiri**, Elisabeth Mocaer, Alain M Gardier, René Hen, Aurore Sors, Denis J David

9.2 Article annexe n°2

Aging and Corticosterone differently affect gene expression in the dentate gyrus

Jean-Philippe Guilloux, Daniela Felice, Alan Pehrson, Yan Li, Indira Mendez-David, Julie Doan, **Maryam Mekiri**, Alain M Gardier, Connie Sanchez, Denis J David

QUERY FORM

SREP	
Manuscript ID	[Art. Id: srep42946]

Journal: SREP

Author:- The following queries have arisen during the editing of your manuscript. Please answer queries by making the requisite corrections at the appropriate positions in the text.

Query No.	Description	Author's Response
	Author surnames have been highlighted – please check these carefully and indicate if the first name or surname have been marked up incorrectly. Please note that this will affect indexing of your article, such as in PubMed. Please check and ensure that the licence type at the end of the paper matches the version on the Licence to Publish form submitted.	

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

S 38093, a histamine H₃ antagonist/inverse agonist, promotes hippocampal neurogenesis and improves context discrimination task in aged mice

Received: 10 October 2016

Accepted: 17 January 2017

Published: xx xx xxxx

Jean-Philippe Guilloux^{1,*}, Benjamin A. Samuels^{2,*}, Indira Mendez-David^{1,*}, Alice Hu³, Marjorie Levinstein³, Charlene Faye¹, Maryam Mekiri¹, Elisabeth Mocaer⁴, Alain M. Gardier¹, René Hen^{3,5}, Aurore Sors⁴ & Denis J. David¹

Strategies designed to increase adult hippocampal neurogenesis (AHN) may have therapeutic potential for reversing memory impairments. H₃ receptor antagonists/inverse agonists also may be useful for treating cognitive deficits. However, it remains unclear whether these ligands have effects on AHN. The present study aimed to investigate the effects of a 28-day treatment with S 38093, a novel brain-penetrant antagonist/inverse agonist of H₃ receptors, on AHN (proliferation, maturation and survival) in 3-month-old and in aged 16-month-old mice. In addition, the effects of S 38093 treatment on 7-month-old APPSWE Tg2576 transgenic mice, a model of Alzheimer's disease, were also assessed. In all tested models, chronic treatment with S 38093 stimulated all steps of AHN. In aged animals, S 38093 induced a reversal of age-dependent effects on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) BDNF-IX, BDNF-IV and BDNF-I transcripts and increased vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. Finally, the effects of chronic administration of S 38093 were assessed on a neurogenesis-dependent "context discrimination (CS) test" in aged mice. While ageing altered mouse CS, chronic S 38093 treatment significantly improved CS. Taken together, these results provide evidence that chronic S 38093 treatment increases adult hippocampal neurogenesis and may provide an innovative strategy to improve age-associated cognitive deficits.

Adult neurogenesis, a process in which new neurons are continuously generated in adulthood, occurs in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) of adult mammalian brains^{1–4}. Although the precise role of this neuronal turnover in the adult brain remains unknown, several studies suggest a relationship between neurogenesis and hippocampal-dependent cognitive functions. Indeed, suppression of neurogenesis in the DG by X-ray irradiation or treatment with an antimitotic agent impaired hippocampus-dependent learning^{5,6}. Furthermore, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances hippocampal neurogenesis and improves learning and mental performance⁷.

Recent studies have implicated adult-born hippocampal neurons in context discrimination, a process by which similar experiences or events are transformed into discrete, non-overlapping representations^{8,9}. Cognitive deficits consistent with impaired context discrimination in humans during normal aging and in patients with mild cognitive impairment have been also described¹⁰. Thus, strategies that specifically increase adult hippocampal neurogenesis may have therapeutic potential for reversing hippocampal memory impairments such as those seen during normal ageing or in diseases with cognitive decline^{8,11,12}.

¹CESP/UMR-S1178, Univ. Paris-Sud, Fac. Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry, France. ²Behavioral and Systems Neuroscience Area, Department of Psychology, Rutgers The State University of New Jersey, Piscataway, NJ, USA. ³Departments of Neuroscience and Psychiatry, Columbia University, New York, USA. ⁴Pôle d'Innovation Thérapeutique Neuropsychiatrie Servier, Suresnes, France. ⁵Department of Integrative Neuroscience, New York State Psychiatric Institute, New York, USA. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.J.D. (email: denis.david@u-psud.fr)

Modulation of the histaminergic H3 subtype receptor has been proposed for the treatment of cognitive deficits observed in Alzheimer's disease (AD)^{13–15}. The H3 subtype receptor, which is widely expressed in the brain, is, among the 4 types of histaminergic receptors, particularly involved in cognitive processes. The H3 receptor has a mostly pre-synaptic localization on histaminergic neurons and its activation leads to the inhibition of the synthesis and release of histamine¹⁶. In addition, activation of postsynaptic H3 heteroreceptors on heterologous nerve endings likely decreases the release of neurotransmitters such as acetylcholine, serotonin, noradrenaline and dopamine^{17,18}. Recently, S 38093, an inverse agonist/antagonist of H3 receptors¹⁹, was found to be active at a mean pharmacological dose of 0.3–1 mg/kg p.o./i.p. in animal behavioral tests of working memory (Morris water maze in rats; spontaneous alternation and concurrent serial alternation tests in mice; delayed matching to sample in aged monkeys) and episodic-like memory (social and object recognition tests in rats; contextual discrimination task in mice)^{20,21}. S 38093 also improves attention, executive functioning, and cognitive flexibility in MPTP-treated monkeys. Moreover, in line with its H3 antagonist/inverse agonist properties, S 38093 dose-dependently increases extracellular histamine levels in the prefrontal cortex and facilitates cholinergic transmission in the prefrontal cortex and hippocampus of rats after both acute and chronic administrations²⁰. While these data indicate that S 38093 has pro-attentional and pro-cognitive properties, interestingly they may also suggest that S 38093 can enhance adult hippocampal neurogenesis. Substantial evidence indicates that cholinergic neurotransmission regulates adult hippocampal neurogenesis²². Furthermore, depletion of cholinergic input to the neurogenic niche during the aging process may contribute to spatial memory deficit²³.

In this study we investigated the effects of chronic S 38093 administration (0.3, 1 and 3 mg/kg/day p.o., 28 days) on hippocampal neurogenesis (proliferation, maturation and survival) in different mouse models, in young adult, aged and AD transgenic mice (APPSWE Tg2576). In parallel, biological markers involved in both hippocampal neurogenesis and Alzheimer's disease, such as BDNF, VEGFA and IGF-1, were evaluated in aged mice. Finally, the effect of chronic administration of S 38093 (0.3 and 3 mg/kg/day p.o., 28 days) was assessed on a neurogenesis-dependent task as a model of "context discrimination" in aged mice.

Results

Detailed statistical results are provided in Supplementary Table 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7.

Chronic S 38093 administration enhances hippocampal neurogenesis in young adult 129/SvEvTac mice. Chronic S 38093 administration (0.3 and 3 mg/kg/d p.o., 28 days) significantly increased proliferation of progenitors in the DG of hippocampus in young adult mice, with similar effects to those obtained with chronic fluoxetine administration (18 mg/kg/d p.o., 28 days) (+28.1%, +27.5% and +35.0% of BrdU+ cells in comparison to vehicle group, respectively ($p < 0.01$) (Fig. 1A). The same dosing regimen of S 38093 and fluoxetine also significantly increased the survival of newborn cells: +117.1%, +137.5% and +122.4% of BrdU-positive cells in comparison to vehicle group, respectively ($p < 0.01$) (Fig. 1B). The total number of DCX+ cells was unchanged after either chronic S 38093 or fluoxetine administration (Fig. 1C), however chronic S 38093 (0.3 mg/kg/d) or fluoxetine treatment significantly increased the number of DCX+ cells with tertiary dendrites ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Fig. 1D). The maturation index was increased for both doses of S 38093 (0.3 mg/kg/d: $p < 0.01$; 3 mg/kg/d: $p < 0.05$, Fig. 1E) and fluoxetine ($p < 0.01$). Interestingly, S 38093 as fluoxetine, increased proliferation, survival and maturation not only at the ventral but also at the dorsal part of the DG in 3-month old 129/SvEvTac mice (Supplementary Figs S2A,B,C,D,E,F). Then, the relative "maturity" of BrdU+ cells was investigated by determining whether they expressed DCX and/or NeuN (Fig. 1F). As expected, the number of immature BrdU+ granule cells (BrdU+/DCX+/NeuN-) decreased in the fluoxetine group, indicating that the immature cells mature out of the DCX stage more quickly than in the vehicle group ($p < 0.01$). Both doses of S 38093 also enhanced maturation of newborn neurons, as the proportion of BrdU+/NeuN+ cells in these groups increased from 21.9% in vehicle treated animals to 40.9% and 31.3% for S 38093 at 0.3 ($p < 0.01$) and 3 mg/kg/d ($p = 0.07$). The number of BrdU+/DCX-/NeuN- cells, which likely represents astrocytes, did not change across groups (Supplementary Figs S4, S5 and S6, Supplemental Movie).

Chronic S 38093 administration enhances hippocampal neurogenesis and facilitates maturation of newborn neurons in aged C57Bl/6JRj mice and in the APPSWE model of Alzheimer's disease. Aging strongly affects cell proliferation of progenitors ($p < 0.001$, Fig. 2A), survival ($p < 0.001$, Fig. 2B) and maturation of newborn neurons ($p < 0.001$, Fig. 2C,D). There is a 2-fold decrease in the maturation index ($p < 0.01$, Fig. 2E). Donepezil at all doses tested had no effect on neurogenesis. Similar to the study in young mice, S 38093 (0.3, 1 and/or 3 mg/kg) significantly increased cell proliferation, survival, and maturation in the DG of hippocampus in aged mice relative to vehicle. (Fig. 2A–E). As expected, the number of immature BrdU+ granule cells (BrdU+/DCX+/NeuN-) decreased in 16-month-old aged mice compared to 3-month-old young adult mice ($p < 0.01$) (Fig. 2F). High doses of S 38093 also increased the maturation of newborn neurons, as the proportion of BrdU+/NeuN+ cells in these groups increased (1 and 3 mg/kg/d: $p < 0.05$). The proportion of BrdU+/NeuN+ cells in this group decreased from 48.5% in 3-month old mice to 23.7% in 16-month old mice ($p < 0.01$). The number of BrdU+/DCX-/NeuN- cells, which likely represents astrocytes, did not change across groups. Donepezil did not affect the fate of the proliferating cells compared to vehicle-treated groups.

The neurogenic effects of chronic administration of S 38093 (3 mg/kg/d p.o., 28 days) were next evaluated in 7-month-old AD transgenic mice (APPSWE model). A two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment for all the different analyzed parameters for hippocampal neurogenesis. S 38093 increased cell proliferation and had a strong effect on cell survival (+117%) compared to vehicle group within the same genotype, $p < 0.05$) (Table 1). A significant effect of treatment for all the different parameters for maturation was also observed. The total number of DCX+ cells with tertiary dendrites and the maturation index were also significantly increased after S 38093 in both genotypes ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Interestingly, chronic S 38093 administration

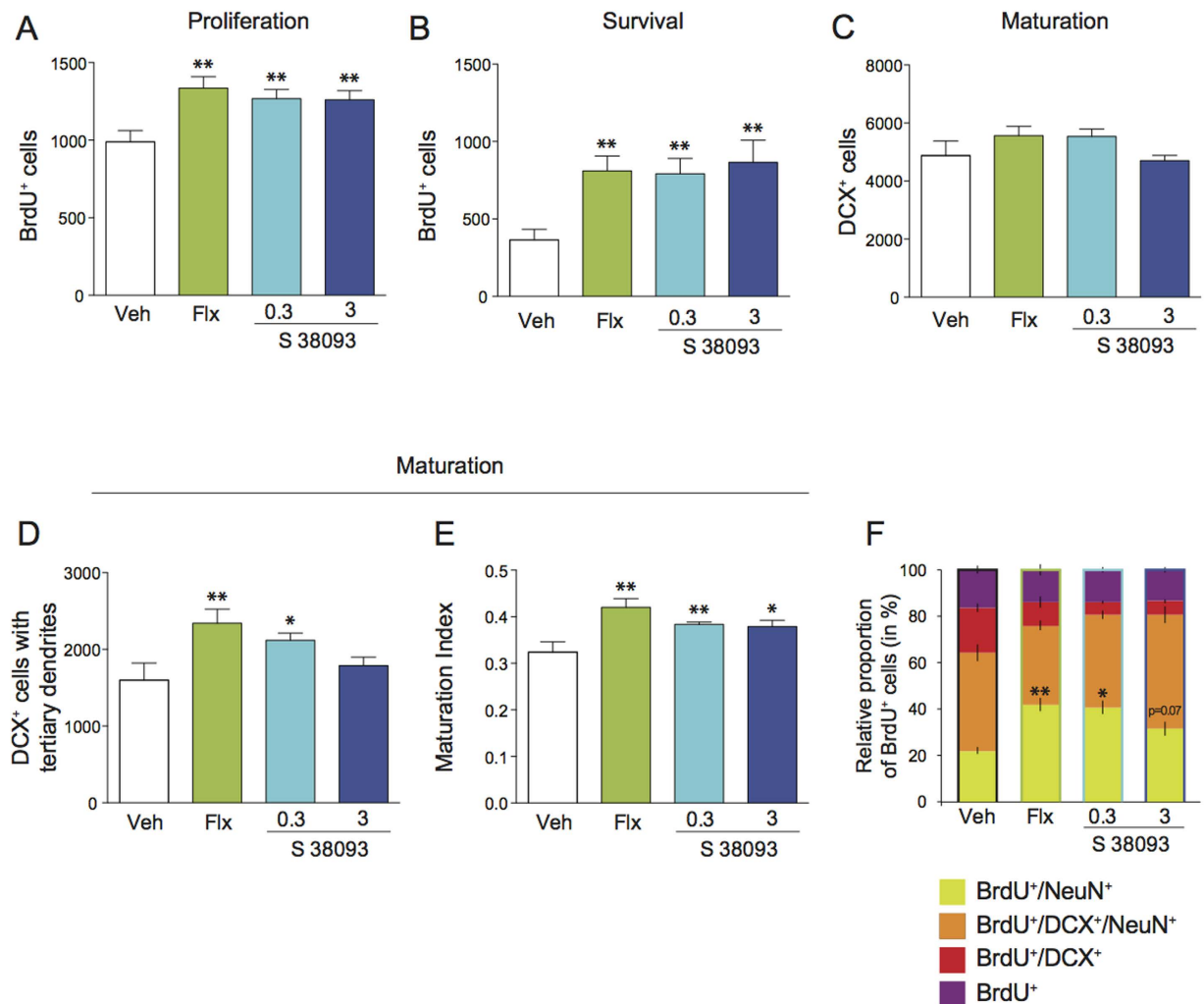


Figure 1. Chronic S 38093 administration enhances adult hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus of young adult 129/SvEvTac mice. The effects of chronic administration of S 38093 (0.3 and 3 mg/kg/day p.o., 28 days) and fluoxetine (18 mg/kg/day p.o., 28 days) on cell proliferation (A), survival (B) and maturation (C–F) were compared to those of vehicle (purified water). Cell proliferation (A) and survival (B) were expressed by the number of BrdU⁺ cells. Maturation was represented by the total number of DCX⁺ cells (C), the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites (D) and the maturation index of newborn granule cells (E). The fate of proliferating cells was characterized using co-localization of BrdU⁺ cells with markers of neuronal maturation (DCX) or mature neurons (NeuN) (F). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. A one-way ANOVA was applied to the data followed by Fisher's PLSD post hoc analysis as appropriate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to vehicle-treated mice ($n = 5$ –10 mice of 3 months old per group).

also increased the dendritic intersections in both genotypes (one-way ANOVA with repeated measure, $p < 0.01$), with a significant effect from 50 to 80 in APPSWE^{TG} mice only ($p < 0.05$). A trend for an increase in dendritic length after S 38093 was also observed in both genotypes (Supplementary Figs S3A,B,C,D,E and S7).

Chronic S 38093 administration modulates hippocampal expression of genes related to neurogenesis and hippocampal function. In aged mice, a decrease in the expression of whole BDNF transcripts (BDNF-IX, -28% , $p < 0.05$) and BDNF-IV (-40% , $p < 0.05$) activity-dependent transcripts and an increase in BDNF-I activity-dependent transcripts ($+57\%$, $p < 0.01$) expression were observed compared to young mice (Fig. 3A,B). No significant age effect was observed on BDNF-VI, VEGF and IGF-1 transcripts (Fig. 3C–F).

In aged mice, chronic administration of S 38093 (1 and/or 3 mg/kg/day p.o., 28 days) reversed this age-dependent decrease in BDNF-IX, BDNF-IV and BDNF-I transcripts. Donepezil only reversed the age-dependent decrease in BDNF-IX transcripts at 0.3 mg/kg/d. In addition, S 38093 at three tested doses (0.3, 1 and 3 mg/kg/d) increased VEGF transcripts compared to vehicle-aged group. However, this increase was only significant at a dose of 1 mg/kg/d ($p < 0.01$).

We finally evaluated whether or not changes in the levels of histamine H3 receptor transcripts in the mice hippocampus could be responsible for the difference of sensitivity of H3 receptor to S 38093 in young *versus* aged

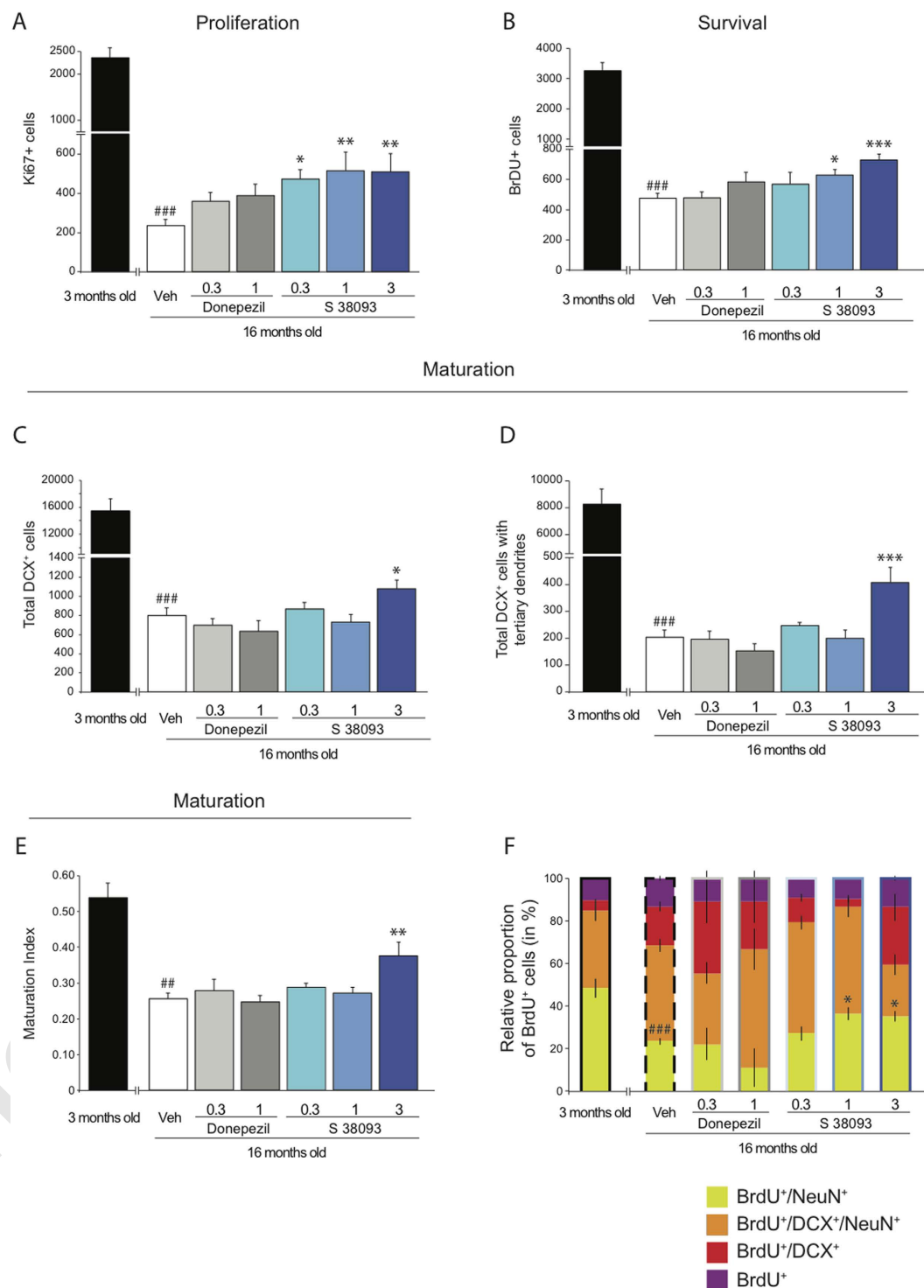


Figure 2. Chronic S 38093 administration enhances adult hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus of old C57Bl/6J mice. The effects of chronic administration of S 38093 (0.3, 1 and 3 mg/kg/day p.o., 28 days) and donepezil (0.1 and 1 mg/kg/day p.o., 28 days) on cell proliferation (A), survival (B), maturation (C–F) were compared to those of vehicle (purified water). Cell proliferation (A) and survival (B) were expressed by the number of BrdU+ cells. Maturation was represented by the total number of DCX+ cells (C), the number of DCX+ cells with tertiary dendrites (D) and the maturation index of newborn granule cells (E). The fate of proliferating cells was characterized using co-localization of BrdU+ cells with markers of neuronal maturation (DCX) or mature neurons (NeuN) (F). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. A one-way ANOVA was applied to the data followed by Fisher's PLSD post hoc analysis as appropriate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ for effects of S 38093 compared to vehicle; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$ for effects of aging in old compared to young vehicle-treated mice ($n = 4$ – 8 mice of 3 or 16 months old per group).

Genotype	APPSWE ^{WT}		APPSWE ^{Tg}	
Treatment	Vehicle	S38093 (3 mg/kg/d)	Vehicle	S38093 (3 mg/kg/d)
Proliferation				
Ki67 ⁺ cells	1158.0 (±102.9)	1527.8* (±173.5)	1200.0 (±1132.3)	1588.0* (±154.85)
Survival				
BrdU ⁺ cells	487.8 (±33.1)	657.6** (±72.9)	538.6 (±47.8)	1168.8** (±218.2)
Maturation				
Total DCX ⁺ cells	3280.0 (±361.2)	4692.0* (±655.1)	3982.8 (±440.1)	5030.4* (±659.5)
Total DCX ⁺ cells with tertiary dendrites	937.3 (±168.95)	1849.2* (±60.9)	1526.4 (±245.8)	2187.6* (±368.5)
Maturation index	0.27 (±0.023)	0.37** (±0.019)	0.36 (±0.031)	0.41** (±0.027)

Table 1. Effects of chronic S 38093 administration on neurogenesis in the dentate gyrus of hippocampus in the APPSWE mouse model of Alzheimer's disease. The effects of chronic administration of S 38093 (3 mg/kg/day p.o., 28 days) on cell proliferation, survival and maturation were compared to those of vehicle (purified water) in APPSWE^{WT} and APPSWE^{Tg} mice. Cell proliferation and survival were expressed by the number of Ki67⁺ and BrdU⁺ cells respectively. Maturation was represented by the total number of DCX⁺ cells, the number of DCX⁺ cells with tertiary dendrites and the maturation index of newborn granule cell. Data are expressed as mean ± SEM. A two-way ANOVA was applied to the data. A significant effect of treatment for all the different analyzed parameters was observed in both genotypes (*p < 0.05, **p < 0.01). Significant interaction for Survival parameter was followed by Fisher's PLSD post hoc analysis. **p < 0.01 compared to the APPSWE^{WT}/vehicle group and APPSWE^{Tg}/vehicle group.

mice. Results showed that there is no age or treatment effect on the H3 receptor transcripts expression in the hippocampus. Indeed, the level of H3 transcripts of aged mice treated or not with the highest dose of S 38093 (3 mg/kg/day) was not statistically different from that of 3-months old animals (Fig. 3G).

Chronic S 38093 administration increases context discrimination in aged C57Bl/6JRj mice.

Aging significantly alters "context discrimination" in a contextual fear conditioning paradigm as previously described²⁴. We confirmed these findings using a context discrimination task (Fig. 4A,B,C and D). We next assessed whether S 38093 could reverse these age-dependent effects. A two-way ANOVA with repeated measured revealed that the difference in the percent time spent freezing between the two similar contexts was significantly different beginning on day 7 for the vehicle group (day 7: p < 0.01; day 8: p < 0.001, Fig. 4F). After a low dose of a chronic S 38093 administration (0.3 mg/kg/d p.o., 28 days), animals displayed a difference in the percent time freezing between the two contexts starting at day 5 (0.3 mg/kg/d: day 5–6: p < 0.01; day 7–8: p < 0.001, Fig. 4G). For the highest dose tested (3 mg/kg/d p.o., 28 days) a significant effect of treatment was observed (p < 0.001, Fig. 4H). Overall, S 38093-treated mice began discriminating between the two similar contexts earlier than the vehicle group. Therefore, the S 38093-treated mice showed an increase in their discrimination ratio as early as day 5 compared to vehicle-treated animals (p < 0.05, Fig. 4I).

Discussion

Strategies that increase adult hippocampal neurogenesis have been researched for their therapeutic potential as antidepressants²⁵. Here, we suggest that such strategies may also be useful for treating hippocampal memory impairments as those seen during normal ageing⁸ or for preserving cognitive capacity²⁶. This is the first study suggesting that H3 receptor antagonists/inverse agonists may be a novel strategy for increasing adult hippocampal neurogenesis, and thus H3 may be a new target for treating depression²⁷ or cognitive deficits^{13–15}. Using a novel brain-penetrant antagonist and inverse agonist of both rodent and human H3 receptors^{20,21}, we found that chronic S 38093 treatment at all tested doses increased both proliferation and survival of immature neurons in the adult DG of the hippocampus of 129SvEv mice (Fig. 1), a well validated strain to investigate pro-neurogenic activity of compounds²⁸. Moreover, we demonstrated that chronic low dose of S 38093 stimulates maturation of immature granule cells. A larger fraction of DCX⁺ cells possessed tertiary dendrites after chronic S 38093 treatment, suggesting a more complex dendritic arborization. Overall, newborn neurons underwent an accelerated maturation after chronic S 38093 treatment, as shown by the increased proportion of newborn cells that ceased to express the immature neuronal marker DCX. Interestingly, the H3 receptor antagonist/inverse agonist produced similar neurogenic effects as chronic fluoxetine²⁹. In the hippocampus, there is very low H3 mRNA expression in the CA1 field of Ammon's Horn and moderate expression in the pyramidal cell layer of the CA3 field. In the DG, intense labeling is found in the subgranular zone, with lower signals in the granular layer³⁰. [¹⁴C]-S 38093-2 binding has been observed in brain areas where H3 receptors are present including the hippocampal formation (DG and subiculum)²¹. Moreover, we previously demonstrated that S 38093 facilitated cholinergic transmission in the prefrontal cortex and the hippocampus of rats after administration^{20,21}. The hippocampus receives abundant cholinergic innervation and ACh plays an important role in learning but can also regulate adult hippocampal neurogenesis³¹. More specifically, changes in forebrain ACh levels primarily influence the proliferation and/or the short-term survival of adult born neurons through activation of muscarinic receptor subtypes M1 and M4 located on the newly born cells. We cannot rule out that the increase in adult hippocampal neurogenesis may have also been induced via increases in monoamine levels. Serotonin, dopamine, and noradrenaline are all involved in different steps of adult hippocampal neurogenesis²².

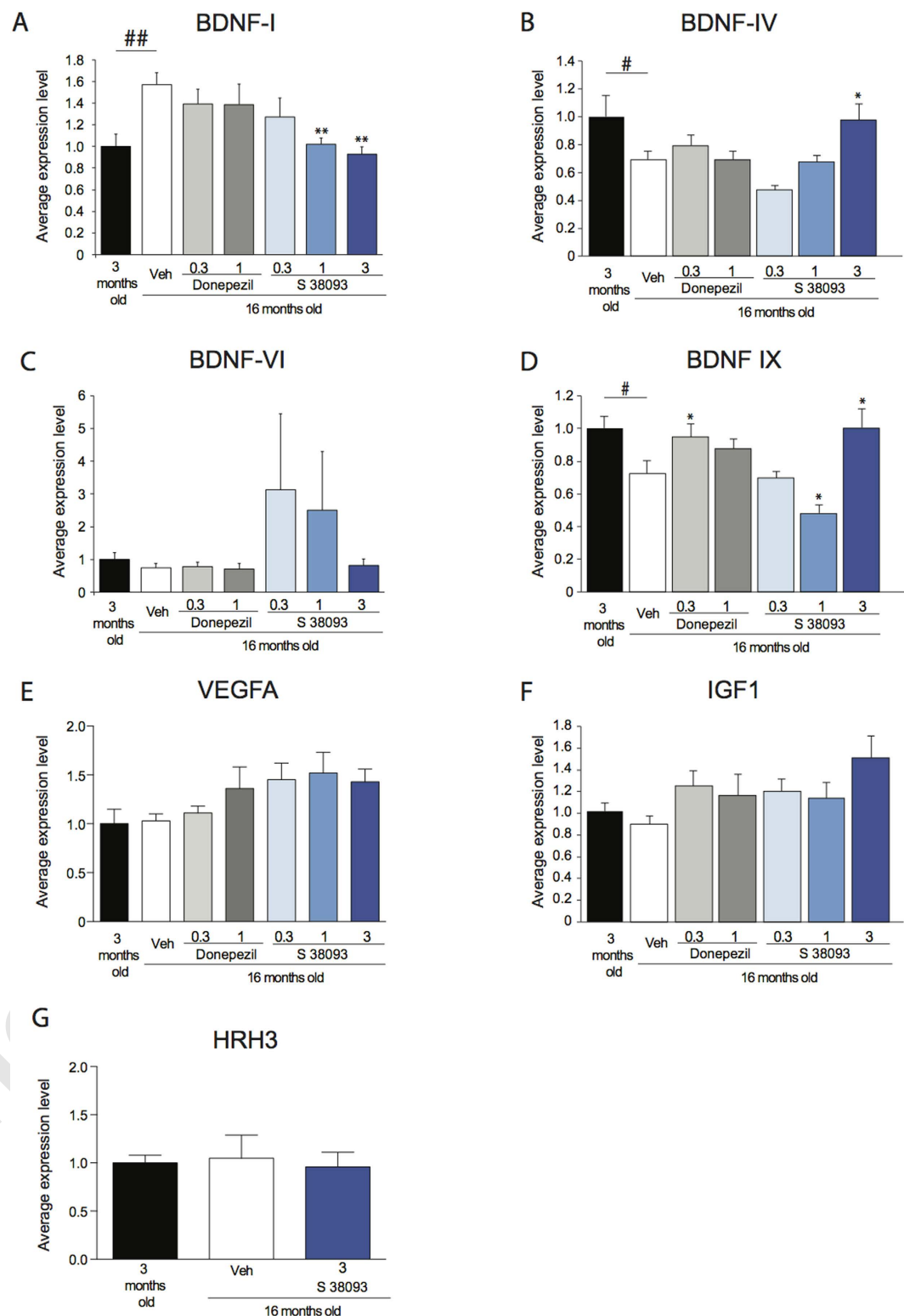


Figure 3. Transcriptional effects in hippocampus of aging and chronic S 38093 administration in old C57Bl/6J mice. The effects of aging and of chronic treatment with S 38093 (0.3, 1 and 3 mg/kg/day p.o., 28 days) donepezil (0.1 and 1 mg/kg/day p.o., 28 days) on hippocampal activity-dependent exons of BDNF (A–C), total BDNF (D), VEGFA (E), IGF1 (F) and H3R (G) gene expression were quantified. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01 for effects of S 38093 compared to vehicle. A one-way ANOVA was applied to the data followed by Fisher's PLSD post hoc analysis as appropriate. # p < 0.05, ## p < 0.01 for effects of aging in old compared to young vehicle-treated mice (n = 5–7 mice of 16 months old per group).

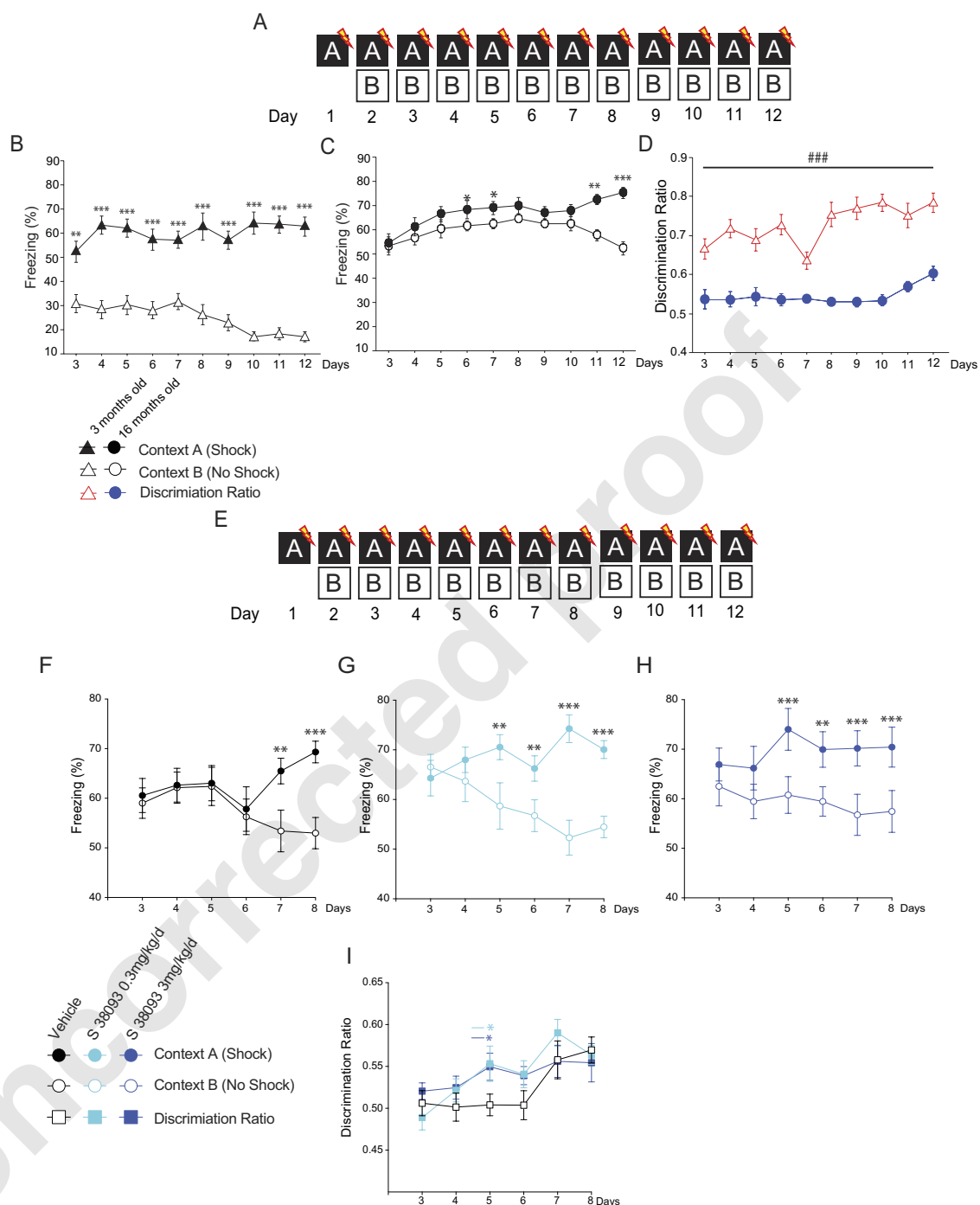


Figure 4. Chronic S 38093 administration improves context discrimination in old C57Bl/6J mice.

Schematic of the Context discrimination task protocol used to evaluate the effects of age (A). Freezing duration in percentage between contexts A and B in 3-month-old animals (B) and in 16-month-old animals (C). Discrimination ratio in young and old mice (D) ($n = 12-15$ young adult or aged mice per group). Schematic of the Context discrimination task protocol used to evaluate the effects of S 38093, a histamine H_3 antagonist/inverse agonist (E). 28 days after the start of treatment, on “day 1” the animals were only exposed to shock context A and on every subsequent day animals were exposed to shock context A then the similar non-shock context B in that order. Context discrimination was measured as the percentage of freezing behavior in both contexts for vehicle (purified water) (F), S 38093 0.3 mg/kg/day p.o. (G) and S 38093 3 mg/kg/d p.o. (H) groups. Discrimination ratios were then calculated across days for each treatment group (I). A two-way ANOVA with repeated measures was applied to the data. Significant main interactions were followed by Fisher’s PLSD post hoc analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ for effects of age (Fig. 4B,C,D) or ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ for effects of treatment (Fig. 4F,G,H) ($n = 12-15$ young adult or aged mice per group). ### $p < 0.001$ for comparisons between young adult and old mice. § $p < 0.05$ planned comparison between S 38093 (0.3 or 3 mg/kg/d) and vehicle group for discrimination ratios (Fig. 4I).

Since the pro-neurogenic effects of S 38093 appeared promising in adult 129SvEv mice, we also evaluated the consequences of a chronic treatment in aged 16-month old mice. Normal rodent aging is associated with attenuation of hippocampal neurogenesis^{3,32} (Fig. 2), and this age-dependent reduction in adult neurogenesis may contribute to cognitive decline²⁶. In our study, we first confirmed that ageing induced a 5-fold decrease in cell proliferation, cell survival, maturation, and dendritic arborization of neurons in the DG of the mouse hippocampus. We then looked at the relative “maturity” of BrdU⁺/NeuN⁺ cells based on whether or not they expressed DCX in aged mice. We found an increase in the production of immature neurons and a decrease in the number of newly formed adult neurons. Interestingly, unlike donepezil, a compound used to treat Alzheimer’s disease, chronic treatment with S 38093 increased cell proliferation (0.3 to 3 mg/kg/day) and survival (1 and 3 mg/kg/day) in the DG of the hippocampus of aged mice. We also observed for the high dose (3 mg/kg/day) an increase in the maturation of neurons, the complexity of their dendritic arborizations, and an increase in the number of newly formed adult neurons. If chronic S 38093 did not fully restore the age-dependent deficit in neurogenesis, it showed that stem cell reactivity is still occurring during aging. Since the lowest dose (0.3 mg/kg/day) was the most efficient to stimulate adult hippocampal neurogenesis in young adult mice (3 month-old) and the highest dose (3 mg/kg) in aged animals (16-month-old mice), we evaluated whether changes in H3 receptor transcripts could highlight the difference of sensitivity of H3 receptor to S 38093 during aging. We confirmed previous results³³ showing that H3 receptor transcripts levels and functionality is unlikely affected during aging.

It is likely that the S 38093-induced effects on dendritic morphology, maturation, and synaptic plasticity are mediated by neurotrophic factors. Indeed, growth factors, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are upregulated after chronic S 38093 treatment (Fig. 3). The observed variations of expression of BDNF-IX (total BDNF) and BDNF-IV (activity-dependent transcript) induced by either aging or chronic S 38093 administration (3 mg/kg) are associated with changes in various steps of neurogenesis and this association has been previously observed in the literature^{34,35}. While restoring baseline levels of BDNF is of therapeutic interest, it is the ability to induce activity-dependent BDNF in response to a stimulus that can enhance neuronal survival and plasticity. In the DG, blockade of histamine H3 receptors located on perforant path terminals with chronic S 38093 could prevent the inhibition the release of glutamate³⁶. Indeed, glutamate signaling is known to induce expression of neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF)^{22,37}. Furthermore, decreases in VEGF levels are found in the hippocampus of aging patients³⁸ and in rodents³⁹, and chronic VEGF administration ameliorates memory impairments in an APP transgenic mouse model of Alzheimer’s disease⁴⁰. In this study, while no effect of age on VEGF expression was observed, chronic S 38093 administration enhanced VEGF levels in the hippocampus of aged mice.

In this study, we found that chronic S 38093 treatment in aged animals increased the proportion of BrdU⁺/NeuN⁺/DCX⁺ cells (Fig. 2E). These young neurons combined with an increase in dendritic complexity make a major contribution to ACSF-LTP²⁹, which may improve cognition. By contrast, deficits in adult hippocampal neurogenesis may impact learning. The DG is a subregion of the hippocampus proposed to play a role in context discrimination, a process by which similar experiences or events are transformed into non-overlapping representations^{9,41}. Sahay and colleagues suggested that strategies designed to specifically increase adult hippocampal neurogenesis, by targeting cell death of adult-born neurons or other means, may have therapeutic potential for reversing impairments in context discrimination such as that seen during normal aging⁸. Given that chronic S 38093 increased adult hippocampal neurogenesis, we finally explored whether it could also be used to treat cognitive decline^{8,42} by assessing the effects of administration in a context discrimination task. As expected, young mice, which have significantly higher levels of neurogenesis, showed context discrimination by day 3 while aged mice did not show discrimination until Day 11. In humans context discrimination has been shown to decline with both normal aging, and in patients with Mild Cognitive Impairment (MCI), and is thought to be impaired in other psychiatric and neurological conditions including Alzheimer’s disease and anxiety-related disorders⁴³. In fact, impaired contextual fear discrimination may result in a bias to encode ambiguous cues as threatening and may underlie the excessive generalization observed in posttraumatic stress disorder and panic disorder. Mice treated with either the low (0.3 mg/kg/day) or high dose (3 mg/kg/day) of S 38093 showed significant discrimination by Day 5, while vehicle treated aged mice did not show discrimination until Day 7.

Taken together, this study provides evidence that chronic treatment with a S 38093, a novel brain-penetrant antagonist/inverse agonist of H3 receptors, results in a normalization of age-dependent behavioral decline possibly through the release of growth factors (e.g., VEGF and BDNF), which in turn could underlie the increased proliferation of neural progenitors and facilitated maturation of young hippocampal neurons not only in adult animals but also in aged mice and AD mouse model.

Methods

Animals. *Neurogenesis study.* Study in young mice. Eighty adult (8 weeks old at the start of the protocol) male mice of 129/SvEv Tac strain (Taconic Farms, Denmark) were used for the neurogenesis study.

Study in aged mice. One hundred and five C57Bl/6Jrj male mice, 15-month-old (25–30 g, Janvier Farms, France) and twenty 2-month-old mice at the start of the protocol were used for the neurogenesis study in old animals (3-month-old and 16-month-old at the end of the protocol).

Study in animal model of Alzheimer’s disease. Neurogenesis was also assessed in thirty transgenic male APPSWE-Tg2576 mice (B6; SJL-Tg(APPSWE)2576Kha; model 1349-RD1, Taconic Farms) and their wild-type littermates. Transgenic mice and their littermates received at 2 months old and were kept at the animal facility until their sacrifice at 8 months old.

Mice were maintained under standard conditions (12/12 h light/dark cycle, lights on at 6 AM, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, food and water *ad libitum*, 5 mice/cage). All behavioral testing and gavage were performed during the light cycle.

The protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international laws and policies (Council directive #87–848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions #92–256B to DJD; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) and in compliance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEE26 authorization 2012–099; Institutional Animal Care and Use Committee of Columbia University and the Research Foundation for Mental Hygiene, Inc.).

Behavioral study. Behavioral experiments were conducted in 2 separate cohorts of thirty-nine 15-month-old male C57Bl/6J mice (Cohort 1: treatment effect) and fifteen 15-month-old male and fifteen 8-week-old C57Bl/6J mice (Cohort 2: age effect) (Charles River, Raleigh, North Carolina, USA) at the start of the protocol.

The mice were housed in groups of two to five per cage and had access to food and water *ad libitum*. The mice were maintained on a 12:12 light/dark schedule and all behavioral testing and gavage was performed during the light cycle. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Columbia University and the Research Foundation for Mental Hygiene, Inc. and were in compliance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Care was taken to minimize the both the number of animals used and their suffering.

Drugs and treatment. *Drugs.* Behavioral and neurogenic effects of S 38093 (Servier, France) were compared to fluoxetine hydrochloride (Anawa Trading (Zurich, Switzerland) or Donepezil hydrochloride (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

Neurogenesis study. Study in young mice (Supplementary Fig. S1A). In two independent cohorts, the effects of chronic S 38093 treatment (0.3 and 3 mg/kg/day, oral gavage, 28 days) on adult hippocampal neurogenesis were tested in 3-month-old mice. Proliferation of progenitors was studied in the first cohort, whereas survival of immature new born neurons and neurons maturation in the DG in the second one. The effects of S 38093 were compared to those of fluoxetine (18 mg/kg/day, oral gavage) and of vehicle (purified water).

Study in aged mice (Supplementary Fig. S1B). Three doses of S 38093 (0.3, 1 and 3 mg/kg/day, oral gavage) were tested in 16-month-old mice after chronic oral treatment (28 days) for proliferation of progenitors, survival of immature newborn neurons and neurons maturation in the DG. The effects of S 38093 were compared to young and aged control group receiving purified water by gavage as vehicle and also to a donepezil-treated group (0.3 and 1 mg/kg/day p.o.).

Study in an animal model of Alzheimer's disease (Supplementary Fig. S1C). S 38093 (3 mg/kg/day, oral gavage) or its vehicle (purified water) were administered to 7-month-old wild type and transgenic model of Alzheimer's disease (APPSWE-Tg2576 mice) during 28 days to assess proliferation of progenitors, survival of immature newborn neurons and neurons maturation in the DG.

Behavioral study. S 38093 (0.3 and 3 mg/kg/day, oral gavage) or its vehicle (purified water) were administered chronically during 28 days, before starting the behavioral experiment (Supplementary Fig. S1D).

Immunohistochemistry. The effects of chronic treatment with S 38093, a novel brain-penetrant antagonist/inverse agonist of H_3 receptors, on AHN (proliferation, maturation and survival) were assessed in 3- and 16-month-old mice and in 7-month-old APPSWE Tg2576 transgenic mice, a potential model of Alzheimer's disease. To this end, after 4 weeks of treatment, animals were anesthetized with ketamine and xylazine (100 mg/ml ketamine; 20 mg/ml xylazine), then perfused transcardially (cold saline for 2 min, followed by 4% cold paraformaldehyde at 4°C). The brains were then removed and cryoprotected in 30% sucrose and stored at 4°C . Serial sections (35 μm) were cryosectioned through the entire hippocampus (-1.10 to -3.80 mm relative to Bregma according to Franklin and Paxino's brain atlas (2008)⁴⁴ and stored in PBS with 0.1% NaN_3 . Since there is a differential contribution of adult hippocampal neurogenesis to cognition and mood along the septotemporal axis of the dentate gyrus, the effects of S 38093 and fluoxetine along the septotemporal axis on proliferation, maturation, survival and neurogenesis were also analyzed (Supplemental Fig. 2). The coordinates used to dissociate the dorsal and ventral hippocampus were based on previous publications^{45,46}: from -1.10 to -2.50 mm relative to Bregma for the dorsal hippocampus and from -2.50 to -3.80 mm for the ventral hippocampus according to Franklin and Paxino's brain atlas (2008)⁴⁴.

Proliferation study. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) or Ki67 labeling were used for proliferation study in the DG of young adult mice. BrdU (150 mg/kg i.p.) was administered 2 h before sacrifice and processed as previously described²⁵. Briefly, for DAB staining, sections were mounted on slides and boiled in citric acid (pH 6.0) for 5 min, rinsed with PBS. Peroxydase was quenched by 0.3% H_2O_2 in 0.1 M TBS. Sections were treated with 0.01% trypsin in $\text{Tris}/\text{CaCl}_2$ for 10 min. Brain sections were incubated for 30 min with 2 N HCl and blocked with 5% NGS. Sections were then incubated overnight at room temperature with anti-mouse BrdU (1:100) (Becton Dickinson, France). After washing with PBS, sections were incubated for 1 hr with secondary antibody (1:200 biotinylated goat anti-mouse, Vector, Burlingame, CA) followed by amplification with an avidin-biotin complex. The staining was visualized with DAB.

In aged and AD transgenic mice (APPSWE Tg2576), proliferation of progenitors was assessed using Ki-67 as a marker for cell division. Ki-67, a nuclear protein expressed in all phases of the cell cycle except for G0, can be

used as an endogenous marker alternative to BrdU incorporation⁴⁷. Ki-67 immunohistochemistry as described previously⁴⁵. Briefly, sections were washed in PBS, blocked (PBS containing 0.3% triton and 10% NDS) and incubated with primary antibody overnight at 4 °C (Ki67 rabbit, 1:100, Vector, Burlingame, CA). Following washes in PBS, sections were incubated with fluorescence coupled rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, France). Using a BX51 microscope (Olympus, Germany), 1/6 and 1/12 of the hippocampus were counted for BrdU⁺ or Ki67⁺ cells respectively by treatment-blind experimenter.

Survival study. Young adult, aged and AD transgenic mice (APPSWE Tg2576) mice were administered BrdU (150 mg/kg i.p. twice a day, for 3 days) 4 weeks before sacrifice. We then proceeded as described previously using a similar DAB protocol to count BrdU⁺ cells.

Doublecortin (DCX) labelling for maturation index study. The immunohistochemistry protocol was adapted from David *et al.*²⁵. For doublecortin staining, the procedure consisted of the following steps: 1 hr incubation in 0.1 M TBS with 0.5% Triton X-100 and 10% normal donkey serum (NDS), followed by goat anti-doublecortin primary antibody (1:100) in TBS/Tx/NDS for 24 hrs at 4 °C. The secondary antibody was biotinylated donkey anti-goat (1:500) in TBS/NDS for 1 hr at room temperature, followed by a 1hr amplification step using an avidin-biotin complex (Vector, USA). DCX-positive (DCX⁺) cells were subcategorized according to their dendritic morphology: DCX⁺ cells and DCX⁺ cells with tertiary (or higher order) dendrites. The maturation index was defined as the ratio of DCX⁺ cells possessing tertiary dendrites to the total number of DCX⁺ cells as described previously⁴⁸. 1/12 of the hippocampus was counted using a BX51 microscope (Olympus, Germany) by treatment-blind experimenter.

Immunohistochemistry and confocal imaging for maturation study. Immunohistochemistry was performed in the following steps: 2 h incubation in 1:1 formamide/2xSSC at 65 °C, 5 min rinse in 2xSSC, 30 min incubation in 2 N HCl at 37 °C, and 10 min rinse in 0.1 M boric acid, pH 8.5, 2 h incubation in 0.1 M PBS with 0.3% Triton X-100, and 5% normal donkey serum. Sections were then incubated overnight at 4 °C in primary antibodies for doublecortin (goat 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), bromodeoxyuridine (BrdU; rat; 1:100; Serotec, Oxford, UK) and neuronal-specific nuclear protein (NeuN) (mouse; 1:500; Chemicon, Temecula, CA). Then fluorescent secondary antibodies were used. All secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (France). Approximately 6 sections per animal and 20–30 BrdU⁺ cells per treatment group were analysed (n = 4–5 animals per conditions). Among the BrdU⁺ cells, the percentage of BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺, BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺ and BrdU⁺/DCX[−]/NeuN⁺ cells were evaluated for each treatment group. All cell counting for triple-stained sections were done using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (X63 magnification).

Sholl analysis. For Sholl analysis, DCX⁺ cells with tertiary, relatively untruncated dendritic branches were traced for each 35 µm hippocampal slice using Neurolucida software (MicroBrightField, Williston, VT) on an Olympus BX51 microscope equipped with a motorized stage device and x100 immersion oil objective. DCX immunohistochemistry was done to maximize the labelling of dendrites. Sholl analysis for dendritic complexity was performed using the accompanying software (NeuroExplorer; MicroBrightField, version 10), calculating dendritic complexity including dendritic length and number of intersections (branch points) as described previously⁴⁸.

Behavioural analysis. *Contextual Fear Discrimination.* The context discrimination task consisted of an 8-day contextual fear discrimination paradigm in which the mice had to learn to distinguish between a fearful shock context and a similar non-shock context. On day 1 the mice were only exposed to the training shock context, and on days 2–8 the mice were exposed to the shock and then non-shock context in that order each day. The mice were run through the context discrimination task starting at 10 am and ending at 2 pm and were then gavaged with vehicle or S 38093 at 4 pm each day. The drug and vehicle were always administered after behavioral testing to avoid possible acute effects of the drug on behavior. Learning was measured by the percent time the mice spent freezing and testing was terminated when percent freezing was consistently significantly different between the two contexts. The mice were tested after 29 days of drug treatment. Conditioning was conducted on one side of a Med-Associates shuttle box (ENV-010MC; 20.3 cm × 15.9 cm × 21.3 cm high) with a clear plexiglass wall, 3 aluminum walls and a stainless steel grid as a floor. Mouse behavior was recorded by digital video cameras mounted above the conditioning chamber. Freezeframe and Freezeview software (Actimetrics, Evanston, IL) were used for recording and analyzing freezing behavior, respectively. In training context A, mice were allowed to habituate in new cages outside the room and were then brought into the room in the new cages. The house fan and house light (CM1820 bulb) were turned on, the stainless steel grid was exposed, the plexiglass wall was up and a mild anise scent was used as an olfactory cue. The door to the sound dampening enclosure was shut for the duration of the trial. 180 s after the mice were placed in the training context, they were delivered a single footshock of 0.75 mA lasting 2 s. 15 s after the end of the footshock, the mice were placed back into their home cages. Non-alcoholic antiseptic wipes were used to clean the grids and catch trays in between trials. An hour later the mice were brought into the room in paper buckets and put into similar context B. The house fan and house light were turned off, the door of the enclosure was left ajar, plastic placemat sheets were put into the shuttle box to make a high-walled circular enclosure, the plexiglass wall was left down and a mild lemon scent was used as the olfactory cue. The stainless steel grid, a salient feature of both contexts, remained exposed. The mice stayed in the chambers for 180 s without receiving a footshock and were placed back into their home cages. 70% ethanol was used to clean the grids and catch trays between trials. The discrimination ratio allowed for evaluation of discrimination between the two contexts and was computed as follows: A = freezing in context A, B = freezing in context B, and the discrimination ratio = A/(A + B). Larger values indicate better discrimination.

Brain areas microdissection. Animals were sacrificed by cervical dissociation. Brains were quickly removed and put in ice-cold slurry of 0.9% NaCl. Three consecutive rostra-caudal sections from Bregma – 0.82 mm to – 5.00 mm (Franklin and Paxinos, 1997) were collected by using a Mouse Brain Matrice (RBMA-200C, World Precision Instruments Inc., USA) and transferred into RNA stabilization solution (RNAlater, Ambion®, Applied Biosystems, France). Hippocampus was then separated under the microscope. All samples were stored in RNAlater at – 80 °C until RNA extraction. LPH and Decorin expression were used as markers to confirm the quality of dissection of tissues as described previously⁴⁵.

RNA extraction. Total RNA was isolated from frozen tissue samples using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) and according to the manufacturer's protocol. RNA quality was assessed using the Biophotometer (Eppendorf) and gel electrophoresis with the RNA LabChip® 6000 Nano kit (Bioanalyzer® 2000, Agilent Technologies). RNA quality cutoff values was OD ratio 260/230 > 1.6 nm and OD ratio 260/280 ratio > 1.7 nm, and RIN (RNA Integrity Number) > 7.0. 0.5 µg of total RNA was then reverse-transcribed and converted into double-stranded cDNA using the qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, Maryland).

Real-Time qPCR. In brief, small PCR products (70–160 base-pairs) were amplified in quadruplets on a BioRad real-time PCR machine (CFX-96), using universal PCR conditions (65–59 °C touch-down, followed by 35 cycles (15 s at 95 °C, 10 s at 59 °C and 10 s at 72 °C)). cDNA was amplified in 20 µl reactions (3 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs, 200 nM primers, 0.5 unit Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)). The primer position for genes of interest was decided after an alignment of the sequence using BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Primers were then designed using Primer 3 Plus, and if applicable, one of the primer matched the sequence corresponding to the probeset of the gene. For each gene, 2 pairs of primers were first tested and the most robust pair were kept for qPCR analysis. Primer dimers were assessed by amplifying primers without cDNA. Primers were retained if they produced no primer dimers or nonspecific signal only after 35 cycles. Results were calculated as the geometric mean of relative intensities compared to three internal controls (ACTIN, GAPDH, PPIA).

Statistical analysis. For the neurogenesis study, data are presented as means ± SEM for BrdU, Ki67 or DCX or BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺, BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺, or BrdU⁺/DCX⁺/NeuN⁺ labeling -positive cells (Figs 1 and 2). For the real-time qPCR experiments, data are presented as means average expression (in %) ± SEM (Fig. 3). For the context discrimination task that models “context discrimination”, data are presented as means ± SEM for freezing (%) or discrimination ratio (Fig. 4). All data were analyzed by one-way ANOVA or two-way ANOVA with repeated measures were applied to the data as appropriate. Significant main effects and/or interactions were followed by Fisher's PLSD post hoc analyses. Discrimination ratio was analyzed following a planned comparison (Fig. 4I).

Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. All analyses were conducted using Prism 6.0h software (GraphPad).

References

- Eriksson, P. S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* **4**, 1313–1317, doi: 10.1038/3305 (1998).
- Gage, F. H. Structural plasticity: cause, result, or correlate of depression. *Biological psychiatry* **48**, 713–714 (2000).
- Bergmann, O., Spalding, K. L. & Frisen, J. Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**, a018994, doi: 10.1101/cshperspect.a018994 (2015).
- Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* **153**, 1219–1227, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002 (2013).
- Madsen, T. M., Newton, S. S., Eaton, M. E., Russell, D. S. & Duman, R. S. Chronic electroconvulsive seizure up-regulates beta-catenin expression in rat hippocampus: role in adult neurogenesis. *Biological psychiatry* **54**, 1006–1014 (2003).
- Shors, T. J. *et al.* Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372–376, doi: 10.1038/35066584 (2001).
- Cotman, C. W. & Berchtold, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences* **25**, 295–301 (2002).
- Sahay, A. *et al.* Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**, 466–470, doi: 10.1038/nature09817 (2011).
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P. & Moser, E. I. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* **154**, 1155–1172, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.073 (2008).
- Yassa, M. A. & Stark, C. E. Pattern separation in the hippocampus. *Trends in neurosciences* **34**, 515–525, doi: 10.1016/j.tins.2011.06.006 (2011).
- Leal, S. L. & Yassa, M. A. Neurocognitive Aging and the Hippocampus across Species. *Trends in neurosciences* **38**, 800–812, doi: 10.1016/j.tins.2015.10.003 (2015).
- McAvoy, K. M. *et al.* Modulating Neuronal Competition Dynamics in the Dentate Gyrus to Rejuvenate Aging Memory Circuits. *Neuron* **91**, 1356–1373, doi: 10.1016/j.neuron.2016.08.009 (2016).
- Brioni, J. D., Esbenshade, T. A., Garrison, T. R., Bitner, S. R. & Cowart, M. D. Discovery of histamine H₃ antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **336**, 38–46, doi: 10.1124/jpet.110.166876 (2011).
- Esbenshade, T. A. *et al.* The histamine H₃ receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *British journal of pharmacology* **154**, 1166–1181, doi: 10.1038/bjp.2008.147 (2008).
- Passani, M. B. & Blandina, P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends in pharmacological sciences* **32**, 242–249, doi: 10.1016/j.tips.2011.01.003 (2011).
- Arrang, J. M., Garbarg, M. & Schwartz, J. C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* **302**, 832–837 (1983).
- Blandina, P. *et al.* Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H₃ receptor activation in rats. *British journal of pharmacology* **119**, 1656–1664 (1996).
- Brown, R. E., Stevens, D. R. & Haas, H. L. The physiology of brain histamine. *Progress in neurobiology* **63**, 637–672 (2001).

19. Sors, A. *et al.* The Synergistic Enhancing-Memory Effect of Donepezil and S 38093 (a Histamine H3 Antagonist) Is Mediated by Increased Neural Activity in the Septo-hippocampal Circuitry in Middle-Aged Mice. *Frontiers in Pharmacology* **7**, doi: 10.3389/fphar.2016.00492 (2016).
20. Panayi, F. *et al.* *In vivo* pharmacological profile of S 38093, a novel inverse agonist at histamine H3 receptors. *Program N° 21.08SA/UU28. Neuroscience Meeting Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience. Online (2014).
21. Panayi, F. *et al.* Mechanistic characterization of S 38093, a novel inverse agonist at histamine H3 receptors. *Program N° 135.06/G3. 2014 Neuroscience Meeting Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience. Online (2014).
22. Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H. & Simon, A. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development* **140**, 2548–2561, doi: 10.1242/dev.088005 (2013).
23. Nagy, P. M. & Aubert, I. Overexpression of the vesicular acetylcholine transporter enhances dendritic complexity of adult-born hippocampal neurons and improves acquisition of spatial memory during aging. *Neurobiology of aging* **36**, 1881–1889, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.021 (2015).
24. Sahay, A., Wilson, D. A. & Hen, R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* **70**, 582–588, doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.012 (2011).
25. David, D. J. *et al.* Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* **62**, 479–493, doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.017 (2009).
26. Pieper, A. *et al.* Discovery of a proneurogenic, neuroprotective chemical. *Cell* **142**, 39–51, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.018 (2010).
27. Femenia, T., Magara, S., DuPont, C. M. & Lindskog, M. Hippocampal-Dependent Antidepressant Action of the H3 Receptor Antagonist Clobenpropit in a Rat Model of Depression. *The international journal of neuropsychopharmacology/official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **18**, doi: 10.1093/ijnp/pyv032 (2015).
28. David, D. J. *et al.* Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **16**, 578–591, doi: 10.1177/1073858409360281 (2010).
29. Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F. & Hen, R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 1374–1384, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008 (2008).
30. Rouleau, A. *et al.* Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. *Journal of neurochemistry* **90**, 1331–1338, doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02606.x (2004).
31. Mohapel, P., Leanza, G., Kokaia, M. & Lindvall, O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiology of aging* **26**, 939–946, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.015 (2005).
32. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 2027–2033 (1996).
33. Terao, A., Steininger, T. L., Morairty, S. R. & Kilduff, T. S. Age-related changes in histamine receptor mRNA levels in the mouse brain. *Neuroscience letters* **355**, 81–84 (2004).
34. Chapman, T. R. *et al.* Aging and infection reduce expression of specific brain-derived neurotrophic factor mRNAs in hippocampus. *Neurobiology of aging* **33**, 832 e831–814, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.015 (2012).
35. Sathanoori, M. *et al.* Differential regulation of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in the postnatal and adult rat hippocampus during development, and in response to kainate administration. *Brain research. Molecular brain research* **130**, 170–177, doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.08.002 (2004).
36. Brown, R. E. & Reymann, K. G. Histamine H3 receptor-mediated depression of synaptic transmission in the dentate gyrus of the rat *in vitro*. *The Journal of physiology* **496** (Pt 1), 175–184 (1996).
37. Mackowiak, M., O'Neill, M. J., Hicks, C. A., Bleakman, D. & Skolnick, P. An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an *in vivo* study. *Neuropharmacology* **43**, 1–10 (2002).
38. Tang, H., Mao, X., Xie, L., Greenberg, D. A. & Jin, K. Expression level of vascular endothelial growth factor in hippocampus is associated with cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **34**, 1412–1415, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.029 (2013).
39. Shetty, A. K., Hattiangady, B. & Shetty, G. A. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* **51**, 173–186, doi: 10.1002/glia.20187 (2005).
40. Wang, P. *et al.* VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* **411**, 620–626, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.003 (2011).
41. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B. & Moser, E. I. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* **315**, 961–966, doi: 10.1126/science.1135801 (2007).
42. Levone, B. R., Cryan, J. F. & O'Leary, O. F. Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiology of stress* **1**, 147–155, doi: 10.1016/j.ynstr.2014.11.003 (2015).
43. Yassa, M. A., Mattfeld, A. T., Stark, S. M. & Stark, C. E. Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8873–8878, doi: 10.1073/pnas.1101567108 (2011).
44. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press 3rd Edition (2007).
45. Xia, L. *et al.* Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1)A and 5-HT(1)B receptors disruption in mice. *Neuroscience letters* **521**, 20–25, doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.046 (2012).
46. Rainer, Q. *et al.* Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *The international journal of neuropsychopharmacology/official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **15**, 321–335, doi: 10.1017/S1461145711000356 (2012).
47. Quesseveur, G. *et al.* BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Translational psychiatry* **3**, e253, doi: 10.1038/tp.2013.30 (2013).
48. Mendez-David, I. *et al.* Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **39**, 1366–1378, doi: 10.1038/npp.2013.332 (2014).

Acknowledgements

This work was supported by the technical assistance of Valerie Nicolas of the UMS IPSIT, microscopy facility, Claudine Deloménie UMS IPSIT, transcriptomic facility, Valerie Dupont-Domergue and the staff of the animal care facility of the SFR-UMS Institut Paris Saclay Innovation Thérapeutique.

Author Contributions

E.M., A.S., B.A.S., R.H., D.J.D. designed the study. I.M.D., B.A.S., A.H., C.F., M.M., M.L., J.P.G., D.J.D. conducted experiments. I.M.D., B.A.S., A.H., M.L., J.P.G. and D.J.D. performed data analysis. All authors contributed to the writing of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: Pr Denis J. David serves as a consultant for Lundbeck, Roche, and Servier. Pr Rene Hen receives compensation as a consultant for Roche, Lundbeck and Servier in relation to the generation of novel antidepressants. All other authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

How to cite this article: Guilloux, J.-P. *et al.* S 38093, a histamine H3 antagonist/inverse agonist, promotes hippocampal neurogenesis and improves context discrimination task in aged mice.. *Sci. Rep.* 7, 42946; doi: 10.1038/srep42946 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Aging and Corticosterone differently affect gene expression in the dentate gyrus

Short Title: Transcriptomic effects of age and CORT in the DG

Authors: Jean-Philippe Guilloux^{1,*§}, Daniela Felice^{1,*}, Alan Pehrson², Yan Li², Indira Mendez-David¹, Julie Doan¹, Maryam Mekiri¹, Alain M Gardier¹, Connie Sanchez², Denis J David¹.

¹CESP, Univ. Paris-Sud, Fac. Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Chatenay Malabry, 92290, France

²Lundbeck Research USA, Inc., 215 College Road, 07652 Paramus, NJ, United States

* Authors equally contribute to this work

§ To whom correspondence should be sent:

Dr Jean-Philippe Guilloux
CESP, UMRS-1178, Faculté de Pharmacie
Université Paris Sud
5, rue Jean-Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry
Tel: +33146835968
Fax: +33146835355
jean-philippe.guilloux@u-psud.fr

Abstract: 204 words

Manuscript (including references and legends): 7704 words

References: 66

Tables: 2

Figures: 3

Supplementary Table: 1

Highlights

Aging has a strong impact on gene expression ► Chronic CORT is known to impair emotional behaviour in young C57BL/6j male mice ► Chronic CORT promotes molecular aging in the dentate gyrus in young animals ► CORT in old animals has anti-aging effects.

Keywords

Aging, Corticosterone, Dentate Gyrus, Microarray, Gene expression.

Conflicts of Interest

DJD serves as a consultant for Lundbeck, Roche, and Servier. AMG received research grant from Servier and Lundbeck. DF received a research grant from Lundbeck. Other authors report no potential conflicts of interest.

Authors contribution

JPG, DF, AP, YL, CS, DJD designed the study.

DF, JPG and JD conducted experiments.

All authors wrote or contributed to the writing of the manuscript.

Abstract

Aging is commonly associated with increased incidence of depression and anxiety disorders and declines in cognitive functions. Additionally, stress is commonly associated with development of depression and anxiety, and its effects vary with age. Our hypothesis is that age or chronic corticosterone administration (CORT) in young animals would induce similar effects on hippocampal gene expression in mice. 2- and 16-months old C57BL/6JRj mice were exposed to a 7-weeks corticosterone administration before dentate gyrus (DG) dissection. Gene expression changes in the DG were analyzed using microarray. Aging effects on gene expression in the DG differed, however slightly between untreated and CORT-treated animals. Comparatively, CORT effects strongly differed between young and old animals, with very few genes ($\approx 5\%$) commonly altered in both conditions. Interestingly, CORT effects in young animals on gene expression showed strong similarity to effects of age. Additionally, age related-genes were more susceptible to CORT-induced changes in young animals and conversely, CORT-related-genes in young animals were more susceptible to age-induced changes. CORT had differential effects between young and old animals: while it exerts pro-depressive and pro-aging effects in young, it has anti-aging effects in old at the transcriptomic level. Our results confirm the age-by-disease interactions and highlight the complex regulation of corticosterone on age-dependent mechanisms.

Introduction

In our society the concept of aging is often associated with time of reflection, being wise, time of rest from career or family issues. However, aging increases the risk for neuropsychiatric and neurological disorders (Reynolds and Kupfer, 1999). Particularly, depression is the most common mental health problem in the elderly, and will supposedly affect more than 20% of the world population by the year 2025 (WHO, 2001). Among the various correlates of aging, increased incidence of low mood, declines in certain cognitive functions and increased risk of suicide have been reported (Steffens and Potter, 2008, Fiske et al., 2009, Steffens et al., 2006). However, aging is not a pathology and mood disorders do not necessarily increase with age (Lenze et al., 2005).

Clinical and preclinical evidence suggests that the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis may be implicated in the aging process. Several clinical studies demonstrated that elderly patients display higher cortisol levels (in saliva or serum), an age-related impairment of HPA sensitivity to steroid feedback (Ferrari et al., 2001, Kumari et al., 2010, Rhebergen et al., 2015) and decreased mineralocorticoid receptors function (Berardelli et al., 2013). Elderly may display flatter diurnal cortisol secretion patterns compared to younger individuals (Kumari et al., 2010). Brain aging may also depend upon the cumulative exposure to increasing glucocorticoids levels with age (Ferrari et al., 2001). In parallel, aged rodents display overactive HPA-axis, decreased mineralocorticoid and glucocorticoid receptors hippocampal levels and attenuated glucocorticoid feedback (Kasckow et al., 2009, Lee et al., 2012, Murphy et al., 2002, Gupta and Morley, 2014, Hibberd et al., 2000).

In rodents, major depressive disorders can be modeled through pharmacological manipulation of the HPA-axis (David et al., 2009), leading to HPA-axis dysfunction. This phenomenon has been implicated in depression, with depressed patients that display HPA-axis hyperactivity (Pariante and Lightman, 2008, Belvederi Murri et al., 2014). Increase in peripheral corticosterone levels in male C57BL/6 mice has been shown to robustly alter animals' behavior, including deficits in emotion-related behavior (David et al., 2009, Guilloux et al., 2011, Hill et al., 2015, Darcet et al., 2014, Rainer et al., 2012), HPA-axis dysfunction associated with physiological changes (David et al., 2009, Hill et al., 2015), and altered circadian rhythms / sleep rhythms (David et al., 2009, Le Dantec

et al., 2014), which resembles symptoms observed in human major depressive disorder (MDD). Besides increased emotionality, chronic corticosterone exposure has been shown to alter cognitive behavior in mice (Darcet et al., 2014, Darcet et al., 2016).

Numerous studies have implicated several brain regions in the context of MDD, including prefrontal cortex, hippocampus and amygdala in mood disorders. Among them, the dentate gyrus of the hippocampus in adult are known to be sensitive to the effects of chronic antidepressant drug treatment, and changes in their morphology have been observed following depressive episodes (Miller and Hen, 2015, Treadway et al., 2015). The hippocampus is also one of the sites that undergo the earliest changes due to aging. For instance, neurogenesis, but also numerous hippocampal-dependent cognitive functions, are known to decline with aging. Thus the hippocampus, and more specifically the dentate gyrus is a key region to study the molecular effects of chronic corticosterone exposure (as a way to induce anxio-depressive like phenotype) and/or of aging, and explore the transcriptomic impact of this age-by-disease interaction.

At the genome-wide levels, prior reports showed a strong age-by-disease interaction in the context of neurological diseases (Glorioso et al., 2011) and more specifically in the context of MDD (Douillard-Guilloux et al., 2013). A strong overlap between age- and MDD-related genes has been shown, with changes in the same direction. Overall these *post-mortem* studies proposed accelerated aging as a hallmark of MDD and/or may confer to greater vulnerability to develop MDD. Yet, this hypothesis has not been confirmed in rodent models of the disease.

Given these evidences, we hypothesized that chronic corticosterone administration in young adult mice would induce gene expression changes in the dentate gyrus similar to those observed with aging. Given the changes in HPA-axis activity in old animals, we expected that CORT exposure would induce differential effects in old *versus* young animals at the transcriptomic levels.

Methods

Animals

Young (2 months old, n=10) and aged (16 months old, n=10) C57BL/6JRj mice (Janvier Labs, France) were maintained under standard conditions (12/12h light/dark cycle, lights

on at 6AM, 22 ± 1°C, food and water *ad libitum*, 5 mice *per cage*). The protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international laws and policies and in compliance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEE26 authorization 2012-099).

Treatment

Corticosterone (4-pregnen-11b-diol-3 20-dione 21 hemisuccinate, CORT from Sigma-Aldrich, France) was dissolved in vehicle (0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin, β-CD from Sigma-Aldrich, France) and administered in drinking water in opaque bottles at the dose of 35 µg/ml (equivalent to 5 mg/kg/day). Corticosterone was administered for 7 weeks before microarray testing. Control animals received vehicle (β-CD) in drinking water during the entire experiment.

Brain areas microdissection

After cervical dislocation, brains were removed during the light phase. Hemispheres were then separated and thalami removed, allowing access to the hippocampus and to dentate gyrus dissection (see (Hagihara et al., 2009)). Dentate Gyri were placed in RNA stabilization solution (RNAlater, Ambion®, Applied Biosystems, France) and stored at -80°C before RNA extraction.

RNA extraction

RNA was extracted using Qiagen RNAeasy Mini Kit (Qiagen, USA) and following all steps recommended by the manufacturer. At the last step, RNA was re-suspended in 15µl of RNase-free water to allow for a high final concentration of RNA. RNA concentrations and quality were determined using a NanoDrop® spectrophotometer (NanoDrop technologies, USA) and a RNA LabChip® 6000 Nano kit (Agilent Technologies, USA). RNA quality cutoff values was OD ratio 260/230>1.6 nm and OD ratio 260/280 ratio>1.7 nm, and RIN (RNA Integrity Number) > 7.0.

Microarray experiments

Samples were processed for hybridization onto Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array, allowing for the analysis of >35,000 coding and non-coding transcripts.

Analysis was performed using Partek GS software. Group differences were observed using a 2-way ANOVA model with 2 main factors (age and treatment). Post-hoc analyses were then performed to dissect the effects of age and/or CORT on gene expression in the dentate gyrus.

Functional analysis

Selected genes were overlaid on the global molecular network of Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) allowing for generation of gene networks based on their connectivity. Their score takes into account the relative numbers of network eligible molecules, of molecules analyzed and the total number of molecules in the Ingenuity's knowledge base. Disease links are generated on literature-based association with illness by IPA (Gaiteri et al., 2010).

Reverse Transcription and Real-Time qPCR

0.5 µg of total RNA was then reverse-transcribed and converted into double-stranded cDNA using the qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, Maryland). In brief, small PCR products (70–160 base-pairs) were amplified in quadruplets on an BioRad real-time PCR machine (CFX-96), using universal PCR conditions (65°C–59°C touch-down, followed by 35 cycles (15 s at 95°C, 10 s at 59°C and 10 s at 72°C)) (Xia et al., 2012). cDNA was amplified in 20 µl reactions (3 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs, 200 nM primers, 0.5 unit Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primers were designed using Primer 3 Plus. 36 genes were tested for qPCR (ARC, BDNF, CALB2, CAMK2D, CAMK4, CCND2, CADPS, CHRNA7, DCX, DRD1A, DRD2, EGR2, EPHA2, EPHB2, FOS, GABRA2, ACTIN, CYCLO, GAPDH, GAD1, GFAP, GPC2, HTR1A, HTR1B, HTR4, HTR6, HTT, JAK2, MC4R, MTOR, NDNF, NES, PTGS2, SLC6A1, SLC6A3, SOX4, SSTR2, TPH1, VAMP2, VEGFA). The selection of genes tested for qPCR was based on their significant change in expression after CORT administration or aging but also due to their prior association with anxiety/depression phenotype in the literature.

Results were calculated as the geometric mean of relative intensities compared to three internal controls (ACTIN, GAPDH and PPIG). Protocols were in accordance with the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistical analysis

Results are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 6. Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA). Significant main effects or interactions were followed up with Newman–Keuls posthoc test. No correction for multiple testing was applied. While this methodology may leads to higher rates of false positives at the single gene level, it allows the study of broader effects of age and/or treatment over the transcriptome (Berton et al., 2006, Sibille et al., 2007).

The relative proportions of age-related genes were compared between groups using the χ^2 test. For all comparisons, $p < 0.05$ was the criterion used for statistical significance.

For Review Only

Results

Effects of age on gene expression

All gene expression results are provided in **Supplementary Table 1**.

Age induced changes in expression of 844 and 563 genes specifically in vehicle- and CORT-treated animals, respectively ($|FC| > 1.2$, $p < 0.05$). 129 genes were altered by age in both conditions (vehicle- and CORT-treated animals, same criteria, **Figure 1A**). Transcript changes induced by age in vehicle treated animals moderately, but significantly, predicted similar trends for the same transcripts in CORT-treated animals ($r = 0.418$, $p < 1e^{-6}$). Similarly, transcript changes induced by age in CORT-treated animals showed similar trends for the same transcripts in vehicle-treated animals ($r = 0.386$, $p < 1e^{-6}$).

Among these 1536 genes differentially affected with age in either one or both conditions, 1106 (72%) of these genes showed similar directionality with age in both conditions. More specifically, 121 out of the 129 genes affected commonly in both conditions (with $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$) showed similar direction of effects of age (**Figure 1B**, green dots). Microarray data were confirmed using qPCR on 42 genes, with a high Array/qPCR concordance (Pearson correlation $r = 0.73$, $p < 1e^{-6}$, **Figure 1C**, **Supplementary Table 1**). Another way to express these data is to look at the gene expression profile induced by age in vehicle, and how these same genes behave in CORT-treated conditions (**Figure 1D-E**). Both **Figures 1B-E** confirmed that effects of age on gene expression partially differ between vehicle and CORT-treated animals as profiles do not completely overlap between these conditions.

Effects of chronic corticosterone on gene expression

Chronic corticosterone treatment induced changes in expression of 386 and 475 genes specifically in young- and aged-animals respectively ($|FC| > 1.2$, $p < 0.05$), with very few genes (28) commonly altered in both conditions (**Figure 2A**). Transcript changes induced by corticosterone in young animals moderately, but significantly, predicted similar trends for the same transcripts in old animals ($r = 0.172$, $p = 0.00069$). However, transcript changes induced by CORT in old animals showed no similar trends for the same transcripts in young animals ($r = 0.037$, $p = 0.21$). Among these 889 genes

differentially affected with CORT in either one or both conditions, 504 (57%) of these genes showed similar directionality after CORT in both young and old animals. More specifically, 21 out of the 28 genes affected commonly in both conditions showed similar direction of effect of CORT treatment (**Figure 2B**). Another way to express these data is to look at the gene expression profile induced by CORT in young (**Figure 2C**), and how these same genes behave in old animals (**Figure 2D**). **Figures 2B-E** confirmed that effects of CORT on gene expression differs depending on the age of the mice.

We then investigated the biological function of these genes affected by age in vehicle or corticosterone-treated animals using Ingenuity Pathway (**Tables 1 & 2**). Differentially expressed genes induced by CORT in young animals were associated with Neurological Disease, Psychological disorders, and BDNF as an upstream regulator. As list of genes differed between vehicle- and CORT-treated animals, the top gene networks as well as other Ingenuity classifications displayed low similarity between groups.

Are age related-genes more susceptible to CORT-induced changes?

We assessed the relative frequencies of genes displaying significant alterations induced by age for several lists of genes: 1/in the whole dataset (25207 genes), 2/ in a set of genes for which CORT has no effect in young subjects (24793 genes), and 3/ in a set of genes for which CORT induced changes in expression in young subjects (414 genes). The baseline for age effect was assessed in vehicle-treated mice, where 3.86% of the genes displayed significant age effects ($|FC|>1.2$, $p<0.05$, **Figure 3A**, hashed bar). In comparison, a similar number of genes (692) were modified with age in CORT-treated mice (2.74%; $\chi^2=0.33$, $p=0.56$; **Figure 3A**). Restricting the pool of genes to only those not affected by CORT showed similar proportions of genes (3.55% of genes related with age in vehicle treated animals, 2.57% of genes in CORT-treated animals). Finally, in the list of genes differentially expressed by CORT, we observed that 22.22% of the genes were also affected by age in vehicle-treated animals (92 out of 414 genes; $\chi^2=90.64$, $p<0.0001$; **Figure 3A**), while a lower number of age-related genes (53, 12.8%) were observed in the CORT-treated animals ($\chi^2=90.64$, $p<0.0001$ vs. the percentage observed in the whole dataset, hashed bar; $\chi^2=5.11$, $p=0.0238$ vs. the percentage observed in the vehicle treated group).

These results demonstrate the overlap between the CORT-related pathology and the effects of aging on gene expression.

Conversely, the increased probability for any gene that is affected by CORT to also display age-related changes in vehicle-treated animals, combined with the lack of increased age effects in the list of genes not affected by CORT treatment, suggests that age dependency in vehicle-treated animals may predict putative involvement in CORT-induced pathology.

We showed previously that 414 genes were differentially regulated with CORT in young animals (with the following criteria: $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$), thus representing 1.64% of the detected genes on the microarray. If we look specifically at age-related genes (973 genes with $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$), we observed that 92 genes (9.46%) had their expression altered by chronic corticosterone (with similar criteria in young: $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$, **Figure 3B**), thus showing that age-related genes are more susceptible to be affected by chronic corticosterone ($\chi^2 = 301.7$, $p < 0.0001$).

Accordingly, we show that 9.4% of the genes significantly altered by age in control subjects were also differentially expressed after CORT treatment (**Figure 3B**, lower pie chart). This proportion is significantly greater than the 1.64% of genes displaying significant CORT-induced changes for the whole data set ($\chi^2 = 301.7$, $p < 0.0001$). On the contrary, age-independent genes showed a non-significant difference in the rate of association with CORT-induced compared with the whole data set ($\chi^2 = 0.072$, $p = 0.789$; upper pie chart).

Together, these results demonstrate that the set of genes displaying age-dependent changes in naïve mice overlap with those affected with CORT. This suggests that age-related genes in vehicle animals may be more vulnerable to the pathophysiologic processes induced by CORT.

Are CORT related genes more susceptible to age-induced changes?

We showed previously that 973 genes were differentially regulated with age in vehicle-treated animals (with the following criteria: $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$), thus representing 3.86% of the detected genes on the microarray. If we look specifically at CORT-related genes (414 genes with $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$), we observed that 53 genes (12.8%) had their

Transcriptomic effects of age and CORT in the DG

expression altered by age (with similar criteria in young: $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$), thus showing that CORT-related genes are more susceptible to be affected by aging ($\chi^2 = 84.72$, $p < 0.0001$).

We assessed the relative frequencies of genes displaying significant alterations induced by CORT for several lists of genes: 1/ in the whole dataset (25207 genes), 2/ in a set of genes for which age has no effect in vehicle-treated animals (24234 genes), and 3/ in a set of genes for which age induced changes in expression in vehicle-treated animals (973 genes). The baseline for CORT-induced effects was assessed in vehicle-treated mice, where 1.64% of the genes displayed significant effects of chronic CORT ($|FC| > 1.2$, $p < 0.05$, **Figure 3C**, hashed bar). In comparison, a similar number of genes (503) were modified with chronic CORT in old mice (1.99%; $\chi^2 = 0.075$, $p = 0.78$). Restricting the pool of genes to only those not affected by age showed similar proportions of genes (1.32% of genes related with CORT in young animals, 1.62% of genes in old animals). Finally, in the list of genes differentially expressed by age, we observed that 9.45% of the genes were also affected by CORT in young animals (92 out of 973 genes; $\chi^2 = 37.81$, $p < 0.0001$; **Figure 3C**), while a similar number of CORT-related genes (110, 11.3%) were observed in old animals ($\chi^2 = 57.85$, $p < 0.0001$ vs. the percentage observed in the whole dataset, hashed bar).

Again, these results demonstrate the overlap between the CORT-related pathology and the effects of aging on gene expression.

While these different results showed the crosstalk between genes inferred by age or chronic CORT treatment, it does not mention if changes in expression are in similar direction. Thus, we looked if effects of age in vehicle-treated animals correlate with the effects of corticosterone in young animals. **Figure 3D** shows a strong correlation of effects of age and chronic corticosterone on gene expression in the dentate gyrus ($r = 0.74$, $p < 1e^{-6}$).

Surprisingly, effects of chronic corticosterone in older animals on genes regulated by age are in opposite direction to the effects of aging on gene expression (**Figure 3E**), suggesting an anti-aging effect of corticosterone in old animals. Conversely, corticosterone effects on gene expression are very similar to the effects of aging (**Figure 3D, F**).

Genes affected by age or CORT belongs to pathways previously implicated in depression

We then investigated the biological function of these genes affected either by age or chronic CORT treatment using Ingenuity Pathway. Genes differentially expressed with age in vehicle-treated animals were associated with Neurological Disease, Psychological disorders, and BDNF as an upstream regulator (**Table 1**), confirming our observations of this age x disease interaction. As list of genes differed between vehicle- and CORT-treated animals, the top gene networks as well as other Ingenuity classifications displayed low similarity between groups. However, in CORT-treated animals, the top disorder associated with age was inflammatory response and LPS as an upstream regulator, linking inflammation-related events to the deregulated molecular state involved in aging and depression (Wolkowitz et al., 2010).

Not surprisingly, genes affected by corticosterone in the dentate gyrus were associated with metabolic disease, endocrine system disorders and inflammatory response, IFN- α (**Table 2**), which have been previously mentioned in the literature associated with depression or antidepressant response (Karatsoreos et al., 2010, Wolkowitz et al., 2010, Guilloux et al., 2015). Additionally, CORT exposure in young mice was associated with neurological disease, behavior, and serotonin receptor signaling, thus confirming the role of corticosterone on mood-related pathologies.

Discussion

Chronic corticosterone exposure in young adult mice has been shown to increase emotionality, impair cognitive function and alter sleep architecture (Darcet et al., 2014, David et al., 2009, Guilloux et al., 2011, Le Dantec et al., 2014). This is the first report aiming at looking at the age-by-disease interaction at the molecular level in an animal model of MDD.

Whole genome expression analysis in the dentate gyrus of the hippocampus, a region participating in cognition and mood regulation processes, revealed the interaction between aging and corticosterone exposure at the molecular level. Our data show that genes modulated by CORT are more susceptible to the effects of aging. Moreover, gene changes induced by CORT in young animals are in the same direction as those induced

by aging. Altogether, our results confirm that molecular changes associated with an anxio-depressive like phenotype share common molecular basis with normal aging.

Aging is influenced by multiple homeostatic mechanisms, and the HPA-axis strongly participates in this homeostatic function. Clinical and preclinical studies have shown HPA-axis dysregulation with aging. In humans, aging is associated with higher peripheral levels of cortisol (Copinschi and Van Cauter, 1995). In aged rats, a reduction in negative feedback sensitivity of the HPA-axis in response to glucocorticoids has been observed (Ferrari et al., 1995, Wilkinson et al., 1997). Additionally, corticosterone response to stress has been shown to be significantly smaller in older rats than in young ones (Buechel et al., 2014), or at least a greater variability in the stress response was observed in aged rats (Segar et al., 2009), as well as a decreased response to dexamethasone injection test (Mizoguchi et al., 2009). *In fine*, recovery from stress is impaired in aged rats with behaviorally verified hippocampal learning impairments (Bizon et al., 2001).

The effect of cortisol/corticosterone on brain functions is well documented in humans and animals, in particular, on hippocampus-related behavioural response. In behavioural rodent studies, an inverted U-shape curve has been proposed as a model for explaining the relationship between performances in hippocampal dependent tasks and peripheral corticosterone levels (Akirav et al., 2004, Salehi et al., 2010), as well as in humans (Erickson et al., 2003, Sapolsky, 2015).

Transcriptomic effects of chronic CORT and/or aging

Here, we confirm the robust effect of age on gene expression, as aging significantly affected the expression of 844 to 2315 genes, which represents approximately 3 to 9% of the genes detected in our microarray (using $|FC| > 1.2$ or no threshold, respectively). This is in range with previous reports on the impact of aging on gene expression in the brain or in other tissue (Blalock et al., 2003, Erraji-Benchekroun et al., 2005, Lee et al., 2000, Sibille, 2013), and confirm the hypothesis that these age-related changes may selectively affect cellular populations and biologic processes.

Aging-affected genes in the dentate gyrus were associated with molecular pathways linked to neurological disorders, psychological disorders (down: ADCYAP1, ARC,

VEGFA, GABRG3, SSTR2, DRD3, HTR1A, CHRNA7, MC4R, DCX, RELN, up: BDNF, GFAP, DRD1).

Hippocampal neurogenesis occurs in the dentate gyrus and is strongly affected with age, especially in C57BL/6 mice, that display a higher rate of neurogenesis compared to other strains (Kempermann et al., 1997). Adult hippocampal neurogenesis involves several cellular processes (cell proliferation, survival, maturation), that encompass genes (BDNF for instance) and molecules participating in broad functions ("Nervous system development", "Embryonic development") or diseases ("Cancer"). Transcript changes induced by age in vehicle-treated animals showed very moderate, however significant, similar trends for the same transcripts in CORT-treated animals and vice-versa (Figure 2A). This incomplete overlap of effect of age between groups reflects in the Ingenuity analysis. Indeed, in CORT-treated animals, the Ingenuity pathways associated with aging included more effects linked to corticosterone impregnation and its effect on inflammation (with LPS as one of the top upstream regulator associated with our list) or metabolism. Overall, among the 1536 genes differentially affected with age in either one or both conditions, a pool of 121 genes were affected similarly, independently of the animals' treatment, probably reflecting a conserved, biological expression program of aging on gene expression. This is consistent with post-mortem findings showing that age-related changes in the brain are strongly correlated between cohorts of patients and brain regions (Glorioso et al., 2011), and that this expression program can be shared across species (McCarroll et al., 2004).

Comparatively, chronic corticosterone induced less changes on gene expression compared to aging, despite the numerous glucocorticoid receptor binding sites in neuronal cells for instance (Polman et al., 2012). This confirms the robust transcriptomic effects of aging compared to neuroendocrine-induced variation of the transcriptome (Chen et al., 2013). Effects of CORT on gene expression were age-dependent. Very few overlap was observed in terms of CORT-induced changes in gene expression between young and aged animals (Figure 3A-B), when compared to the effects of age (Figure 2A-B). Thus, pathways analysis showed distinct results between young and aged animals, however revealed mainly peripheral effects of corticosterone treatment: metabolic disease (up: PTGS2, down: GLP1R, NOS1, MC4R), endocrine system disorders, inflammatory response (up: IL33, down: IL1R1) or humoral immune response (up: PTGS2, IFNZ).

The age-by-disease interaction in the CORT model

Our work also supports the hypothesis that altered emotional states, here induced by chronic exposure to corticosterone “advance” or “accelerate” brain aging. This has been observed in post-mortem studies (Douillard-Guilloux et al., 2013, Wolkowitz et al., 2010), and in preclinical studies (Buechel et al., 2014, Chen et al., 2013). Indeed, genes differentially expressed after CORT exposure in young animals were more likely to change with aging than genes not regulated by CORT. Reciprocally, genes regulated with age were more prone to be affected by chronic corticosterone administration. Correlative analysis showed that CORT and aging regulate expression of common target genes in the same direction. As observed with the slope of the correlation curve, age-related changes on gene expression were almost twice greater compared to the effects of corticosterone. Our study in the mice CORT model of anxiety-depression here fully confirms prior microarray analysis on the age by disease interaction observed in post-mortem MDD subjects.

Pro- vs. Anti-aging effects of CORT: age matters

One observation that strongly differs to clinical study is the “beneficial” effects of CORT treatment in aged animals. Surprisingly, at the transcriptomic level, CORT rescued the effects of aging on gene expression. Indeed, rather than promoting aging, the effect of CORT opposed the aging changes for many of its targets and can be viewed as “anti-aging” (Figure 4E). Aging significantly changed the expression of 974 genes in the DG. Surprisingly, 807 of these 974 age-regulated genes were regulated in the opposite direction after corticosterone treatment in aged animals, suggesting that chronic CORT induced anti-aging effects in animals. This hippocampal, anti-aging effects of CORT exposure or stress in aged animals have previously been reported in rodent studies (Buechel et al., 2014, Chen et al., 2013): however their translational validity remains to be tested. This suggests that corticosterone, and by extension, glucocorticoids may participate in promoting brain aging in young animals, but can also exert anti-aging effects in aged mice. It remains to be determined if this shifting window from pro- to anti-aging effects of CORT is a long term process or occurs in the late periods of life. Whether these anti-aging effects of CORT on gene expression in the DG can translate to a lesser effects of CORT on animals’ emotional or cognitive behaviour remains also to be elucidated.

Additionally, these results suggests also that expression changes induced by normal aging may also be responsible for a novel molecular state that is less vulnerable to the effects of corticosterone. This may reflect, at the hippocampal and genomic levels, the lower sensitivity to glucocorticoid treatment observed in elderly humans, (Ferrari et al., 2001, Otte et al., 2005, Raskind et al., 1994, Sapolsky et al., 1986, Quax et al., 2013), or in rodents (Buechel et al., 2014, Chen et al., 2013).

Limitations

Here, we used chronic corticosterone exposure known to induce an anxiety/depression-like phenotype. While this neuroendocrine model displays a strong validity and numerous hallmarks of an altered phenotype, it lacks the impact of social stress observed in other animal models of MDD (Unpredictable Chronic Mild Stress or Social Defeat for instance). While greater sensitivity to chronic stress has been reported in aged rats (Herrera-Perez et al., 2008, Kinsey et al., 2008), this sensitivity has not been reported after an acute stress (Buechel et al., 2014). Additional studies in aged animals would help in defining the appropriate dose and duration of treatment required to alter emotional behaviour.

Brain structures were extracted when animals were at rest. Thus, our microarray experiments were not designed to capture differences of genes that are highly expressed during learning and memory processes (Burke and Barnes, 2006).

Given the number of animals tested in microarray, we were not able to test differences in the aged group, for instance, by separating mice showing low vs. high impairment in behavior as proposed by (Burger et al., 2008). Finally, these results were obtained in a cohort of male animals only and need to be confirmed in female animals for which response to aging and/or corticosterone exposure may strongly differs (Frick et al., 2002, Guilloux et al., 2011, Stowie and Glass, 2015).

References

Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., Sandi, C., Venero, C. & Richter-Levin, G. (2004) A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn Mem*, 11, 188-95.

Belvederi Murri, M., Pariante, C., Mondelli, V., Masotti, M., Atti, A. R., Mellacqua, Z., Antonioli, M., Ghio, L., Menchetti, M., Zanetidou, S., Innamorati, M. & Amore, M. (2014) HPA axis and aging in depression: systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 41, 46-62.

Berardelli, R., Karamouzis, I., D'angelo, V., Zichi, C., Fussotto, B., Giordano, R., Ghigo, E. & Arvat, E. (2013) Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine*, 43, 51-8.

Berton, O., Mcclung, C. A., Dileone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., Graham, D., Tsankova, N. M., Bolanos, C. A., Rios, M., Monteggia, L. M., Self, D. W. & Nestler, E. J. (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311, 864-8.

Bizon, J. L., Helm, K. A., Han, J. S., Chun, H. J., Pucilowska, J., Lund, P. K. & Gallagher, M. (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur J Neurosci*, 14, 1739-51.

Blalock, E. M., Chen, K. C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C. & Landfield, P. W. (2003) Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci*, 23, 3807-19.

Buechel, H. M., Popovic, J., Staggs, K., Anderson, K. L., Thibault, O. & Blalock, E. M. (2014) Aged rats are hypo-responsive to acute restraint: implications for psychosocial stress in aging. *Front Aging Neurosci*, 6, 13.

Burger, C., Lopez, M. C., Baker, H. V., Mandel, R. J. & Muzyczka, N. (2008) Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, 89, 379-96.

Burke, S. N. & Barnes, C. A. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 7, 30-40.

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, 611-22.
- Chen, K. C., Blalock, E. M., Curran-Rauhut, M. A., Kadish, I., Blalock, S. J., Brewer, L., Porter, N. M. & Landfield, P. W. (2013) Glucocorticoid-dependent hippocampal transcriptome in male rats: pathway-specific alterations with aging. *Endocrinology*, 154, 2807-20.
- Copinschi, G. & Van Cauter, E. (1995) Effects of ageing on modulation of hormonal secretions by sleep and circadian rhythmicity. *Horm Res*, 43, 20-4.
- Darcet, F., Gardier, A. M., David, D. J. & Guilloux, J. P. (2016) Chronic 5-HT receptor agonist treatment restores learning and memory deficits in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Neurosci Lett*, 616, 197-203.
- Darcet, F., Mendez-David, I., Tritschler, L., Gardier, A. M., Guilloux, J. P. & David, D. J. (2014) Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front Behav Neurosci*, 8, 136.
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D. A., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Artymyshyn, R. P., Gardier, A. M., Gerald, C., Antonijevic, I. A., Leonardo, E. D. & Hen, R. (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62, 479-93.
- Douillard-Guilloux, G., Guilloux, J. P., Lewis, D. A. & Sibille, E. (2013) Anticipated brain molecular aging in major depression. *Am J Geriatr Psychiatry*, 21, 450-60.
- Erickson, K., Drevets, W. & Schulkin, J. (2003) Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 233-46.
- Erraji-Benchekroun, L., Underwood, M. D., Arango, V., Galfalvy, H., Pavlidis, P., Smyrniotopoulos, P., Mann, J. J. & Sibille, E. (2005) Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol Psychiatry*, 57, 549-58.
- Ferrari, E., Cravello, L., Muzzoni, B., Casarotti, D., Paltro, M., Solerte, S. B., Fioravanti, M., Cuzzoni, G., Pontiggia, B. & Magri, F. (2001) Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Eur J Endocrinol*, 144, 319-29.

Ferrari, E., Magri, F., Dori, D., Migliorati, G., Nescis, T., Molla, G., Fioravanti, M. & Solerte, S. B. (1995) Neuroendocrine correlates of the aging brain in humans. *Neuroendocrinology*, 61, 464-70.

Fiske, A., Wetherell, J. L. & Gatz, M. (2009) Depression in older adults. *Annu Rev Clin Psychol*, 5, 363-89.

Frick, K. M., Burlingame, L. A., Delaney, S. S. & Berger-Sweeney, J. (2002) Sex differences in neurochemical markers that correlate with behavior in aging mice. *Neurobiol Aging*, 23, 145-58.

Gaiteri, C., Guilloux, J. P., Lewis, D. A. & Sibille, E. (2010) Altered gene synchrony suggests a combined hormone-mediated dysregulated state in major depression. *PLoS One*, 5, e9970.

Glorioso, C., Oh, S., Douillard, G. G. & Sibille, E. (2011) Brain molecular aging, promotion of neurological disease and modulation by sirtuin 5 longevity gene polymorphism. *Neurobiol Dis*, 41, 279-90.

Guilloux, J. P., Bassi, S., Ding, Y., Walsh, C., Turecki, G., Tseng, G., Cyranowski, J. M. & Sibille, E. (2015) Testing the predictive value of peripheral gene expression for nonremission following citalopram treatment for major depression. *Neuropsychopharmacology*, 40, 701-10.

Guilloux, J. P., Seney, M., Edgar, N. & Sibille, E. (2011) Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods*, 197, 21-31.

Gupta, D. & Morley, J. E. (2014) Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Compr Physiol*, 4, 1495-510.

Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N. & Miyakawa, T. (2009) Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse. *J Vis Exp*.

Herrera-Perez, J. J., Martinez-Mota, L. & Fernandez-Guasti, A. (2008) Aging increases the susceptibility to develop anhedonia in male rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 1798-803.

Hibberd, C., Yau, J. L. & Seckl, J. R. (2000) Glucocorticoids and the ageing hippocampus. *J Anat*, 197 Pt 4, 553-62.

Hill, A. S., Sahay, A. & Hen, R. (2015) Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 40, 2368-78.

- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S. M., Bowles, N. P., Weil, Z. M., Pfaff, D. W. & McEwen, B. S. (2010) Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology*, 151, 2117-27.
- Kasckow, J., Xiao, C. & Herman, J. P. (2009) Glial glucocorticoid receptors in aged Fisher 344 (F344) and F344/Brown Norway rats. *Exp Gerontol*, 44, 335-43.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10409-14.
- Kinsey, S. G., Bailey, M. T., Sheridan, J. F. & Padgett, D. A. (2008) The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. *Physiol Behav*, 93, 628-36.
- Kumari, M., Badrick, E., Sacker, A., Kirschbaum, C., Marmot, M. & Chandola, T. (2010) Identifying patterns in cortisol secretion in an older population. Findings from the Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 1091-9.
- Le Dantec, Y., Hache, G., Guilloux, J. P., Guiard, B. P., David, D. J., Adrien, J. & Escourrou, P. (2014) NREM sleep hypersomnia and reduced sleep/wake continuity in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression based on chronic corticosterone administration. *Neuroscience*, 274, 357-68.
- Lee, C. K., Weindruch, R. & Prolla, T. A. (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet*, 25, 294-7.
- Lee, S. Y., Hwang, Y. K., Yun, H. S. & Han, J. S. (2012) Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment. *Brain Res*, 1478, 48-54.
- Lenze, E. J., Schulz, R., Martire, L. M., Zdaniuk, B., Glass, T., Kop, W. J., Jackson, S. A. & Reynolds, C. F., 3rd (2005) The course of functional decline in older people with persistently elevated depressive symptoms: longitudinal findings from the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc*, 53, 569-75.
- Mccarroll, S. A., Murphy, C. T., Zou, S., Pletcher, S. D., Chin, C. S., Jan, Y. N., Kenyon, C., Bargmann, C. I. & Li, H. (2004) Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. *Nat Genet*, 36, 197-204.
- Miller, B. R. & Hen, R. (2015) The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol*, 30, 51-8.

Mizoguchi, K., Ikeda, R., Shoji, H., Tanaka, Y., Maruyama, W. & Tabira, T. (2009) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience*, 159, 259-70.

Murphy, E. K., Spencer, R. L., Sipe, K. J. & Herman, J. P. (2002) Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. *Endocrinology*, 143, 1362-70.

Otte, C., Hart, S., Neylan, T. C., Marmar, C. R., Yaffe, K. & Mohr, D. C. (2005) A meta-analysis of cortisol response to challenge in human aging: importance of gender. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 80-91.

Pariante, C. M. & Lightman, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 31, 464-8.

Polman, J. A., Welten, J. E., Bosch, D. S., De Jonge, R. T., Balog, J., Van Der Maarel, S. M., De Kloet, E. R. & Datson, N. A. (2012) A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells. *BMC Neurosci*, 13, 118.

Quax, R. A., Manenschijn, L., Koper, J. W., Hazes, J. M., Lamberts, S. W., Van Rossum, E. F. & Feelders, R. A. (2013) Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 9, 670-86.

Rainer, Q., Xia, L., Guilloux, J. P., Gabriel, C., Mocaer, E., Hen, R., Enhamre, E., Gardier, A. M. & David, D. J. (2012) Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15, 321-35.

Raskind, M. A., Peskind, E. R. & Wilkinson, C. W. (1994) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and human aging. *Ann N Y Acad Sci*, 746, 327-35.

Reynolds, C. F., 3rd & Kupfer, D. J. (1999) Depression and aging: a look to the future. *Psychiatr Serv*, 50, 1167-72.

Rhebergen, D., Korten, N. C., Penninx, B. W., Stek, M. L., Van Der Mast, R. C., Oude Voshaar, R. & Comijs, H. C. (2015) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in older persons with and without a depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 341-50.

Salehi, B., Cordero, M. I. & Sandi, C. (2010) Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. *Learn Mem*, 17, 522-30.

Sapolsky, R. M. (2015) Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci*, 18, 1344-6.

- Sapolsky, R. M., Krey, L. C. & McEwen, B. S. (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, 7, 284-301.
- Segar, T. M., Kasckow, J. W., Welge, J. A. & Herman, J. P. (2009) Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains. *Physiol Behav*, 96, 6-11.
- Sibille, E. (2013) Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 15, 53-65.
- Sibille, E., Su, J., Leman, S., Le Guisquet, A. M., Ibarguen-Vargas, Y., Joeyen-Waldorf, J., Glorioso, C., Tseng, G. C., Pezzone, M., Hen, R. & Belzung, C. (2007) Lack of serotonin_{1B} receptor expression leads to age-related motor dysfunction, early onset of brain molecular aging and reduced longevity. *Mol Psychiatry*, 12, 1042-56, 975.
- Steffens, D. C., Otey, E., Alexopoulos, G. S., Butters, M. A., Cuthbert, B., Ganguli, M., Geda, Y. E., Hendrie, H. C., Krishnan, R. R., Kumar, A., Lopez, O. L., Lyketsos, C. G., Mast, B. T., Morris, J. C., Norton, M. C., Peavy, G. M., Petersen, R. C., Reynolds, C. F., Salloway, S., Welsh-Bohmer, K. A. & Yesavage, J. (2006) Perspectives on depression, mild cognitive impairment, and cognitive decline. *Arch Gen Psychiatry*, 63, 130-8.
- Steffens, D. C. & Potter, G. G. (2008) Geriatric depression and cognitive impairment. *Psychol Med*, 38, 163-75.
- Stowie, A. C. & Glass, J. D. (2015) Longitudinal Study of Changes in Daily Activity Rhythms over the Lifespan in Individual Male and Female C57BL/6J Mice. *J Biol Rhythms*.
- Treadway, M. T., Waskom, M. L., Dillon, D. G., Holmes, A. J., Park, M. T., Chakravarty, M. M., Dutra, S. J., Polli, F. E., Iosifescu, D. V., Fava, M., Gabrieli, J. D. & Pizzagalli, D. A. (2015) Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry*, 77, 285-94.
- Who (2001) Mental Health: New Understanding, New Hope
- Wilkinson, C. W., Peskind, E. R. & Raskind, M. A. (1997) Decreased hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitivity to cortisol feedback inhibition in human aging. *Neuroendocrinology*, 65, 79-90.

Wolkowitz, O. M., Epel, E. S., Reus, V. I. & Mellon, S. H. (2010) Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depress Anxiety*, 27, 327-38.

Xia, L., Delomenie, C., David, I., Rainer, Q., Marouard, M., Delacroix, H., David, D. J., Gardier, A. M. & Guilloux, J. P. (2012) Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1)A and 5-HT(1)B receptors disruption in mice. *Neurosci Lett*, 521, 20-5.

Acknowledgements

Microarray experiment and statistical analyses were performed by the technical assistance of Sébastien Jacques and Florent Dumont and the staff from the “Genom’ic platform” of the Cochin Institute, Paris-Descartes University. We thank Dr Claudine Deloménie for the technical support (qPCR) at the Transcriptome Facility of the SFR-UMS Institut Paris-Saclay Innovation Thérapeutique.

Animal care was under the supervision of Valérie Dupont-Domergue and the staff from the animal care facility of the SFR-UMS Institut Paris-Saclay Innovation Thérapeutique.

We thank Pr Etienne Sibille (University of Toronto, Center for Addiction and Mental Health – CAMH, Canada) for insightful comments on this project.

Legends

Table 1: Ingenuity Pathway analysis of genes regulated by age in vehicle or corticosterone-treated animals.

Table 2: Ingenuity Pathway analysis of genes regulated by CORT in young or old animals.

Figure 1: Differential effects of age on gene expression in the dentate gyrus.

(A) Venn diagram of transcript levels with significant age effect in vehicle and corticosterone treated animals. Arrows indicate directional correlations between changes in transcript levels for genes identified in one treatment (origin of arrow) and changes for the same genes in the other condition (end of arrow). (B) Comparative effects of age on gene expression in vehicle and corticosterone-treated animals. In the grey quadrants are reported the genes showing similar directionality of effect of age: blue dots represents genes for which an effect of age was observed in at least one condition (72%) and green dots for which an effect of age was observed in both conditions. (C) qPCR confirmation of gene expression changes observed using microarray. (D-E) Differential effects of age on gene expression in vehicle and corticosterone-treated animals in the DG. (D) Age-affected genes in vehicle treated animals are organized by the magnitude of their changes in transcript levels along the x-axis and form a continuous profile with a pre-determined 20% effect cutoff value. Vertical bars indicate the amplitude of changes (log2 of old/young expression ratio). (E) Vertical bars indicate the relative transcript levels for the same age-affected genes in CORT-treated animals. In pale green is the gene expression profile of the effect of age in Vehicle treated animals (from top).

Figure 2: Differential effects of CORT on gene expression in the dentate gyrus.

(A) Venn diagram of transcript levels with significant effect of chronic CORT in young and old animals. Arrows indicate directional correlations between changes in transcript levels for genes identified in one condition (origin of arrow) and changes for the same genes in the other condition (end of arrow). (B) Comparative effects of CORT on gene expression in young and old animals. In the grey quadrants are reported the genes showing similar directionality of effect of CORT: blue dots represents genes for which an effect of CORT was observed in at least one condition (72%) and green dots for which

an effect of CORT was observed in both conditions. **(C-D)** Differential effects of CORT on gene expression in young and old animals in the DG. **(C)** CORT-affected genes in young animals are organized by the magnitude of their changes in transcript levels along the x-axis and form a continuous profile with a pre-determined 20% effect cutoff value. Vertical bars indicate the amplitude of changes (log2 of CORT/Veh expression ratio). **(D)** Vertical bars indicate the relative transcript levels for the same CORT-affected genes in old animals. In pale green is the gene expression profile of the effect of CORT in young animals (from top).

Figure 3: Age by disease interaction on gene expression.

(A) The percentages of age-related genes (y-axis) in CORT-treated animals (blue bars) and Vehicle-treated animals (green bars) are displayed for various lists of genes. The numbers on top of bars represent the number of age-related genes. The numbers in parentheses at the bottom of the columns represent the number of genes in the corresponding gene lists. *** $p < 0.0001$, using χ^2 analyses, comparing the frequency of age-dependent genes in the different groups to the expected frequency, that is, the frequency of age-related genes observed in the control group (green bar with white dashes). # $p < 0.05$, using χ^2 analyses, comparing the frequency of age-dependent genes in the CORT-treated group to the frequency observed in vehicle-treated animals within the same list of genes. DE: differentially expressed; **(B)** Overrepresentation of CORT effects in gene set displaying age-related changes in controls. The histogram shows the relative proportion of genes showing CORT effects in the dentate gyrus of vehicle treated mice. The lower pie chart indicates that 9.4% of the age-related genes in vehicle-treated are also differentially expressed in CORT-treated mice *** $p < 0.0001$; χ^2 analysis comparing frequency of genes differentially expressed in CORT-treated animals in the age-related genes selection compared with their frequency in the whole data set. The upper pie chart indicates that the frequency of CORT effect in the set of genes that are age independent was nominally greater, but not significantly different, from the vehicle-treated mice; **(C)** Increased numbers of CORT-related genes in age-related genes. The percentages of CORT-related genes (y-axis) in old (blue open bars) and young animals (green open bars) are displayed for various lists of genes. The numbers on top of bars represent the number of age-related genes. The numbers in parentheses at the bottom of the columns represent the number of genes in the corresponding gene lists. *** $p < 0.0001$, using χ^2 analyses, comparing the frequency of age-dependent genes in the

different groups to the expected frequency, that is, the frequency of age-related genes observed in the control group (green bar with white dashes). [#] $p < 0.05$, using χ^2 analyses, comparing the frequency of age-dependent genes in the CORT-treated group to the frequency observed in vehicle-treated animals within the same list of genes. DE: differentially expressed; (D) Gene expression correlation between the effects of age in vehicle and corticosterone effects in young animals in the dentate gyrus. Dark blue symbols correspond to genes with the following criteria: age effect: $|FC| > 1.2$, $p < 0.05$, while grey symbols represent the genes with only statistical threshold ($p < 0.05$). Correlation was performed on genes from the restricted list and was statistically significant (^{§§§} $p < 1e^{-6}$). Comparative effects of age on gene expression in vehicle-treated animals and effects of corticosterone in old (E) or young (F) animals.

Supplementary Table 1: Supplementary Table 1: List of genes significantly affected with aging and/or CORT administration in dentate gyrus.

Download as a separate excel file.

Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

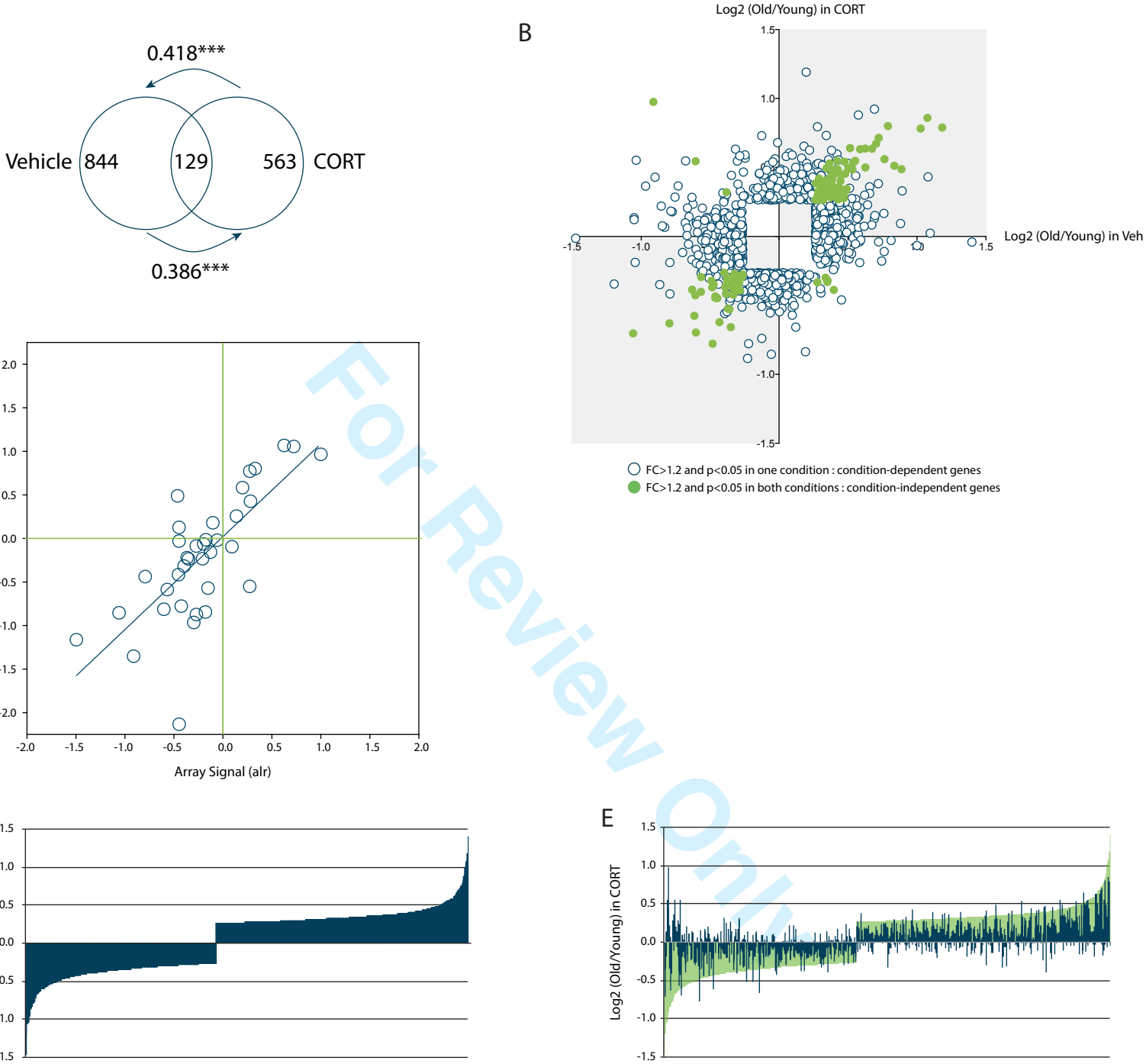


Figure 2

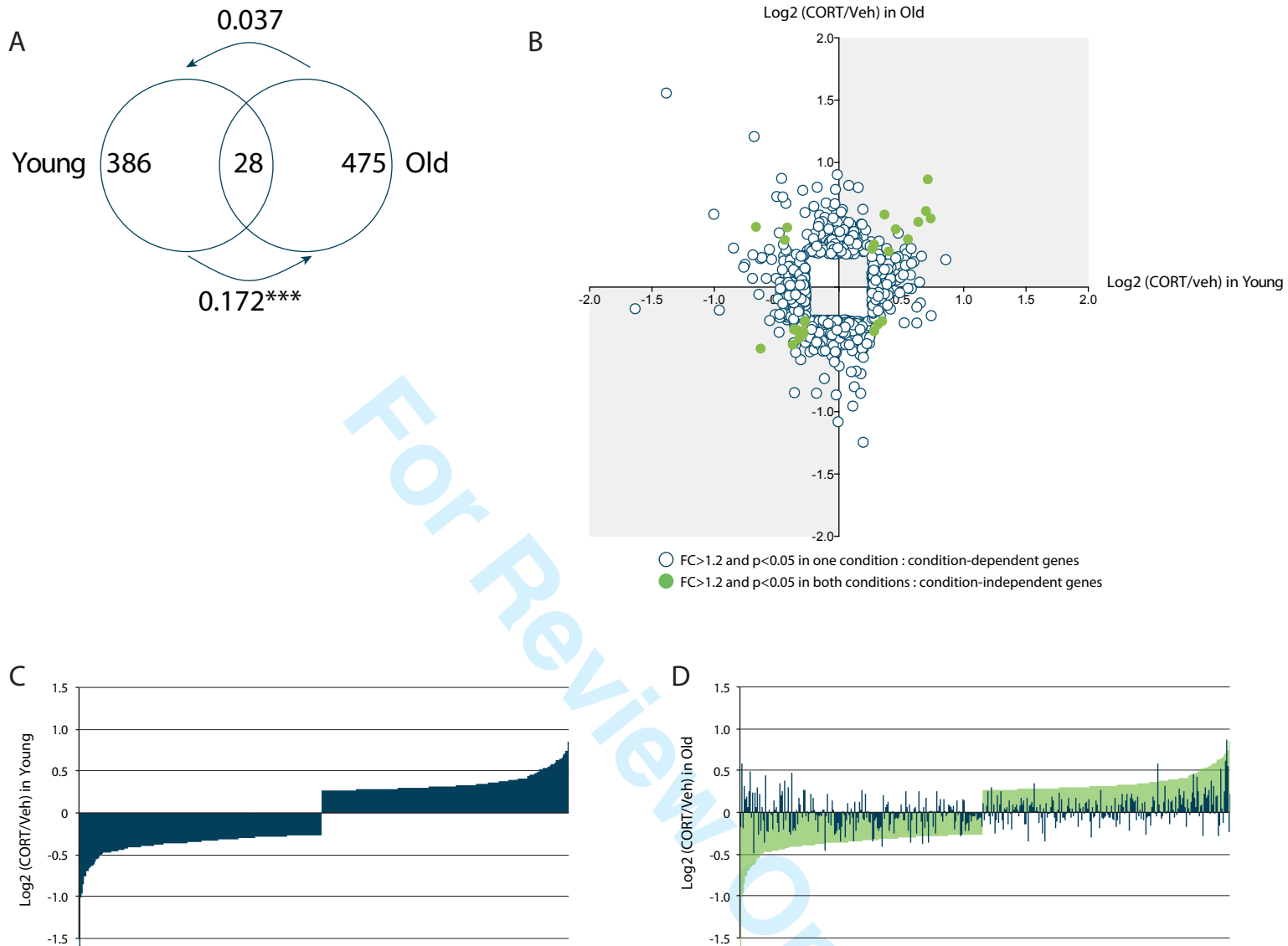
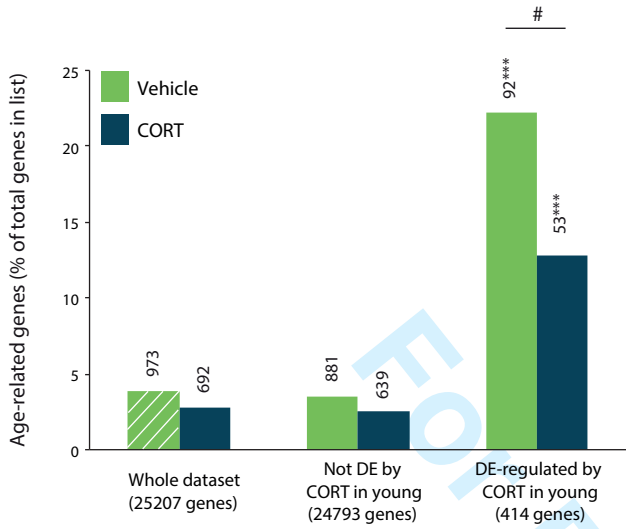
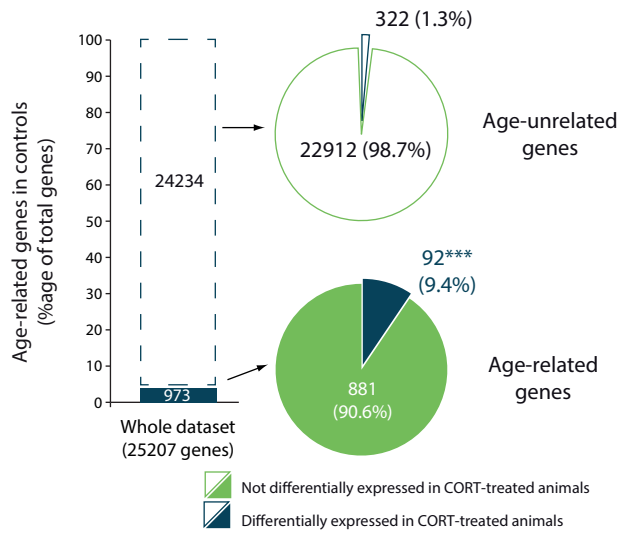


Figure 3

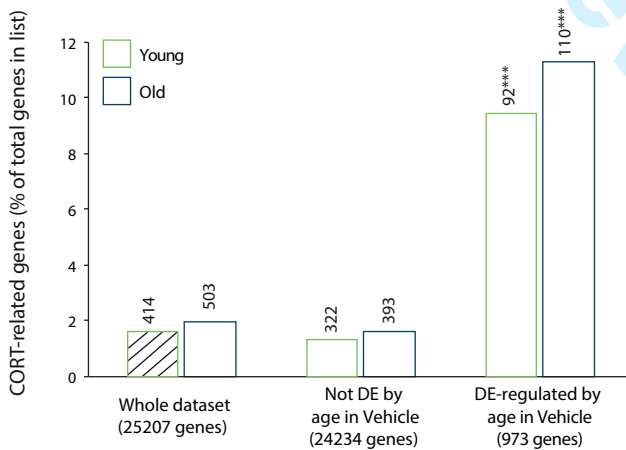
A



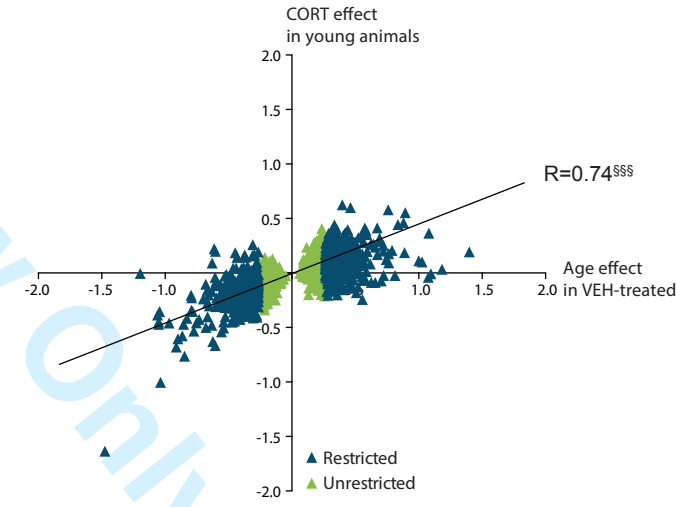
B



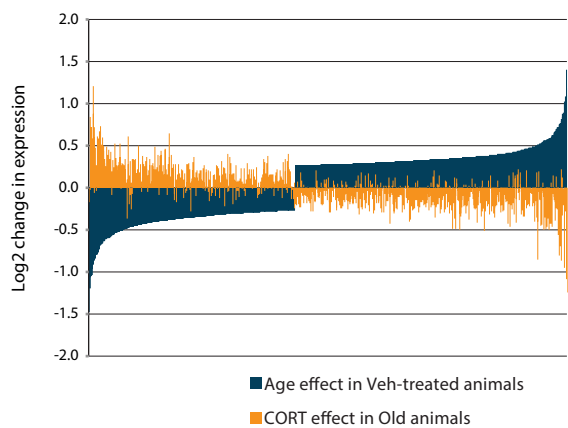
C



D



E



F

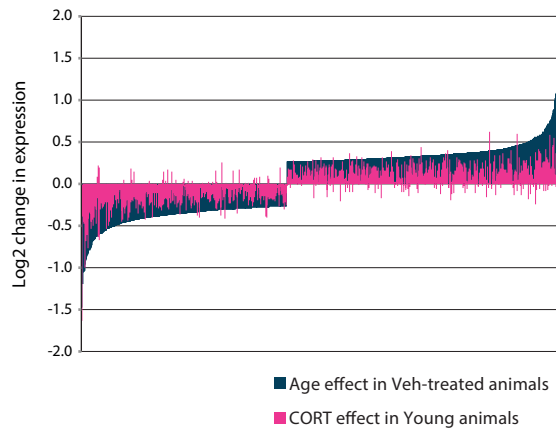


Table 1 : Ingenuity Pathway analysis of genes regulated by age in vehicle- or CORT-treated animals.

For the « Associated Network Functions », the network scores in parenthesis represent the negative log values of right-tailed Fisher's exact tests for network consistence.

Genes tested (mapped)	Effects of age in Vehicle-treated mice	Effects of age in Cort-treated mice
	973(935)	692(650)
Associated Network Functions		
1	Cellular Movement, Nervous System Development and Function, Cell Death and Survival (38)	Cellular Compromise, Cellular Function and Maintenance, Post-Translational Modification (40)
2	Cell Signaling, Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization (34)	Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation (38)
3	Amino Acid Metabolism, Post-Translational Modification, Small Molecule Biochemistry (32)	Cell Cycle, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities (35)
4	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Neurological Disease (30)	Inflammatory Response, Humoral Immune Response, Protein Synthesis (32)
5	Cell Morphology, Embryonic Development, Organ Development (28)	Digestive System Development and Function, Organismal Development, Tissue Morphology (32)
Diseases and Disorders		
	Neurological Disease ($4.5e^{-7}$ - $6.3e^{-3}$)	Inflammatory Response ($3.9e^{-5}$ - $2.3e^{-2}$)
	Hereditary Disorder ($5.9e^{-7}$ - $6.1e^{-3}$)	Cancer ($2.5e^{-4}$ - $2.3e^{-2}$)
	Psychological Disorders ($5.9e^{-7}$ - $6.1e^{-3}$)	Organismal Injury and Abnormalities ($2.5e^{-4}$ - $2.3e^{-2}$)
	Cancer ($7.7e^{-4}$ - $2.3e^{-2}$)	Skeletal and Muscular Disorders ($9.8e^{-5}$ - $1.7e^{-2}$)
	Neurological Disease ($1.1e^{-3}$ - $2.2e^{-2}$)	Metabolic Disease ($5.4e^{-4}$ - $1.7e^{-2}$)
Physiological System Development and Function		
	Nervous System Development and Function ($4.3e^{-10}$ - $5.7e^{-3}$)	Embryonic Development ($6.8e^{-5}$ - $2.3e^{-2}$)
	Tissue Morphology ($2.8e^{-7}$ - $6.1e^{-3}$)	Digestive System Development and Function ($1.3e^{-4}$ - $2.3e^{-2}$)
	Embryonic Development ($3.6e^{-7}$ - $6.5e^{-3}$)	Organismal Development ($1.3e^{-4}$ - $2.3e^{-2}$)
	Behavior ($5.6e^{-4}$ - $2.5e^{-2}$)	Organ Development ($7.2e^{-5}$ - $1.7e^{-2}$)
	Embryonic Development ($5.6e^{-4}$ - $2.1e^{-2}$)	Organ Morphology ($7.2e^{-5}$ - $1.7e^{-2}$)
Top Canonical Pathways		
	eNOS Signaling ($4.9e^{-3}$)	Fatty Acid β -oxidation III ($1.6e^{-3}$)
	Ketogenesis ($5.2e^{-3}$)	Tyrosine Biosynthesis IV ($3.2e^{-3}$)
	Ovarian Cancer Signaling ($5.5e^{-3}$)	Phenylalanine Degradation I (Aerobic) ($5.2e^{-3}$)
	Axonal Guidance Signaling ($6.7e^{-3}$)	Endoplasmic Reticulum Stress Pathway ($8.1e^{-3}$)
	Semaphorin Signaling in Neurons ($7.9e^{-3}$)	Histidine Degradation VI ($1.8e^{-2}$)
Upstream Regulator		
	LY294002 ($1.4e^{-8}$)	PD 153035 ($6.8e^{-5}$)
	trichostatin A ($6.1e^{-8}$)	Lipopolysaccharide ($1.3e^{-4}$)
	BDNF ($1.3e^{-7}$)	UDP-D-glucose ($1.9e^{-4}$)

Table 2 : Ingenuity Pathway analysis of genes regulated by CORT in young or old animals.

For the « Associated Network Functions », the network scores in parenthesis represent the negative log values of right-tailed Fisher’s exact tests for network consistence.

Genes tested (mapped)	Effects of CORT in young mice	Effects of CORT in old mice
	414 (398)	503 (486)
Associated Network Functions		
1	Cell Cycle, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation (32)	Connective Tissue Disorders, Developmental Disorder, Hereditary Disorderodification (39)
2	Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Hematological System Development and Function (30)	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Renal Proliferation (36)
3	Renal and Urological System Development and Function, Ophthalmic Disease, Nervous System Development and Function (27)	Cellular Function and Maintenance, Hematological System Development and Function, Cellular Compromise (35)
4	Cell Cycle, Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization (25)	Cell Signaling, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry (32)
5	Cell Morphology, Organ Morphology, Reproductive System Development and Function (25)	Neurological Disease, Cellular Movement, Cell-To-Cell Signaling and Interaction (29)
Diseases and Disorders		
	Metabolic Disease (6.7e ⁻⁵ - 1.4e ⁻²)	Inflammatory Response (6.3e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
	Endocrine System Disorders (1.1e ⁻⁴ - 1.4e ⁻²)	Connective Tissue Disorders (9.8e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
	Gastrointestinal Disease (1.1e ⁻⁴ - 1.8e ⁻²)	Developmental Disorder (9.8e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
	Cancer (7.7e ⁻⁴ - 2.3e ⁻²)	Skeletal and Muscular Disorders (9.8e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
	Neurological Disease (1.1e ⁻³ - 2.2e ⁻²)	Metabolic Disease (5.4e ⁻⁴ - 1.7e ⁻²)
Physiological System Development and Function		
	Hematological System Dvpment and Function (1.2e ⁻⁵ - 2.6e ⁻²)	Hematological System Development and Function (6.8e ⁻⁶ - 1.7e ⁻²)
	Tissue Morphology (1.2e ⁻⁵ - 2.6e ⁻²)	Immune Cell Trafficking (8.6e ⁻⁶ - 1.7e ⁻²)
	Humoral Immune Response (1.9e ⁻⁴ - 2.4e ⁻²)	Embryonic Development (7.2e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
	Behavior (5.6e ⁻⁴ - 2.5e ⁻²)	Organ Development (7.2e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
	Embryonic Development (5.6e ⁻⁴ - 2.1e ⁻²)	Organ Morphology (7.2e ⁻⁵ - 1.7e ⁻²)
Top Canonical Pathways		
	Small Cell Lung Cancer Signaling (3.3e ⁻³)	Purine Ribonucleosides Degradation to Ribose-1-P (7.8e ⁻³)
	TWEAK Signaling (1.1e ⁻²)	Xanthine and Xanthosine Salvage (1.7e ⁻³)
	Serotonin Receptor Signaling (1.1e ⁻²)	Cholesterol Biosynthesis I (2.1e ⁻²)
	Superpathway of Citrulline Metabolism (1.6e ⁻²)	Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol) (2.1e ⁻²)
	NF-κB Activation by Viruses (2.1e ⁻²)	Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol) (2.1e ⁻²)
Upstream Regulator		
	EFNA2 (4.9e ⁻⁵)	IFN alpha/beta (6.2e ⁻⁷)
	leukotriene D4 (9.1e ⁻⁵)	5-O-mycolyl-beta-araf-(1->2)-5-O-mycolyl-alpha-araf-(1->1')-glycerol (9.1e ⁻⁶)
	TNF (1.1e ⁻⁴)	RNASEH2B (1.6e ⁻⁵)

