



HAL
open science

La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) dans la dépression : ses effets comportementaux et les modifications physiologiques qui les sous-tendent chez l'animal

Tanat Peanlikhit

► To cite this version:

Tanat Peanlikhit. La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) dans la dépression : ses effets comportementaux et les modifications physiologiques qui les sous-tendent chez l'animal. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCE020 . tel-02082174v1

HAL Id: tel-02082174

<https://theses.hal.science/tel-02082174v1>

Submitted on 28 Mar 2019 (v1), last revised 29 Mar 2019 (v2)

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE AU LABORATOIRE DE NEUROSCIENCES INTEGRATIVES ET CLINIQUES**

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale environnement-santé

Doctorat de médecine, santé publique, environnement et société

Spécialité Neurosciences

Par

Monsieur PEANLIKHIT Tanat

**La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) dans la dépression :
ses effets comportementaux et les modifications physiologiques qui les sous-
tendent chez l'animal**

Thèse présentée et soutenue à UFR santé, Besançon le 20 Décembre 2018

Composition du Jury :

M. FOUCHER Jack	MCU-PH, Université de Strasbourg	Président
M. HADDJERI Nasser	DR, Stem Cell and Brain Research Institute	Rapporteur
Mme. LALANE-TONGIO Laurence	PU-PH, Université de Strasbourg	Rapporteur
M. HAFFEN Emmanuel	PU-PH, Université de Franche-Comté	Directeur de thèse
Mme. MONNIN Julie	Ingénieur de Recherche, CHU de Besançon	Codirecteur de thèse
Mme. ETIEVANT Adeline	ATER, Université de Franche-Comté	Codirecteur de thèse



REMERCIEMENTS

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยจากความช่วยเหลือและการให้คำแนะนำในหลายๆด้าน จากอาจารย์ที่ปรึกษา ทั้งสามท่าน ซึ่งได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ เอ็มมานูเอล ฮาฟเฟิน (Professor Emmanuel Haffen) อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.จูลี มงนัง (Dr. Julie Monnin) และ ดร.อาเดอลีน เอธิเอวองท์ (Dr. Adeline Etiévant) กระผมขอขอบคุณพระคุณทั้งสามท่านเป็นอย่างสูง สำหรับความช่วยเหลือกระผมในการเรียน การทำวิจัย ประสิทธิ์ประสาทความรู้และความเข้าใจในงานวิจัยและการทดลอง กระผมขอขอบพระคุณ ในการความช่วยเหลือและการเสียสละเวลาของทั้งสามท่าน และขอบคุณสำหรับโอกาส ในการศึกษาต่อทั้งในระดับปริญญาโทและปริญญาเอกของกระผม

กระผมรู้สึกเป็นเกียรติอย่างยิ่ง สำหรับคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ แจ็ค ฟูเชร์ (Dr. Jack Foucher), ศาสตราจารย์ ดร. โลรองซ์ ลาลาน-ตงซิโอ (Professor Laurence Lalanne-Tongio) และ อาจารย์ ดร. นาสเซอร์ ฮาดเจรี (Dr. Nasser Haddjeri) เสียสละเวลาอันมีค่าของท่าน สำหรับการสอบและประเมินวิทยานิพนธ์ของกระผมในครั้งนี้ และกระผมขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่าน ที่ให้ความสนใจในวิทยานิพนธ์นี้

กระผมขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในปริญญาโท สรีระวิทยา ประสาทวิทยา และพฤติกรรมศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ศาสตราจารย์ ฌองหลุยส์ มีโย (Professor Jean-Louise Millot), ศาสตราจารย์ แวงซองท์ แวนแวน (Professor Vincent Van Waes) และ อาจารย์ ดร. อีวองท์ ปีเตอร์ชมิท (Dr. Yvan Peterschmitt) ที่ช่วยให้กระผมนั้น ได้สำเร็จ การศึกษาในระดับปริญญาโทและมีโอกาสเข้าศึกษาต่อ ในระดับปริญญาเอก

กระผมขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สำรี มั่นเขตกรณ์ (Professor Samlee Munkhetkorn), ดร. นายแพทย์ ลีโอนเนล ปาซาร์ท (Dr. Lionel Pazart) และ ดร. เกวานเนล โรลิ่ง (Dr. Gwenaël Rolin) สำหรับทุกๆความช่วยเหลือ ไม่ว่าจะเป็นที่คำแนะนำในการศึกษาต่อ โอกาสในการศึกษาต่อในต่างประเทศ คำแนะนำในการวิจัย แนวทางการใช้ชีวิต รวมไปถึงการเรียนรู้วัฒนธรรมฝรั่งเศส

ในการศึกษาต่อในระดับปริญญาเอกนี้จะไม่สามารถดำเนินไปได้ด้วยดี ถ้ากระผมไม่ได้รับทุนการศึกษาจากรัฐบาลฝรั่งเศสที่จัดสรรโดยสถานเอกอัครราชทูตฝรั่งเศสประจำประเทศไทย ภายใต้งบโครงการทุน Franco-Thai ซึ่งกระผม ขอขอบพระคุณ ดร. สเตฟาน รอย (Dr. Stéphane Roy) และคุณพี วัณเพ็ญ ศิริพัฒน์ (Wanpen Sirapat) จากหน่วยงานทางด้านความร่วมมือทางวิทยาศาสตร์และมหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ ใน Laboratoire des neurosciences cliniques et intégratives, นักวิจัยในแลป ดร. ปีแอร์-อ็องรี ริโซลด์ (Dr. Pierre-Yves Risold), นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ เอ็กรเวียซ์ซี (Herve Reysse), อานนา ดาวิ (Anna Daoui) และ คริสโตฟ ฮูดายเออร์ (Christophe Houdayer) รวมไปถึงเพื่อนุ่กศึกษาปริญญาเอก และเพื่อนๆ ในโรงพยาบาลศูนย์เบอซองงง : ดร.โมนีก้า สยามสกา (Dr. Monika Szymanska), ดร. โซเลน เพดรอง (Dr. Solène Pédrón), อีวาน บาร์สนิก้า (Yoan Barsznica), เกรกอรี ทีโอ (Gregory Tio), บาห์รี รามาดอน (Bahrie Ramadan), ลิ

เดีย คาเบอซ่า อัลลวาราซ (Lidia Cabeza Alavarez) และ มารี บาร์บิเยร์ (Marie Barbier) รวมไปถึง สำหรับทุกๆ การต้อนรับ ความช่วยเหลือ และมีมิตรภาพอันดี

ขอบคุณเพื่อนๆ น้อยๆ นักศึกษาฝึกงาน มาโลรี ดูอามล (Mallauri DUHAMEL) และ เอธิเยน เซโด (Etienne CEDOZ) ที่ช่วยสอนภาษา คอยแก้ภาษาให้กระผม ตลอดการศึกษา รวมไปถึงมิตรภาพอีกดีเสมอมา

ขอขอบคุณ ครอบครัว ชาอิส (Chays) และครอบครัว ปาซาร์ท (Pazart) รวมไปถึงคุณลุง อีฟ โกซโซ (Yves Gausso) สำหรับโอกาสในการเรียนรู้ ขนบธรรมเนียมและวัฒนธรรมฝรั่งเศส และการต้อนรับอย่างอบอุ่นเปรียบเสมือนว่าผมเป็นส่วนหนึ่งในครอบครัว

ขอขอบคุณสำหรับทุกๆ ครอบครัวของผมนั้น ทั้ง พ่อ แม่ พี่ น้อง ที่คอยสนับสนุนผมในทุกๆ ด้าน ทั้งการเงิน และกำลังใจ ในการศึกษาต่อในระดับปริญญาเอกและสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณมนุษย์แฟนน้อย (Alisa Rithapai) สำหรับทุกๆ กำลังใจ ทุกคำพูด ที่ทำให้ผมนอนฝันดีในเวลาที่ย่ียดจากการทำงาน ขอขอบคุณที่คอยเคียงข้างกันเสมอมา

Et leur traduction en français ...

Tout d'abord, je souhaite remercier mes trois directeurs et directrices de thèse, Professeur Emmanuel HAFEN, Dr. Julie MONNIN ainsi que Dr. Adeline ETIEVANT, sans qui ce travail n'aurait jamais pu se réaliser. En premier lieu, je vous remercie de m'avoir accueilli et intégré au sein de votre laboratoire et de m'avoir donné la chance de concrétiser ce projet de thèse. En effet, vos conseils, vos connaissances et votre expérience ont été d'une aide précieuse quant à la réalisation de cette dernière. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée en me laissant travailler en autonomie, encadrer des étudiants en master et en me laissant présenter nos études lors de congrès internationaux. Vous m'avez permis de développer de nombreuses compétences qui, j'en suis persuadé, me resteront utiles tant dans ma vie professionnelle que personnelle.

Par la suite, je souhaite sincèrement remercier les membres du jury qui ont acceptés d'évaluer ce travail : Dr. Jack FOUCHER, Pr. Laurence LALANNE-TONGIO et Dr. Nasser HADDJERI. Je vous remercie également pour le temps consacré à la lecture et à la critique de ce manuscrit, ainsi que pour l'intérêt porté à ce travail.

J'adresse également tous mes remerciements aux Maîtres de conférences et Professeurs de l'Université du Laboratoire des Neurosciences Intégratives et Cliniques de Besançon. Tout particulièrement les Professeurs Jean-Louis MILLOT et Vincent VAN WAES ainsi que le Dr. Yvan PETERSHMITT, qui m'ont permis de valider mon année de Master 2 « Physiologie, Neurosciences et Comportement » au sein de la Faculté des Sciences et Techniques de Besançon.

Mes sincères remerciements au Professeur Samlee MANKHETKORN sans qui la poursuite de mes études en France n'aurait jamais pu avoir lieu. Merci également aux Dr. Lionel PAZART et Gwenaël Rolin pour leur accueil, leur accompagnement et leurs conseils quant à mon adaptation à la vie Française, qui ne fut pas sans difficultés. Merci à vous pour vos nombreux et indispensables conseils qui m'ont permis de mener à bien mes études et de m'intégrer si bien à ce joli pays dont la culture et les coutumes sont bien différentes des miennes.

Un grand merci à l'Ambassade Française de Thaïlande et tout particulièrement aux attachés de coopération scientifique et universitaire, Dr. Stéphane ROY et Mademoiselle Wanpen SIRAPAT. En effet, ce projet n'aurait pu se concrétiser sans la bourse « Franco-Thaï » qui m'a été attribué.

Merci à tous les membres du Laboratoire des Neurosciences Intégratives et Cliniques de Besançon, sans qui ces années de recherche n'auraient pas été si plaisantes. Merci au Dr. Pierre-Yves RISOLD, Hervé REYSIE, Anna DAOUI et Christophe HOUDAYER pour m'avoir si bien accueilli au sein de ce laboratoire. Merci également à mes collègues, devenus amis, du service Psychiatrie de l'adulte du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon : Dr. Monika SZYMANSKA, Dr. Solène PEDRON, Yoan BARSZNICA, Gregory TIO, Bahrie RAMADAN, Lidia CABEZA ALVAREZ et Marie BARBIER. Merci pour vos conseils en cas de besoin mais aussi, et surtout, pour votre présence amicale, votre joie et votre bonne humeur.

Ma gratitude va également à Mallaury DUHAMEL et Etienne CEDOZ pour les nombreuses corrections de textes en français et pour les liens amicaux que nous avons créés.

J'adresse mes chaleureux remerciements à mes deux familles d'accueil française, la famille CHAYS et la famille PAZART ainsi qu'à mon oncle, Yves GAUSSOT. Je me suis senti, grâce à vous, comme un vrai membre de vos familles !

Enfin et surtout, un grand merci à mes parents et à mes deux sœurs pour votre soutien et votre présence et ce, malgré la distance qui nous séparent depuis plusieurs années. Vous avez réussi à me supporter, à m'épauler et à m'apporter tout le courage dont j'avais besoin pour mener à bien mes études.

Je terminerai par remercier très sincèrement ma petite amie (vraiment très petite !), Alisa RITTHAPHAI. Merci pour tout le courage que tu m'as apporté, pour toute la confiance que tu m'as donnée et que tu me donnes encore. Merci pour ta capacité à me faire plonger au pays des rêves lorsque nous passons un peu (trop) de temps au téléphone. En somme, merci pour tout ce que tu fais pour moi.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	6
ABREVIATIONS.....	10
RESUME / ABSTRACT	13
PREAMBULE.....	15
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	17
1 La dépression unipolaire ou syndrome dépressif majeur	17
1.1 Symptômes, Prévalence et Conséquences de la dépression	17
1.2 Etiologie de la dépression	18
1.2.1 Facteurs génétiques et héritabilité de la dépression	18
1.2.2 L'hypothèse monoaminergique	20
1.2.3 Le stress : hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA pour hypothalamic-pituitary-adrenal axis)	21
1.2.4 L'hypothèse inflammatoire	24
• Inflammation et SNC : généralités.....	24
• Evidence du lien entre inflammation et dépression	25
• Les mécanismes neurobiologiques sous-tendant l'hypothèse inflammatoire de la dépression	29
○ Activation de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO1) et ses conséquences	29
○ Cytokines et glutamate.....	31
1.2.5 Stress et inflammation : Intrication entre l'hypothèse inflammatoire et la dérégulation de l'axe HPA.	32
1.3 Modélisation de la dépression chez l'animal	36
1.3.1 Complexité liée à la modélisation des troubles psychiatriques chez l'animal	36
1.3.2 Définition d'un modèle animal de dépression.	37
1.3.3 Modèles animaux de la dépression.....	38
• Les modèles basés sur des stress sociaux	38
• Les modèles basés sur des stress environnementaux.....	39
• Les modèles pharmacologiques	40
1.4 Traitements de la dépression.....	42
1.4.1 Les antidépresseurs pharmacologiques	43
• Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO):	43

• Les antidépresseurs tricycliques (ATC):.....	44
• Les inhibiteurs de la recapture des monoamines :	44
• Les antidépresseurs atypiques :	45
1.4.2 Les stimulations cérébrales	46
• L'ECT (ou sismothérapie):.....	47
• La VNS:.....	47
• La rTMS :.....	47
• La DBS :.....	48
2 La stimulation transcrânienne par courant continu : la tDCS	49
2.1 Historique et principe de la tDCS	49
2.2 Sécurité associée à la stimulation transcrânienne	50
2.3 Effets thérapeutiques de la tDCS.....	51
2.4 Mécanismes d'actions de la tDCS.....	53
2.4.1 Rappels sur le potentiel membranaire et la plasticité synaptique.....	53
• Le potentiel membranaire.....	53
• La plasticité synaptique	54
2.4.2 Effets neurophysiologiques de la tDCS.....	55
• Modulation du potentiel membranaire	55
• Mécanismes des effets à long-terme de la tDCS.....	57
○ La plasticité synaptique : implication de la potentialisation à long terme (LTP).....	57
○ Effet sur la neurotransmission	58
○ BDNF, plasticité structurelle et neurogénèse.....	60
• Implication des cellules gliales	61
• Processus inflammatoires	62
2.5 La tDCS chez l'animal.....	64
3 Objectifs	67
MATERIEL ET METHODES	69
1 Animaux et Hébergement.....	69
2 Stimulations par tDCS.....	70
2.1 Chirurgie et placement de l'embase	70
2.2 Stimulation par tDCS	71
3 Modèles murins de dépression	72
3.1 Exposition chronique à la Corticostérone (modèle CORT)	72
3.1.1 Préparation de la corticostérone	73
3.1.2 Administration chronique de CORT.....	73

3.2	Administration aiguë de Lipopolysaccharide (modèle LPS)	73
3.2.1	Préparation de la solution de LPS.....	73
3.2.2	Administration de la solution de LPS.....	73
3.3	Exposition aux stress chroniques imprédictibles (modèle UCMS - Unpredictable Chronic Mild Stress).....	74
4	Evaluation comportementale	75
4.1	Mesure des comportements autocentrés.....	75
4.1.1	Etat du pelage de la souris	75
4.1.2	Le Splash test.....	76
4.2	Comportements de type anxieux.....	76
4.2.1	Test de l'open-field.....	77
4.2.2	Comportements de type anxio-dépressif : le test d'hypophagie induit par la nouveauté (Novelty-Suppressed Feeding Test ; NSF)	77
	• Comportement de résignation : le test de nage forcée (FST)	78
	• Comportement d'anhédonie : test de préférence au sucrose	78
4.3	Score d'émotivité	79
5	Immunohistochimie	80
5.1	Perfusion intra-cardiaque et prélèvement.....	80
5.2	Marquage de la protéine c-fos	81
5.3	Préparation des lames.....	82
5.4	Comptage des cellules marquées.....	82
6	Analyse des marqueurs inflammatoires	86
6.1	Prélèvement de la rate et préparation des échantillons.....	86
6.2	Mise en culture et analyse des populations.....	86
7	Traitement des résultats.....	87
7.1	Présentation des données.....	87
7.2	Statistiques.....	87
7.2.1	t test.....	88
7.2.2	ANOVAs	88
	RESULTATS.....	89
1	Publication 1: The antidepressant-like effect of tDCS in mice: a behavioral and neurobiological characterization	89
2	Résultats complémentaires concernant l'effet de la tDCS sur les comportements de type dépressifs induits par l'administration chronique de CORT	102
2.1	Effets comportementaux de l'administration chronique de CORT	102
2.2	Effets comportementaux de la tDCS dans le modèle CORT.....	104

3	Effet de la tDCS sur les comportements de résignation induits par l'injection de lipopolysaccharide (LPS) ; premiers pas vers l'implication des processus inflammatoires.	106
4	Publication 2: tDCS normalized depressive-like behaviors and inflammatory modulations induced by unpredictable chronic mild stress in mice.	108
5	Résultats complémentaires concernant l'effet de la tDCS sur les comportements de type dépressif et la réponse inflammatoire induits par la procédure d'UCMS.	126
5.1	Effet de la tDCS sur le poids et l'état du pelage dans le modèle UCMS.	126
5.1.1	Etat du pelage :	126
5.1.2	Poids	127
5.2	Evaluation des effets comportementaux de la tDCS chez des souris soumises à la procédure d'UCMS	128
5.3	Evaluation des effets biologiques de la tDCS chez des souris soumises à la procédure d'UCMS: implication de la réponse inflammatoire.	131
DISCUSSION		134
1	Résumé des résultats obtenus et discussion	134
2	Perspectives et leurs résultats préliminaires.....	140
2.1	Effets de la tDCS dans le modèle du FST répété.....	140
2.2	Mise en évidence d'un lien entre dépression et inflammation.....	144
3	Conclusion	146
REFERENCES		148

ABBREVIATIONS

3HK	3-hydroxykynurenine
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	5-hydroxytryptamine/sérotonine
5-HTT ou SERT	transporteur de la sérotonine
ACTH	Adrenocorticotropique hormone
AHR	récepteur arly hydrocarbonés
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APA	Association de Psychiatrie Américaine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATC	antidépresseur tricyclique
ATP	Adenosine triphosphate
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BDI	Beck Depression Index
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Cm ²	Coulomb/mètre carrée
Ca ²⁺	Ion calcium
cACC	caudal anterior cingulate cortex
CAMKII	calmodulin-dependent protein kinase II
CD4/CD8	cluster of differentiation 4/ cluster of differentiation 8
CIM	Classification internationale des Maladies
CMS	Chronic Mild Stress – stress chroniques modérés
CORT	Corticostérone
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
CREB	cAMP response element binding protein
CRF	Corticotropin releasing factor
CRP	C-reactive protein
CT	Coat State Test – évaluation de l'état du pelage
DA	Dopamine
DAMPs	damage associated molecular patterns
DBS	Deep Brain stimulation
DLPFC/ CPFDL	Dorsolateral prefrontal cortex/Cortex préfrontal dorsolatéral

DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder
ECT	Electroconvulsivothérapie
EDM	Episode dépressive majeur
FST	Forced Swim Test - test de la nage forcée
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GCs	Glucocorticoids
GluR2	glutamate receptor 2
GRs	Recepteurs aux glucocorticoïdes
HAMD/HDRS	Hamilton Depression rating scale
HPA	hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis – axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
HSP	Heat shock protein
Hz	Hertz
IDO	Indoleamine 2,3 dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IMAO	Inhibiteur des monoamines oxidases
Ip	intrapéritonéale
IP3R2	Inositol triphosphate receptor type 2
IRSNA	Inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
ISRS	Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
K ⁺	ion potassium
KA	acide kynurénique
KMO	kynurénine monoxydase
KO	Knock-out
LC	locus coeruleus
LCR	liquide céphalo-rachidien
L-dopa	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LPS	Lipopolysaccharide
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
MADRS	Montgomery and Asberg Depression Rating Scale
MAO	monoamine oxidase
MEP	Potentiel moteur évoqué
MRS	Spectroscopie par Résonance Magnétique
NA	Noradrénaline
Na ⁺	Ion sodium
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell

NK	natural killer
NLRP3	Nod-like receptor 3
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	Nitric oxide
NR2B	NMDA receptor subtype 2B
NSAID	anti-inflammatoire non-stéroïdien
NSF	Novelty Suppressed Feeding Test – test d'hypophagie induite par la nouveauté
OSM	Organisation mondiale de la Santé
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PE	Potentiel évoqué
PKC	Protein kinase C
PVN	paraventricular nucleus
QA	Acide Quinolinique
rACC	Rostral anterior cingulate cortex
ROS	Reactive oxygen species
rTMS	Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation
SNC	Système nerveux central
SPT	Sucrose Preference Test – test de preference au sucrose
SSRI	Selective Serotonin re-uptake Inhibitor
ST	Splash Test
SVZ	Zone sous ventriculaire
TDAH	Trouble de l'attention et hyperactivité
tDCS	transcranial direct current stimulation
TDO	tryptophan 2,3 dioxygenase
TEP	tomographie par émission de positrons
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TPH-2	Tryptophan hydroxylase
TST	Tail Suspension Test – Test de suspension par la queue
UCMS	Unpredictable Chronic Mild Stress
VNS	Stimulation du nerf vague

RESUME / ABSTRACT

La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) fait l'objet d'un regain d'intérêt par les communautés scientifique et médicale pour le traitement de diverses maladies psychiatriques, notamment la dépression majeure. Le but de ce travail de thèse est (i) de modéliser l'effet antidépresseur de la tDCS chez la souris saine afin d'identifier les paramètres de stimulation optimaux et de confirmer l'effet de type antidépresseur de la tDCS chez différents modèles murins de dépression et (ii) d'identifier certains des mécanismes d'action de la tDCS afin d'améliorer son utilisation et donc la prise en charge des patients. Nous avons montré que la tDCS induisait un effet de type antidépresseur à long terme dans le test de nage forcée chez la souris saine, effet qui varie en intensité en fonction des paramètres de stimulation (nombre, durée, intensité et polarité de stimulation). La tDCS permet également de normaliser les comportements de type dépressifs observés chez les souris soumises à une exposition chronique à la corticostérone (hormone de stress) (modèle CORT), à des stress imprédictibles (modèle UCMS) ou à l'injection de LPS. L'analyse de l'expression du facteur de transcription précoce c-fos par immunohistochimie a permis de mettre en évidence que cet effet antidépresseur est associé à l'activation des neurones au sein de différentes structures impliquées dans la régulation émotionnelle et suggère la mise en place d'autres mécanismes (neuroplasticité?) lorsque la stimulation est répétée. De façon intéressante, la tDCS semble moduler la réponse inflammatoire induite par l'exposition chronique à des stress imprédictibles. En effet, la tDCS normalise les augmentations du nombre de cellules et des taux de globule blanc dans la rate, induites par la procédure d'UCMS et témoignant du déclenchement de la réponse inflammatoire. Ainsi ce travail participe à une meilleure compréhension des effets comportementaux de la tDCS et des phénomènes physiologiques les sous-tendant.

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method with increasing interest for the treatment of several brain disorders, such as major depression. Despite great enthusiasm and promising results, some studies report discrepant findings and no consensus exists for the clinical use of tDCS. The present work aims (i) to determine the most effective stimulation parameters to optimize antidepressant-like effect of tDCS in the forced-swim test in naïve mice and to evaluate the ability of tDCS to reverse depressive-like behaviors in different mouse models of depression, and (ii) to identify some of the mechanisms of action of tDCS to enhance our knowledge on this therapeutic strategy, and thus its clinical effects. We reported that tDCS induced long-lasting antidepressant-like effect, which varied as a function of stimulation settings including number, duration, intensity and polarity of stimulation. Interestingly, the present study also demonstrated that tDCS reduced

depressive-like behaviors in different mouse models of depression (UCMS, chronic corticosterone exposure and acute LPS administration). Using cFos immunohistochemistry, we reported that behavioral outcomes induced by a single stimulation were associated with neuronal activation in several brain area involved in emotional regulation. Surprisingly, ten stimulations failed to modulate neuronal activation suggesting the development of other mechanisms behind the long-term effect of repeated tDCS, probably associated with plastic changes in the neuronal response. Interestingly, tDCS have the ability to reverse the UCMS-induced inflammatory response, particularly the number of cells and the polynuclear cell percentage in the spleen. This work brings new insights for a better understanding of the behavioral effects of tDCS and its underlying physiological processes.

PREAMBULE

Avec une prévalence sur la vie entière de 20% dans la population générale, la dépression majeure est un des troubles neuropsychiatriques les plus fréquents. La prise en charge des patients reste insuffisante puisque le délai d'action des traitements pharmacologiques actuellement disponible reste long et que la moitié des patients n'expérimente pas d'effet thérapeutique adéquat après un premier traitement. Les recherches se poursuivent donc afin d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la dépression et de développer des traitements antidépresseurs plus efficaces et à action plus rapide.

Plusieurs pistes peuvent être explorées dans l'objectif d'améliorer la prise en charge des patients. D'abord, il est nécessaire de mieux cerner la physiopathologie de la dépression pour en améliorer le traitement. Si l'hypothèse monoaminergique de la dépression (déficience des systèmes sérotoninergique, noradrénergique et dopaminergique au niveau cérébral) est largement admise et a permis le développement successif de différentes classes d'antidépresseurs actuellement prescrits, d'autres altérations ont été identifiées. En effet, la dépression est apparue comme étant une pathologie complexe et multifactorielle, avec une intrication étroite entre différentes causes étiologiques (génétique, environnementale, dérégulation de l'axe HPA, réponse inflammatoire...). De nombreuses données cliniques et précliniques ont démontré un lien étroit entre une activation du système immunitaire et la dépression, donnant naissance à l'hypothèse inflammatoire de la dépression. Cette hypothèse offre de nombreuses pistes à explorer et des perspectives thérapeutiques intéressantes.

Parallèlement à l'exploration de nouvelles hypothèses concernant la physiopathologie de la dépression, il est important de développer de nouveaux traitements pour améliorer le quotidien des personnes souffrant de dépression. De nouvelles stratégies, basées sur la stimulation cérébrale, offre un nouvel espoir face aux limites atteintes par les traitements pharmacologiques en psychiatrie. La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) est une technique de neuromodulation non invasive, peu coûteuse et avec très peu d'effets secondaires qui est l'objet d'un regain d'intérêt par la communauté scientifique et médicale. La tDCS consiste à moduler l'activité neuronale en modifiant la polarisation membranaire de repos dans le but de rétablir les activités cérébrales anormales décrites chez les patients souffrant de dépression. Si certains des mécanismes d'action de la tDCS sont bien documentés, beaucoup de connaissances sont encore manquantes et l'utilisation de la tDCS en clinique reste mal maîtrisée, avec des effets thérapeutiques plus ou moins prononcés.

Ce travail de thèse a deux objectifs principaux. Le premier est d'améliorer les connaissances sur les effets comportementaux de la tDCS chez la souris; après la détermination des paramètres de stimulation permettant d'obtenir la réponse comportementale la plus robuste chez la souris saine, l'effet de type antidépresseur de la tDCS sera confirmé dans différents modèles de dépression. Le second est d'identifier certains des mécanismes d'action de la tDCS; les structures cérébrales recrutées par la tDCS seront identifiées et l'effet de la tDCS sur les processus inflammatoires induit par la procédure de stress chronique (UCMS) sera évalué.

Nous présenterons, tout d'abord, dans ce manuscrit un état de l'art des connaissances sur la dépression, sa physiopathologie et ses traitements puis nous nous focaliserons sur les données de la littérature concernant la tDCS, ses effets et ses mécanismes d'action connus. Nous présenterons ensuite le détail des techniques et expérimentations réalisées dans ce travail puis les résultats obtenus. Enfin nous nous attacherons à replacer ces données dans leur contexte scientifique et à déterminer leurs applications et perspectives.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1 LA DEPRESSION UNIPOLAIRE OU SYNDROME DEPRESSIF MAJEUR

1.1 Symptômes, Prévalence et Conséquences de la dépression

La première description de la dépression est faite par Hippocrate (460-370 avant J.C.) qui la caractérise comme une entité distincte due à un excès de bile (*mélas*) noire (*kholé*), on l'appelle alors la mélancolie. Elle est ensuite considérée pendant de nombreux siècles, de même que les autres maladies psychiques, comme un témoin de la présence du malin. Il faut attendre le XVIIème Siècle pour qu'elle soit considérée comme un syndrome et elle est aujourd'hui reconnue comme une pathologie à part entière dont les symptômes sont décrits dans le DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ou Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux) de l'American Psychiatric Association (APA-Association américaine de Psychiatrie) ou la CIM-10 (Classification internationale des Maladies) publiée par l'OMS.

Les critères diagnostiques de l'épisode dépressif majeur selon le DSM-5 sont les suivants :

- A. Au moins 5 des symptômes suivants ont été présents durant la même période de deux semaines et représentent un changement par rapport au fonctionnement précédent : au moins un de ces symptômes est soit (1) une humeur dépressive, soit (2) une perte d'intérêt ou de plaisir.
Remarque : Ne pas inclure les symptômes qui sont clairement attribuables à une autre condition médicale.
1. Humeur dépressive présente la plus grande partie de la journée, presque tous les jours, comme signalée par la personne (p. ex., se sent triste, vide, désespérée) ou observée par les autres (p. ex., pleure). (Remarque : Chez les enfants et les adolescents, peut être une humeur irritable.)
 2. Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes, ou presque toutes, les activités, la plus grande partie de la journée, presque tous les jours (signalée par la personne ou observée par les autres).
 3. Perte de poids significative en l'absence de régime ou gain de poids (p. ex., changement de poids excédant 5 % en un mois), ou diminution ou augmentation de l'appétit presque tous les jours. (Remarque : Chez les enfants, prendre en compte l'absence de l'augmentation de poids attendue.)
 4. Insomnie ou hypersomnie presque tous les jours.
 5. Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours (observable par les autres, non limités à un sentiment subjectif de fébrilité ou de ralentissement intérieur).
 6. Fatigue ou perte d'énergie presque tous les jours.
 7. Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée (qui peut être délirante) presque tous les jours (pas seulement se faire grief ou se sentir coupable d'être malade).
 8. Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours (signalée par la personne ou observée par les autres).
 9. Pensées de mort récurrentes (pas seulement une peur de mourir), idées suicidaires récurrentes sans plan précis ou tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.
- B. Les symptômes entraînent une souffrance cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.
- C. L'épisode n'est pas imputable aux effets physiologiques d'une substance ou d'une autre affection médicale.

Selon l'OMS, la dépression est le premier facteur de morbidité et d'incapacité dans le monde ; elle concernerait plus de 300 Millions de personnes.

Outre la souffrance psychique du patient, les conséquences de la dépression sont importantes et parfois dramatiques. Les relations sociales et familiales peuvent être considérablement altérées, de même que la sphère professionnelle, avec notamment, une multiplication des arrêts de travail et une baisse de productivité. La dépression peut également être associée à l'apparition et au développement de troubles somatiques connexes, comme par exemple, le diabète, les pathologies cardio-vasculaires et les maladies infectieuses. Enfin, l'une des conséquences directes la plus dramatiques est le risque suicidaire. La dépression est la première cause de suicide et le risque de tentative de suicide est multiplié par 21 en cas de syndrome dépressif majeur (Olié and Mouren 2014).

Le coût socio-économiques est lui aussi non négligeable, d'une part par le coût des traitements propres à cette pathologie mais aussi aux pathologies associées. Citons pour exemple, une étude du CreDES (centre de recherche, d'étude et de documentation en économie de la Santé) qui a mis en évidence que, sur une période de 3 mois, un dépressif souffre de 7 affections en moyenne, générant une facture de 555 € dont 120 € au titre de la maladie principale quand un individu non dépressif n'en déclare que 3 pour une dépense de 180 €. Au-delà de ce coût direct, l'OMS met surtout en avant la perte économique mondiale relative au manque de reconnaissance et d'accès aux soins de la dépression et l'estime à 1000 milliards de dollars US par an.

1.2 Etiologie de la dépression

La dépression est une pathologie complexe et multifactorielle dont certaines causes et atteintes physiopathologiques ont été identifiées sans qu'elles soient exclusives, exhaustives et systématiques. Nous dresserons ici un inventaire des connaissances actuelles mais de nombreuses pistes restent à investiguer.

1.2.1 Facteurs génétiques et héritabilité de la dépression

Si la dépression n'est pas une maladie génétique, plusieurs études mettent en avant l'héritabilité de la dépression. Dans leur étude portant sur des familles de jumeaux mono-et dizygotes, Sullivan *et al.* (2000) déterminent la part d'héritabilité de la dépression à environ 37%. Il semblerait également que cette part ne soit pas identique selon les caractéristiques de la pathologie. En effet, les formes précoces, sévères et récurrentes auraient une héritabilité plus importante que les autres formes (Holmans *et al.* 2007).

Cependant, et malheureusement, aucune association systématique entre des marqueurs génétiques et la dépression n'est possible et aucun gène majeur n'a pu être isolé. Les études suggèrent plutôt

que les facteurs génétiques prédisposeraient au développement de la pathologie en cas d'exposition à des facteurs environnementaux qui feraient office de déclencheur. Le stress est l'un de ces facteurs, cet aspect sera développé dans un paragraphe ultérieur.

A ce jour, plusieurs gènes semblent avoir une pertinence plus élevée que les autres pour explorer les facteurs génétiques impliqués dans l'apparition de troubles dépressifs. Parmi eux, la présence d'un polymorphisme du transporteur de la sérotonine, du récepteur 5-HT_{1A}, de la tryptophane hydroxylase 2 (TPH-2), du « brain derived neurotrophic factor » (BDNF) (Gonda et al. 2018), serait associée à la survenue d'une dépression relative au stress, ou d'une modulation des états dépressifs et de la réponse aux antidépresseurs. Nous allons ici détailler plus précisément le gène le plus étudié dans le contexte de la dépression; le gène codant pour le transporteur de la sérotonine (SERT ou 5-HTT). SERT est la cible des antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), largement utilisés en clinique et qui montrent une efficacité significative dans le traitement de la dépression. Il n'y a pas de preuve directe d'association de ce gène aux troubles dépressifs, cependant sa région promotrice est le siège d'un polymorphisme fonctionnel (5-HTTLPR) responsable, selon l'inclusion ou non de 44 paires de bases, de la présence d'un allèle long ou court et donc du taux d'expression du gène 5-HTT. Plus précisément, la variante courte du gène est associée à une activité transcriptionnelle réduite se traduisant par une diminution d'expression du transporteur et donc une baisse de la recapture de la sérotonine (5-HT) en comparaison à la version longue (Lesch et al. 1996, 1994; Heils et al. 1996). Selon les études génétiques, l'allèle court serait associé à l'occurrence de troubles dépressifs chez l'Homme et prédisposerait à la manifestation d'une personnalité anxieuse et pessimiste (Lesch et al. 1996; Ogilvie et al. 1996). De plus, le polymorphisme génétique du gène 5-HTT serait susceptible de moduler l'influence des événements stressants sur l'apparition des symptômes dépressifs : l'allèle court est associé à l'exacerbation des symptômes dépressifs, du risque suicidaire et au diagnostic de dépression en lien avec les événements stressants (Caspi et al. 2003). La preuve d'une interaction gène-environnement dans la pathologie dépressive est ici clairement démontrée. Elle a d'ailleurs été confirmée dans une méta-analyse portant sur une cinquantaine d'études menées chez l'Homme ou l'animal (Karg et al. 2011). Au niveau cérébral, une étude a démontré l'association entre le génotype 5-HTTLPR et les structures, fonctions et interconnexions des circuits neuronaux impliquant l'amygdale et le cortex cingulaire antérieur (rACC pour rostral anterior cingulate cortex et cACC pour caudal anterior cingulate cortex), structures cérébrales impliquées dans le circuit des émotions et potentiellement la dépression (Pezawas et al. 2005). Il a en effet été démontré au niveau fonctionnel, une diminution de la connectivité entre l'amygdale et le rACC chez les porteurs de l'allèle court du gène 5-HTT, synonyme d'une augmentation d'activité de l'amygdale chez ces sujets puisque le rACC module négativement

l'activité de l'amygdale. D'un point de vue structurel, les analyses morphométriques réalisées dans cette étude ont montré chez les porteurs de l'allèle court du gène 5-HTT, une réduction du volume de matière grise dans des régions limbiques fortement impliquées dans le traitement des émotions négatives et en particulier le cortex cingulaire périgénuale et l'amygdale.

1.2.2 L'hypothèse monoaminergique

L'hypothèse monoaminergique est l'hypothèse phare de la dépression depuis les années 50. Elle tire son origine de l'effet dépressif de la réserpine, utilisée, au départ, à des fins hypotensives (Cocco and Agué 1977; Freis 1954). Cet alcaloïde inhibe le transport vésiculaire des monoamines (adrénaline, sérotonine, noradrénaline, dopamine) résultant en une déplétion de ces monoamines au niveau des terminaisons axonales centrales et périphériques. Elle est également à l'origine de l'avènement des antidépresseurs de type IMAO (inhibiteur de la monoamine oxydase), ISRS (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine) et ISRSNA (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline), aujourd'hui largement utilisés dans le traitement de la dépression.

Plus en détail, l'hypothèse monoaminergique propose qu'une déficience ou un dysfonctionnement de la neuromodulation assurée par les monoamines au niveau cérébral soit à l'origine de la dépression. Plusieurs données corroborent cette hypothèse :

Tout d'abord, un taux réduit de 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid), métabolite principal de la sérotonine, a été retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients déprimés sans traitement. Une concentration réduite de 5-HT et de 5-HIAA est également retrouvée en post-mortem dans le cerveau de patients déprimés et/ou suicidés. Les patients souffrant de dépression présentent également des concentrations plasmatiques diminuées de tryptophane (Owens and Nemeroff 1994).

Ces taux bas de monoamines sont associés à des perturbations de fonction des protéines de transport, qui jouent un rôle crucial dans la communication nerveuse et la transmission monoaminergique. Ainsi une augmentation de l'activité de la monoamine oxydase, responsable de la recapture de la 5-HT dans la fente synaptique, est observée chez les patients souffrant de dépression, résultant en une diminution de la sérotonine disponible (Jesulola et al. 2018) et l'inhibition de cette enzyme est la base de nombreux antidépresseurs (IMAO).

Le fonctionnement des récepteurs aux monoamines peut également jouer un rôle dans cette hypothèse monoaminergique. Un grand nombre d'études biomoléculaires ont démontré de telles anomalies dans le cas de la dépression. Les patients présentent par exemple, un amoindrissement du

nombre et de l'affinité des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂ et une hypersensibilité des récepteurs adrénergiques α_2 , chargés de moduler la libération de noradrénaline dans le cerveau (Hrdina et al. 1997; Kaufman et al. 2016). La signalisation cellulaire est également altérée, notamment via les protéines-G et les protéines kinases (Coull et al. 2000).

Les études en tomographie par émission de positrons (TEP) ont largement contribué à l'avènement de l'hypothèse monoaminergique de la dépression en confirmant l'implication de la sérotonine, la noradrénaline, le glutamate et la dopamine dans la physiopathologie de la dépression (Jesulola et al. 2018; Yohn et al. 2017; B. Liu et al. 2017). On retrouve, en effet, chez des patients déprimés, une altération du potentiel de couplage des récepteurs 5HT_{1a} et 5HT_{1b} (Sullivan et al. 2015; Wang et al. 2016; Ananth et al. 2018; Parsey et al. 2006; Iscan et al. 2017; Tiger et al. 2016; Meyer et al. 2004; Voineskos et al. 2007; Arakawa et al. 2016; Lee et al. 2014, 2015) et une diminution de la transmission noradrénergique. Un traitement par antidépresseur engendre également une augmentation de la neurotransmission glutamatergique chez des patients déprimés, et l'administration d'un traitement augmentant la liaison de la noradrénaline à ses récepteurs entraîne une augmentation de la symptomatologie dépressive (Arakawa et al. 2008; Sekine et al. 2010; Moriguchi et al. 2017; Moriguchi, Yamada, et al. 2017; Yatham et al. 2018; Abdallah et al. 2017; C.-T. Li et al. 2016; Chen et al. 2018; Esterlis et al. 2018).

1.2.3 Le stress : hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA pour hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

Le stress est l'un des facteurs environnementaux majeurs pouvant précipiter l'apparition de symptômes dépressifs. Il est admis dans la littérature scientifique que le lien entre stress et dépression passerait par l'hyper activation de l'axe HPA, circuit impliqué dans la perception du stress par l'organisme et la réponse physiologique appropriée.

En condition non pathologique, l'interprétation subjective d'un stimulus comme une menace/un stress par le système limbique (i.e. amygdale et hippocampe) induit d'une part l'activation du locus coeruleus (LC, noyau regroupant les neurones noradrénaline) et du système nerveux sympathique, et d'autre part la libération d'hormones par l'axe HPA. En effet, l'activation du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus par les noyaux amygdaliens, l'hippocampe, le cortex préfrontal et le LC entraîne la sécrétion de CRF (corticotropin releasing factor) et de vasopressine (Figure 1). Ces hormones activent alors la sécrétion d'ACTH (adrenocorticotrophic hormone) par l'hypophyse qui stimule ensuite la sécrétion de glucocorticoïdes (GCs), hormones stéroïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le rongeur), par les glandes surrénales. Une fois libérés dans la circulation sanguine, les glucocorticoïdes inondent l'organisme et agissent au niveau périphérique sur les

fonctions métaboliques et immunitaires mais également au niveau cérébral où ils agissent, entre autre, sur la survie neuronale, la neurogenèse, la mémorisation et l'appréciation émotionnelle des évènements (Herbert et al. 2006; Pariante and Lightman 2008; Nicolaidis et al. 2015). Les glucocorticoïdes interagissent également avec leurs récepteurs de l'axe HPA (au niveau de l'hypophyse, de l'hypothalamus et de l'hippocampe) afin d'induire un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRF et de vasopressine par l'hypothalamus et d'ACTH par l'hypophyse (Pariante and Lightman 2008; Nicolaidis et al. 2015). Ce processus permet le maintien de l'homéostasie de l'organisme, cependant en cas de sur-activation ou sous-activation de ce système, l'homéostasie n'est plus maintenue ce qui implique de multiples conséquences physiologiques pouvant mener à des pathologies aiguës ou chroniques (Nicolaidis et al. 2015).

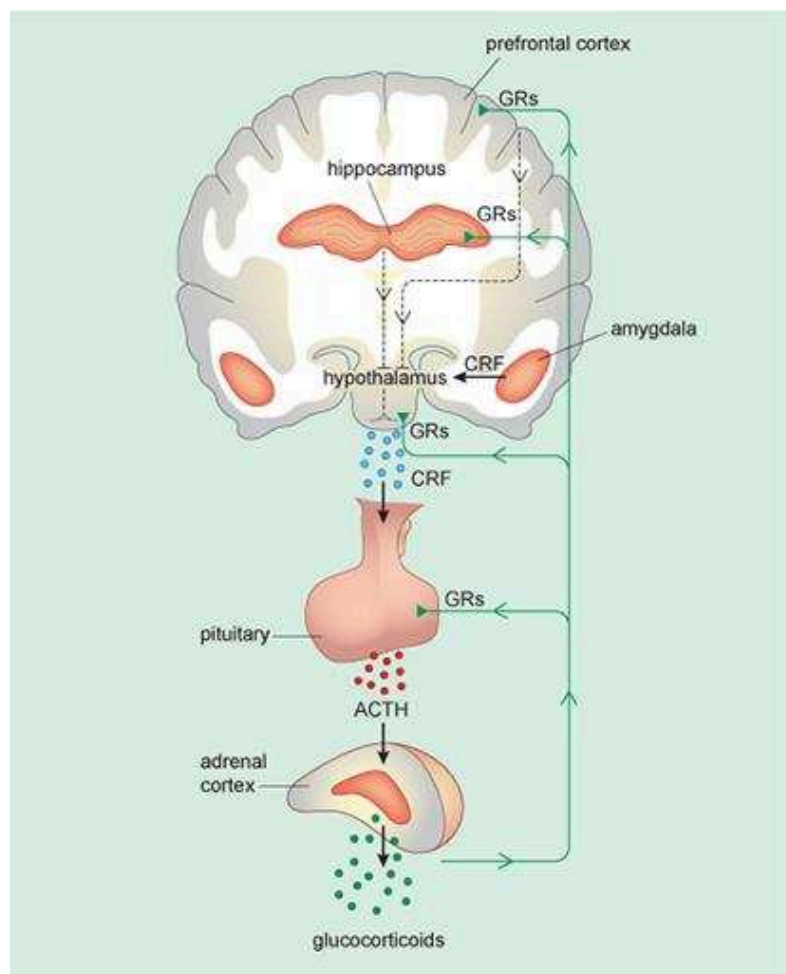


Figure 1 : Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Le lien entre dépression et axe HPA se fait au niveau de la boucle de rétroaction négative des glucocorticoïdes puisqu'il est suggéré que la dépression pourrait être la conséquence d'une exposition chronique au stress entraînant un dysfonctionnement du système de gestion du stress. En effet, lors d'un stress chronique, l'activation répétée de l'axe HPA entraînerait une altération du

rétrocontrôle négatif et du fonctionnement des récepteurs aux glucocorticoïdes engendrant un niveau élevé et continu de cortisol dans le sang. Des données cliniques soutiennent cette hypothèse; un pourcentage significatif (50 %) de patients souffrant de dépression sévère présente un niveau élevé de cortisol dans la salive, le plasma, l'urine et une taille accrue de l'hypophyse et des glandes surrénales (pour revue, voir (Nemeroff and Vale 2005)).

L'exposition à des stress chronique et le dérèglement de l'axe HPA induisent plusieurs altérations neurobiologiques qui pourraient être transmises par les facteurs neurotrophiques. Le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), facteur neurotrophique cérébral majeur, a été beaucoup étudié ces dernières années (Angelucci et al. 2005; Nestler et al. 2002). Chez l'animal, le stress aigu ou chronique induit une diminution de l'expression de BDNF au niveau du gyrus denté et de la couche de cellules pyramidales de l'hippocampe (Smith 1996). La grande majorité des antidépresseurs induisent, à l'inverse, une augmentation de l'expression de BDNF dans ces régions et sont capables de reverser l'effet du stress précédemment décrit (Nibuya et al. 1996). Chez l'Homme, la participation du BDNF a également été démontrée; une diminution des taux plasmatiques de BDNF a été retrouvée chez les patients souffrant de dépression majeure et une surexpression de BDNF a été retrouvée, en post-mortem, au niveau hippocampique dans les cerveaux de patients traités par antidépresseurs (Karege et al. 2002; Chen et al. 2001).

Outre les facteurs neurotrophiques, la médiation entre stress et dépression pourrait également être liée aux processus inflammatoires, l'une des nouvelles hypothèses physiopathologiques de la dépression. Ce point sera développé dans la partie suivante (1.2.4).

De nombreux modèles animaux, dont certains seront utilisés dans ce travail, sont basés sur l'hypothèse de l'axe HPA. Nous citerons pour exemple, le modèle UCMS (unpredictable chronic mild stress) et le modèle CORT (administration chronique de corticostérone). Le modèle UCMS développé par Katz en 1981 (Katz et al. 1981) consiste en une série de stress de faible intensité, administrée de manière chronique et aléatoire sur plusieurs semaines. Ce modèle comportemental est sensé mimé l'exposition répétée au stress susceptible d'induire une dépression chez l'homme.

Le modèle CORT, quant à lui, consiste en une administration chronique de corticostérone (équivalent du cortisol humain) dans l'eau de boisson, là aussi pendant plusieurs semaines (Murray et al. 2008a; David et al. 2009; Gourley et al. 2008; Ardayfio and Kim 2006). Cette administration chronique mime, quant à elle, l'effet physiologique d'une exposition répétée au stress et probablement la dérégulation de l'axe HPA décrite en début de ce paragraphe.

Ces modèles murins de la dépression seront développés plus précisément dans le paragraphe 1.3.3 (modèles basés sur les stress environnementaux).

1.2.4 L'hypothèse inflammatoire

Les hypothèses étiologiques de la dépression présentées précédemment sont les plus courantes et les plus anciennes. Aujourd'hui, de nouvelles hypothèses émergent dans la communauté scientifique ; l'hypothèse inflammatoire est l'une des principales et celle qui offre des perspectives thérapeutiques des plus intéressantes. Cette hypothèse étant au cœur d'une partie de ce travail de thèse, nous la développerons particulièrement dans ce chapitre.

- Inflammation et SNC : généralités

Le système immunitaire est un système complexe qui a pour but de protéger l'organisme contre les agressions telles que les pathogènes et leurs toxines.

Il est composé de 3 systèmes de défense agissant à différents niveaux : (1) les barrières anatomiques et physiologiques telles que la peau, le mucus ou encore la salive, (2) l'immunité innée impliquant les cellules phagocytaires mononucléaires (macrophages et monocytes) et polynucléaires (neutrophiles) et (3) l'immunité acquise caractérisée par l'activation des lymphocytes T et B et la production d'anticorps spécifiques.

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme un organe immun privilégié, du fait de l'existence de la barrière hémato-encéphalique et ses jonctions serrées limitant la pénétration des anticorps et cellules immunitaires périphériques non activées. Cependant on sait aujourd'hui qu'une activation immunitaire périphérique peut agir sur le cerveau et qu'une réaction inflammatoire peut se mettre en place au sein même du SNC. Ce phénomène est appelé neuroinflammation.

Les principaux médiateurs de l'inflammation du SNC sont les cytokines, des grosses protéines qui font partie d'une grande famille de molécules de signalisation cellulaire. De manière grossière, elles peuvent être distinguées en deux catégories : pro-inflammatoires, c'est le cas du TNF, de l'interleukine (IL) 1 et d'IL-6, ou anti-inflammatoires, comme par exemple IL-10 ou TGF- β . Elles ont un rôle central et multiple puisqu'elles agissent en cascade sur de nombreuses autres molécules.

Au niveau central, les cytokines sont produites par les neurones eux-mêmes, les astrocytes et la microglie, cette dernière semblant jouer un rôle particulièrement important dans l'immunité innée cérébrale. Les cellules microgliales d'origine myéloïde sont les macrophages résidents du SNC. Elles ont une morphologie particulière caractérisée par des prolongements fins qui « surveillent » le micro-environnement neuronal. Une fois activée, elles sont capables de modifier leur morphologie et présente alors un corps cellulaire hypertrophique et des prolongements rétractés et condensés. Les cellules microgliales peuvent alors mettre en place des mécanismes transcriptionnels qui mènent à

l'analyse et à la libération des cytokines et d'autres seconds messagers. Ce phénomène est appelé gliose réactionnelle (Fleshner et al. 2017; Wohleb et al. 2016).

Dans le lien entre inflammation et dépression, outre l'activation immunitaire centrale, les cytokines périphériques peuvent également agir sur le fonctionnement cérébral. Ces molécules sont en effet capables de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau de zones spécifiques, plus « lâches » telles que l'organe circumventriculaire, ou par un transport actif au travers de cette barrière (Quan and Banks 2007). Elles peuvent également agir via l'activation du nerf vague, par l'entrée de monocytes activés de la périphérie vers le système nerveux central (SNC) et en tant que second messenger au niveau de la couche endothéliale de la BHE (Krishnadas and Cavanagh 2012; Capuron and Miller 2011).

Les cytokines, centrales ou périphériques, inondent le cerveau et leur action y est multiple.

- Evidence du lien entre inflammation et dépression

C'est à la fin des années 80 que les premières données soulevant l'hypothèse d'un lien entre système immunitaire et dépression apparaissent, et notamment grâce à la découverte d'une augmentation notable du nombre total de globules blancs dans le sang et du pourcentage de neutrophiles et de lymphocytes chez les patients dépressifs (Zorrilla et al. 2001). De même, une diminution de l'activité des « natural killer cells » est également mise en évidence chez ces sujets (Irwin et al. 1987; Irwin and Miller 2007). Par la suite, de nombreuses données cliniques et précliniques ont fourni la preuve irréfutable de ce lien entre inflammation et dépression et ce, par de nombreuses approches.

Premièrement, les cliniciens observent une **comorbidité très importante entre la dépression et de nombreuses pathologies impliquant le système immunitaire**. On note, entre autres, une prévalence augmentée de syndrome dépressif majeur dans des conditions inflammatoires comme l'asthme, l'arthrite, les maladies coronariennes, le diabète ou encore l'obésité. Par exemple, la prévalence de dépression chez les patients hospitalisés pour une pathologie cardiaque est comprise entre 17 et 25% (Halaris 2017) et entre 13 et 42% chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune fréquente (Pryce and Fontana 2017). Il est important de noter que ces co-morbidités sont bidirectionnelles, l'ordre d'apparition des symptômes inflammatoires ou dépressifs étant variable.

Un second argument est en faveur du lien entre perturbations immunitaires et dépression, il s'agit **des modifications d'expression des marqueurs de l'inflammation**, principalement les cytokines,

chez les patients souffrant de dépression. Comme précédemment décrit, les cytokines sont des protéines de signalisation cellulaire responsables de la médiation et de la régulation de la réponse immunitaire. Elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α (tumor necrosis factor)) ou anti-inflammatoires (IL-1Ra, IL-4, IL-10 et TGF (transforming growth factor)- β 1).

Il est aujourd'hui admis que l'expression de ces cytokines est modulée lors d'un trouble dépressif même si le niveau de perturbation et le type de cytokine concerné varie selon les études. Il est par exemple retrouvé chez des patients déprimés, comparés à des sujets sains, une surexpression de TNF α R1 (sous-type 1 du récepteur au TNF), TNF α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-1 β et une augmentation de la CRP (Huang et al. 2018; Zhang et al. 2018; Zou et al. 2018; Danner et al. 2003; Dowlati et al. 2010). L'équipe de Garden a étudié l'expression de 27 marqueurs plasmatiques immunitaires chez des patients âgés souffrant de dépression unipolaire et a retrouvé une surexpression de 22 d'entre eux, comparé aux taux présents chez des témoins âgés sains (Gaarden et al. 2018). De manière intéressante, il semble que ces taux anormalement élevés varient également selon le type de dépression. En effet, les patients déprimés résistant au traitement antidépresseur montrent une élévation encore plus conséquente de cytokines pro-inflammatoires (Haroon et al. 2018; Huang et al. 2018). Cette surexpression de cytokines est également positivement corrélée à la sévérité de la dépression, comme l'ont montré Zou *et al.* (Zou et al. 2018) qui observent une corrélation entre le score HAMD (Hamilton depression rating scale – échelle de dépression d'Hamilton) et des niveaux plus élevés d'IL-1 β et de TNF α .

Ces modifications sont également observées dans différents modèles animaux de dépression (Liu et al. 2017). Une augmentation des concentrations périphériques et centrales de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) est ainsi observée chez des animaux soumis au protocole d'UCMS [unpredictable chronic mild stress (stress chroniques modérés imprédictibles)] (Steptoe et al. 2001; Persoons et al. 1995; Grippo et al. 2005; Kubera et al. 1998; Goshen et al. 2008; Pan et al. 2006; You et al. 2011; S. Li et al. 2008; W. Liu et al. 2013), de résignation acquise (Chourbaji et al. 2006), d'isolement social (Bartolomucci et al. 2003; Möller et al. 2013) ou de défaite sociale (Gómez-Lázaro et al. 2011; Patki et al. 2013; Sukoff Rizzo et al. 2012; Audet et al. 2011) et chez des rongeurs ayant subi une ablation du bulbe olfactif (Rinwa et al. 2013; Song et al. 2009). Les effets de l'UCMS sur la réponse inflammatoire seront détaillés plus loin, dans le paragraphe 1.3.

Si ces éléments sont en faveur d'une sur-activation du système immunitaire dans la dépression, il faut noter que les taux de cytokines chez les patients déprimés restent bien inférieurs à ceux observés dans les pathologies impliquant directement le système immunitaire (Zunszain, Hepgul, and

Pariante 2013). De plus, il a été observé chez des patients déprimés une diminution de la réponse immunitaire induite par une injection de LPS (lipopolysaccharide) (Zhang et al. 2018). L'administration de LPS, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif (ex: E-coli), ne déclenche pas d'infection mais provoque une forte réponse du système immunitaire prenant la forme de symptômes pseudo-grippaux pendant quelques heures suivant l'injection. 18h après stimulation par LPS, les patients souffrant de dépression montrent un taux inférieur d'IL-1 β , IL-6 et TNF α par rapport à des sujets sains, taux pourtant plus élevés chez ces patients en l'absence de LPS. L'hypothèse soulevée par cette équipe postule que la pathologie dépressive engendrerait une inflammation chronique à bas bruit qui induirait un affaiblissement de la réponse immunitaire innée des patients en présence d'un agent pathogène, phénomène pouvant s'apparenter au processus de tolérance immunitaire induit par une inflammation chronique et pouvant également expliquer la prévalence accrue de certaines pathologies inflammatoires chez les patients déprimés mentionnée en début de chapitre.

Le lien entre inflammation et dépression est également mis en évidence par **l'effet pro-dépressif de l'administration exogène de cytokines et l'effet antidépresseur d'agents anti-inflammatoires ou de mutations génétiques altérant le système immunitaire.**

Concernant le premier point, il est fréquemment observé chez des patients traités par immunothérapie dans le cas de cancer (traitement par IL-2) ou d'hépatite C chronique (traitement par IFN α) une induction de symptômes dépressifs. Dans une revue de neuf études prospectives conduites chez des patients traités par IFN α dans un contexte d'hépatite C, la prévalence de dépression était comprise entre 20 et 30% alors qu'elle est de 15% sur la vie entière pour la population générale (Krishnadas and Cavanagh 2012).

L'effet « protecteur » d'une altération du système immunitaire est confirmé par l'utilisation de modèles animaux transgéniques, comme les souris Knock-out (KO) pour le récepteur aux IL-1 ou des souris sur-exprimant un antagoniste de ces récepteurs. Ces animaux, lorsqu'ils sont soumis à un protocole de CMS pendant 5 semaines, ne présentent pas les modifications inflammatoires et comportementales qui y sont associées chez des animaux sains (Goshen et al. 2008). Les souris KO pour le gène codant l'IL-6 sont quant à elles « résistantes » au protocole de résignation acquise, et les souris KO pour le gène codant le récepteur 1 au TNF α ne montrent pas les comportements de type dépressif généralement associés à la contention (Chourbaji et al. 2006; Kaster et al. 2012; Liu et al. 2017).

Un autre élément en faveur du lien entre inflammation et dépression est **l'impact des traitements anti-inflammatoires sur l'humeur**. De nombreuses études ont été réalisées avec des composés anti-inflammatoires dans un contexte de dépression, seule ou associée à d'autres pathologies somatiques. Les composés testés le plus fréquemment sont les acides gras oméga 3, la curcumine, les composés anti-inflammatoires non stéroïdiens ou NSAIDs (pour non-steroid anti-inflammatory drugs), le Celecoxib (inhibiteur de la cyclo-oxygénase 2 ou Cox 2) ou l'Infliximab (antagoniste du TNF α). Les résultats sont mitigés, présentant selon les études des effets positifs ou négatifs de ces composés sur les symptômes dépressifs (pour revue voir (Liu et al. 2017; Raison 2017; Köhler et al. 2014)). Il a par exemple été mis en évidence que l'infliximab réduit les symptômes dépressifs mais uniquement chez les patients souffrant de dépression résistante et associée à une forte inflammation basale (Raison et al. 2013). Malgré de nombreuses limites, tant au niveau des populations d'étude (hétérogénéité des pathologies, comorbidités) que des traitements utilisés (en association ou non avec des antidépresseurs, prise en compte des effets secondaires), toutes ces études ont le mérite de soulever l'évidence du lien entre système immunitaire et pathologie dépressive, sans pour autant démontrer le potentiel thérapeutique des anti-inflammatoires dans le traitement de la dépression.

Finalement, le dernier argument en faveur de l'association entre immunité et dépression vient de la mise en évidence de la **capacité des traitements antidépresseurs classiques à moduler l'expression des marqueurs de l'inflammation**. De nombreuses études cliniques ont aujourd'hui été menées chez des patients souffrant de syndrome dépressif majeur et traités par antidépresseurs dans le but d'évaluer la réponse comportementale/thérapeutique aux antidépresseurs et de mesurer les taux plasmatiques de cytokines. Deux méta-analyses ont combiné certaines de ces données. La première menée par Hannestad *et al.* portait sur 22 essais cliniques évaluant les taux sériques de TNF- α , IL-6 et IL-1 β avant et après traitement antidépresseurs chez des patients souffrant de syndrome dépressif majeur. Les auteurs concluent à une réduction des symptômes dépressifs par les antidépresseurs associée à une diminution des taux d'IL-1 β et IL-6 mais pas de TNF- α (Hannestad et al. 2011). La seconde méta-analyse compile les données issues de 35 essais investiguant l'expression d'IL-6, TNF- α et de protéine C-réactive (CRP pour C-reactive protein) également chez des patients souffrant de dépression et traités par antidépresseurs. Les résultats sont en faveur d'une diminution du taux d'IL-6 induite par les traitements mais ceci indépendante de la réponse clinique. Il est à noter que le taux persistant de TNF- α a pu être associé à la résistance au traitement antidépresseur (Strawbridge et al. 2015).

L'effet des antidépresseurs sur le système immunitaire a également été démontré chez l'animal (Schmidt et al. 2016). Par exemple, chez le rat, l'imipramine et la fluoxétine conduisent à une

réduction de l'expression des ARNm de TNF- α et IL-1 β dans des cultures microgliales (Obuchowicz et al. 2014). La paroxétine et l'amitryptiline entraînent une diminution des taux de TNF- α et IL-1 β (Vismari et al. 2012; Liu et al. 2014). La miansérine, quant à elle, réverse la surexpression de TNF- α et d'IL-6 induite par le stress chronique et la stimulation par LPS (Manikowska et al. 2014).

- Les mécanismes neurobiologiques sous-tendant l'hypothèse inflammatoire de la dépression

- *Activation de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO1) et ses conséquences*

L'un des mécanismes d'action clé des cytokines est l'activation de l'IDO1 (Dantzer 2017). Son implication dans l'hypothèse inflammatoire de la dépression vient tout d'abord d'une observation faite chez des patients souffrant de cancer et traités par IL-2 ou IFN- α et qui avaient des taux diminués de tryptophane circulant. L'importance de cette diminution était positivement corrélée à la sévérité des symptômes dépressifs. Le tryptophane étant métabolisé par l'enzyme IDO1, un lien entre cette molécule et la symptomatologie dépressive a été recherché. Chez des souris injectées au LPS ou au Bacillus Calmette-Guerin (BCG, forme atténuée de *Mycobacterium bovis*), une activation d'IDO1 a été observée, et la temporalité de cette activation était corrélée à la disparition des comportements de type maladif (cf: symptôme pseudo-grippal) et à l'apparition des symptômes dépressifs (Lestage et al. 2002; Moreau et al. 2005; Moreau et al. 2008), l'IDO1 semble ainsi être un élément clé de la transition entre comportements maladifs et dépression.

Mais par quels processus cet enzyme peut agir sur le cerveau pour induire une symptomatologie dépressive ? Plusieurs voies d'action semblent impliquées et pour mieux les comprendre, un point sur le rôle de l'IDO1 est nécessaire.

Le tryptophane ingéré est métabolisé selon deux voies (Figure 2). La première, qui concerne environ 1% du tryptophane consiste en sa dégradation en 5-hydroxy tryptophane par l'enzyme tryptophane hydroxylase, ce métabolite étant lui-même dégradé en sérotonine (5- hydroxy-tryptamine) par l'enzyme décarboxylase. Les 99% restant suivent quant à eux la voie des kynurénines. La première étape consiste en la dégradation du tryptophane par l'IDO1 ou la tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO) en N-formyl-kynurénine. Cette molécule est ensuite métabolisée en kynurénine par la formamidase. La kynurénine suit alors à son tour deux voies de transformation. La première aboutit à la production d'acide kynurénique (KA) via l'enzyme kynurénine aminotransférase, et la seconde à la libération de 3-hydroxykynurenine (3HK) (via l'enzyme kynurenine monooxydase KMO) puis d'acide quinolinique (QA) (figure 2).

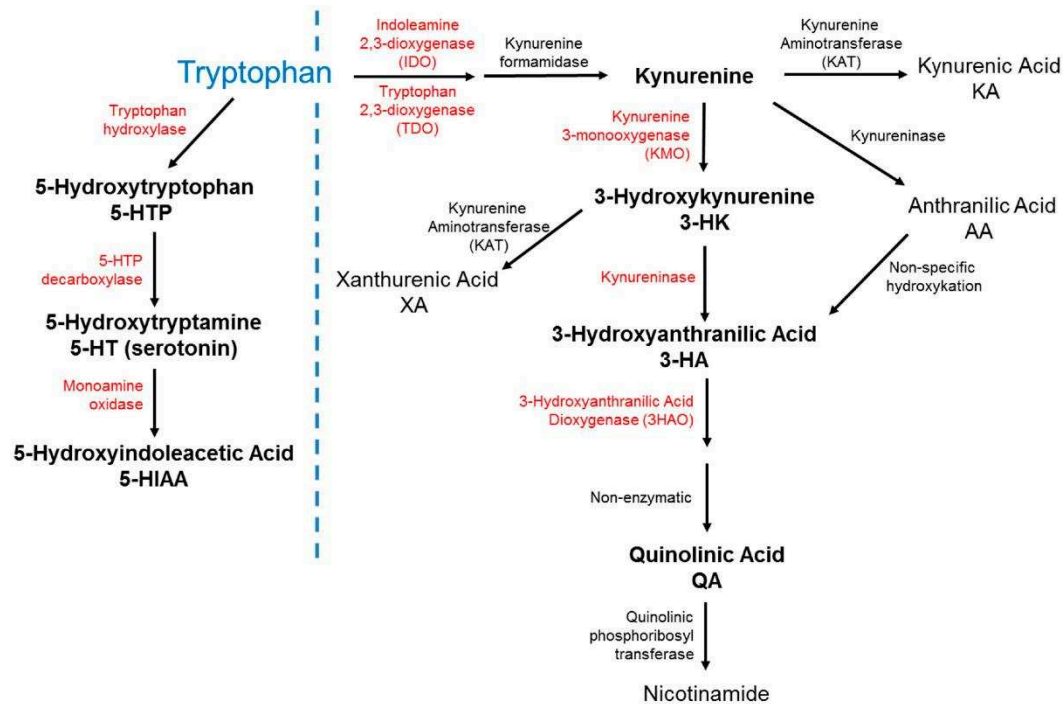


Figure 2: Métabolisme du tryptophane. Le tryptophane peut être métabolisé selon deux voies; une aboutissant à la synthèse de la sérotonine et l'autre permettant la synthèse de kynurénine. Les principaux enzymes sont notés en rouge (Li et al. 2015).

L'activation d'IDO1 par les cytokines a donc plusieurs conséquences :

- 1) Diminution de la biodisponibilité du tryptophane par l'augmentation de la métabolisation du tryptophane en kynurénine. Par voie de conséquence, l'utilisation du tryptophane dans la synthèse protéique est diminuée et la production de sérotonine est limitée (Bradley et al. 2015; Widner et al. 2002).
- 2) Augmentation de la production de kynurénines. Contrairement à ce qui a longtemps été pensé, les kynurénines ne sont pas biologiquement inactives. En effet, elles agissent comme des ligands de haute affinité avec les récepteurs aryl hydrocarbonés (AHR), récepteurs présents dans de nombreux types cellulaires et jouant un rôle protecteur au niveau des muqueuses et des barrières tissulaires. L'activation des AHR par les kynurénines a un effet immunosuppresseur tant au niveau de l'immunité innée que de l'immunité acquise. Ce processus semble nécessaire à l'induction de l'état de type dépressif qui apparaît après une injection de LPS chez le rongeur. En effet, une injection de LPS n'induit pas de comportements de type dépressif quand l'activation de la voie des kynurénine est génétiquement ou pharmacologiquement bloquée (Lawson et al. 2013; O'Connor et al. 2009).
- 3) Augmentation des métabolites de la kynurénine. Or il semble que ces métabolites ont un rôle soit neuroprotecteur en ce qui concerne l'acide kynurénique, soit neurotoxiques pour

3HK et QA (Savitz et al. 2015; Myint et al. 2007). Or cette balance entre les métabolites neurodégénératifs et neuroprotecteurs semble centrale dans la physiopathologie de la dépression (A. M. Myint and Kim 2003) et pourrait être une des voie via laquelle l'inflammation affecte les structures et fonctions cérébrales. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs études mettant en évidence un métabolisme des kynurénine préférentiellement en faveur de l'acide quinolinique chez des patients souffrant de dépression (Wichers et al. 2005; Savitz, Dantzer, et al. 2015; Savitz, Drevets, et al. 2015; Myint et al. 2007). De même, les concentrations plasmatiques de QA chez des patients souffrant d'hépatite C et traités par INF α sont positivement corrélées avec le score de dépression (Baranyi et al. 2015).

Par ailleurs, les métabolites de la kynurénine ont la capacité de moduler la neurotransmission glutamatergique: l'acide kinurénique (KA), agit comme un antagoniste des récepteurs au glutamate et inhibiteur des récepteurs nicotinique alpha7 à l'acétylcholine (Birch et al. 1988), et l'acide quinolinique est un agoniste des récepteurs NMDA au glutamate.

○ *Cytokines et glutamate*

Le glutamate peut être un élément important de l'action des cytokines sur le cerveau. Il a en effet été démontré que l'excitotoxicité au glutamate était retrouvée dans de nombreuses pathologies psychiatriques comme la dépression (Krishnadas and Cavanagh 2012). Cette neurotoxicité serait liée à une sur-stimulation des récepteurs NMDA au glutamate menant à une accumulation de calcium dans le neurone et à la mort neuronale. L'inflammation joue sur le système glutamatergique à différents niveaux : (1) la surexpression et la suractivation des récepteurs NMDA, (2) l'accroissement de la libération et l'inhibition de la recapture du glutamate, (3) la modification des récepteurs AMPA et (4) l'influence sur la voie des kynurénines décrite précédemment.

Plus en détail, l'exposition des neurones de l'hippocampe à IL-1 β et TNF- α intensifie les dommages excitotoxiques induit par les récepteurs NMDA et AMPA. Ce phénomène serait lié à l'activation des récepteurs aux IL-1 (IL-1 R1) qui co-localisent avec les récepteurs NMDA au niveau des neurones hippocampiques et qui une fois activés, induiraient la phosphorylation de l'isoforme NR2B de la sous-unité du récepteur NMDA, menant à la suractivation de ce récepteur, augmentant ainsi l'influx de Ca²⁺ dans le neurone et par conséquent sa mort cellulaire (Krishnadas and Cavanagh 2012; Bernardino et al. 2005; Viviani et al. 2003).

De plus, IL-1 β est capable d'inhiber la recapture du glutamate par les cellules gliales, probablement grâce à une action de cette cytokine sur l'expression du récepteur au glutamate, induisant ainsi une augmentation du glutamate extracellulaire et de l'excitotoxicité liée à l'activation des récepteurs

NMDA, phénomène également accru par l'activation de NO (nitric oxide ou oxyde d'azote) synthase par l'IL1 β qui a pour conséquence l'élévation de la libération de glutamate (Hu et al. 2000; Krishnadas and Cavanagh 2012).

Concernant l'action sur les récepteurs AMPA, il a été démontré que TNF- α induisait la production de récepteurs AMPA sans sous-unité GluR2, le récepteur possédant normalement 4 sous-unités (GLUR1-4), conformation facilitant l'influx de Ca²⁺ dans le neurone, le prédisposant à l'excitotoxicité induite par le glutamate (Stellwagen et al. 2005).

Enfin, comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, les cytokines agissent sur la voie des kynurénines en favorisant la transformation du tryptophane en 3H kynurénine et acide quinolinique, agonistes des récepteurs NMDA, qui à forte concentration favorisent l'excitotoxicité et la mort cellulaire induite par le calcium (Maes 2008; Krishnadas and Cavanagh 2012).

1.2.5 Stress et inflammation : Intrication entre l'hypothèse inflammatoire et la dérégulation de l'axe HPA.

Dans des conditions « normales » non pathologiques, l'exposition à un stress environnemental ou psychosocial entraîne une série d'activation de l'axe HPA aboutissant à la libération de glucocorticoïdes (notamment le cortisol), de noradrénaline et d'adrénaline dans la circulation sanguine qui ont pour but de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Outre leur action de rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA, les GCs interagissent avec le système immunitaire via les récepteurs aux glucocorticoïdes (GRs). Ceux-ci, lorsqu'ils sont activés subissent une translocation jusqu'au noyau de la cellule où ils entraînent la surexpression de gènes codant pour les cytokines anti-inflammatoires et répriment la voie de signalisation inflammatoire, notamment par l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B, l'un des facteurs de transcription majeur pour les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. Les GCs agissent ainsi par rétrocontrôle négatif sur l'inflammation induite par le stress (Bauer and Teixeira 2018a).

Dans des conditions de surexposition au stress, une libération persistante et élevée de GCs pourrait entraîner un phénomène de « résistance ou insensibilité » aux GCs. Ce phénomène serait dû à l'action des cytokines pro-inflammatoires qui réduirait l'expression des GRs et leur fonction, notamment l'absence d'inhibition de NF- κ B (Bauer and Teixeira 2018a; Slavich and Irwin 2014; Wohleb et al. 2016) (Figure 3).

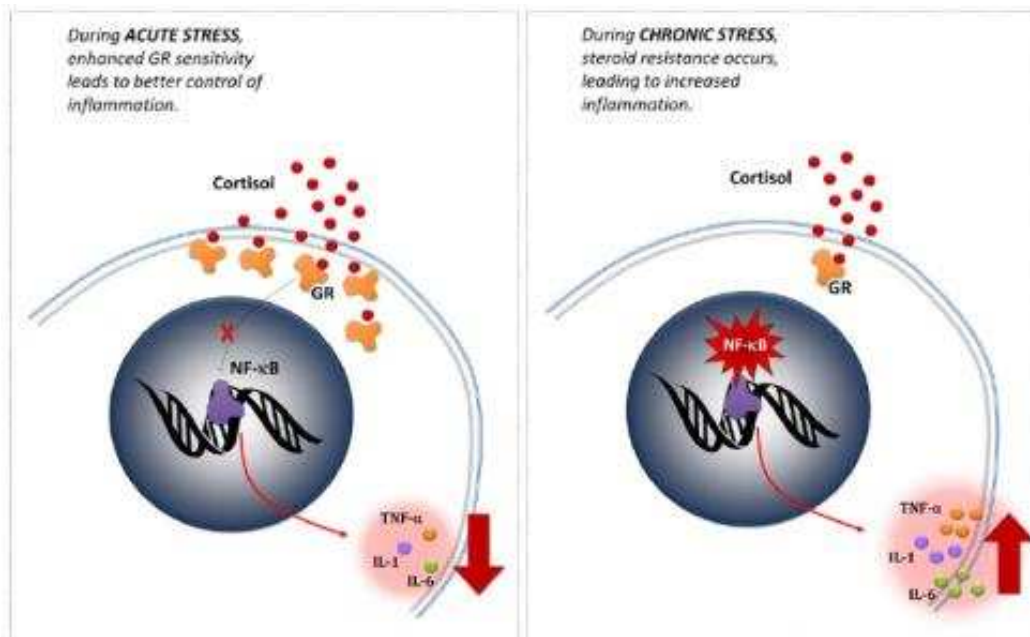


Figure 3: L'exposition aux stress peut induire une réponse anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire. Les cellules du système immunitaire sont normalement sensibles à l'élévation des taux de glucocorticoïde induit par les stress. Les GC régulent la fonction immunitaire en se liant aux récepteurs aux glucocorticoïdes (GRs). Une fois activé, le GR s'internalise dans noyau et réprime les voies de signalisation inflammatoires. Des stress répétés induisent une l'élévation chronique des taux de cortisol et une résistance des GRs aboutissant à une augmentation de l'inflammation (Bauer and Teixeira 2018b).

Une seconde voie d'activation du système immunitaire par le stress est également envisagée. Il semblerait qu'un stress provoque une surexpression de DAMPs (damage associated molecular patterns) et PAMPs (pathogen associated molecular patterns) par l'organisme, comme par exemple l'Adénosine triphosphate (ATP) extracellulaire, l'acide urique ou encore les protéines de choc thermique (HSP pour heat shock proteins). Ces molécules, via leur fixation à des récepteurs spécifiques, particulièrement les Toll like receptors (TLR), entraîneraient une activation des inflammasomes NLRP3 (Nod-like receptor 3) induisant ainsi la libération de cytokines (Figure 4) (Fleshner et al. 2017; Bauer and Teixeira 2018; Iwata et al. 2013).

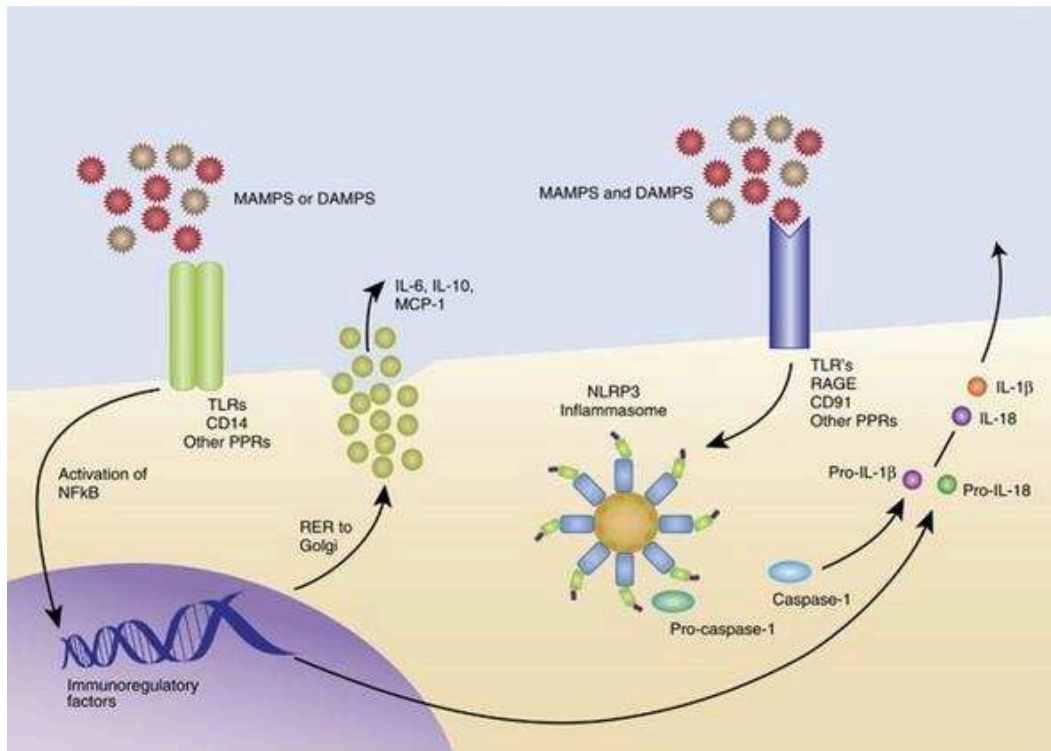


Figure 4: Le stress, via la surexpression de DAMPS et MAMPS et l'activation des récepteurs TLRs, activerait l'inflammasome nlrp3 et toute la cascade immunitaire qui en découle (Fleshner, Frank, and Maier 2017).

Ce phénomène de résistance aux GCs a pu être observé dans différents modèles animaux. Citons par exemple le cas de rongeurs exposés à des défaites sociales ou des chocs chroniques au niveau de la queue (chronic tail chock stress) répétés, ou à une administration chronique de GCs (simulant l'effet du stress) qui montrent une surexpression de TLRs et une réponse inflammatoire exacerbée suite à une stimulation par endotoxine, caractérisée par une surexpression de cytokines pro-inflammatoires. En clinique, ce phénomène a été beaucoup étudié dans le cas des stress de l'enfance, fortement lié à l'apparition de symptômes dépressifs à l'âge adulte et qui pourrait être médié par une altération du système immunitaire (Slavich and Irwin 2014; Bauer and Teixeira 2018a). La maltraitance dans l'enfance est un facteur de risque majeur de développement de psychopathologie à l'âge adulte; par exemple, elle multiplie par 2.6 le risque de développer un syndrome dépressif majeur (Teicher and Samson 2013). Le stress dans l'enfance est associée à des modulations neuro-endocrino-immunitaires durables qui seraient susceptibles d'augmenter la vulnérabilité pour les pathologies psychiatriques (Bauer and Teixeira 2018a; Danese and McEwen 2012). Chez des sujets sains adultes ou adolescents ayant subi des stress dans l'enfance, on observe des modifications de marqueurs de l'inflammation, par exemple une augmentation des lymphocytes T activés ou sénescents, des natural killer (NK) et un ratio CD4/CD8 plus élevé, et également un accroissement des niveaux plasmatiques de cytokines (IL-6, IL-1 β et TNF- α) au niveau basal et en cas de stimulation par des endotoxines (Carpenter et al. 2010; Bielas et al. 2012; Danese et al. 2009). En cas de pathologie dépressive, les

stress dans l'enfance modifie également les marqueurs inflammatoires. Chez des adolescentes à haut risque de dépression suivies pendant 2 ans et demi, Miller et Cole ont observé que celles qui avaient développé une dépression et qui avaient une histoire de stress dans l'enfance avaient des niveaux plus élevés de CRP et d'IL-6 que celles qui n'avaient pas eu ces stress (Miller and Cole 2012). De même, chez des enfants ayant subi des maltraitances dans l'enfance et ayant développé une pathologie dépressive, des taux élevés de CRP ont été retrouvés en comparaison à des enfants ayant subi des maltraitances mais n'ayant pas développé de dépression, avec dépression sans antécédents de maltraitance ou des enfants sains (Danese and McEwen 2012) (Figure 5).

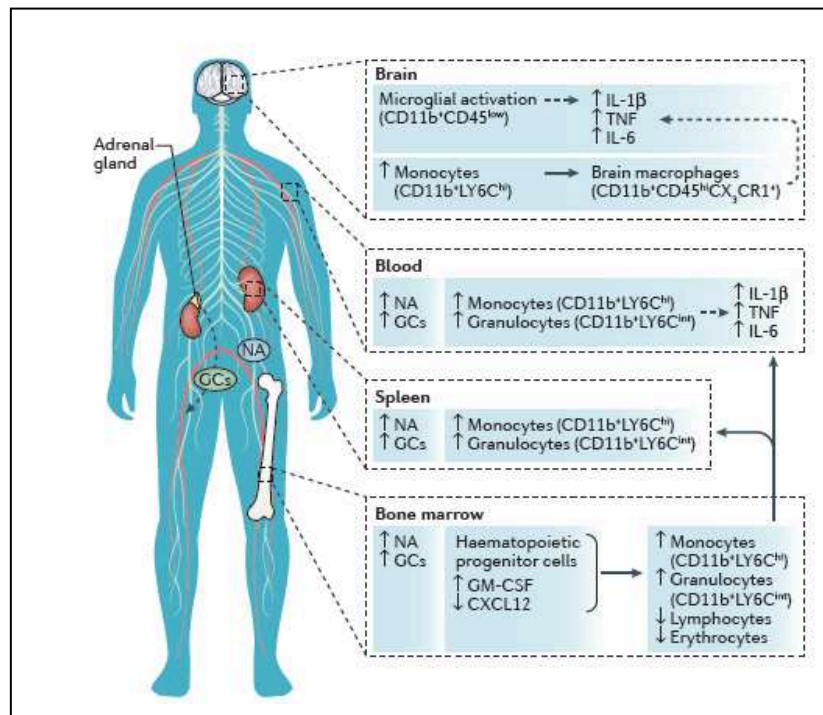


Figure 5: L'exposition à des stress répétés provoque l'activation de l'axe HPA et donc la libération de glucocorticoïdes (GC) dans la circulation sanguine par la glande surrénale. Parallèlement, l'activation du système nerveux sympathique induit la libération de catécholamines et de noradrénaline. Ces hormones et neurotransmetteurs influencent le recrutement, le déplacement et l'état d'activation des cellules immunitaires centrales et périphériques. Plusieurs organes immunitaires subissent des altérations après une exposition aux stress qui, ensemble, contribuent à l'élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires dans les tissus périphériques et centraux observée chez les individus souffrant de dépression (Wohleb et al. 2016).

Ce chapitre montre toute la complexité de la pathologie dépressive. L'intrication est étroite entre l'inflammation, la dérégulation de l'axe HPA, l'altération de la transmission monoaminergique ainsi que les vulnérabilités génétiques et morphologiques. Cependant à l'heure actuelle, on ne saurait affirmer que l'un est la cause de l'autre. Il est probable que ces éléments interagissent multidirectionnellement et à des niveaux différents menant l'organisme dans un cercle infernal vers la

dépression. Les origines environnementales et biologiques multiples de la dépression complexifient d'avantage la compréhension de sa physiopathologie et de sa prise en charge thérapeutique. La recherche animale et l'utilisation de modèles animaux sont donc nécessaires pour saisir les divers aspects de cette pathologie humaine multifactorielle, notamment concernant la neurobiologie et les bases moléculaires sous-tendant la dépression. Divers modèles animaux permettent de mimer certaines des causes et certains des symptômes de la dépression, les plus connus seront décrits dans le chapitre suivant et nous nous attarderons particulièrement sur les modèles animaux utilisés dans la partie expérimentale de ce travail de thèse.

1.3 Modélisation de la dépression chez l'animal

1.3.1 Complexité liée à la modélisation des troubles psychiatriques chez l'animal

Etant donné la complexité des troubles psychiatriques, il est légitime de se questionner sur la place des modèles précliniques en psychiatrie. La dépression plonge l'individu dans un état mental complexe généralement défini chez l'homme par une forte composante psychologique (sentiment de culpabilité, de désespoir, absence de motivation et de satisfaction) difficile à quantifier. Cependant, ces symptômes se manifestent également par des réactions somatiques (liées entre autre à l'hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien) et comportementales (résignation ou inappétence). Ces signes peuvent être retrouvés chez les rongeurs en utilisant des paradigmes expérimentaux adéquats ; si la composante subjective des émotions n'est pas accessible chez l'animal, il est admis que leur expression comportementale et les processus neurobiologiques qui les sous-tendent le sont, d'autant que les structures et mécanismes sollicités dans les situations aversives ou de stress ont été largement conservés sur le plan évolutif (Gray and McNaughton 2000). Par ailleurs, de nombreux paramètres physiologiques (pression artérielle, sécrétion endocrinienne) et comportementaux (comportement de résignation acquise, évitement des zones anxiogènes) utilisés pour rendre compte d'un état pseudo-dépressif chez l'animal sont sensibles aux antidépresseurs efficaces chez l'homme. Par exemple, l'anhédonie expérimentalement induite par divers stress chroniques chez le rongeur est abolie par les antidépresseurs (Muscat et al. 1992; Willner et al. 1992; Rygula et al. 2006). Plusieurs dispositifs expérimentaux ont donc été développés afin de modéliser les comportements caractéristiques de l'état pseudo-dépressif et de la réponse antidépressive. Le test de nage forcée est, par exemple un test validé et couramment utilisé afin d'évaluer l'état de résignation chez l'animal (Porsolt et al., 1977).

1.3.2 Définition d'un modèle animal de dépression.

Dans l'optique de soutenir une approche translationnelle, des chercheurs ont proposé certains critères de validité méthodologiques pour établir un bon modèle animal d'une pathologie (Willner 1984; Belzung and Lemoine 2011). Les critères de validité le plus souvent pris en compte sont aux nombres de trois ; (i) le critère d'homologie (validité de construction ou "construct validity") repose sur l'analogie des comportements associés à la pathologie chez l'homme et l'animal, mais également de l'étiologie et des mécanismes biologiques de la pathologie; (ii) le critère isomorphique (validité apparente ou "face validity") souligne le fait que les modèles animaux doivent partager des similarités symptomatologique; (iii) le critère prédictif (validité prédictive, ou "predictive validity") représente la capacité du modèle à répondre à des traitements efficaces chez l'homme. Un modèle idéal serait donc basé sur des causes identiques, induirait des profils symptomatologiques similaires et serait sensible aux mêmes traitements que ceux efficaces dans la pathologie ciblée. Mais il n'existe pour l'instant pas de modèle parfait, notamment pour la dépression; les différentes approches en neuropsychiatrie (génétique, pharmacologique, comportementale ou lésionnelle) et les différents modèles qui en découlent présentent tous des forces et des faiblesses (Tableau 1).

Approche générale	méthode spécifique	forces	faiblesses
Génétique	élevage sélectif	focus sur le phénotype d'intérêt	peut produire un phénotype artificiel de la pathologie humaine
	mutation randomisée et sélection	focus sur le phénotype d'intérêt	peut produire un phénotype artificiel de la pathologie humaine
	animal transgénique (KO, KI, sur expression d'un gène etc...)	Récapitule les anormalités génétique d'une pathologie humaine focus sur le phénotype d'intérêt	pénétrance variable de l'anomalie génétique chez le rongeur la pertinence du phénotype peut être difficile à établir chez l'homme
	modulation génique grâce à un virus	contrôle temporel et spatial de la variation génétique focus sur le phénotype d'intérêt	Ne reflète pas la cause génétique de la maladie chez l'homme
Pharmacologique	Administration d'agonistes et antagonistes de neurotransmetteur	contrôle temporel et parfois spatial (dans le cas d'une injection intracraniale) focus sur le neurotransmetteur d'intérêt	Manque de preuve qu'un trouble mental implique une lésion sélective d'un seul neurotransmetteur
Comportementale	Stress sociaux chroniques (à l'âge adulte ou pendant le développement)	Est basé sur les facteurs de risque chez l'homme	Absence de spécificité pour une pathologie humaine donnée
	stress chroniques physiques	facile à réaliser	Absence de validité de construction pour la plupart des maladies mentales
Lésion et stimulation électrique	stimulation cérébrale, incluant les approches par optogénétique	contrôle temporel et spatial des fonctions d'un réseau neuronal	manque de connaissance sur les anormalités des circuits neuronaux dans les pathologies humaines
	lésions anatomiques	Peut induire des anormalité comportementales rappelant celles observées chez l'homme	manque de preuve pour considérer une lésion comme cause d'un trouble mental chez l'homme

Tableau 1: Différentes approches concernant les modèles animaux en neuropsychiatrie. D'après (E. J. Nestler and Hyman 2010)

Malgré le développement de nombreux modèles avec des validités théoriques très acceptables, il est cependant important de rappeler que l'analogie entre deux espèces animales, ici l'Homme et le rongeur, ne peut jamais être considérée comme parfaite (notamment en termes de symptômes de pathologies et réponse aux traitements). Il est donc nécessaire de rester prudent quant aux conclusions que l'on tire des recherches réalisées sur ces modèles, et de leur transposition à l'Homme.

1.3.3 Modèles animaux de la dépression

Le développement de "bons" modèles animaux de la dépression est rendu difficile par le fait que ce soit une maladie multifactorielle et présentant des symptômes pas toujours évidents à modéliser. Si il existe des modèles génétiques de la dépression basés sur l'invalidation ou la surexpression d'un gène [invalidant le transporteur (5-HTT KO) ou un récepteur (5-HT 1A KO) de la sérotonine par exemple (Domínguez-López et al., 2012)], il n'y a actuellement pas de gène connu comme ayant un rôle prépondérant dans l'apparition de la dépression. Ces modèles génétiques, ainsi que le modèle de bulbectomie olfactive (lésion bilatérale des bulbes olfactifs), sont dit empiriques: ils sont fondés sur l'apparition d'altérations comportementales et neurobiologiques comparable à celle observées dans la dépression mais présentent peu de relation avec l'étiologie de cette pathologie. D'autres modèles, plus éthologiques, tentent de reproduire au mieux les facteurs qui précipitent un individu vers la dépression en exposant les animaux à des stress socio-environnementaux.

- Les modèles basés sur des stress sociaux

Les stress majeurs qui occurrent au cours d'une vie, et particulièrement les stress interpersonnels ou le rejet social, font partie des facteurs de risques proximaux les plus importants de la dépression (Slavich and Irwin 2014). Par conséquent, un grand nombre de modèles animaux de dépression consistent à soumettre les rongeurs à un ou des stress sociaux.

Le modèle de **séparation maternelle** est intéressant pour étudier l'impact des évènements stressants au début de la vie d'un individu sur l'apparition de la dépression à l'âge adulte. Il consiste à séparer, pendant quelques heures par jour, les petits de leur mère entre la première et la troisième semaine postnatale. Cette procédure induit des modifications comportementales et endocriniennes, telles que des comportements anxieux et de résignation, une dérégulation de l'axe HPA et des systèmes monoaminergiques et opioïdes, associées à un phénotype dépressif qui peuvent persister à l'âge adulte (Francis et al. 1999; Mirescu et al. 2004; Dent et al. 2000).

Le modèle de **défaite sociale** consiste à introduire un animal mâle dans la cage d'un autre mâle plus agressif, provoquant l'attaque et la défaite de l'intrus. Après cette première phase d'interaction, les 2 animaux sont séparés par une plaque de plexiglass pendant 24h afin que l'intrus soit exposé à la présence de son agresseur. La répétition de cette procédure entraîne des modifications comportementales, neurologiques et neuroendocriniennes à long termes mimant le phénotype dépressif. En effet, ce modèle induit une diminution des interactions sociales et une anhédonie chez le rat (Von Frijtag et al. 2000) ainsi qu'une modification du fonctionnement du système sérotoninergique et des changements structurels (arbre dendritique) et électrophysiologiques (LTP/LTD) des neurones hippocampiques (Buwalda et al. 2005; Krishnan et al. 2007).

A ces deux principaux modèles s'ajoutent le modèle **d'isolement sociale** (Valzelli 1973; Serra et al. 2005) ou **de subordination chronique** (Raab et al. 1986; Fuchs 2005) qui sont respectivement basés sur l'isolement ou la hiérarchie sociale.

- Les modèles basés sur des stress environnementaux

Un modèle très utilisé est le modèle de **résignation apprise**. Il consiste à exposer l'animal à des chocs électriques imprédictibles au niveau de la queue ou des pattes dans des cages spécifiques sans possibilité de les éviter. Lorsque, après un certain temps, une possibilité de s'évader leur est donnée, les animaux restent dans le dispositif et continuent de subir ces chocs électriques (Seligman and Maier 1967; Nestler et al. 2002; Chourbaji et al. 2005). Les rongeurs soumis à ce dispositif pendant plusieurs jours présentent des caractéristiques comportementales et physiologiques se rapprochant des symptômes de la dépression (altération du sommeil, du poids, des comportements sexuels, augmentation des comportements de résignation, élévation du taux de glucocorticoïde) qui peuvent être atténuées par un traitement antidépresseur (pour revue, Pryce et al. 2011).

Les modèles ayant la meilleure validité de construction sont ceux fondés sur l'exposition des rongeurs à des stress chroniques, imprédictibles ou non, et d'intensité variable (unpredictable chronic mild stress, **UCMS**). Les premiers travaux concernant cette procédure ont été réalisés par Katz et al. en 1981 (Katz 1981) puis Willner et al. en 1987 (Willner et al. 1987). Des rats étaient soumis à différents stress sévères (chocs électriques, isolement, immersion dans l'eau froide etc ...) pendant au moins trois semaines afin d'induire une élévation de la concentration plasmatique de corticostérone et une baisse de la préférence au sucrose. Ces altérations biologiques et comportementales sont corrigées après l'administration d'un traitement antidépresseur chronique (Katz 1982; Katz and Sibel 1982; Willner et al. 1987). Une version affinée de cette procédure a

ensuite été développé dans le but de diminuer l'intensité des stress pour des questions d'éthique. Les rats ou souris sont désormais exposés de façon séquentielle à de nombreux stress d'intensité faible à modérée (par exemple : bruits de prédateurs, contention, litière mouillée), présentés de façon aléatoire pendant plusieurs semaines (Nollet et al. 2013). Il s'avère que l'efficacité du modèle dépende plus de la chronicité et de l'imprédictibilité des stress que de leurs caractéristiques individuelles, ce qui confère une forte validité de construction à l'UCMS. De nombreuses études ont mis en évidence que l'UCMS induit des comportements assimilés aux symptômes de la dépression (anhédonie, comportements sexuels, résignation, comportements autocentrés, troubles du sommeil etc...) en association avec des altérations de la plasticité neuronale mais également neuroendocriniennes, neurochimiques et moléculaires (modification de la balance monoaminergique, augmentation du niveau de glucocorticoïdes et diminution de la neurogénèse) (Willner 2005, 2016; Ducottet et al. 2003). L'ensemble de ces altérations comportementales et biochimiques sont reversées par un traitement chronique, et non pas aigu, avec les différentes classes d'antidépresseurs pharmacologiques efficaces en clinique.

Par ailleurs, le modèle UCMS semble être un bon outil pour étudier l'aspect inflammatoire de la dépression, hypothèse récente et attractive concernant sa physiopathologie (cf paragraphe 1.2.4). En effet, plusieurs études ont démontré que les comportements de types dépressifs observés chez le rat soumis à cette procédure sont associés à une élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL 1B, IL-6, TNF- α (You et al. 2011; Zhang et al. 2015a; Wang et al. 2014), et à l'activation des cellules microgliales au sein de plusieurs régions cérébrales impliquées dans la physiopathologie de la dépression (e.g. cortex infralimbique, NAc, amygdale, hippocampe) (Farooq et al. 2012; Tynan et al. 2010).

L'UCMS combine donc les trois critères de validité préalablement cités et induit un état de type dépressif "large" et robuste ce qui en fait "LE" modèle de dépression pour étudier les mécanismes neurobiologiques liés à la physiopathologie et au traitement de la dépression.

- [Les modèles pharmacologiques](#)

Comme nous l'avons décrit précédemment (chapitre 1.2.3), une élévation des taux de glucocorticoïdes plasmatiques est relevée chez les patients souffrant de dépression. De même, les stress sociaux et stress chroniques chez le rongeur induisent une augmentation de corticostérone, témoignant des perturbations de l'axe HPA en association avec l'apparition de comportements de type dépressif. Ainsi, l'augmentation artificielle des concentrations en glucocorticoïdes par **l'apport de corticostérone exogène** (eau de boisson, pompe osmotique, injection sous-cutanée) permet

d'étudier directement l'influence des glucocorticoïdes sur le développement de la symptomatologie dépressive.

Une large littérature met en évidence que l'administration répétée de CORT chez le rat ou la souris produit des altérations comportementales robustes mimant les principaux symptômes de la dépression: augmentation des comportements de résignation dans le FST, diminution des comportements sexuels, de la préférence au sucrose et des comportements autocentrés (David et al. 2009; Murray et al. 2008b; Gourley et al. 2008; Johnson et al. 2006). Ces modifications comportementales typiques du phénotype dépressif sont associées à des altérations physiologiques également retrouvées chez des patients déprimés telles qu'une perte de poids, une dérégulation des fonctions de l'axe HPA, une diminution du volume de l'hippocampe et de la neurogénèse (pour revue, voir Sterner and Kalynchuk 2010). La majorité des altérations comportementales et neurobiologiques induites par l'élévation des taux de CORT sanguine est corrigée par l'administration chronique d'antidépresseurs (David et al. 2009; Ago et al. 2008). Le modèle CORT possède donc une bonne validité apparente (similarités symptomatologiques) et une validité prédictive (effet bénéfique des traitements efficaces en clinique) mais n'est pas une simulation réaliste des causes de la pathologie humaine car restreinte à un seul facteur, à savoir l'élévation des taux de CORT.

Le **modèle LPS** repose sur l'injection de lipopolysaccharides (LPS) permettant d'induire une réponse inflammatoire aboutissant à un état de type dépressif. Le LPS est un composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*) qui joue le rôle d'une endotoxine induisant une forte réponse du système immunitaire en se liant aux récepteurs de certaines cellules telles que les macrophages, monocytes, lymphocytes B et les cellules dendritiques, conduisant, entre autres, à la sécrétion de cytokines inflammatoires.

L'administration périphérique de LPS induit, dans un premier temps, l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires circulantes au niveau central et périphérique et donc l'apparition d'un comportement maladif (ralentissement moteur, anhédonie, nausée) qui atteint son maximum 2 à 8 heures après l'injection. De façon concomitante, certaines cytokines pro-inflammatoires potentialisent l'activité de l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) avec un pic observable 24 heures après l'injection de LPS. L'activation de l'IDO modifie le métabolisme du tryptophane qui va s'écarter de la production de 5-HT pour favoriser la production de kynurénine (cf chapitre 1.2.4 et Dantzer et al., 2008), modification qui semble initier le passage des comportement de type maladifs vers les comportements de type dépressif chez le rongeur (Maes et al. 2011) (Figure 6).

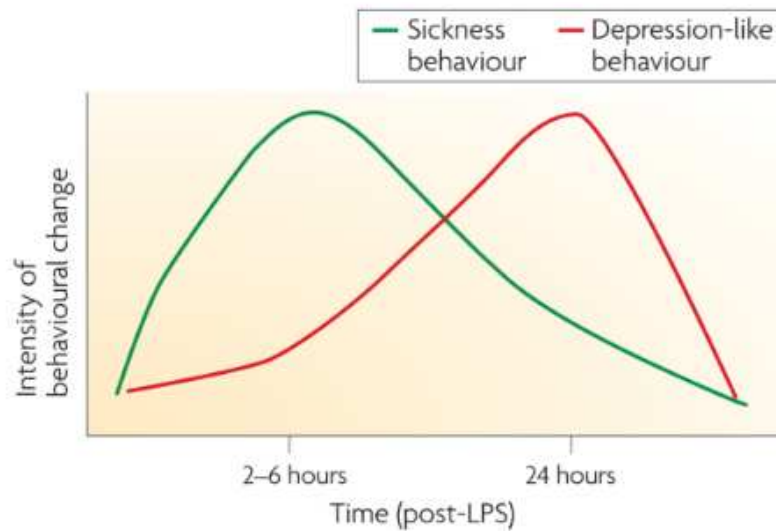


Figure 6: L'administration périphérique de LPS induit des comportements de type maladif dont le pic d'intensité se situe 2 à 6h après l'injection avant de disparaître progressivement. Les comportements de types dépressifs, provoqués par l'activation de l'IDO, apparaissent ensuite avec un pic 24h après l'administration de LPS (Dantzer et al. 2008).

1.4 Traitements de la dépression

En tout temps, et sous différents noms, l'état dépressif a toujours existé. La perception de cette maladie, et par conséquent, ses traitements ont cependant, beaucoup évolué.

Mélancolie, folie, neurasthénie, ... dans l'Antiquité, l'origine de cette pathologie est localisée dans les viscères, c'est la bile (du grec *mélas*) noire (du grec *kholé*) qui envahit toute la personne. Le traitement est alors à base de bains, de potions d'ellébore, de laxatifs et de vomitifs. Dans les années 1800, la psychiatrie devient une discipline médicale à part entière et l'origine organique de la dépression est recentrée sur le cerveau, c'est une maladie de l'esprit. Les patients sont alors internés en asile psychiatrique, l'enfermement et le traitement moral sont alors de mise. A la fin du XIXème siècle, Sigmund Freud présente ses théories menant à repenser les processus psychiques, c'est l'avènement de la psychanalyse.

Dans les années 1930, les électrochocs, aujourd'hui appelés électroconvulsivothérapie (ECT) font leur apparition. Leur efficacité est notable, en particulier pour les dépressions sévères, mais les effets secondaires sont importants. Dans les années 1950, les premiers antidépresseurs font leur apparition et deviennent, au fil des découvertes de nouvelles molécules, les traitements de premières lignes de la dépression, parfois en association avec les psychothérapies.

Depuis la fin des années 1990, de nouvelles techniques de stimulation cérébrales refont surface, notamment pour tenter de palier aux dépressions résistantes aux antidépresseurs. Les principaux types d'antidépresseurs ainsi que les techniques d'électrostimulations les plus utilisées sont présentées dans ce chapitre.

1.4.1 Les antidépresseurs pharmacologiques

C'est dans les années 50, suite à la découverte des effets antidépresseurs inattendus d'un antituberculeux (l'iproniazide), que les premiers antidépresseurs voient le jour. De là, découleront quasiment tous les autres antidépresseurs, leurs mécanismes d'action étant sensiblement similaires. En effet, la plupart des antidépresseurs provoquent une augmentation de la disponibilité synaptique des neurotransmetteurs monoaminergiques: sérotonine, noradrénaline et/ou adrénaline, et ceci soit en inhibant la recapture des neurotransmetteurs, et/ou en inhibant les enzymes de dégradation, soit en supprimant le tonus inhibiteur exercé sur l'activité des neurones monoaminergiques et donc la libération de ces neurotransmetteurs [(Figure 7) (pour revue, (Feighner 1999))].

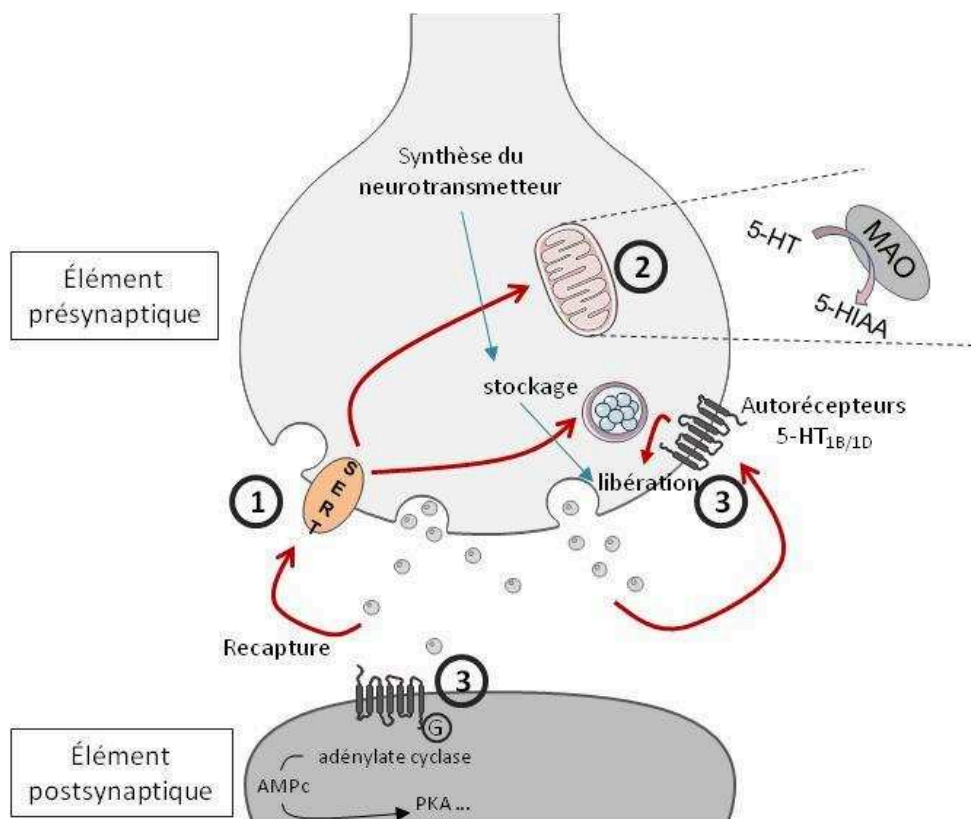


Figure 7 : Mécanismes d'actions des antidépresseurs. Les antidépresseurs actuels augmentent la disponibilité synaptique de la 5-HT, NA et DA via trois principaux mécanismes d'action : l'inhibition de la recapture (1), de la dégradation (2) ou le blocage d'un autorécepteur (3) du neurotransmetteur. Une autre possibilité est l'action directe sur les récepteurs postsynaptiques(3).

- Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO):

Les IMAOs agissent sur les MAOs mitochondriales, prévenant la dégradation par déamination enzymatique des monoamines cytoplasmiques extra vésiculaires : 5HT, DA, NA. Ces molécules ont pour conséquence une augmentation rapide des quantités des monoamines intracellulaires, puis après libération, extracellulaires, ce qui prolonge et amplifie l'action de ces neurotransmetteurs sur

leurs récepteurs (Finberg and Youdim 1983). Plusieurs types d'IMAO existent, différenciés par leur capacité à inhiber les MAO de forme A ou B. Les IMAO prescrits aujourd'hui sont sélectifs et agissent préférentiellement sur la MAO-A, principalement responsable de l'inactivation de la 5HT et de la NA (Livingston and Livingston 1996).

Une interaction néfaste de ces composés avec les aliments riches en tyramine, ou d'autres médicaments, ayant été à l'origine de nombreux effets secondaires, leur utilisation est aujourd'hui limitée.

- Les antidépresseurs tricycliques (ATC):

Ces antidépresseurs tirent leur nom de leur structure chimique, puisqu'ils sont formés de 3 cycles. D'un point de vue fonctionnel, ils constituent une classe hétérogène de composés étant donné la pluralité de leurs sites d'action. Leur action antidépressive principale est généralement attribuée à l'inhibition des mécanismes de recapture des monoamines (Stahl 2000). D'autres mécanismes d'action ont été identifiés tels que l'antagonisme des récepteurs cholinergiques muscariniques, les récepteurs histaminiques H1 et les récepteurs α 1-adrénergiques parfois associé à des activités antagonistes supplémentaires sur les récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT_{2A}. De nombreux effets indésirables sont liés à l'utilisation de ces traitements comme les vertiges, la xérostomie, la prise de poids, la sédation et les céphalées. Comme les IMAOs, leur utilisation est aujourd'hui assez limitée, les médecins y préférant les antidépresseurs de seconde génération : les inhibiteurs de la recapture des monoamines.

- Les inhibiteurs de la recapture des monoamines :

Les inhibiteurs de la recapture des monoamines, contrairement aux classes d'antidépresseurs précédemment décrites, ont une action très ciblée et n'ont que très peu d'affinité pour les récepteurs muscariniques, histaminiques et adrénergiques, augmentant ainsi leur tolérance et diminuant le risque de survenue d'effets secondaires.

Ces antidépresseurs ont le même mode d'action que les IMAOs et les ATC puisqu'ils favorisent la neurotransmission monoaminergique. Il en existe deux catégories :

- Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) se lient sur le transporteur de la sérotonine et l'inhibent. Ce dernier étant responsable de la recapture de la sérotonine libérée dans la fente synaptique, son inhibition entraîne une accumulation de 5HT dans la fente synaptique, prolongeant son effet sur les récepteurs post-synaptiques (Stahl 1998).
- Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNA) agissent de manière similaire aux ISRS mais en ciblant de manière simultanée les transporteurs présynaptiques de la sérotonine et de la noradrénaline (Seth et al. 1992). A noter que dans le

cortex préfrontal, les IRSNA ont également la capacité de réguler la quantité de dopamine puisque dans cette zone, le transport de la dopamine peut être réalisé par les transporteurs de la noradrénaline. Il semblerait que les IRSNA soient capables d'améliorer un plus large spectre de symptômes que les antidépresseurs agissant sur une seule monoamine (Zajacka and Albano 2004).

- Les antidépresseurs atypiques :

Comme leur nom l'indique, ces antidépresseurs ont un mode d'action complexe, ne leur permettant pas d'être classés dans l'une des catégories précédentes. Les plus fréquemment utilisés ont les suivant :

La miansérine, introduite en Europe dans les années 1970, a une faible affinité pour les sites de recapture de la NA, mais bloque simultanément ses récepteurs inhibiteurs présynaptiques, renforçant ainsi son rôle neurotransmetteur (Itoh et al. 1990).

La mirtazapine, possède une structure chimique et a des propriétés antagonistes des récepteurs α 2-adrénergiques et des récepteurs post-synaptiques 5-HT_{2A/2C} et 5-HT₃. Elle bloque également les récepteurs histaminiques H₁. Elle a pour effet d'augmenter les niveaux hippocampiques de NA et les concentrations de 5-HT (Holm and Markham 1999).

L'agomélatine est un antidépresseur récemment mis sur le marché qui possède une action double. Il agit à la fois sur les récepteurs mélatoninergiques en les activant et sur les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2C} en les inhibant. Son action antidépressive s'associe à une amélioration de la qualité et de la stabilité du sommeil des patients déprimés (Green 2011).

Malgré l'offre large d'antidépresseurs sur le marché, leur délai d'action reste long (environ 3 semaines) et leur efficacité limitée, on considère que 50 à 60% des patients traités par antidépresseurs n'obtiennent pas une réponse thérapeutique adéquate après un premier traitement. Les médecins ont alors différentes options thérapeutiques, telles que l'association de différents traitements antidépresseurs ou la co-administration d'antidépresseur et d'autres psychotropes tels que les antipsychotiques et les anxiolytiques. Il s'y ajoute depuis quelques décennies d'autres méthodes thérapeutiques non médicamenteuses : les stimulations cérébrales. Nous détaillerons les plus communes dans le paragraphe suivant ; la stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS), au cœur de ce travail de thèse, sera quant à elle décrite tant au niveau de ses principes et mécanismes d'action que de ses effets thérapeutiques dans le chapitre suivant.

1.4.2 Les stimulations cérébrales

Les techniques de stimulation cérébrales, souvent considérées comme innovantes, ont pourtant une histoire beaucoup plus ancienne que les autres thérapies. Il y a 2000 ans, les Romains utilisaient les raies électriques pour soulager la douleur et les maux de têtes. Plus près de notre ère, c'est à la fin du XVIIIème siècle que les travaux de Luigi Galvani et Alessandro Volta de Palua ouvriront la voie à l'utilisation des stimulations électriques en clinique.

En psychiatrie, et plus précisément dans le traitement de la dépression, les techniques de stimulations cérébrales (Figure 8) sont, pour la plupart d'entre elles, uniquement utilisées dans le cadre de la recherche. C'est le cas de la stimulation du nerf vague (VNS-vagus nerve stimulation), la stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS-repeated transcranial magnetic stimulation), la tDCS et la stimulation cérébrale profonde (DBS-deep brain stimulation). Seule l'électroconvulsivothérapie (ECT) est utilisée hors du cadre de la recherche pour la prise en charge des dépressions résistantes.

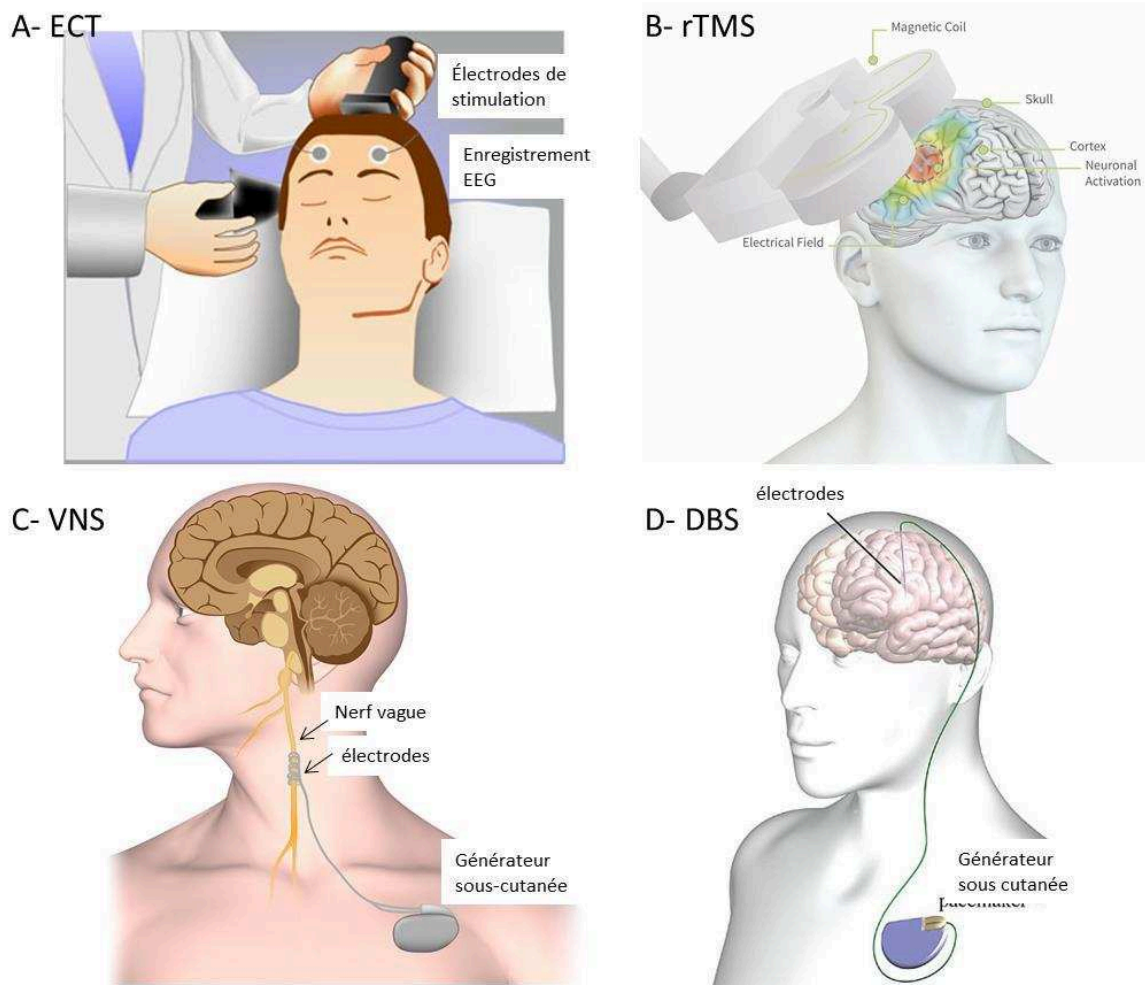


Figure 8: Quelques techniques de stimulation cérébrale: l'électroconvulsivo-thérapie (A), la stimulation magnétique transcrânienne (B), la stimulation du nerf vague (C) et la stimulation cérébrale profonde(D).

- L'ECT (ou sismothérapie):

Autrefois appelée électrochocs, cette technique très décrite dans les années 60/70 a beaucoup évolué depuis ses premières utilisations au début du XXème siècle. Elle consiste à appliquer des électrodes reliées à un stimulateur à la surface du crâne du patient (Figure 8A). Pendant quelques secondes, le patient anesthésié et curarisé reçoit un courant électrique d'une intensité faible qui provoque une crise d'épilepsie (Keltner and Boschini 2009). Les paramètres de stimulation sont de 500 à 800mA, 20 à 120 Hz, avec une durée d'impulsion de 0.3 à 2 ms et une durée de stimulation ne dépassant pas 8 secondes. Le traitement se fait à raison d'une douzaine de séances, réparties sur 4 à 6 semaines. Son efficacité est largement prouvée puisqu'elle est considérée comme l'un des traitements antidépresseur les plus efficaces (Ebmeier et al. 2006). Cependant, au regard de ses effets secondaires tels que les atteintes cognitives transitoires, cette technique est privilégiée en cas de dépression résistante ou de dépression sévère de type mélancolique.

- La VNS:

Cette technique de stimulation est invasive puisqu'elle nécessite l'implantation d'un générateur d'impulsions électriques dans la paroi supérieure gauche du thorax relié à une électrode placée au niveau du cou sur le nerf vague gauche (Figure 8C). Elle a au départ été mise en place pour traiter les patients souffrant d'épilepsie. Certains d'entre eux ayant montré une amélioration de leur humeur, son efficacité est aujourd'hui étudiée dans la dépression majeure (Vonck et al. 2014). Des études préliminaires ont montré son efficacité à court et long terme chez des patients souffrant de dépression résistante avec un taux de réponse allant de 30 à 50% (Nemeroff et al. 2006). Ces résultats prometteurs restent à confirmer avec des études de plus grande ampleur. Les modes d'action de la VNS sont peu connus mais on suppose qu'elle augmenterait la sécrétion de monoamines et jouerait sur la plasticité cérébrale hippocampique (Grimonprez et al. 2015; Manta et al. 2013).

- La rTMS:

Contrairement aux autres techniques présentées ici, la rTMS n'implique pas directement un courant électrique mais un champ magnétique. Cette technique utilise un générateur relié à une bobine qui produit un champ magnétique. Ce champ magnétique apposé à la surface du crâne (figure 8B), sur une zone cible, va générer un champ électrique secondaire capable de produire une dépolarisation des neurones. En clinique, la stimulation se fait de manière répétée, c'est-à-dire que les impulsions ou série de trains d'impulsions sont délivrées à intervalles réguliers. L'effet de la rTMS est modulé par la variation des paramètres de stimulation, notamment sa fréquence : il est admis qu'une fréquence

de stimulation basse (<1Hz) entraîne une diminution de l'excitabilité corticale alors qu'une stimulation à haute fréquence l'augmente (Lefaucheur 2009).

La plupart des études sur les effets de la rTMS dans la dépression majeure utilisent des stimulations répétées à haute fréquence en regard du cortex préfrontal dorsolatéral gauche (DLPFC-dorsolateral prefrontal cortex). Les effets antidépresseurs de la rTMS ont été largement étudiés, et malgré l'hétérogénéité des méthodes d'investigation, des populations et des paramètres utilisés, cette technique semble présenter un réel intérêt clinique (Lefaucheur et al. 2014; Berlim et al. 2014; Lepping et al. 2014). D'ailleurs, malgré de nombreuses incertitudes concernant ses mécanismes d'actions, l'utilisation de la rTMS pour traiter les patients déprimés a récemment été approuvée par les autorités de santé en Amérique du nord (McClintock et al. 2018).

- La DBS :

La stimulation cérébrale profonde consiste à implanter une ou de plusieurs électrodes dans une région spécifique du cerveau par chirurgie stéréotaxique guidée par neuroimagerie. Les électrodes implantées sont reliées à un neurostimulateur accessible de manière non-invasive dont les paramètres de stimulation peuvent être modulés aisément (figure 8D). En clinique les paramètres de stimulation sont compris entre 60-130Hz, 60-200µs pour la durée de l'impulsion et 2-10 volts (Holtzheimer and Mayberg 2011). Cette technique est utilisée fréquemment chez les patients atteints de la maladie de Parkinson dans le but de diminuer les tremblements et les dystonies et de nouvelles indications sont à l'étude, notamment concernant la dépression majeure. Différentes régions du cerveau, supposées dysfonctionnelles dans la dépression, ont été ciblées par les chercheurs afin d'évaluer les possibles effets antidépresseurs de la DBS : la capsule antérieure, le noyau accumbens, le pédoncule du thalamus inférieur, l'habenula latérale et le gyrus cingulaire subgénéral. Quelques études ne suivant qu'un nombre très réduit de patients sur plusieurs années, montrent des effets encourageants sur la symptomatologie dépressive (Altinay et al. 2015), mais les mécanismes d'actions de cette technique très invasive restent mal connus.

Depuis une vingtaine d'années, la tDCS connaît un nouvel essor face aux limites atteintes par les traitements pharmacologiques en psychiatrie. Outre son caractère non invasif, la tDCS est une technique facile à mettre en place (un générateur de courant et deux électrodes), à transporter et peu coûteuse. Par ailleurs elle n'induit pas de douleur et très peu d'effets secondaires ont été rapportés. Enfin, la tDCS semble avoir diverses applications et des effets bénéfiques sur différentes pathologies.

2 LA STIMULATION TRANSCRANIENNE PAR COURANT CONTINU : LA TDCS

2.1 Historique et principe de la tDCS

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la possibilité de traiter certaines pathologies par l'électricité n'est pas une idée nouvelle puisque les premières traces d'électrothérapie remontent au 1^{er} siècle de notre ère où un médecin de l'empereur romain, Scribonius Largus, décrivait l'intérêt du poisson torpille pour soulager les maux de tête et la goutte. Depuis, plusieurs écrits rapportent que de nombreux médecins et scientifiques ont tenté à travers les siècles de traiter différentes maladies par l'électricité.

Il faudra cependant patienter jusqu'à la fin du XVIII^{ème} siècle et les travaux d'Alessandro Volta qui inventa la pile voltaïque permettant de délivrer des stimulations électriques continues, appelées "stimulation galvaniques" en hommage à Luigi Galvani, père de l'électrophysiologie. Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'utilisation de l'électrothérapie comme traitement de la mélancolie. Parmi eux, Giovanni Aldini qui découvre la possibilité d'utiliser le galvanisme comme outils thérapeutique en réalisant des expériences sur des animaux et des cadavres. C'est en 1802 qu'il appliqua pour la première fois le galvanisme sur la tête d'un jeune homme souffrant de mélancolie (Figure 9A). La guérison qui a été observée après plusieurs semaines de stimulation a séduit Philippe Pinel qui utilisa cette technique sur un certain nombre de patients de la Pitié-Salpêtrière. Il a fallu attendre 1964 pour la publication d'études préliminaires sur la tDCS et c'est à partir de la fin des années 1990 que les chercheurs se sont penchés avec intérêt sur les effets neurophysiologiques de la tDCS.

La stimulation transcrânienne par courant continu est une technique de stimulation cérébrale non invasive. Elle consiste à envoyer un courant électrique continu de faible intensité (1-2 mA) par l'intermédiaire de deux électrodes positionnées sur le scalp des patients (Figure 9B). Ce courant est mono polaire, c'est-à-dire qu'il est émis par une électrode active et se dirige vers une électrode de référence à travers la boîte crânienne (Bikson et al. 2010). Les répercussions physiologiques de ces électrodes vont dépendre de leur placement et de leur taille; si l'électrode active est chargée positivement, la stimulation est dite anodique et si elle est chargée négativement, la stimulation est dite cathodique. La stimulation par tDCS va permettre de moduler l'excitabilité des aires cérébrales ciblées et positionnées sous ces électrodes. En effet, la tDCS, comme les autres techniques de stimulation électrique du cerveau, vise à moduler de façon transitoire les circuits cérébraux

dysfonctionnels (Nitsche et al. 2008). Plus précisément, cette technique de neuromodulation va modifier l'activité d'un réseau neuronal en orientant la polarisation du potentiel membranaire de repos d'un groupe de neurones de manière à rétablir les activités cérébrales anormales observées dans différentes pathologies psychiatriques.

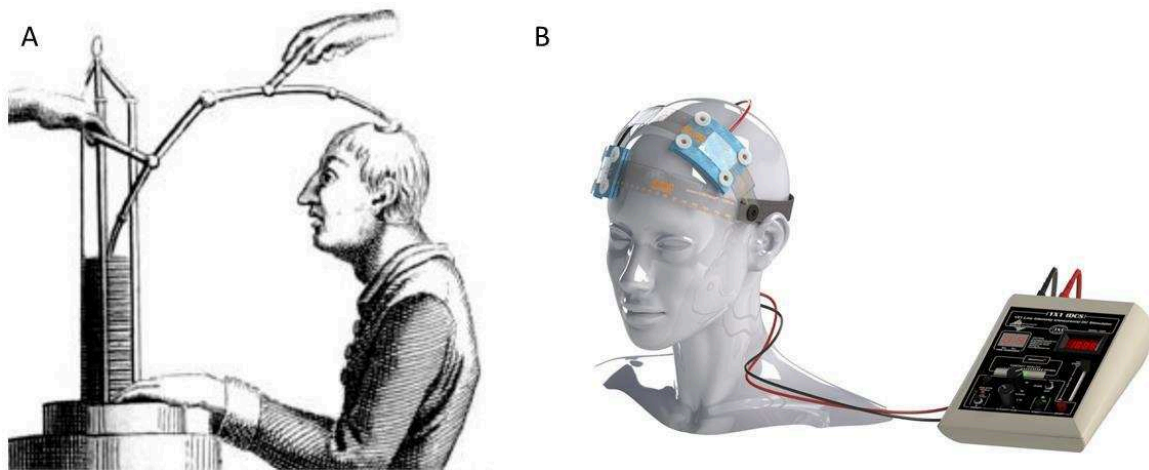


Figure 9: (A) Représentation de la stimulation d'un sujet humain par courant galvanique en 1800 selon Aldini. (B) Actuellement, la tDCS est réalisée grâce à un générateur relié à deux électrodes positionnées sur le scalp du patient.

2.2 Sécurité associée à la stimulation transcrânienne

Les effets secondaires associés à l'utilisation de la tDCS sont relativement mineurs. Une équipe a rassemblé et analysé les données concernant les effets secondaires ressentis par 102 sujets sains et patients au cours des deux années précédant leur publication; dans 70% des cas, les effets décrits sont des sensations de picotements sous l'électrode active et les 30 % d'évènements restant sont des démangeaisons (Poreisz et al. 2007). Une autre équipe s'étant intéressée à la tolérance des individus lors de stimulations répétées a rapporté à peu près les mêmes proportions d'évènement indésirable, avec en plus de rares cas de brûlure ou d'inconfort (Paneri et al. 2016).

Chez l'animal, une étude s'est spécifiquement penchée sur les potentiels dangers et effets délétères de la tDCS en étudiant les seuils de densité de courant et de charge pouvant provoquer des dommages cérébraux (Liebetanz et al. 2009). Ces auteurs ont montré que la stimulation cathodique peut induire de sévères lésions neuronales lorsque de très fortes densités de charge sont utilisées (supérieures à 52400 C/m^2), bien plus importante que la densité de charge généralement utilisée au cours des études cliniques (170 à 480 C/m^2). Si ces résultats ne peuvent pas être directement transférés à l'homme et ne considèrent que les effets morphologiques « aigus » de la stimulation cathodique (alors que la plupart des effets cliniques et précliniques sont induits par une stimulation

anodique), ils suggèrent que des protocoles de tDCS plus « intensifs » (en termes de durée et d'intensité de stimulation) peuvent être utilisés chez l'homme en toute sécurité afin d'en améliorer l'efficacité thérapeutique.

2.3 Effets thérapeutiques de la tDCS

Les premières études portant sur l'utilisation de la tDCS dans le traitement de la dépression ont été réalisées en 1964. Deux études contrôlées randomisées en double-aveugle ont montré un effet positif significatif de la tDCS sur les scores de dépression de 29 et 24 sujets (Redfearn et al. 1964; Costain et al 1964). D'autres études ont été menées jusqu'aux années 1970, cependant elles ne parvenaient pas toutes à démontrer l'efficacité de ce traitement. La technique est alors massivement abandonnée au profit des antidépresseurs qui font alors leur apparition. A la fin des années 1990 – début 2000, la technique réapparaît dans la littérature, certainement du fait du taux de réponse finalement insatisfaisant des traitements pharmacologiques. Les paramètres de stimulation sont alors mieux contrôlés, de même que le placement des électrodes, notamment grâce aux travaux de Nitsche et Paulus (Nitsche and Paulus 2000, 2001). En 2006 la première étude clinique utilisant les paramètres (1 ou 2 mA, 20 min, 5-10 stimulations) ainsi que le placement des électrodes (anode au niveau du CPFDL gauche) pratiquées actuellement est publiée (Fregni et al. 2006). Elle porte sur 10 patients souffrant d'EDM d'intensité sévère, traité par tDCS active ou placebo. Les résultats sont très prometteurs puisque l'équipe démontre une diminution de 60% du score HDRS moyen et de 70% du score BDI chez les patients traités, amélioration significativement supérieure à celle observée dans le groupe placebo. Le taux de réponse est également supérieur dans le groupe traité puisqu'il présente 4 répondeurs contre 0 dans le groupe placebo. Par la suite, l'équipe de Boggio *et al.* précisent l'action de la tDCS en démontrant que la zone cérébrale ciblée ainsi que la dose administrée (nombre de séances) modulent l'effet observée et notamment sa durée (Boggio et al. 2007, 2008). Malheureusement, les études qui ont été publiées depuis montrent des résultats plus mitigés; l'efficacité de la tDCS en tant que traitement antidépresseur n'étant pas toujours démontrée (Loo et al. 2010; Loo et al. 2012; Rigonatti et al. 2008; Fregni et al. 2007; Blumberger et al. 2013; Brunoni, Ferrucci, et al. 2013; Brunoni, Valiengo, et al. 2013; Segrave et al. 2014; Brunoni et al. 2014; Bennabi et al. 2014; Ferrucci et al. 2009; Ferrucci et al. 2009; Brunoni et al. 2011; Martin et al. 2011; Dell'Osso et al. 2012; Martin et al. 2013). Au vu de ces résultats hétérogènes, plusieurs auteurs se sont attelés à la rédaction de méta-analyses visant à donner une réponse concrète sur l'efficacité de la tDCS dans le traitement de la dépression (Mutz et al. 2018; Shiozawa et al. 2014; Kalu et al. 2012; Berlim et al., 2013)(pour revue voir (Bennabi and Haffen 2018). Là aussi, cependant, les conclusions divergent. Berlim *et al.* ne montrent pas de différence significative entre tDCS active et tDCS placebo tant au

niveau de la réponse que de la rémission alors que Kalu *et al.* et Shiozawa *et al.* concluent à une supériorité de la tDCS active versus placebo quant à la diminution des scores aux échelles de dépression et au taux de rémission. Sans dénigrer la qualité de ces études, il est tout de même important de noter qu'elles n'incluent que peu de données puisqu'elles portent sur 6 ou 7 essais contrôlés randomisés dont les effectifs sont parfois très réduits. De plus, si les paramètres de stimulation sont assez similaires, les populations d'étude sont parfois différentes, ce qui complique l'interprétation de ces résultats.

Il est donc aujourd'hui difficile de conclure sur l'impact thérapeutique de la tDCS et sur son utilisation optimale en clinique, et de nombreux points restent à soulever. Parmi eux, l'impact des traitements pharmacologiques concomitant au traitement par tDCS semble intéressant à étudier. Dans la plupart des études précitées, le traitement pharmacologique des patients n'est pas contrôlé, or de nombreuses interactions peuvent avoir lieu puisque certains processus neurobiologiques sont modulés par les deux types de traitement, comme les systèmes monoaminergiques, la plasticité ou l'inflammation. La plupart des études montrant un effet antidépresseur significatif de la tDCS portaient sur des patients non traités par psychotropes alors que les études négatives incluent majoritairement des patients sous traitement pharmacologique associé. L'idée d'une interaction négative entre ces deux types de traitement émerge alors. Pourtant, en 2013, Brunoni *et al.* montrent, dans une étude à grande échelle (120 patients inclus), que l'association de la tDCS avec un traitement par Sertraline augmente le score MADRS des patients de manière significativement supérieure par rapport aux traitements seuls. Il y aurait donc une synergie entre ces deux traitements.

D'autres facteurs peuvent jouer sur l'impact de la tDCS, comme les caractéristiques de la dépression. Dans les études précitées pour lesquelles un traitement était associé à la tDCS et n'avait pas d'effet sur les symptômes dépressifs, on peut imaginer que les patients avaient une dépression plus sévère et/ou résistante par rapport aux patients des études sans traitement associé et démontrant un effet positif. En effet, la plupart des études portant sur une population de patients déprimés résistants ne montre pas d'effets significatifs de la tDCS (Palm *et al.* 2012; Bennabi *et al.* 2014). Par contre, concernant la sévérité, Ferrucci *et al.* (2009) ont démontré que l'effet antidépresseur de la tDCS était d'autant plus marqué que l'EDM était sévère. Enfin, le type de dépression, unipolaire ou bipolaire, peut influencer la réponse au traitement. Trois études se sont intéressées particulièrement à cette population avec des résultats positifs semblant aller vers une efficacité supérieure de la tDCS dans la dépression bipolaire comparée à la dépression unipolaire (Brunoni *et al.* 2011; Dell'Osso *et al.* 2012; Brunoni *et al.* 2013).

Parmi les interrogations qui persistent sur les effets cliniques de la tDCS, la question des séances d'entretien est également posée. En effet, lorsqu'un effet antidépresseur de la tDCS est observé, il est malheureusement limité dans le temps. L'ajout de séances de traitement à distance du traitement de base semble être intéressant cependant, pour le moment, cette question a été peu étudiée et on ne sait pas combien de séances seraient nécessaires, à quelle fréquence et pendant combien de temps.

La tDCS est donc une technique de neuromodulation prometteuse mais son utilisation est aujourd'hui encore trop empirique et laissée à la discrétion de chaque équipe. Il est donc aujourd'hui nécessaire de proposer des essais cliniques de grande ampleur, incluant de nombreux patients et permettant de prendre en compte de nombreux facteurs confondants. Mais il est également nécessaire de chercher plus précisément les mécanismes biologiques mis en jeu pour mieux comprendre cette technique et aller vers une utilisation maîtrisée et raisonnée. En effet, à l'heure actuelle, les impacts neurobiologiques et physiologiques de la tDCS ne sont que partiellement connus, le chapitre suivant décrit les données de la littérature à ce sujet.

2.4 Mécanismes d'actions de la tDCS

Avant de développer de manière plus détaillée les mécanismes d'action connus de la tDCS, il nous semblait nécessaire de faire un point théorique de certaines fonctions de base des neurones qui seront utiles pour la compréhension des phénomènes décrits ultérieurement.

2.4.1 Rappels sur le potentiel membranaire et la plasticité synaptique.

- Le potentiel membranaire

Les neurones sont des cellules excitables, qui transmettent l'information via la formation de potentiels d'actions grâce à leurs dendrites et axones. Leur membrane est électriquement chargée. Le potentiel membranaire est défini comme la polarité résultant d'une distribution non-uniforme des ions de part et d'autres de la membrane. Au repos, l'intérieur de la cellule est négatif par rapport à l'extérieur et le potentiel membranaire de repos est d'environ -70 mV. Le neurone est un site de convergence d'informations provenant d'une ou plusieurs populations neuronales. La libération de substances extrasynaptiques, tels que les neuromédiateurs, active des récepteurs ou des canaux ioniques spécifiques au niveau de la synapse entraînant une variation des concentrations internes et externes d'ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) et donc de répartition des charges de part et d'autre de la membrane.

Ce changement du potentiel membranaire induit la dépolarisation de la membrane qui, si elle atteint un certain seuil, provoque l'apparition d'un potentiel d'action (Figure 10).

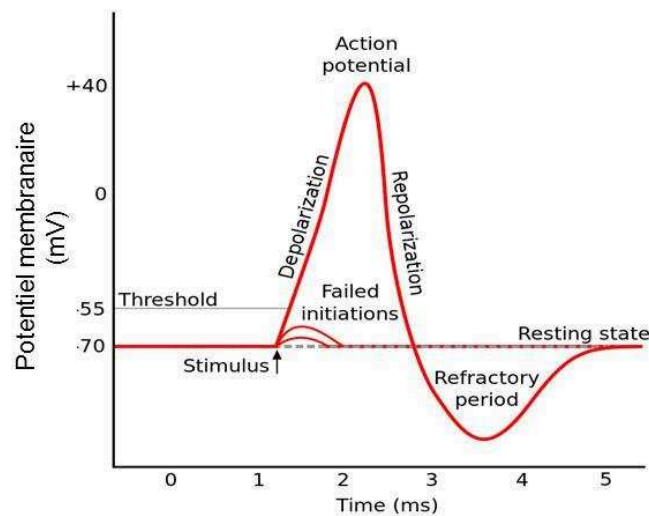


Figure 10: Un stimulus permettant le déplacement du potentiel membranaire au-delà de la valeur seuil induit un potentiel d'action, c'est-à-dire une dépolarisation puis une repolarisation et hyperpolarisation de la membrane cellulaire.

- La plasticité synaptique

Le cerveau est neuroplastique, c'est-à-dire qu'il est capable de développer de nouvelles interconnexions neuronales et synaptiques et de renforcer ou d'affaiblir l'efficacité synaptique ou d'un réseau neuronal. Nous allons ici nous intéresser à la plasticité synaptique qui correspond à une modification persistante de l'intensité de la transmission synaptique. L'exposition répétée à un stimulus, et donc la sollicitation répétée d'un réseau neuronal, peut aboutir à une augmentation graduelle de la force des synapses d'un réseau neuronal. La neuroplasticité synaptique est possible grâce aux phénomènes de potentialisation à long-terme (LTP) et de dépression à long-terme (LTD). La plasticité synaptique de l'hippocampe, modélisée par la LTP et la LTD, constitue la base cellulaire de l'apprentissage et de la mémoire (Malenka and Bear 2004). Les mécanismes impliqués dans l'induction de la LTP sont bien identifiés (Figure 11): l'activation des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques N-méthyl-D-aspartate (NMDA) suite à une libération massive de glutamate au niveau synaptique provoque un flux entrant de Ca^{2+} au niveau dendritique (Bliss and Lomo 1973; Nicoll 2003). L'accumulation intracellulaire de calcium déclenche une cascade de réactions moléculaires au sein du neurone qui aboutit à une modification durable de la synapse : l'accumulation de calcium induit l'augmentation d'AMPC et donc l'activation de différentes protéines kinases qui, à leur tour, vont phosphoryler certains facteurs de transcription (dont cFos et CREB) et activer la machinerie génique (Bennett 2000; Hardingham et al. 2006), qui permettra l'expression et

l'entretien de la LTP dur à l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA dans la membrane postsynaptique. Ces modifications auront pour conséquence de modifier la sensibilité de la cellule postsynaptique au glutamate.

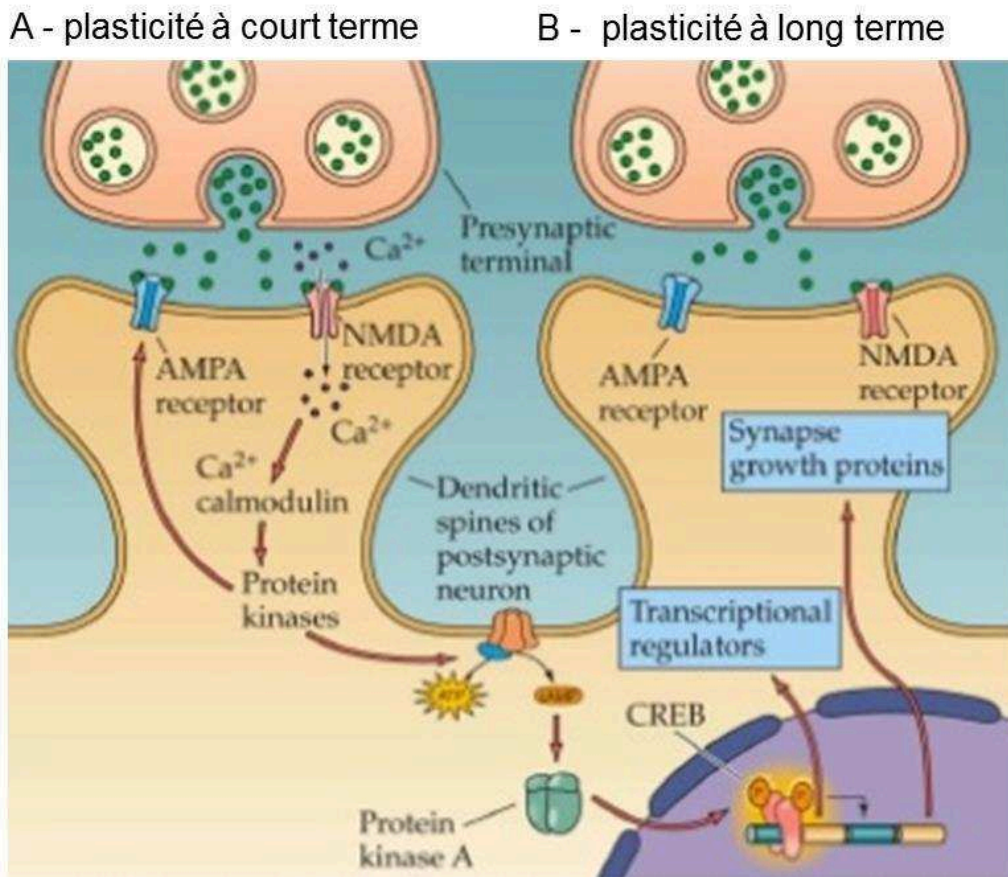


Figure 11: Changements à court et long terme associés à la plasticité synaptique. (A) Une dépolarisation postsynaptique suffisante permet une dépolarisation membranaire, l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule et l'ouverture des récepteurs NMDA. L'entrée massive de Ca²⁺ par ces canaux induit une cascade de signalisation aboutissant (B) à des modifications d'expression de certains gènes et à l'apparition des processus de potentialisation à long-terme (LTP). D'après Purves et al. (2008).

2.4.2 Effets neurophysiologiques de la tDCS.

- Modulation du potentiel membranaire

Dans les années 60, des études électrophysiologiques menées chez le rat et le lapin ont montré que de brefs courants anodiques délivrés par des électrodes intracérébrales ou épidurales au niveau du cortex moteur ou sensori-moteur augmentent l'activité et l'excitabilité corticale et activent des neurones jusqu'alors silencieux (Bindman et al. 1964; Purpura and McMurtry 1965; Morrell 1961). A l'inverse, les courants cathodiques réduisent la fréquence de décharge des neurones ou l'inhibent (Creutzfeldt, Fromm, and Kapp 1962; Bindman, Lippold, and Redfearn 1964). D'autres études ont parallèlement révélé que des courants électriques externes peuvent causer la redistribution et la

migration de certaines protéines membranaires et transmembranaires, tels que les canaux ioniques qui régulent le potentiel membranaire (Jaffe 1977; Stollberg and Fraser 1988). Il a donc été proposé qu'une stimulation anodique engendre une dépolarisation des membranes du corps cellulaire, rapprochant les neurones de leur seuil d'activation et favorisant la décharge spontanée des neurones et donc une excitation corticale (Figure 12). A l'inverse, une stimulation cathodique provoque une hyperpolarisation membranaire entraînant une diminution de l'excitabilité neuronale (Creutzfeldt et al. 1962; Purpura and McMurtry 1965). L'enregistrement de potentiels évoqués dans les cortex visuels et moteurs suite à une stimulation chez la souris a plus tard confirmé que la tDCS facilite ou inhibe l'excitabilité corticale selon la polarité (figure12) (Cambiaghi et al. 2010, 2011).

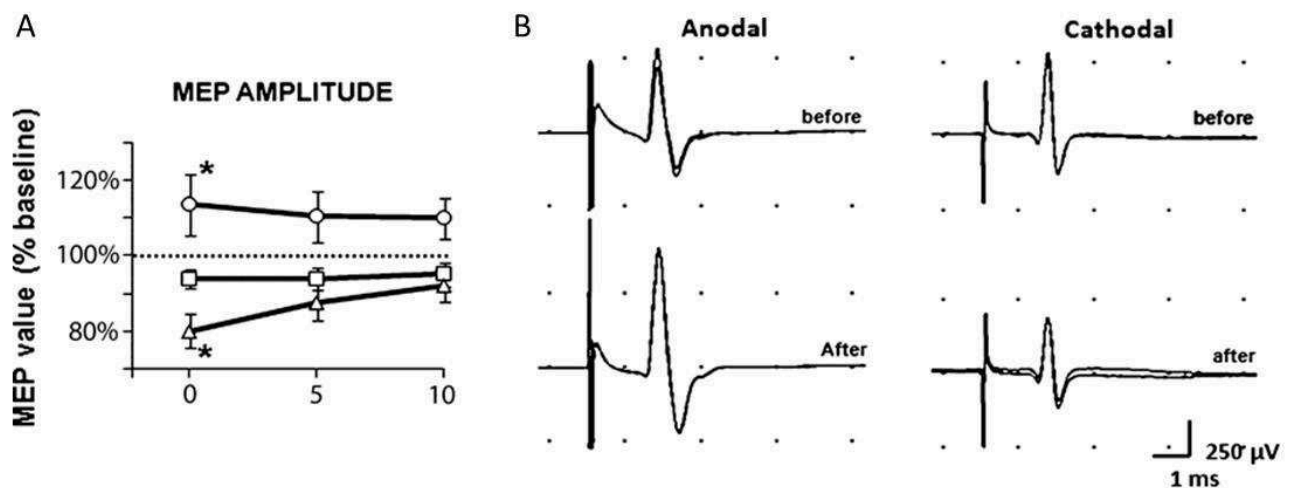


Figure 12: (A) Effet de la tDCS [anodique (ronds), sham (carrés), cathodique (triangles)] sur l'amplitude des potentiels évoqués moteurs (MEP). (B) exemples de MEPs avant et après une stimulation anodique et cathodique. D'après Cambiaghi et al., (2010).

Plus précisément, la tDCS engendre une faible densité de courant au sein de la zone cérébrale stimulée et module le potentiel membranaire de repos des neurones afin d'agir sur l'activité neuronale spontanée sans induire de potentiel d'action (Wagner et 2007; Radman et al. 2009). Cette modulation du potentiel membranaire semble être due à une "régulation" des canaux sodiques et calciques membranaires. En effet, leur blocage par la carbamazépine ou la fluarizine annule l'augmentation de l'excitabilité neuronale normalement observée après une stimulation anodique chez l'homme (Nitsche et al. 2003).

En fonction de la durée et de l'intensité de la stimulation, des effets postsynaptiques peuvent être induits. Cependant des études *in vitro* ont complexifié le tableau en démontrant que ces effets étaient dépendants d'autres facteurs tels que l'orientation du courant électrique par rapport à l'axe somato-dendritique des neurones pyramidaux (Rahman et al. 2013; Bikson et al. 2004a), la

morphologie neuronale (Radman et al. 2009) ou l'orientation des axones (Kabakov et al. 2012). En effet, il existe de forts effets directionnels dans les interactions champs électrique/neurones puisque les champs électriques influencent différemment les neurones perpendiculaires ou parallèles à leur trajectoire (Ranck 1975) mais aussi les axones dépendamment de leur orientation (Kabakov et al. 2012). Ces auteurs ont notamment montré que l'orientation des axones par rapport au vecteur du champ électrique détermine si le courant est excitateur ou inhibiteur et que l'orientation des dendrites influence la magnitude des effets du courant électrique. De même, le corps cellulaire et la terminaison axonale d'un neurone répondent différemment à un courant, modulant la plasticité synaptique en fonction de la polarité et de l'orientation de ce courant électrique: un champ radial, orienté suivant l'axe somatodendritique des neurones pyramidaux (inversement à un champs tangentiel), produit une polarisation somatique (la dépolarisation facilitant l'efficacité synaptique, l'hyperpolarisation la diminuant) (Rahman et al. 2013). Ces études suggèrent que la connaissance de l'orientation du champ électrique est nécessaire pour prédire les effets de la stimulation.

Ces modifications d'excitabilité neuronale, et donc de fréquence de décharge, sont des phénomènes non synaptiques expliquant les effets immédiats de la tDCS. Or cette technique de neuromodulation induit également des changements à long terme, se maintenant après l'arrêt de la stimulation, impliquant principalement des phénomènes de plasticité synaptique (LTP) et régulés par de nombreux neurotransmetteurs, en lien avec l'activité glutamatergique et gabaergique au sein du cerveau.

- Mécanismes des effets à long-terme de la tDCS.
 - *La plasticité synaptique : implication de la potentialisation à long terme (LTP)*

L'administration de substances inhibant la synthèse de protéines pendant la stimulation atténue la polarisation à long-terme induite par une stimulation anodique (Gartside 1968), suggérant que ses effets tardifs sur l'activité neuronale soient dépendants de la synthèse de protéines et donc probablement associés à des phénomènes de plasticité synaptique. Plusieurs équipes se sont donc intéressées aux changements moléculaires induits par une stimulation polarisée, notamment ceux connus pour être étroitement associés à des modifications de neuroplasticité. La grande majorité de ces études ont examiné les effets de la tDCS appliquée au niveau du cortex moteur, région impliquée dans l'exécution motrice, la formation de la mémoire motrice et la consolidation des aptitudes motrices chez l'homme comme chez l'animal (Ungerleider 1995; Rioult-Pedotti, Friedman, and Donoghue 2000; Muellbacher et al. 2002). Chez le rat, la stimulation du cortex sensori-moteur provoque l'accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Hattori, Moriwaki, and Hori

1990; Moriwaki 1991; Moriwaki et al. 1995) et l'augmentation de la concentration extracellulaire de calcium (Islam et al. 1995). Ces premières données soutiennent l'hypothèse selon laquelle les effets à long terme de la tDCS sur l'activité neuronale seraient sous-tendus par des modifications importantes et durables de l'efficacité synaptique, probablement via un mécanisme de potentialisation à long terme ou LTP. En adéquation avec cette hypothèse, d'autres études ont signalé que la stimulation anodique du cortex sensori-moteur accentue, jusqu'à 24 heures après la stimulation, le taux cytoplasmique de la protéine kinase C (PKC) (Islam et al. 1997) et l'expression du facteur de transcription précoce cfos (Islam et al. 1995; Moriwaki et al. 1995).

Plus récemment, des études *in vitro* travaillant sur des tranches de cortex moteur primaire ou d'hippocampe prélevées chez le rongeur ont permis d'affirmer que les effets tardifs de la stimulation par courant continu étaient bien associés à un phénomène de plasticité LTP-dépendant (Fritsch et al. 2010; Kronberg et al. 2017; Podda et al. 2016; Ranieri et al. 2012)). Fritsch et al (2010) ont élégamment mis en évidence que la stimulation anodique induit une LTP dépendante de la polarité (non observable après stimulation cathodique) et de l'activation des récepteurs au glutamate NMDA. En effet, un prétraitement avec un antagoniste des récepteurs NMDA empêche toute induction de LTP par la stimulation.

Cette modification de la force de transmission synaptique par la tDCS a été vérifiée par des études pharmacologiques réalisées chez l'homme qui ont notamment confirmé le rôle crucial des récepteurs NMDA dans les effets durables de la tDCS. En effet, l'administration d'une substance agoniste (d-cycloserine) des récepteurs NMDA accentue les effets à long terme de la tDCS sur le MEP alors que l'administration d'un antagoniste (dextrométhorpane) les annule (Liebetanz et al. 2002; Nitsche et al. 2003, 2004). Etant donné que l'activation des récepteurs NMDA est la première étape de l'induction de la LTP, ces données soutiennent que les effets de la tDCS sont engendrés par un mécanisme semblable à celui de la LTP et de la dépression à long-terme (LTD) (Liebetanz et al. 2002; Nitsche et al. 2003) : la tDCS anodique induit une LTP en augmentant l'activité pré-synaptique couplée à une dépolarisation post-synaptique. A l'inverse, la tDCS cathodique provoquerait une LTD via une réduction du taux de décharge présynaptique et une hyperpolarisation post-synaptique (Stagg and Nitsche 2011).

- *Effet sur la neurotransmission*

Plusieurs études mettent en évidence une modulation des effets à long terme de la tDCS par certains neurotransmetteurs tels que la dopamine et la sérotonine. Concernant **la sérotonine**, des expérimentations menées sur le sujet sain ont mis en évidence que l'augmentation de l'excitabilité

du cortex moteur (MEPs) induite par la tDCS anodique peut être amplifiée et prolongée par l'administration d'une dose unique (Nitsche et al. 2009) ou répétée (Kuo et al. 2016) de citalopram (SSRI). Par ailleurs, une ou plusieurs doses de citalopram peuvent également prévenir la diminution d'excitabilité normalement observée après une stimulation cathodique et induire une facilitation. Ces auteurs suggèrent que l'augmentation des taux de 5-HT suite à l'administration de citalopram n'induit pas de plasticité par elle-même mais modulerait la plasticité du système glutamatergique. Plus précisément, l'impact du citalopram peut être expliqué par le fait que l'élévation des taux de sérotonine va augmenter l'influx de calcium dans les cellules via les récepteurs NMDA et les canaux calcium voltage dépendant (Gu 2002; Holderbach et al. 2007). Etant donné que les effets à long terme de la tDCS sont dépendants des récepteurs NMDA et du calcium, l'élévation des taux de 5-HT peut renforcer l'excitabilité induite par la tDCS anodique via l'accroissement de l'influx calcique.

Concernant la **dopamine**, une étude a démontré l'importance des récepteurs D2 dans l'induction de la neuroplasticité par la tDCS : le blocage de ces récepteurs par la sulpiride, antagoniste D2, retarde les effets d'une stimulation anodique et annule ceux d'une stimulation cathodique chez l'homme (Nitsche et al. 2006). A l'inverse, l'administration de pergolide, agoniste des récepteurs D2, prolonge la diminution d'excitabilité induite par une stimulation cathodique. Une autre étude rapporte des données un peu moins claires puisque l'administration de L-dopa, et donc l'augmentation des taux de dopamine, provoque une inhibition de l'excitabilité induite par la tDCS cathodique et prolonge les effets inhibiteurs de la tDCS cathodique sur l'excitabilité du cortex moteur chez des individus sains (Kuo et al. 2008). La microdialyse chez le rat a également mis en évidence une élévation des taux de dopamine dans le striatum après une stimulation par tDCS cathodique (Tanaka et al. 2013). D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'implication de la dopamine dans les effets de la tDCS.

Une des hypothèses majeures concernant les mécanismes sous-tendant la modulation synaptique induite par la tDCS est la modification des transmissions **glutamatergique et GABAergique** au sein du cerveau. L'administration d'un agent pharmacologique agoniste du récepteur du GABA-A entraîne un retard suivi d'une augmentation et d'une prolongation des effets de la stimulation anodique chez l'homme sans avoir d'effet sur les conséquences d'une stimulation cathodique (Nitsche et al. 2004). Par ailleurs, l'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique (MRS) a montré qu'une stimulation anodique au niveau du cortex moteur induit une diminution significative des concentrations de GABA, donc une inhibition de la neurotransmission GABAergique alors qu'une stimulation cathodique provoque une diminution du glutamate associée à une baisse de glutamate

(Antonenko et al. 2017; S. Kim et al. 2014; Nitsche et al. 2004; Stagg et al. 2009). Certains auteurs pensent que les effets de la tDCS pourraient s'expliquer en partie par une modification de la balance excitation/inhibition (ratio glutamate/GABA) (Krause, Márquez-Ruiz, and Kadosh 2013). Des données chez l'animal semblent conforter cette hypothèse puisque des enregistrements effectués *in vivo* chez le lapin montrent que la tDCS induit des réponses évoquées plus semblable à celles observées chez l'homme lorsque les interneurons sont activés en même temps que les cellules pyramidales (Molae-Ardekani et al. 2013)

- *BDNF, plasticité structurelle et neurogénèse*

Plusieurs études indiquent que le facteur de croissance **BDNF** (Brain derived Neurotrophic Factor), impliqué dans diverses formes de plasticité synaptique et jouant notamment un rôle critique dans la maintenance de la LTP (Bramham and Messaoudi 2005; Lu, Christian, and Lu 2008), pourrait être nécessaire à l'apparition des effets neuronaux tardifs de la tDCS (Cocco et al. 2018). Fritsch *et al.* 2010 ont notamment mis en évidence que l'administration d'un faible courant électrique continu au niveau du cerveau de souris mutantes n'exprimant pas le BDNF n'induit pas de LTP contrairement à la souris saine. Une autre équipe a montré que la potentialisation de la LTP induite par la tDCS anodique, ainsi que l'amélioration de la mémoire visuo-spatiale qui lui est associée, est liée à la modulation de l'expression du BDNF, notamment via des régulations épigénétiques (Podda et al. 2016). De plus, Kim *et al.* (2017), ont montré que la tDCS anodique répétée au niveau du cortex sensorimoteur de rat entraîne une augmentation des taux d'ARN de différents gènes associés à des phénomènes de plasticité (BDNF, CREB, CAMKII...). Cette élévation des taux de BDNF a été directement associée à une amélioration mnésique chez le rat (Leffa et al. 2016; Yoon et al. 2016).

La tDCS semble également moduler la **plasticité structurelle** puisque l'application d'un courant continu externe sur différents types cellulaires en culture peut avoir un effet sur la migration, l'orientation, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Pelletier and Cicchetti 2015). La stimulation modifie la morphologie des neurones (corps cellulaire plus allongé), et provoque l'allongement des axones, des dendrites (Jiang et al. 2012), des astrocytes et de la microglie. Ces différents types cellulaires ont la capacité de modifier leur orientation en fonction de la stimulation puisque les neurones semblent s'orienter parallèlement au champ électrique alors que les cellules gliales s'alignent perpendiculairement à ce champ électrique (Pelletier et al. 2015).

La tDCS semble également favoriser la **neurogénèse** et donc la création de nouvelles cellules au sein du cerveau. En effet, une stimulation anodique ou cathodique augmente le nombre de cellules

nouvellement formées au sein de la zone sous ventriculaire (SVZ), l'un des deux sites cérébraux de neurogenèse adulte (Braun et al. 2016; Pikhovych et al. 2016). Ces études, et celle de Rueger et al. (2012a), rapportent également une augmentation du nombre de cellules souches neuronales au sein des zones corticales stimulées par tDCS chez des rongeurs sains ou ayant subi une ischémie cérébrale. Ces données sont particulièrement importantes si on considère le potentiel effet thérapeutique de la tDCS chez des patients ayant une lésion cérébrale.

- Implication des cellules gliales

Un certain nombre d'études commencent à s'intéresser à l'implication de la glie dans les effets de la tDCS. Trois grands groupes de cellules gliales ont été identifiés dans le cerveau : (1) les oligodendrocytes enveloppent les axones des neurones de couches de myéline afin d'en augmenter la vitesse de conduction ; (2) les cellules microgliales sont principalement considérées comme les cellules immunitaires du cerveau et participent à la réponse inflammatoire; et (3) les astrocytes ont un rôle déterminant dans le control homéostatique des neurones (Magistretti 2006) et au cours des phénomènes de transmission synaptique, notamment via la capture et la libération de transmetteurs qui peuvent moduler l'activité neuronale (Halassa and Haydon 2010).

Considérant la faible densité de courant induite par la tDCS au sein du cerveau, certains auteurs se questionnent sur la capacité d'un si faible courant à moduler, même légèrement, l'excitabilité neuronale (Roth 2009). Ruohonen et al (2012) ont réalisé une analyse théorique signalant que les changements de potentiel membranaire observés après tDCS sont du même ordre de grandeur que les variations de potentiel membranaire astrocytaire pendant l'activation neuronale (environ 2 mV) (Massimini and Amzica 2001) . Ces auteurs suggèrent donc que la tDCS, plutôt que de moduler le potentiel membranaire des neurones, altérerait le potentiel transmembranaire des cellules gliales.

Une étude récente a montré, grâce à l'imagerie in vivo des ions calcium au sein du cerveau de souris mutante (exprimant une protéine fluorescente permettant de mesurer la signalisation calcique), que les astrocytes jouent un rôle important dans l'induction de la plasticité cérébrale induite par la tDCS (Monai et al. 2016): une stimulation anodique du cortex visuel primaire entraîne une élévation de la concentration calcique dans les astrocytes alors que l'activité des neurones corticaux ne semble pas modifiée. Ces auteurs ont également montré que cette élévation des concentrations calciques astrocytaires, et donc leur activation, est dépendante des récepteurs α_1 de la noradrénaline et diminuée par l'ablation des neurones noradrénergiques (Monai et al. 2016). Ils proposent que la tDCS, en plus de ces effets sur l'activation neuronale, activerait les fibres noradrénergiques, et donc

la libération de noradrénaline. Cette élévation des taux de NA induirait, via l'activation des récepteurs α_1 , une augmentation des concentrations de Ca^{2+} au sein des astrocytes et la libération de gliotransmetteurs (glutamate, ATP, D-sérine) pouvant moduler la neurotransmission au niveau synaptique (

Figure 13).

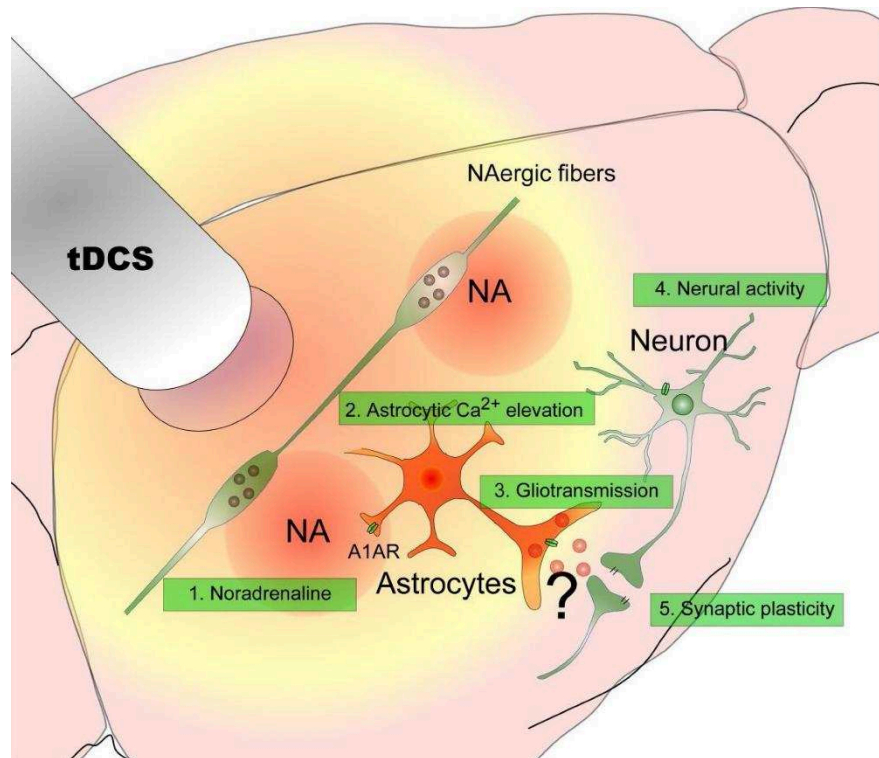


Figure 13: Représentation schématique des effets que pourraient induire la tDCS sur les astrocytes. La tDCS provoquerait (1) l'activation des fibres ou boutons noradrénergiques (NA) qui induirait (2) l'activation des astrocytes via les récepteurs α_1 de la noradrénaline (A1AR) et donc (3) la libération de gliotransmetteurs par les astrocytes. La modification de la polarisation membranaire des neurones placés sous l'anode (4), associée à la libération de gliotransmetteurs dans la synapse, modulerait la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA (5) (Monai and Hirase 2018).

Outre les astrocytes, certaines études ont mis en évidence que les oligodendrocytes peuvent être recrutés par la tDCS anodique dans un modèle de lésion cérébrale (Braun et al. 2016). De même, la tDCS semble capable de polariser, et donc d'activer, les cellules microgliales (Rueger et al. 2012) suggérant une possible modulation de la réponse inflammatoire.

- Processus inflammatoires

Comme nous l'avons vu dans le chapitre décrivant l'étiologie de la dépression, l'hypothèse inflammatoire est aujourd'hui en plein essor ; il serait donc logique d'étudier les modulations

inflammatoires qui pourraient être induites par la tDCS afin d'expliquer son mode d'action. Pour le moment, la littérature est assez pauvre à ce sujet, mais commence à émerger.

Tout d'abord, les études menées *in vitro* donnent des éléments intéressants : des cultures de cellules immunitaires ont été soumises à des champs de courant électriques provoquant l'accélération et la polarisation de la migration de ces cellules. Ceci a pu être observé dans des cultures de lymphocytes, monocytes, neutrophiles, macrophages et de cellules polynucléaires (Pelletier and Cicchetti 2015)). De plus, des courants électriques de forte intensité peuvent provoquer une réponse inflammatoire, caractérisée par la surexpression de la cyclooxygénase 2 (cox 2) dans des cellules gliales quiescentes (Pelletier et al. 2014).

Chez l'animal, des études ont également été menées afin de déterminer les effets de la tDCS sur l'inflammation. Chez le rat sain, Rueger *et al.* (2012a) ont observé qu'après 5 ou 10 jours de stimulation anodique ou cathodique par tDCS à 500µA pendant 15 minutes, l'expression d'iba1 était augmentée dans les cellules microgliales du cortex ipsilatéral à la stimulation, caractéristique d'une réponse immunitaire innée accrue. A l'inverse, la stimulation cathodique d'animaux ayant subi une occlusion de l'artère cérébrale (modèle d'ischémie cérébrale) provoque la diminution du nombre de cellules microgliales Iba1⁺ et CD45⁺ (Peruzzotti-Jametti et al. 2013), synonyme d'une activité anti-inflammatoire. Trois études ont été menées chez des modèles animaux de douleur chronique. Dans la première, la tDCS a été appliquée pendant 8 jours (0.5mA pendant 20 minutes) après induction de la douleur chronique par constriction du nerf sciatique. Cette étude rapporte que, parallèlement à l'atténuation des comportements nociceptifs, la tDCS reverse totalement la surexpression des cytokines IL-1β et IL-10 dans le cortex et la moelle épinière (Cioato et al. 2016). Dans la seconde étude, le modèle utilisé est différent puisqu'il s'agit d'un modèle de douleur inflammatoire, provoqué par l'administration d'un composé (complete Freund's adjuvant). De manière intéressante, le traitement par tDCS (8 sessions de 20 min. à 0.5mA) entraîne une diminution de certains comportements nociceptifs, sous-entendant une action de la tDCS sur l'inflammation (Laste et al. 2012a). Enfin, dans la troisième étude, la douleur est induite par un stress chronique par contention et le traitement par tDCS anodique entraîne à la fois une diminution de la douleur et des niveaux de TNF-α dans l'hippocampe des animaux (Spezia Adachi et al. 2012).

Dernièrement, Leffa *et al.* ont stimulé des animaux modélisant le TDAH (trouble de l'attention et hyperactivité) et ont mesuré les effets de la tDCS sur les marqueurs comportementaux et neurochimiques de cette pathologie (Leffa et al. 2018). Ces auteurs ont retrouvé un effet procognitif de la tDCS (mémoire à long terme) associé à une augmentation de la production de ROS (reactive oxygen species - espèces réactives de l'oxygène) dans l'hippocampe des animaux malades mais également sains. Si ce dernier élément est en faveur d'une modulation de l'inflammation par la tDCS,

il montre cependant que celle-ci n'est pas à l'origine de l'effet comportemental observé. Si ces différentes recherches n'ont pas été menées sur des modèles animaux de dépression, elles permettent cependant d'entrevoir des pistes intéressantes.

Les seules données disponibles sur la modulation de l'inflammation par la tDCS dans la pathologie dépressive sont issues des publications de Brunoni *et al.*, elles-mêmes issues de deux larges études cliniques portant sur l'efficacité de la tDCS chez des patients souffrant de dépression unipolaire en association ou non avec la sertraline (étude SELECT/tDCS) (Brunoni et al. 2015, 2014) ou l'escitalopram (ELECT/tDCS) (Brunoni et al. 2018). Dans ces deux études, des dosages plasmatiques de cytokines ou de leurs récepteurs ont été réalisés en parallèle du suivi clinique mais malheureusement aucune d'entre elles ne parvient à démontrer un effet significatif de la tDCS sur la concentration de ces marqueurs, et encore moins une association entre l'effet antidépresseur des traitements et leur modulation de l'inflammation.

Il semble donc que des modifications non-synaptiques (fréquence de décharge) couplées à des phénomènes de plasticité synaptique (c'est-à-dire qui modifient la force de transmission) soient impliquées respectivement dans les effets immédiats et à plus long terme de la tDCS. Cependant, la majeure partie des données présentées, bien qu'importantes, ne nous donnent qu'une vision partielle des mécanismes neurobiologiques impliqués dans les effets de la tDCS. En effet, la plupart des études rapportées sont réalisées sur des tranches ou coupes de cerveau (enregistrement, marquage histologique) et sont généralement obtenues par stimulation du cortex moteur et non du cortex préfrontal comme c'est le cas chez les patients souffrant de dépression. Il est désormais crucial de réaliser des expérimentations chez l'animal afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de la tDCS et donc de mieux l'utiliser.

2.5 La tDCS chez l'animal.

Liebetanz et al (2009) ont été les premiers à développer un dispositif permettant de stimuler par tDCS des rats non anesthésiés. Ce modèle, fréquemment utilisé depuis (Dockery et al. 2011; Monai et al. 2016; Podda et al. 2016), permet de stimuler le cerveau grâce à une électrode anodique vissée dans une embase chirurgicalement fixée sur le crâne. Une contre-électrode est positionnée au niveau thoracique à l'aide d'un corset le temps de la stimulation. L'asymétrie entre les deux électrodes a été décidée dans le but de créer un gradient de densité de courant (la densité la plus importante étant celle au niveau de l'aire cérébrale stimulée). Leur éloignement (contrairement à ce qui est pratiqué

chez l'Homme, où les deux électrodes sont le plus souvent céphaliques) permet d'éviter le passage de courant directement de l'une à l'autre (shunt).

Si quelques données existent concernant l'effet de la tDCS sur les fonctions motrices (Faraji et al. 2013; Kim et al. 2010; Zhang et al. 2015; Yoon et al. 2012) et cognitives (Dockery et al. 2011; Kamida et al. 2010) chez l'animal, il y en a actuellement très peu concernant les effets comportementaux de la tDCS chez des modèles murins de pathologies psychiatriques en général et de dépression en particulier. La plupart sont issues des travaux précédents du laboratoire de Neurosciences de Besançon où a été réalisé ce travail de Doctorat.

Le dispositif que nous utilisons au laboratoire est inspiré de celui de Liebetanz *et al.* mais il est utilisé sur la souris anesthésiée (isoflurane) ou vigile mais contenue (maintenue dans une boîte de contention). Les souris sont soumises à 2 sessions de stimulation anodique par jour, chaque stimulation durant 20 minutes (200 μ A), pendant 5 jours au niveau du cortex frontal gauche. En accord avec les données récoltées chez l'homme, nos résultats comportementaux révèlent que la tDCS a un effet de type antidépresseur et améliore la mémoire de travail sans affecter les fonctions locomotrices et les comportements de type anxieux (Pedron et al. 2014). Plus précisément, les souris stimulées sont moins immobiles que les souris contrôle dans le test de nage forcée soulignant une diminution des comportements de résignation 3 semaines après la dernière stimulation. La tDCS améliore également la capacité des souris à reconnaître un nouvel objet témoignant d'une amélioration des capacités cognitives des souris stimulées.

Les effets comportementaux de la tDCS ont aussi été évalués chez la souris adulte exposée de façon chronique à la nicotine à l'adolescence (injection i.p. 2 fois par jours pendant 14 jours) (S. Pedron et al. 2014), un modèle permettant d'étudier des comportements associés à l'abstinence (Iñiguez et al. 2009). La tDCS a un effet normalisateur sur les comportements pathologiques associés à cette exposition tels que les comportements pseudo-dépressif dans le test de nage forcée et l'effet renforçateur de la nicotine dans le test de préférence de place jusqu'à 3 semaines après la dernière stimulation. D'autres expérimentations sont en cours pour déterminer les effets de la tDCS sur d'autres marqueurs de la réponse antidépressive (notamment la neurogénèse) ainsi que chez un modèle murin de maladie psychiatrique.

Outre les travaux de notre équipe, Monai et al (2016) ont montré qu'une session unique de tDCS améliorerait les comportements de type dépressifs observés chez des souris soumises à des contentions chroniques. En effet, le temps d'immobilité des souris dans le test de suspension caudale (TST) après 5 jours de stress était plus bas chez les souris stimulées que chez les souris non stimulées, témoignant de l'effet de type antidépresseur de la tDCS. De façon très intéressante, cette

amélioration comportementale n'est plus observable chez les souris ayant une lésion noradrénergique, un blocage des récepteur $\alpha 1$ de la noradrénaline ou une déficience en IP₃R2, qui diminue toute l'élévation de Ca²⁺ dans les astrocytes, suggérant que les astrocytes, après activation par la noradrénaline, participeraient aux effets neurobiologiques de la tDCS (cf. chapitre précédent sur l'implication du système glial dans les mécanismes d'action de la tDCS).

3 OBJECTIFS

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, la dépression est une pathologie très complexe, à forte prévalence mais avec une prise en charge difficile. Même si les antidépresseurs, traitements les plus fréquents à l'heure actuelle, apportent des résultats satisfaisants, il reste encore un fort taux de patients non-répondeurs, voire résistants aux traitements pharmacologiques. De ce constat, découlent deux grands objectifs à la recherche sur la dépression et sa prise en charge. Le premier consiste à trouver de nouvelles offres thérapeutiques, et particulièrement non pharmacologiques. Nous avons vu que le nombre de techniques de stimulations grandit d'années en années, avec des techniques plus ou moins invasives, induisant plus ou moins d'effets secondaires. Parmi ce choix de techniques de stimulation, nous avons choisi de travailler particulièrement sur la tDCS, d'une part parce qu'elle est non-invasive et peu délétère et d'autre part parce qu'elle est utilisée en clinique dans le service de psychiatrie du CHU de Besançon, ce qui nous permet d'offrir une portée clinique assez directe à nos recherches.

Malgré l'utilisation de la tDCS en psychiatrie, cette technique est finalement assez peu maîtrisée, comme d'ailleurs la plupart des nouvelles techniques de stimulation, et son utilisation reste empirique et ne repose pas sur des données scientifiques complètes, notamment concernant ses mécanismes d'action. Or la connaissance exacte, complète de ceux-ci est indispensable à la maîtrise des effets thérapeutiques et indésirables de cette technique.

Le second grand objectif de la recherche sur la dépression permettant d'augmenter l'offre de soins de cette pathologie est la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, les antidépresseurs actuels ciblent majoritairement les systèmes monoaminergiques (principalement sérotoninergiques et noradrénergiques), considérés comme dysfonctionnels dans la pathologie dépressive. Cependant comme nous l'avons déjà mentionné, le taux de réponse à un traitement antidépresseur n'est pas de 100%, d'où la nécessité d'autres cibles. Compte tenu également de la complexité physiopathologique de la dépression, décrite dans l'introduction de ce travail, il est évident qu'un traitement novateur passe par une cible nouvelle.

Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'hypothèse inflammatoire de la dépression, hypothèse qui connaît un réel essor actuellement, et qui nous a semblé pleine de promesses.

Ainsi, les objectifs détaillés de ce projet sont :

1. Améliorer les connaissances sur la tDCS et son utilisation chez l'animal.

Le passage au modèle animal est indispensable à la recherche poussée des mécanismes d'action de la tDCS. Pour cela, un dispositif a été développé au sein du laboratoire de Neurosciences de Besançon il y a quelques années. Les premières études ont été prometteuses puisqu'elles ont

permis de montrer les modifications comportementales induites par ces stimulations, cependant une caractérisation plus complète de ses effets était nécessaire.

Nous avons donc, dans un premier temps, cherché les paramètres optimaux de stimulation chez la souris saine, permettant d'obtenir des effets comportementaux de type antidépresseur.

Dans un second temps, il nous a semblé nécessaire de confirmer ces effets de type antidépresseur dans différents modèles de dépression, utilisant des constructions différentes : le modèle CORT obtenu par administration chronique de corticostérone), le modèle LPS (obtenu par injection de lipopolysaccharides) et le modèle UCMS (unpredictable chronic mild stress), le gold standard des modèles animaux de dépression.

2. Rechercher les mécanismes d'action de la tDCS et rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cet objectif, nous nous sommes d'abord intéressés à la capacité de la tDCS à activer des zones cérébrales qui ne sont pas directement situées au site de stimulation et qui sont connues pour être impliquées dans la physiopathologie de la dépression. Pour cela un marquage c-fos a été réalisé dans les cerveaux d'animaux stimulés.

Enfin, afin de tester l'hypothèse inflammatoire, à la fois comme mécanisme d'action de la tDCS mais également comme nouvelle cible thérapeutique, nous avons recherché les modifications des processus inflammatoires induites dans le modèle UCMS et l'effet de la tDCS sur ces modifications.

MATERIEL ET METHODES

1 ANIMAUX ET HEBERGEMENT

Les souris (Janvier Labs, Laval, France) âgées de 6 semaines à leur arrivée sont hébergées en condition standard à l'animalerie (cycle jour/nuit de 12/12 h, lumières allumées à 7h ; température et humidité contrôlées). La nourriture et l'eau sont disponibles *ad libitum*.

En accord avec la littérature, plusieurs souches de souris ont été utilisées dépendamment des expérimentations mises en œuvre :

- 211 souris femelles de souche SWISS ont été utilisées afin de caractériser les effets comportementaux et neurobiologiques de la tDCS chez la souris saine et chez des souris ayant subi une déplétion en sérotonine (injections de PCPA, n=36).
- 77 souris mâles de souche C57BL6 ont été utilisées pour étudier l'effet comportemental de la tDCS chez les modèles murins de la dépression basés sur l'administration chronique de corticostérone (n= 38) ou l'injection de LPS (n= 39).
- 74 souris femelles BALB/c ont été utilisées dans l'étude des effets comportementaux et de la réponse inflammatoire à la tDCS (n= 74) dans le modèle de stress chroniques imprédictibles (UCMS).

Pour les expérimentations n'impliquant pas de protocole d'UCMS, les souris ont été placées en cages collectives tout au long de l'expérience (n=5 par cage), excepté lors des périodes de chirurgie et de stimulation (placement en cages individuelles afin d'éviter le détachement de l'embase).

Concernant la procédure d'UCMS, 40 souris sont arbitrairement séparées en deux groupes et hébergées dans 2 salles différentes lors de chaque expérimentation. Le premier groupe de 20 souris, appelé « témoin » correspond aux souris non exposées aux stress. Le second groupe est composé de 20 souris exposées aux stress et est appelé « UCMS ». Les souris témoins et UCMS sont placées en cage individuelle de leur arrivée jusqu'à leur euthanasie. Les souris témoin bénéficient d'un environnement enrichi par l'ajout d'un tube en plastique ou d'un dôme en carton.

Toutes les études suivent les normes européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Elles ont été approuvées par le comité d'éthique bisontin en expérimentation animale (CEBEA-58) et le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (MESR).

2 STIMULATIONS PAR TDCS

La stimulation par tDCS chez la souris nécessite tout d'abord la fixation d'un support cylindrique sur le crâne de l'animal par chirurgie. Ce support, appelé embase, sera utilisée pour positionner l'électrode de stimulation (anode) au-dessus de la région cérébrale ciblée et évitera son déplacement pendant ou entre chaque stimulation. L'embase et les électrodes de stimulations ont été conçues en collaboration avec l'entreprise DIXI microtechniques (Besançon, France) et en s'inspirant de précédents travaux (Liebetanz et al. 2006, 2009).

2.1 Chirurgie et placement de l'embase

La chirurgie est réalisée sous anesthésie générale (solution de Kétamine 80 mg/kg et Xylazine 12 mg/kg). La souris est placée dans un cadre stéréotaxique, une incision sagittale est pratiquée sur la longueur du crâne. Après avoir nettoyé le crâne de son périoste, l'embase est positionnée au niveau de la région frontale gauche (+1 mm en avant, +1 mm sur la gauche par rapport au Bregma). Elle est fixée par adjonction de ciment dentaire (Glass Ionomer, GC Fuji I, Japon) (Figure 14). Une fois l'opération réalisée, du paracétamol est administré par voie orale (150mg/L d'eau de boisson) pendant 24 heures. Une semaine de repos est respectée entre la chirurgie et le début des stimulations.

Les souris Sham sont également anesthésiées, leur crâne est mis à nu et recouvert de ciment sans positionnement d'embase.

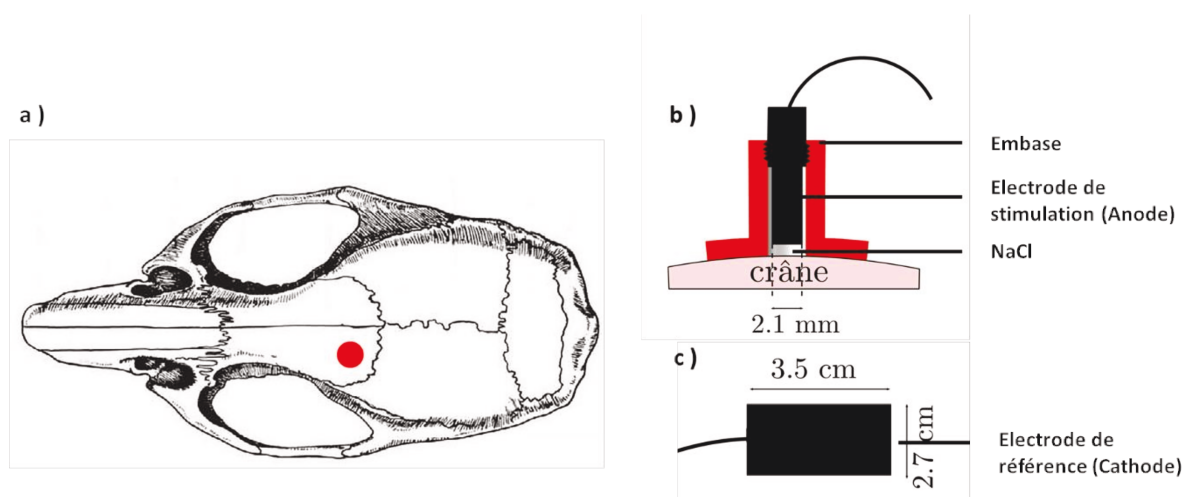


Figure 14: Schéma du matériel de stimulation, a) L'embase est fixée au-dessus du cortex frontal gauche par chirurgie. Pendant la stimulation par tDCS, l'anode est vissée dans l'embase remplie de liquide physiologique (b) et la cathode (c) est plaquée au niveau du thorax grâce à un gilet ; adapté de (Pedron et al., 2014).

2.2 Stimulation par tDCS

Les souris sont soumises à la stimulation par tDCS au moins une semaine après la chirurgie. Elles sont anesthésiées par Isoflurane® dans la boîte de l'appareil d'anesthésie gazeuse (TEM SEGA, Bordeaux, France). Une fois la souris endormie, l'expérimentateur peut placer la cathode (électrode de 3.5 cm x 2.7cm, physiomed Elektromedizin AG, Schnaittach, Allemagne) préalablement recouverte de gel conducteur au niveau du thorax des souris grâce à un gilet de contention. L'animal est replacé dans la boîte d'anesthésie puis l'anode (surface de contact avec le crâne 3.5 mm²) est vissée dans l'embase préalablement remplie de NaCl 0,9% (Figure 15).

Les stimulations sont effectuées grâce au stimulateur « NeuroConn DC-stimulator® » (utilisé en recherche clinique) et aux générateurs fabriqués dans notre laboratoire (Open-tES, Besançon, France) spécialisés pour la stimulation du rongeur. L'impédance électrique, ou la résistance du circuit électrique, est mesurée automatiquement pendant la stimulation. Si celle-ci dépasse 90 kΩ, le stimulateur est automatiquement arrêté afin que l'expérimentateur puisse optimiser la conductance (ajout NaCl et gel conducteur, positionnement des électrodes). Les souris Sham (non stimulées) sont également anesthésiées par isoflurane pendant la même durée que les souris stimulées mais ne reçoivent pas de stimulation par tDCS.

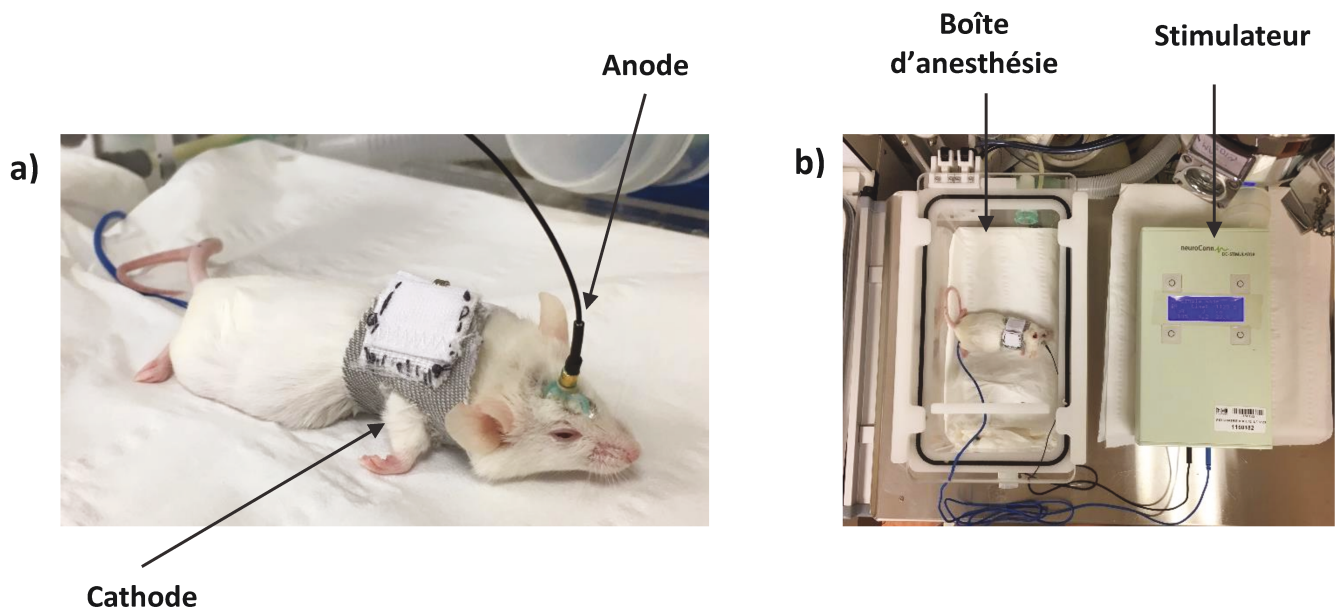


Figure 15 : Dispositif permettant la stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) sous condition d'anesthésie gazeuse ; a) l'anode est vissée dans l'embase préalablement fixée sur le crâne et cathode attaché au thorax des souris anesthésiées (b) l'anode est reliée au stimulateur (ici Neuroconn) qui permet de stimuler la souris placée dans la boîte d'anesthésie gazeuse.

Selon les expérimentations, leur but et leurs contraintes (nombre de souris, réalisation de stress, etc.), les nombre, durée et intensité des stimulations sont variables. Les différents protocoles de stimulation sont présentés dans le tableau ci-dessous (

Tableau 2 : Différents protocoles de stimulation par tDCS utilisés selon les expérimentations (Tableau 2).

Expérience	Protocole de stimulation
<u>Souris saines</u> Etude de l'effet du nombre de stimulation et étude de l'expression de c-fos	1 stimulation anodique, 200µA, 20 min 10 stimulations anodiques (2 stimulation/jour pendant 5 jours), 200µA, 20 min
<u>Souris saines</u> Etude de l'effet de la variation d'intensité des stimulations	1 stimulation anodique, 25 µA, 20 min 1 stimulation anodique, 100 µA, 20 min 1 stimulation anodique, 200 µA, 20 min
<u>Souris saines</u> Etude de l'effet de la variation de la durée des stimulations	1 stimulation anodique, 200µA, 20 min 1 stimulation anodique, 200µA, 10 min 1 stimulation anodique, 200µA, 3 min
<u>Souris saines</u> Etude de l'effet de la variation de la polarité des stimulations	1 stimulation anodique, 200µA, 20 min 1 stimulation cathodique, 200µA, 20 min
<u>Modèle CORT</u>	21 stimulations anodiques, 200µA, 20 min (1 stimulation par jour, 21 jours consécutifs)
<u>Modèle UCMS</u>	10 stimulations anodiques, 200µA, 20 min (1 stimulation par jour, 5 jours par semaine, pendant 2 semaines)
<u>Modèle LPS</u>	10 stimulations anodiques, 200µA, 20 min, (2 stimulations par jour pendant 5 jours)

Tableau 2 : Différents protocoles de stimulation par tDCS utilisés selon les expérimentations

3 MODELES MURINS DE DEPRESSION

Plusieurs procédures ont été utilisées dans ce travail de thèse afin d'induire des comportements de type dépressif chez les souris.

3.1 Exposition chronique à la Corticostérone (modèle CORT)

Le modèle CORT repose sur l'administration chronique de corticostérone, hormone de stress qui va induire l'hyperactivation de l'axe HPA. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, l'activation répétée de l'axe HPA est l'une des hypothèses physiopathologiques de la dépression puisqu'elle entraînerait une altération du rétrocontrôle négatif et du fonctionnement des récepteurs aux glucocorticoïdes engendrant un niveau élevé et continu de cortisol dans le sang, participant à l'apparition de symptômes dépressifs.

3.1.1 Préparation de la corticostérone

La corticostérone (4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21- hemisuccinate; Sigma, St Louis, MO, USA) est pesée et d'abord dissoute dans une solution de hydroxypropyl- β –cyclodextrin (BCD, concentration 200mL/L. IMCD, France;). Le mélange CORT+BCD, placé dans de la glace pour éviter qu'il ne chauffe, est d'abord soniqué pendant 10 minutes puis vortexé pendant 3 minutes. Ces étapes sont répétées 2 à 3 fois afin d'obtenir une dissolution complète de la CORT dans la BCD. Cette solution est ensuite diluée dans de l'eau de boisson habituelle des animaux afin d'obtenir une concentration finale de CORT à 35mg/L d'eau.

3.1.2 Administration chronique de CORT

La Corticostérone (35 mg/L, équivalent 5mg/kg/jour) est administrée par voie orale, grâce à l'eau de boisson pendant 9 semaines. L'eau contenant la corticostérone est versée dans des biberons opaques afin de préserver la corticostérone de sa dégradation par la lumière. La solution de CORT est refaite tous les 3-4 jours. Les souris du groupe « Véhicule » ont accès à un biberon d'eau normale, également opaque.

3.2 Administration aiguë de Lipopolysaccharide (modèle LPS)

Comme présenté dans l'introduction de ce travail (cf paragraphe 1.3.3), l'injection de lipopolysaccharides (LPS) permet d'induire une réponse inflammatoire, et donc la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires aboutissant à un état de type dépressif (Dantzer et al., 2008). Nous évaluerons les effets de la tDCS sur les comportements de type dépressif 24h après administration i.p. de LPS.

3.2.1 Préparation de la solution de LPS

Le LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA) est dissout dans une solution de Chlorure de Sodium à 0,9% afin d'obtenir une concentration de 0,83 mg/ml (O'Connor et al., 2009).

3.2.2 Administration de la solution de LPS

Les souris reçoivent une injection i.p. de LPS (groupe LPS-tDCS). Le groupe témoin correspondant (groupe véhicule) reçoit quant à lui une injection i.p. de NaCl 0,9%.

3.3 Exposition aux stress chroniques imprédictibles (modèle UCMS - Unpredictable Chronic Mild Stress)

Le modèle UCMS tente de reproduire, dans un modèle animal, les effets du stress dans l'apparition des troubles dépressifs, c'est à dire l'ensemble des altérations comportementales, neuroplastiques, neuroendocrines, neurotoxique et moléculaires observables chez l'individu déprimé (Willner et al. 1992). Cette procédure bien validée consiste à soumettre les animaux de façon chronique et aléatoire à des stress psychosociaux ou environnementaux pendant plusieurs semaines.

Les souris de groupe UCMS sont exposée à une ou deux situations anxiogènes par jour (6 jours par semaine pendant 9 semaines) dans une pièce spécifique de l'animalerie, isolée des autres animaux hébergés et notamment ceux du groupe témoin non stressé. Afin d'éviter toute habituation des souris, la nature et la durée du stress ainsi que l'heure à laquelle il est réalisé sont déterminés de façon aléatoire. Les stress, leurs descriptions ainsi que leur durée sont présentées dans les Tableau 3 Tableau 4. La durée de chaque stress est augmentée progressivement au fil des semaines (Nollet et al., 2013).

Stress	Description	Durée
Empty cage (<i>sans litière</i>)	La litière de chaque cage est enlevée	1 H - 6 H
Damp sawdust (ou <i>litière humide</i>)	La litière est mouillée par ajout de 150 ml d'eau (20°C)	1 H - 6 H
Tilting cage (ou <i>bascule</i>)	Les cages sont penchées avec un angle de 45°	1 H - 6 H
Bath (ou <i>bain</i>)	Chaque souris est déposée dans une cage dont de fond est rempli par 225 ml d'eau à 20°C	15 min – 3 H
Fèces de rat	Des fèces et de la litière de rat sont déposés dans chaque cage	1-3 heures
Restrain (ou <i>contention</i>)	Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis placées dans des tubes fermés et percés (permettant la respiration des souris)	15 min – 3H
Without dark phase (ou <i>absence de phase sombre</i>)	La phase nocturne est supprimée en laissant 3 lampes allumées dans la pièce d'hébergement et ce durant toute la phase nocturne (19H00-07H00)	12 heures
Predator sound (ou <i>bruit de prédateur</i>)	Un son d'oiseaux est diffusé dans la pièce d'hébergement	10-30 minutes
Flash	Deux stroboscopes sont allumés pendant la phase nocturne (fréquence d'environ 300 flash/minutes)	10-30 minutes
Stress social	Chaque souris est placée dans une cage précédemment occupée par un autre individu	1 heure
Shaking cage	La cage de la souris est positionnée sur un plateau à mouvements vibratoires	5-15 minutes
privation d'eau	La souris n'a plus d'accès à l'eau pendant 24h	12-24 heures

Tableau 3 : Description des différents stress mis en œuvre lors de la procédure d'UCMS

Semaine	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche
1	Damp 1 H (10h00-11h00) Tilting 1 H (15h00-16h00)	Bath 15 min (9h00-9h15)	Restain 15 min (11h00-11h15) Flash 30 min (20h00-20h30)	Rat 1 H (16h00-17h00)	Shaking 5 min (9h00-10h30)	Bruit 10 min (1h00-1h10)	
3	Shaking 5 min (13h00-15h30)		Tilting 1 H (12h00-13h00)	Bath 20 min (15h00-16h00) Flash 30 min (22h00-22h30)	w/o dark phase	Shaking 7 min (12h00-14h00)	Bruit 15 min (3h00-3h15)
5	Damp 1.5 H (17h00-18h15)	w/o dark phase	w/o saw dust 3 H (9h00-12h00)	Rat 1.5 H (9h00-10h15) Bruit 30 min (18h00-18h30)	Restain 20 min (14h00-14h20)		w/o dark phase

Tableau 4 : Exemple d'enchaînement des stress lors des semaines 1, 3 et 5 de la procédure d'UCMS

4 EVALUATION COMPORTEMENTALE

Pour la plupart des tests comportementaux réalisés lors de ce travail de thèse, les souris ont été placées dans la pièce d'expérimentation une heure avant le début des phases de test afin qu'elles s'habituent à ce nouvel environnement (odeurs, luminosité, bruits ambiant). Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 5% entre chaque souris afin d'éviter toute odeur pouvant modifier le comportement de l'animal suivant. Une caméra vidéo (GoPro Session®) permet l'enregistrement des différents comportements de l'animal pendant la durée du test.

4.1 Mesure des comportements autocentrés

4.1.1 Etat du pelage de la souris

Chez les rongeurs, le comportement d'auto-toilettage est très sensible au stress (Kalueff and Tuohimaa 2004) et l'état du pelage peut être un indicateur de l'état pseudo-dépressif chez la souris. En effet, l'état du pelage est dépendant de la fréquence et de la durée de toilettage et constitue le reflet de la motivation de l'animal envers des activités autocentrées. Le pendant chez l'homme serait la faible hygiène personnelle observée chez beaucoup de patients dépressifs.

Pour ce test, un score est attribué à l'état du pelage le lundi de chaque semaine durant tout le protocole par l'expérimentateur au niveau de 6 ou 7 zones du corps : tête (pour les expérimentations sans tDCS), cou, pelage dorsal (dos), pelage ventral (abdomen), queue, pattes avant et pattes arrière. Pour chaque zone du corps, l'état du pelage peut passer d'un état lisse, brillant et propre (score de 0) à un état ébouriffé, avec des épis (score de 1) (Figure 16). Des scores intermédiaires ont été attribués pour un pelage plus ou moins dégradé. Le score global est ensuite calculé, rendant un maximum de 6 ou 7 pour chaque animal.

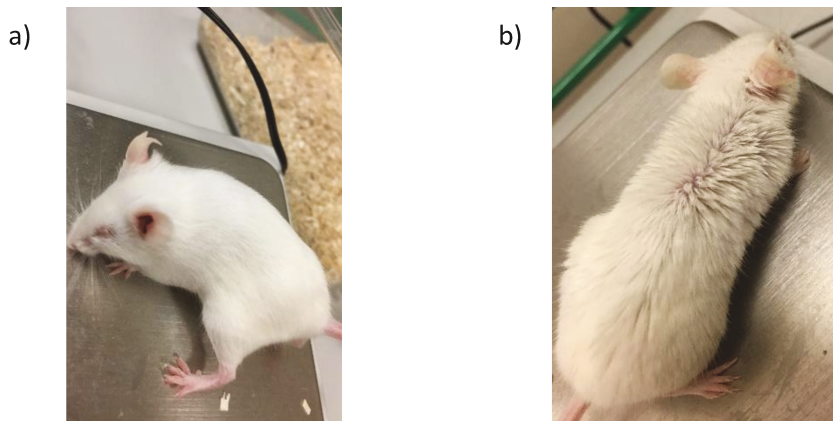


Figure 16 : Test de l'état du pelage ; exemple d'une souris témoin dont le pelage en bon état donne un score de 0 (a). Une souris du groupe UCMS a, inversement, un état du pelage dorsal dégradé (score=1) (b).

Ce test qui permet l'évaluation de l'état émotionnel de la souris au fil des semaines a été réalisé chez les souris soumises aux procédures d'UCMS ainsi que leur groupe contrôle.

4.1.2 Le Splash test

Le Splash test évalue également la motivation de la souris pour se toiletter mais, cette fois, ce comportement est induit artificiellement par pulvérisation d'une solution visqueuse et palatable de sucrose sur son pelage dorsal. Ce test permet une mesure quantitative directe de comportement de toilettage (Nollet et al., 2013).

Chaque souris est placée dans une cage individuelle 24h avant le test. Le jour de test, la pièce est faiblement éclairée par deux lampes halogène afin d'obtenir une luminosité homogène d'environ 50-60 lux, une solution de sucrose (10%) est pulvérisée (environ 1-2ml) sur le pelage dorsal de la souris. Elle est alors immédiatement replacée dans sa cage d'hébergement individuel afin d'éviter tout comportement exploratoire que susciterait un nouvel environnement. Le temps total de toilettage est comptabilisé pendant 5 minutes.

4.2 Comportements de type anxieux.

Les tests comportementaux visant à évaluer les comportements de type anxieux reposent sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les espaces ouverts, éventuellement surélevés et/ou fortement éclairés dans lesquels les animaux sont confrontés à une situation conflictuelle : affronter le danger d'explorer un milieu inconnu éventuellement source de récompense, ou rester immobile sans prendre de risque. La faible exploration du nouvel environnement et l'évitement des zones les plus aversives de ces dispositifs sont considérés comme des indices d'anxiété.

4.2.1 Test de l'open-field

Le test d'"Open-field" est une arène carrée (50x50 cm) blanche et moyennement éclairée (environ 50 Lux). Dans ce contexte expérimental anxiogène pour l'animal, on estime que l'anxiété est inversement proportionnelle à sa capacité à s'aventurer dans la zone centrale du dispositif.

Les souris sont placées dans un coin du dispositif carré et laissées libres de l'explorer pendant 5 minutes. Lors de l'analyse des enregistrements vidéo, un calque divisant le dispositif en 25 carreaux est disposé sur l'écran. Le nombre de visites et le temps passé au centre, considéré comme étant l'ensemble des carrés n'ayant pas de côté touchant les parois, sont ensuite comptabilisés par analyse des enregistrements vidéo. Une visite au centre est comptabilisée lorsque les quatre pattes de l'animal sont dans la zone centrale. Ces données permettent de calculer le nombre total de visites au centre du dispositif ainsi que les pourcentages de temps passé et de carreaux traversés au centre.

Ce test est également utilisé pour mesurer la locomotion de l'animal. Pour ce faire, nous réalisons un comptage du nombre de carreaux traversés ce qui donne une idée de la distance parcourue.

4.2.2 Comportements de type anxio-dépressif : le test d'hypophagie induit par la nouveauté (Novelty-Suppressed Feeding Test ; NSF)

Ce test est couramment utilisé pour évaluer les comportements associés à l'état "dépressif" et "anxieux" chez le rongeur (Samuels et Hen, 2011). Ce dernier est d'abord privé de nourriture pendant 24h puis placé au sein d'une enceinte carrée (50x50x25 cm) faiblement éclairée (50 lux) au centre de laquelle une croquette est déposée sur une feuille de papier blanc (7x7 cm) (Figure 17). Le rongeur se trouve alors en situation de motivation conflictuelle entre le besoin de s'alimenter et la crainte de s'aventurer dans un espace inconnu et anxiogène. La souris est placée dans un coin de cette enceinte et le chronomètre est immédiatement déclenché. Le temps que met la souris à saisir et croquer la croquette est mesuré et appelé temps de latence. Si la souris n'a pas mangé la croquette au bout de 5 min, elle est replacée dans sa cage d'hébergement et un temps de latence de 300 secondes lui sera donné. La litière qui recouvre le sol de l'enceinte est changée et le dispositif est nettoyé (éthanol 5%) entre chaque animal.



Figure 17 : test d'hypophagie induit par nouveauté. Une croquette de nourriture est positionnée au centre d'une enceinte

- Comportement de résignation : le test de nage forcée (FST)

Le test de la nage forcée est un test comportemental élaboré à la fin des années 1970 par Porsolt qui permet d'évaluer un comportement "pseudo-dépressif" chez les rongeurs (Porsolt et al., 1977). La procédure consiste à exposer un animal à une situation de stress inéluctable durant laquelle il est forcé de nager. Après une période initiale de forte activité de nage afin de trouver une échappatoire, l'animal réduit l'intensité de ses mouvements pour ne garder finalement que ceux nécessaires au maintien de sa tête hors de l'eau. Cette réponse correspond à une immobilité comportementale qui permet d'évaluer l'état de résignation de l'animal face au stress qui lui est infligé.

La souris est mise dans un béccher en verre transparent, à parois lisses, de 18 cm de diamètre et de 27 cm de hauteur, rempli de manière à ce que la souris ne puisse ni sortir, ni poser sa queue au fond du récipient (profondeur de l'eau 18 cm) (Figure 18). L'eau est maintenue à une température de $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ et changée entre chaque souris. Une caméra permet l'enregistrement de la session de nage, d'une durée de 6 minutes, qui sera ensuite visionnée par l'expérimentateur qui comptabilisera le temps où la souris est restée immobile. L'animal est considéré immobile lorsque ses membres postérieurs ne bougent plus ou qu'il réalise de légers mouvements pour se maintenir à la surface d'eau.

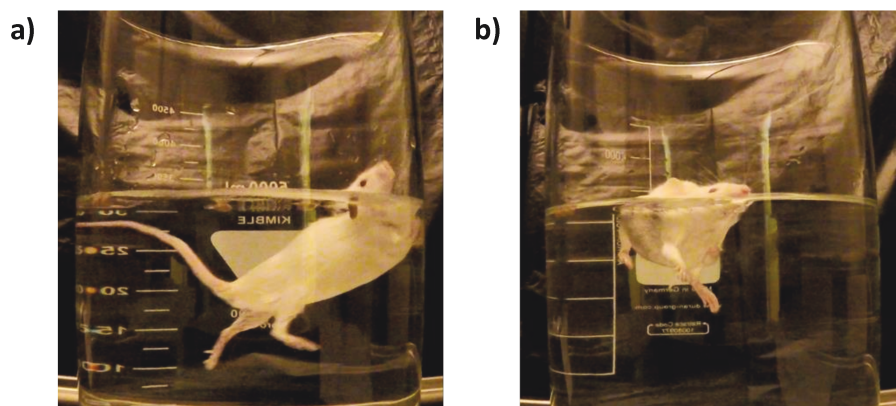


Figure 18 : Le test de la nage forcée permet d'observer différents comportements de la souris face à un stress inéluctable; soit la souris nage (a), soit elle est immobile (b).

- Comportement d'anhédonie : test de préférence au sucre

Le test de préférence au sucre permet d'évaluer l'anhédonie chez les rongeurs, l'un des principaux symptômes de la dépression chez l'homme (Willner et al., 1987). Ce test est une procédure de libre choix lors duquel les souris peuvent consommer soit de l'eau sucrée soit de l'eau non sucrée. Généralement, les rongeurs préfèrent la solution sucrée. Une diminution de la consommation d'eau sucrée au profit de la consommation d'eau normale est considérée comme une diminution de la préférence de l'eau sucrée et donc le témoin de comportements de type anhédonique. Le test de

préférence au sucrose est fréquemment utilisé pour évaluer l'efficacité d'un traitement antidépresseur sur l'anhédonie induite par différents modèles de dépression chez les rongeurs.

Afin d'éviter le comportement de néophobie, les souris sont habituées à une solution de sucrose à 2% (présence continue d'un biberon de sucrose en remplacement du biberon d'eau) pendant 3 heures au cours de la phase nocturne la nuit précédant le test. Le jour du test, la souris a le choix entre 2 biberons, un contenant une solution de sucrose (2%) et un rempli d'eau pendant 16 heures (de 17h00 à 09h00 le lendemain) (Figure 19). La position de la solution de sucrose ou d'eau est choisie de façon aléatoire (entre gauche ou droite) pour éviter le biais de latéralité. Chaque biberon est pesé au début et à la fin du test. La consommation de chaque boisson est mesurée ainsi :

$$\text{Poids fin de test} - \text{Poids début de test}$$

La préférence au sucrose est exprimée en pourcentage de sucrose consommé par rapport au volume total de liquide consommé et calculée selon la formule suivante :

% de préférence au sucrose = (volume de sucrose consommé x100) / (volume de sucrose consommé + volume d'eau consommé)

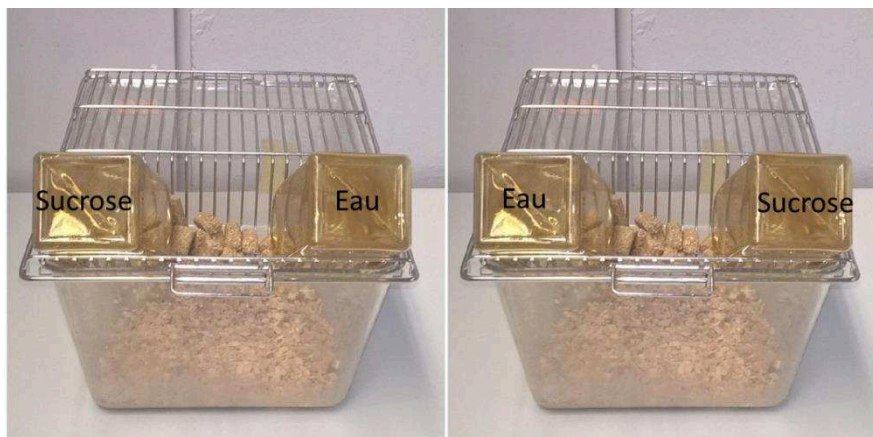


Figure 19 : Test de préférence au sucrose. La souris a accès à deux biberons (un d'eau et un de solution de sucrose à 2%) pendant 16 heures.

4.3 Score d'émotivité

A plusieurs reprises dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le score d'émotivité pour caractériser la présence ou non d'un phénotype anxio-dépressif chez les animaux. La méthode utilisée pour calculer ce score se base sur le calcul du « z score » (Guilloux et al. 2011; Mekiri et al. 2017). Ce dernier est une dimension mathématique qui permet de normaliser les résultats obtenus lors des tests comportementaux, réduisant la variabilité intrinsèque de chaque test, et ainsi de comparer les données à différents temps, entre différentes cohortes ou entre diverses études. Le z

score est donc un score standardisé (par la moyenne et la déviation standard du groupe de référence) qui indique de combien de déviation standard (σ) une observation (x) est au-dessus ou en-dessous de la moyenne du groupe contrôle (μ), x représentant une donnée individuelle pour un paramètre observé (Guilloux et al. 2011).

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

Dans les deux expérimentations pour lesquelles nous avons utilisé ce score, il a été obtenu en combinant les données obtenues à 3 tests comportementaux : (1) Splash test, NSF et FST et (2) test de préférence au sucrose, NSF et FST. L'augmentation du score émotionnel reflète un état émotionnel qu'on peut considérer comme de type dépressif puisqu'elle correspond à une diminution du temps de toilettage dans le Splash test, une diminution de la préférence au sucrose, une augmentation du temps d'immobilité dans le FST et une augmentation du temps de latence dans le NSF. Ce score d'émotivité n'est donc pas basé sur une seule donnée comportementale mais plutôt sur une convergence d'observations comportementales qui définissent ensemble le phénotype anxieux et dépressif.

5 IMMUNOHISTOCHEMIE

L'immunohistochimie a été utilisée afin d'évaluer les effets d'une ou dix sessions de tDCS sur l'activité neuronale et d'identifier les régions cérébrales qui pourraient être impliquées dans l'effet antidépresseur de la tDCS. c-fos est un proto-oncogène qui est exprimé suite à la dépolarisation de la cellule (Bullitt 1990), donc immédiatement après l'activation d'une cellule. L'expression de ce gène permet la production de la protéine c-fos qui est donc considérée comme un marqueur de l'activation neuronale.

5.1 Perfusion intra-cardiaque et prélèvement

La perfusion est réalisée 1 heure après la fin de la stimulation car le pic d'expression de c-fos apparaît 1-2 heures après l'activation neuronale (Islam et al. 1995). La souris est anesthésiée par injection i.p. de pentobarbital (100 mg/kg). Lorsque la souris ne répond plus aux stimuli, elle est placée sur la planche de perfusion. Après avoir dégagé le cœur, l'oreillette droite est sectionnée et la pointe du ventricule gauche est entaillée. Une canule est ensuite insérée dans l'entaille du ventricule gauche afin de faire passer du NaCl 0.9% (rinçage) puis du paraformaldéhyde 4% dans le système veineux et artérielle de l'animal afin de fixer les tissus.

Après la perfusion, le cerveau est prélevé et mis dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures à 4°C. Le cerveau est ensuite plongé dans une solution de sucrose à 15% dilué dans du tampon phosphate 0,1 M pendant une nuit. Le cerveau est congelé par immersion dans de l'isopentane dans le SnapFrost (-80°C) pendant environ 10 seconds et conservés à -20°C. Des coupes coronales de 30 µm sont réalisées au microtome (Microm HM400), et réparties dans 4 boîtes 24 puits contenant du cryoprotecteur (25ml de glycérol + 25ml d'éthylène glycol dans 50ml de PBS) et conservées à -20 °C.

5.2 Marquage de la protéine c-fos

1. Trois rinçages de 10 minutes dans le PBS-triton¹ sous agitation
2. Incubation des coupes dans une solution contenant 30% d'H₂O₂ dans du PBS triton pendant 15 minutes sous agitation à température ambiante afin d'inactiver les peroxydases endogènes.
3. Trois rinçages de 10 minutes dans le PSB-triton sous agitation à température ambiante
4. Incubation dans l'anticorps primaire de lapin anti-cfos (Calbiochem) dilué au 1 / 10 000 dans du diluant lait (5g de lait écrème en poudre, 0.5g de BSA et 5 mg d'Azide de sodium NaN₃ dans 50mL de PBS-triton) pendant 72h sous agitation à 4°C.
5. Trois rinçages de 10 minutes dans une solution de PBS-triton
6. Incubation dans l'anticorps secondaire de cheval biotinylés anti-IgG de lapin couplé à l'enzyme peroxydase (Vector), ratio 1/10 000 pendant 24 heures sous agitation à 4°C.
7. Trois rinçages de 10 minutes dans le PBS
8. Incubation dans le kit ABC (Avidin-Biotin Complex ; avidin horseradish peroxydase complex, Vector laboratory - 3 gouttes de réactif A + 3 gouttes du réactif B dans 20 ml de PBS) 1 heure sous agitation à température ambiante afin d'amplifier le signal permettant la détection de c-fos.
9. Trois rinçages de 10 minutes dans le PBS sous agitation à température ambiante
10. Incubation des coupes dans une solution de DAB (Diamino Benzidine 50 mg dans 100ml de PBS+ 20µl de H₂O₂) pendant 5-10 min sous agitation à température ambiante afin de provoquer l'apparition de précipités bruns.
11. Trois rinçages de 10 minutes dans le PBS sous agitation à température ambiante

¹ PBS+triton est une solution composée de 0,3% de triton dans du tampon de phosphate (PBS)

5.3 Préparation des lames

Les coupes sont montées sur des lames pré-gélatinées. Elles sont ensuite laissées à température ambiante pendant une nuit puis déposées dans une étuve (37°C) pendant plusieurs jours. Après séchage complet, les coupes sont déshydratées et délipidées dans des bains successifs d'éthanol [3 min dans éthanol 70%, 2 fois 3 min dans éthanol 95%, 2 bains de 3 min dans éthanol 100%, puis 3 bains de Xylène (3min à chaque bain)]

Après le dernier bain de xylène, les lames sont immédiatement recouvertes par quelques gouttes de Baume du Canada puis par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Les lames montées sont remises à 37°C pendant 3 jours.

5.4 Comptage des cellules marquées

Les différentes structures sont observées au microscope optique (Olympus DP50 camera) grossissement 100x ou 200x. Les structures cérébrales ciblées sont: les cortex moteurs (M1 et M2), le cortex préfrontal (infralimbique, prélimbique et cingulaire), l'hippocampe dorsal (CA1, CA3 et gyrus denté), le noyau accumbens (Shell et core), les noyaux paraventriculaires du thalamus et de l'hypothalamus et l'aire tegmentale ventrale (identifiées selon « The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates» (Franklin and Paxinos, 2008)). Les cellules marquées, et donc exprimant le facteur de transcription c-fos, sont comptabilisées sur 1, 2 ou 3 sections du cerveau à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, W.S., U.S. National Intitue of Health). Les zones correspondantes aux différentes aires de comptages sont détaillées sur les figures Figure 20, Figure 21, Figure 22Figure 23Figure 24Figure 25Figure 26.

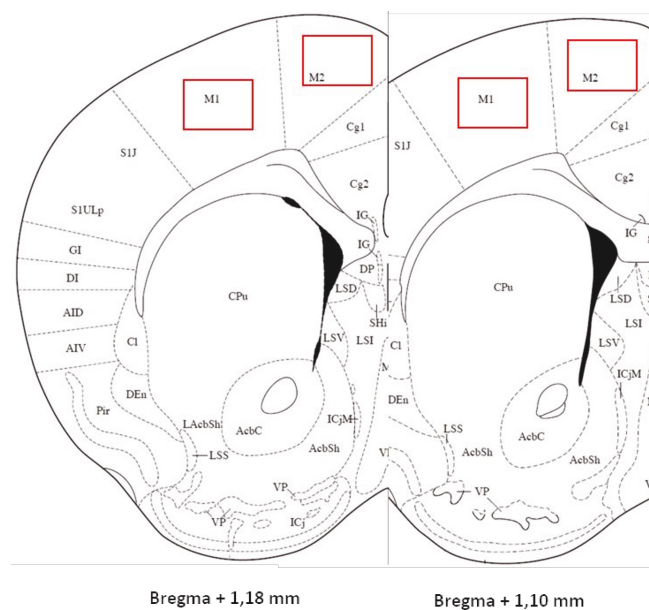


Figure 20 : zones de comptage (carrés rouges) des cellules exprimant c-fos dans les cortex moteurs M1 et M2.

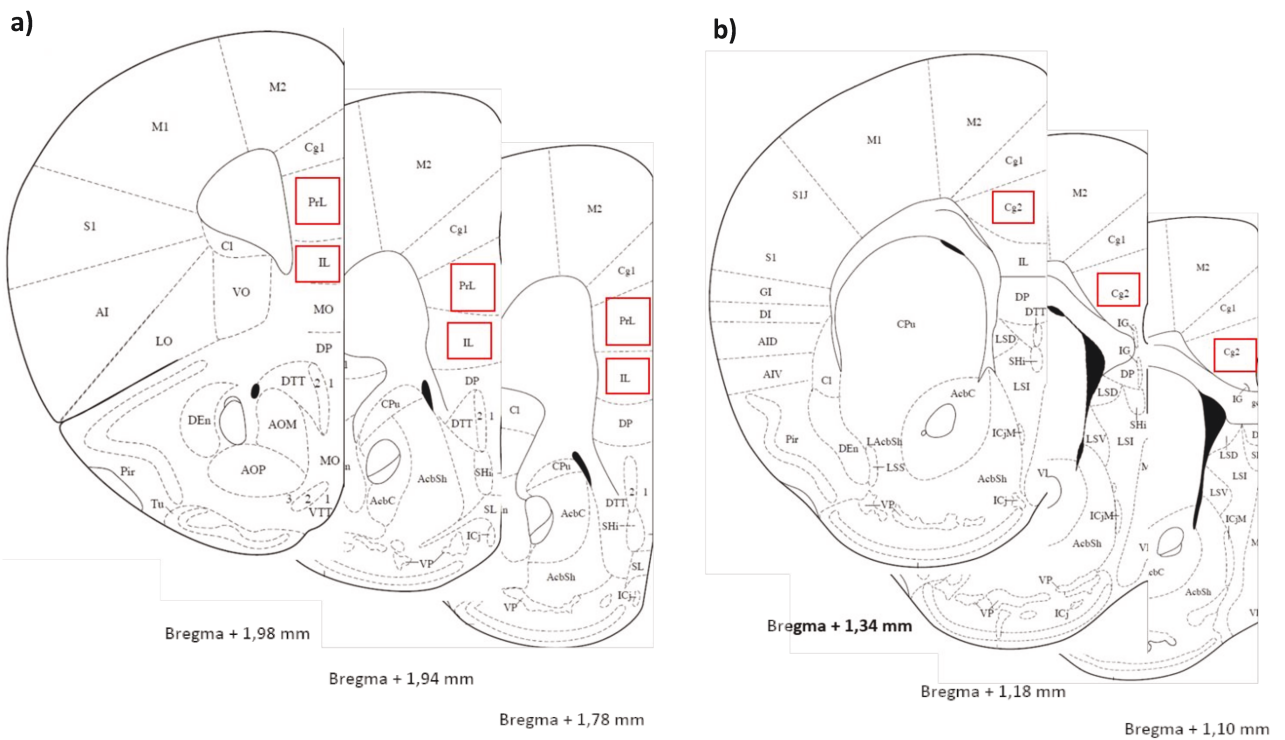


Figure 21 : zones de comptage des cellules exprimant c-fos dans le cortex préfrontal prélimbique, infralimbique (a) et cingulaire (b).

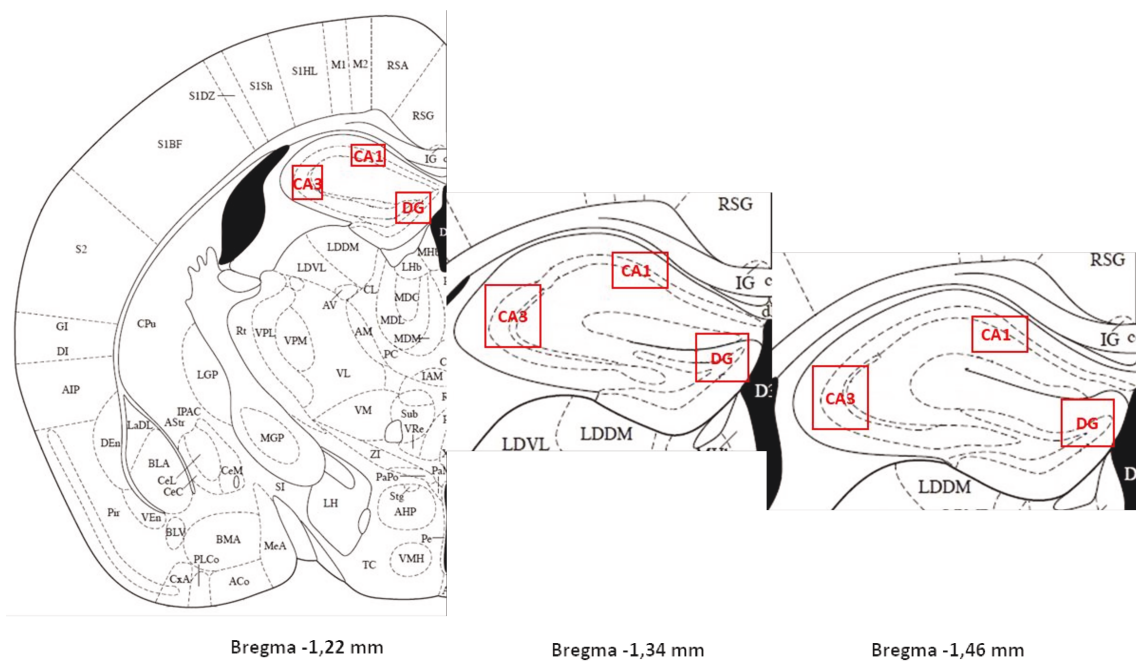


Figure 22 : zones de comptage des cellules exprimant c-fos dans l'hippocampe dorsal [CA1, CA3 et gyrus denté (DG)]

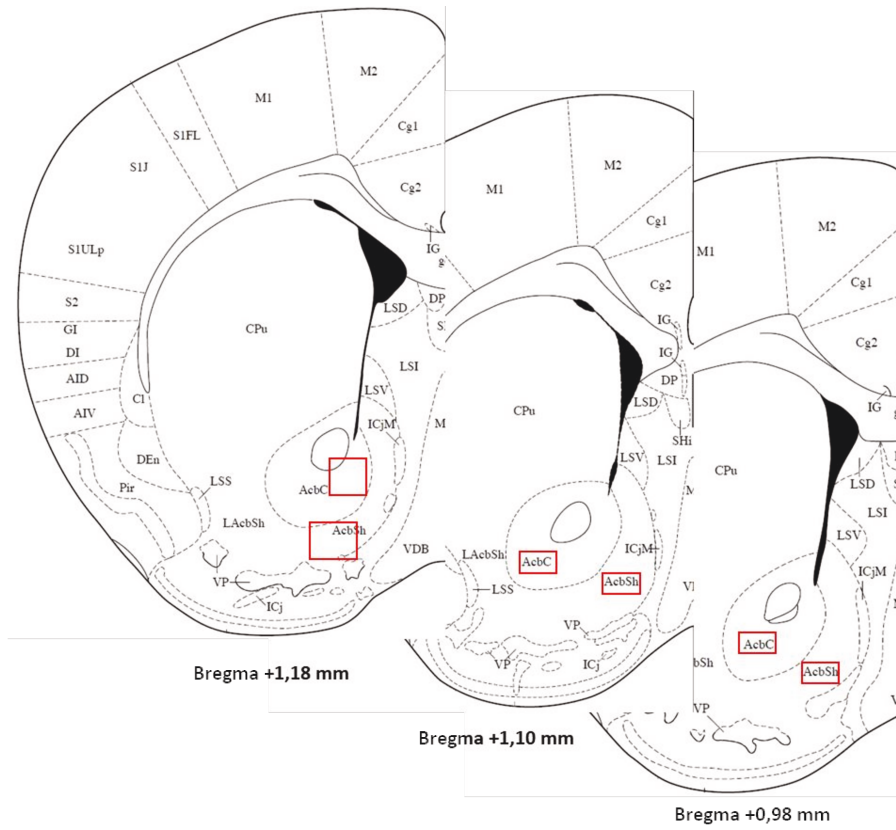


Figure 23 : zones du comptage des cellules exprimant c-fos dans noyaux accumbens (core et shell)

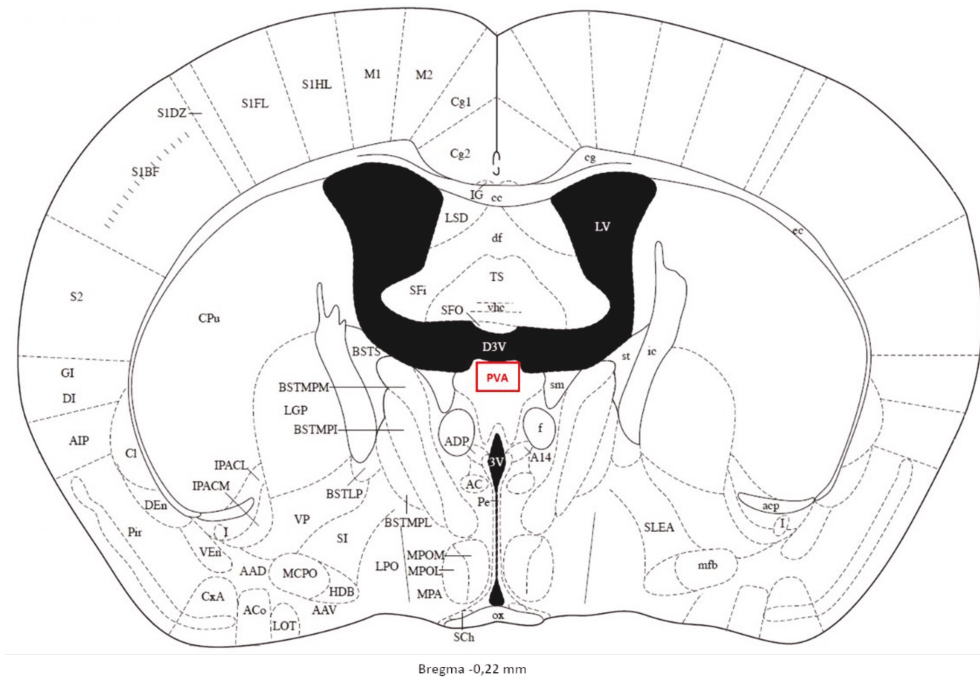


Figure 24 : Zone de comptage des cellules exprimant c-fos dans le noyau paraventriculaire du thalamus

6 ANALYSE DES MARQUEURS INFLAMMATOIRES

Ces expérimentations ont été réalisées en collaboration avec l'équipe "relation hôte-greffon" (UMR1098) de Besançon, plus particulièrement avec l'aide de Francis Bonnefoy et Sylvain Perruche.

6.1 Prélèvement de la rate et préparation des échantillons.

Au terme de la procédure de stress chronique, la rate de chaque souris est prélevée afin de quantifier le nombre total de cellule et le taux de marqueurs de l'inflammation. En effet, la rate est un organe lymphoïde secondaire chez la souris et est donc impliquée dans la réponse immunitaire spécifique. Les souris sont sacrifiées par anesthésie à l'isoflurane puis inhalation de CO₂ et placées en décubitus latéral droit. La peau et le péritoine sont incisés, la rate est dégagée de ses adhérences et placée dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture RPMI.

1. La rate est broyée dans du milieu de culture pour récupérer les splénocytes.
2. Homogénéisation de la suspension cellulaire par passages répétés à travers l'aiguille de 25G d'une seringue de 5 ml
3. Recueil de la suspension dans un tube Falcon.
4. Centrifugation de la suspension cellulaire pendant 5 minutes à 1400 RPM à température ambiante.
5. Elimination des globules rouges par choc osmotique à l'aide d'une solution de lyse. La solution mère de lyse [82,9 g NH₄Cl (Merck, Darmstadt, Allemagne), 370 mg EDTA Na₂ (Sigma), 10 g KHCO₃ (Merck), q.s.p. 1 litre d'eau ppi, à pH = 7,3] est conservée à +4 °C et diluée 10 fois pour l'utilisation.
6. Incubation du culot cellulaire dans une solution de lyse 1X pendant 5 minutes à température ambiante afin de l'homogénéiser.
7. Après lyse, les cellules sont lavées deux fois par PBS (BioWhittaker).
8. Comptabilisation des cellules viables à la cellule de Malassez (Marienfeld, Allemagne) après coloration au Bleu de Trypan (Sigma Aldrich).

Après comptage, les suspensions cellulaires sont conservées à +4 °C jusqu'à leur mise en culture et leur analyse par cytométrie de flux.

6.2 Mise en culture et analyse des populations

1. Les cellules sont reprises dans un milieu de culture en "Dulbecco Modified Eagle Medium" supplémenté avec 10% de sérum foetal de veau (Life Technologies), 1% de

penicilline/streptomycine, 10 mM HEPES (Sigma Aldrich), 10 mM d'acides aminés non essentiels (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), et 0.05 mM de 2-mercaptoethanol (Sigma Aldrich) à 10.106 cellules/ml.

2. Mise en culture des cellules dans des plaques 96 puits à fond rond en présence de 50 ng/mL de phorbol myristate acetate (PMA), de 1 µg/mL de ionomycine (iono) et de brefeldin A (1 µL/mL of cells; BD Pharmingen) pendant 4 heures pour ensuite effectuer le marquage afin d'évaluer la polarisation des populations de lymphocytes T.
3. Après stimulation PMA + iono, marquage des cellules avec des anticorps membranaires CD4 (clone RM4-5, BD Biosciences)/CD25 (clone PC-61, BD Biosciences).
4. Perméabilisation des cellules avec un tampon de perméabilisation nucléaire (eBioscience) afin de rendre accessibles les compartiments intra cytoplasmiques et intra nucléaires.
5. Marquages de Foxp3 (clone FJK-16s, eBioscience), IL-17 (clone TC11-18H10.1, Biolegend) et IFNγ (clone RMMA-1, Biolegend).
6. Re stimulation des cellules spléniques avec du LPS (1 µg/ml) ou CpG 12 (ng/ml) durant 24h pour permettre l'étude des cellules présentatrices d'antigène.
7. Marquage des cellules avec des anticorps spécifiques des PDC (mPDCA (clone 927, Biolegend)), des CDC (CD11c (clone N418, Biolegend)) et des macrophages (F4/80) et des anticorps spécifiques des marqueurs de maturation : CD40 (clone 3/23; Biolegend), CD80 (clone 16-10A1; BD Biosciences), CD86 (clone GL-1; Biolegend), IA/IE (clone M5/114.15.2; Biolegend).
8. Après marquage, les cellules sont analysées sur un cytomètre de flux BD Canto II ou BD Fortessa X20 avec le logiciel Diva (BD Biosciences).

7 TRAITEMENT DES RESULTATS

7.1 Présentation des données

Les résultats de chaque étude sont représentés sous forme d'histogrammes (paramètre comportemental testé) ou de courbes (décours temporel, ...) par la moyenne et l'erreur type (standard error of the mean, SEM). L'effectif des groupes (la plupart du temps, au minimum de 8 animaux par groupe) sera précisé pour chaque étude dans le chapitre « Résultats ».

7.2 Statistiques

Plusieurs types de tests statistiques ont été réalisés au moyen du logiciel STATISTICA version 7.1 en fonction du nombre de données à analyser (précisés ultérieurement pour chaque étude). Nous avons

réalisé des tests paramétriques puisqu'il est considéré que la majorité des variables biologiques quantitatives continues (telles que les nôtres) possèdent une distribution normale (Preux et al. 2003). Un test de Shapiro-Wilk réalisé sur nos premières données nous a par ailleurs permis de le vérifier pour nos variables comportementales.

7.2.1 t test

Lorsque nous avons comparé les moyennes de deux groupes expérimentaux (un seul facteur, tel que, le test de la nage forcée dans l'étude d'effets de la tDCS Sham vs stimulation cathodique et le test de la nage forcée dans étude de la tDCS chez modèle de CORT), nous avons utilisé un test de Student. Le seuil de significativité est fixé pour $p < 0.05$.

7.2.2 ANOVAs

Des ANOVAs à plusieurs facteurs ont été réalisées quand les souris étaient réparties dans des groupes basés sur au moins deux facteurs différents (par exemple : exposition ou non aux stress et exposition ou non à la tDCS).

Dans le cas spécifique des tests répétés plusieurs fois sur un même groupe de souris ou des tests avec décours temporel, des ANOVAs à mesure répétées ont été calculées avec comme facteur intra-spécifique le groupe (sham ou stimulé), et comme facteur inter-spécifique un décours temporel (ex : mesure de l'état du pelage au fil des semaines).

Lorsque les ANOVAs présentaient un facteur ou une interaction statistiquement significative ($*p < 0.05$), un post-hoc de Fisher était exécuté.

Des ANOVA deux voies sont réalisées dans **1.)** l'étude des effet comportementaux de la tDCS dans le test de la nage forcée (un facteur de stimulation ; Sham vs tDCS et un facteur de délai du temps (3,21 et 60 jours). **2.)** l'étude des effets neurobiologique de la tDCS chez la souris avec un facteur de stimulation (Sham vs tDCS) et un facteur de nombre de stimulation (1 vs 10 stimulations). **3.)** l'étude des effets comportementaux de la tDCS chez modèle murin de la dépression (modèle de CORT, UCMS et LPS) avec un facteur de stimulation (Sham vs tDCS) et facteur de traitement (Véhicule vs CORT, Témoin vs UCMS et Véhicule vs LPS).

RESULTATS

1 PUBLICATION 1: THE ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF TDCS IN MICE: A BEHAVIORAL AND NEUROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION

But de l'étude :

Malgré des résultats cliniques prometteurs et un enthousiasme grandissant en faveur de l'utilisation de la tDCS dans le traitement de la dépression, beaucoup de questions restent en suspens concernant ses mécanismes d'actions et les paramètres de stimulation optimaux. Ces interrogations nécessitent d'être résolues afin d'améliorer les bénéfices thérapeutiques de la tDCS.

Le premier objectif de cette étude est de déterminer les paramètres de stimulation (nombre de stimulation, intensité du courant, durée et polarité de la stimulation, état de vigilance) permettant d'obtenir l'effet de type antidépresseur le plus robuste chez la souris saine dans le test de nage forcée. Le second objectif est de tester si la tDCS est capable d'améliorer les comportements de type dépressifs observés chez un modèle murin de la dépression, à savoir l'exposition chronique à la corticostérone (modèle CORT), hormone de stress qui induit l'hyperactivation de l'axe HPA. Enfin, cette étude vise à déterminer si les modifications comportementales induites par la tDCS sont associés à des changements d'activité neuronale, mesurée par la quantification de l'expression de c-fos, au sein de différentes structures cérébrales.

Méthodologie :

Expérimentation 1 : recherche des paramètres optimaux de stimulation chez la souris saine

- Etude de l'effet du nombre de stimulations :

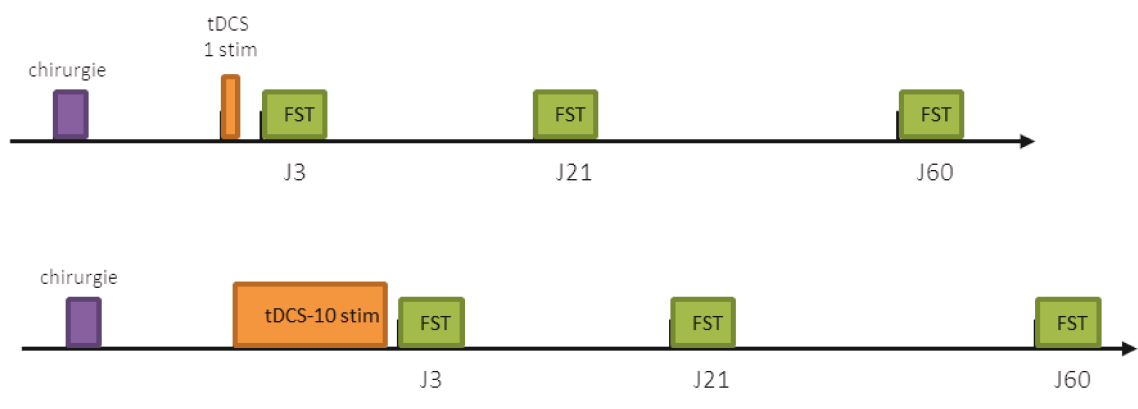


Figure 27 : protocole d'étude des effets d'une ou 10 stimulations par tDCS sur le temps d'immobilité dans le test de la nage forcée, chez la souris saine. Une chirurgie est réalisée 1 semaine avant la (les) stimulation(s) par tDCS. Un test de nage forcée (FST) est réalisé 3, 21 et 60 jours après la fin des stimulations.

- Etude de l'effet de l'intensité/durée/polarité de la stimulation ou effet de la vigilance :

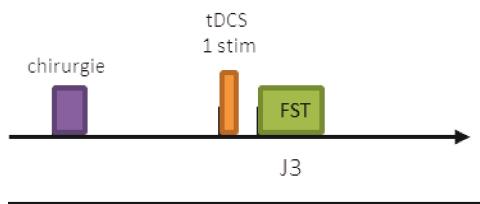


Figure 28 : protocole d'étude des effets de l'intensité (25 μ A, 100 μ A, 200 μ A), de la durée (5 min, 10 min, 20 min) ou de la polarité (cathodale, anodale) de la stimulation par tDCS et de l'état de vigilance (anesthésie ou vigile sous contention) de l'animal sur le temps d'immobilité dans le test de la nage forcée chez la souris saine. Une chirurgie est réalisée 1 semaine avant la stimulation par tDCS. Un test de nage forcée (FST) est réalisé 3 jours après la stimulation

Expérimentation 2 : étude de l'effet comportemental de la tDCS chez la souris CORT

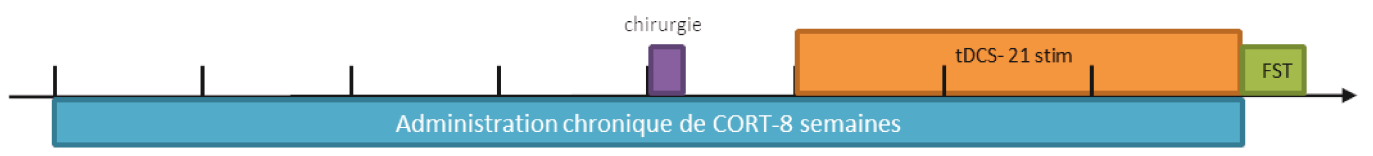


Figure 29 : protocole d'étude des effets de la tDCS sur le temps d'immobilité au test de nage forcée chez des souris CORT. Les souris reçoivent une administration chronique de corticostérone pendant 8 semaines. Après 4 semaines de CORT (phase d'induction), une chirurgie est réalisée afin de placer l'embase sur le crâne de l'animal. Après une semaine de repos, les animaux sont stimulés par tDCS, à raison de 21 stimulations de 20 min à 200 μ A. un FST est réalisé trois jours après la fin des stimulations.

Expérimentation 3 : étude de l'effet de la tDCS sur l'expression de c-fos.

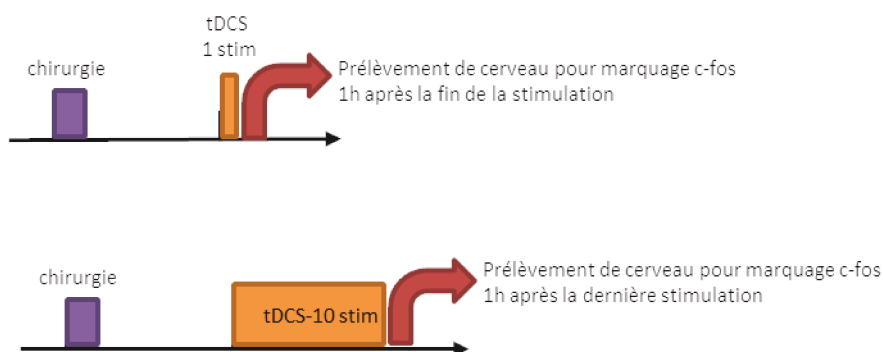


Figure 30 : protocole d'étude des effets de 1 ou 10 stimulations par tDCS sur l'expression de c-fos dans le cerveau de souris saine. L'embase est positionnée par chirurgie 1 semaine avant la tDCS. Les souris reçoivent une (20 min, 200 μ A) ou 10 stimulations par tDCS (2 par jour pendant 5 jours, 20 min, 200 μ A). Une heure après la fin de la dernière stimulation, les cerveaux des souris sont prélevés en vue d'un marquage immunohistochimique de la protéine c-fos.

Résultats :

L'évaluation comportementale dans le test de nage forcée révèle que la tDCS au niveau du cortex frontal gauche induit une diminution de la durée d'immobilité, témoignant de l'effet antidépresseur de la stimulation corticale chez la souris saine et pseudo-dépressive dans nos conditions expérimentales.

- *Expérimentation 1 : recherche des paramètres optimaux de stimulation chez la souris saine*

Nos résultats montrent que le nombre de stimulation, l'intensité et la polarité du courant, la durée de la stimulation ainsi que l'état de vigilance de l'animal pendant la stimulation influencent l'effet comportemental de la tDCS dans le test de nage forcée :

- **Nombre de séances** : Nos résultats démontrent que la répétition des stimulations a un rôle crucial sur la durée des effets comportementaux observés. En effet, 1 seule séance de tDCS est suffisante pour induire une diminution significative du temps d'immobilité 3 jours après la stimulation comparé au groupe sham, et cet effet antidépresseur est toujours visible 21 jours après la stimulation. Dix sessions de stimulation induisent des effets similaires à 9 et 21 jours. Cependant, ces stimulations induisent également une diminution du temps d'immobilité jusqu'à 60 jours après la stimulation, qui n'est pas observée chez les animaux ayant reçus une seule stimulation.

- **Intensité de stimulation** : Nos résultats révèlent qu'une stimulation par tDCS à 25 ou 100 μA n'a pas d'effet comportemental alors qu'elle a un effet antidépresseur à 200 μA , à 3 jours.

- **Durée de stimulation** : les résultats obtenus sont moins clairs. Une stimulation de 3 ou 20 min provoque une diminution significative du temps d'immobilité, donc un effet de type antidépresseur alors qu'une session de 10 min n'a pas d'effet.

- **Polarité** : Une stimulation cathodique du cortex frontal gauche n'induit pas d'effet antidépresseur dans le FST.

- **Etat de vigilance** : Nous avons démontré qu'une seule session de stimulation n'induit pas de changement comportemental dans le FST lorsque la stimulation est administrée chez la souris vigile en contention. Ce résultat suggère que le stress induit par la contention peut moduler la réponse comportementale induite par la tDCS.

- *Expérimentation 2 : étude de l'effet comportemental de la tDCS chez la souris CORT*

Nos données indiquent que la tDCS améliore les comportements de type dépressifs observés chez des souris exposées de façon chronique à de la corticostérone lorsqu'elle est administrée de façon répétée (21 sessions de stimulation, 200 μA , 20 min). En effet, la CORT augmente le temps d'immobilité dans le FST, un effet qui est normalisé par la tDCS.

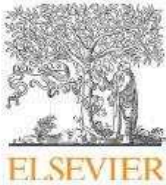
- *Expérimentation 3 : étude de l'effet de la tDCS sur l'expression de c-fos.*

Pour terminer, l'immunohistochimie de la protéine c-fos a été utilisée dans le but d'identifier les régions cérébrales associées à l'effet comportemental de la tDCS. Nos résultats montrent qu'une stimulation par tDCS du cortex frontal induit une augmentation du nombre de cellule exprimant c-fos, donc une activation neuronale, dans différentes aires cérébrales des souris saines anesthésiées. Ces régions sont le cortex préfrontal infra- et prélimbique et cingulaire, l'hippocampe dorsal (CA1, CA3 et gyrus denté), le noyau accumbens (Nacc shell), les noyaux paraventriculaires du thalamus et de l'hypothalamus et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Aucune modification de l'expression de c-fos n'a été quantifiée dans l'hippocampe ventral (CA1, CA3 et gyrus denté), le Nacc core ou les cortex moteurs M1 et M2. Etonnamment, 10 sessions de tDCS ne modifient pas l'expression de c-fos dans les différentes structures cérébrales précédemment citées.

Conclusions et hypothèses :

Nos résultats démontrent que la répétition des stimulations n'est pas nécessaire pour obtenir un effet antidépresseur aigu mais est essentiel pour que cet effet se maintienne à long-terme. Nous avons également démontré que l'utilisation de différents paramètres de stimulation était associée à différents effets comportementaux dans le FST. Il semble que le protocole de stimulation qui produise l'effet comportemental le plus robuste chez la souris saine soit composé d'une ou plusieurs stimulations anodiques de 20 min à 200 μ A. Cet effet est confirmé dans le modèle de dépression induite par l'administration chronique de corticostérone.

Nos données indiquent qu'une session unique de tDCS augmente l'expression du facteur de transcription précoce *cfos* au sein du cortex préfrontal ventromédian, des circuits subcorticaux- limbiques associés et du circuit de la récompense. Étonnamment, la répétition des stimulations de tDCS n'induit pas de changement d'expression de *c-fos* dans les régions analysées. Compte tenu de l'effet comportemental induit par 10 stimulations de tDCS, nous supposons que les neurones répondent différemment au stimulus lorsqu'il est présenté une ou plusieurs fois. Ce résultat peut être dû à un émoussement de la réponse (effet "blunting") : après une exposition répétée au même stimulus, des gènes précoces sont induits immédiatement mais de façon atténuée par rapport à l'induction provoquée par la première exposition. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que des processus de plasticité synaptique aient pu se mettre en place. Ceux-ci pourraient être impliqués dans la maintenance de l'effet comportemental de la tDCS jusqu'à 60 jours.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Stimulation

journal homepage: <http://www.journals.elsevier.com/brain-stimulation>

The antidepressant-like effect of tDCS in mice: A behavioral and neurobiological characterization



Tanat Peanlikhit^a, Vincent Van Waes^a, Solène Pedron^a, Pierre-Yves Risold^a,
Emmanuel Haffen^{a, b, c}, Adeline Etiévant^{a, b, 1}, Julie Monnin^{a, b, c, *, 1}

^a Laboratoire de Neurosciences intégratives et cliniques, EA 481, Université Bourgogne Franche-Comté, 25000 Besançon, France

^b Service de Psychiatrie, CHRU Besançon, 25000 Besançon, France

^c Centre d'Investigation Clinique CIC1431, Inserm, CHRU Besançon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2016

Received in revised form

9 February 2017

Accepted 25 March 2017

Available online 29 March 2017

Keywords:

Transcranial direct current stimulation

Antidepressant

Stimulation parameters

Mouse model of depression

Long-lasting effects

Forced-swim test

c-fos

ABSTRACT

Background: Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method increasingly popular for the treatment of several brain disorders, such as major depression. Despite great enthusiasm and promising results, some studies report discrepant findings and no consensus exists for the clinical use of tDCS.

Objective: The present study aims to (i) determine the most effective stimulation parameters to optimize antidepressant-like effect of tDCS in the forced-swim test in mice and (ii) identify brain regions recruited by tDCS and possibly involved in its behavioral effect using Fos immunohistochemistry.

Results: We reported that tDCS induced long-lasting antidepressant-like effect, which varied as a function of stimulation settings including number, duration, intensity and polarity of stimulation. Interestingly, the present study also demonstrated that tDCS reduced depressive-like behaviors induced by chronic corticosterone exposure. Furthermore, behavioral outcomes induced by a single stimulation were associated with neuronal activation in the prefrontal cortex, dorsal hippocampus, ventral tegmental area and nucleus accumbens, whereas no overexpression of c-fos was associated with 10 stimulations.

Conclusion: The strongest behavioral response was observed with an anodal stimulation of 200 μ A during 20min. The repetition of this stimulation was necessary to induce long-lasting behavioral effects that are probably associated with plastic changes in the neuronal response.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive brain stimulation modality that is currently investigated as an alternative therapy to pharmacological treatments for several neuropsychiatric and neurological disorders including major depression [1,2]. Indeed, tDCS seems to alleviate symptoms in depressed patients through anodal stimulation over the left dorsolateral prefrontal cortex [3–7]. Despite encouraging results

and growing popularity, there is no consensus for the use of tDCS in depressed patient and several questions remain unanswered, including the most effective stimulation parameters (*i.e.* the number of stimulation, current intensity, and duration of the stimulation session). If patients usually received a weak (1–2 mA) direct current during 20–30 min and for 5 to 15 sessions, preclinical researches are needed to determine the effects of different stimulation settings on depressive-like behaviors.

A recent study in our laboratory has characterized some behavioral effects of tDCS in naïve mice: ten tDCS sessions over the frontal cortex of awaken mice had antidepressant-like properties and reduced abnormal behaviors associated with chronic nicotine exposure [8]. More precisely, anodal repeated-tDCS (2 × 20 min/day for five consecutive days, 0.2 mA) significantly decreased the immobility time in the forced-swim test 3 weeks after the last stimulation and improved working memory without affecting weight, locomotor activity and anxiety. The first objective of the

* Corresponding author. Service de psychiatrie - consultations, CHRU Besançon, MEMCP+1, 25030 Besançon cedex, France.

E-mail addresses: rt_prom_98@hotmail.com (T. Peanlikhit), vincent.van_waes@univ-fcomte.fr (V. Van Waes), solene.pedron@univ-fcomte.fr (S. Pedron), pierre-yves.risold@univ-fcomte.fr (P.-Y. Risold), emmanuel.haffen@univ-fcomte.fr (E. Haffen), adeline.etievant@gmail.com (A. Etiévant), jmonnin@chu-besancon.fr (J. Monnin).

¹ These authors contributed equally to this work.

present study was to determine the most effective stimulation parameters to induce optimized antidepressant-like effect in the forced-swim test in healthy mice. More precisely, various stimulation paradigms were used by modulating: the number of stimulation (one versus ten), the current intensity, duration and polarity, and the vigilance state of mice (anaesthesia versus contention). Secondly, in order to further characterized behavioral outcomes of tDCS and given that depression is one of the main indication for tDCS, we tested the ability of tDCS to alleviate depressive-like behaviors in a mouse model of depression induced by chronic corticosterone administration [9]. Long-term exposure to hexogenous corticosterone in rodents had been used to induce behavioral abnormalities reflecting anxiety and depressive-like states [9–12].

Additionally, further information on the neurobiological effects of tDCS is necessary to improve its efficiency and security since the current knowledge on this topic is not sufficient. In contrast to other neurostimulation modalities, tDCS does not directly trigger action potential in neuronal cells but induces changes in cortical tissue excitability through a mild shift of the membrane potentials toward hyperpolarization or depolarization (respectively for cathodal and anodal stimulations) [13–15]. Several preclinical and clinical studies reported that non-synaptic mechanisms involved in the immediate effects of tDCS are completed by synaptic ones, mostly involved in its long-term effects and that could be associated with neuronal plasticity (such as LTP phenomenon) [16–18]. That being said, the cellular mechanisms and cerebral structures underlying the antidepressant effect of tDCS remain, for the most part, unknown. The second objective of the present study was to map neural activation patterns underlying the antidepressant-like response to tDCS using *c-fos* immunohistochemistry. *c-fos* is an immediate early gene from the Fos family which expression is the first step of neuron's response to stimulation. The product of its

transcription is able to activate late-response genes, resulting in a delayed secondary wave of gene-response [19–21].

Materials and methods

Animals

Adult female Swiss mice (for experiments in naive mice) and adult male C57Bl/6 mice (for the experiment on a mouse model of depression) were purchased from Janvier lab (Laval, France). The number of animals used is detailed in Table 1. All mice were 6–7 weeks old and weighed 22–30 g at the beginning of the experiments. Mice were housed 5–6 per cage (excepted during repeated stimulations) under standard and controlled laboratory conditions (12:12 h light/dark cycle) with food and water available *ad libitum*. Before the surgery, mice were allowed 1 week of acclimation. Behavioral testing occurred during the light phase, in the morning. All procedures met the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the University of Franche-Comté Animal Care and Use Committee (CEBEA-58).

Surgery

A tubular plastic jack (internal diameter: 2.1 mm) was surgically fixed onto the skull using dental paste one week before the stimulation protocol. Animals were anaesthetized with ketamine hydrochloride/xylazine (80 mg/kg and 12 mg/kg respectively; i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. The center of the plastic jack was positioned over the left frontal cortex (+1 mm antero-posterior and 1 mm left to the bregma, according to Paxinos and Watson [22]) and fixed with glass ionomer cement (GC Corporation). After surgery, all animals were allowed to recover for one

Table 1

Stimulation protocols, number of animals (N) and time post tDCS for the Forced Swim test (FST) assessment performed in each experiment. Stim: stimulation, min.: minutes, D: days after the last stimulation.

Experiment	Stimulation protocol	N	FST	
long lasting effect and number of stimulation	experiment 1	1 anodal stim. 200 μ A, 20 min.	9	D3, D21
		1 sham, 20 min	10	
		10 anodal stim. 200 μ A, 20 min.	10	
		10 sham 200 μ A, 20 min.	10	
	experiment 2	1 anodal stim. 200 μ A, 20 min.	10	D3, D60
		1 sham, 20 min	9	
		10 anodal stim. 200 μ A, 20 min.	9	
		10 sham 200 μ A, 20 min.	9	
Intensity	1 anodal stim, 200 μ A, 20 min.	10	D3	
	1 anodal stim, 100 μ A, 20 min.	10		
	1 anodal stim, 25 μ A, 20 min.	10		
	1 sham, 20 min.	9		
Duration	1 anodal stim, 200 μ A, 20 min.	10	D3	
	1 anodal stim, 200 μ A, 10 min.	9		
	1 anodal stim, 200 μ A, 3 min.	10		
	1 sham, 20 min.	9		
Polarity	1 cathodal stim, 200 μ A, 20 min.	10	D3	
	1 sham, 20 min.	9		
Vigilance state (contention)	1 anodal stim under contention, 200 μ A, 20 min.	10	D3, D21	
	1 sham under contention, 20 min	9		
Corticosterone model of depression	corticosterone administration/15 anodal stim, 200 μ A, 20 min.	7	D3	
	water administration/15 anodal stim, 200 μ A, 20 min.	10		
	corticosterone administration/15 sham stim, 20 min.	10		
	water administration/15 sham stim, 20 min.	9		
<i>c-fos</i> expression	1 anodal stim. 200 μ A, 20 min.	5	D3, D21	
	1 sham, 20 min	5		
	10 anodal stim. 200 μ A, 20 min.	5		
	10 sham, 20 min.	5		

week before undergoing tDCS. During this period, as well as during the electrical stimulations, mice were placed in individual cages.

Stimulation protocol

The jack was filled with saline solution (NaCl 0.9%) before the stimulation to establish a contact area of 3.5 mm² toward the skull. The stimulation electrode (anode, DIXI Microtechniques, Besançon, France) was screwed into the tubular jack. A larger conventional rubberplate electrode (cathode, 4 cm²; NeuroConn, Ilmenau, Germany) served as the counter electrode and was placed onto the ventral thorax using a jacket. Animals were under light anaesthesia with isoflurane during the tDCS protocol. To determine neuronal activation pattern and long lasting effects of tDCS, mice received either 1 or 10 stimulations (2 stimulations per day for five consecutive days, interstimulation interval of minimum 3 h). An anodal 20 min constant current of 0.2 mA (current density of 57.1 A/m²) was applied transcranially over the frontal cortex (adapted from Ref. [8]) using a DC-stimulator Plus (NeuroConn, Ilmenau, Germany). Sham animals were subjected to the same procedures (surgery, anaesthesia and electrode montage), but current was not delivered. To identify the most effective settings of stimulation, different stimulation protocols were used as described in Table 1. To apply tDCS in awaken mice, animals were restrained in a box during the active or sham tDCS session as described in Ref. [8].

Chronic corticosterone exposure

Corticosterone (4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21-hemisuccinate from Sigma, St Louis, MO) was dissolved in vehicle (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin (β -CD), IMCD, France). Corticosterone (35 μ g/ml, equivalent to 5 mg/kg/day) was delivered in opaque bottles to protect them from light, available *ad libitum* in the drinking water during 8 weeks. Control mice received water. To evaluate the antidepressant-like effect of tDCS in this model of depression, mice received 15 stimulations (1 stimulation/day for 15 days) 5 weeks after the beginning of CORT exposure. Forced-swim test was performed 3 days after the last stimulation.

Forced-swim test

Each mouse was placed into a glass cylinder (height 26 cm, diameter 18 cm) containing water at a temperature of 32 \pm 2 °C and a depth of 15 cm. Each test lasted 6 min and was video recorded for subsequent scoring of the total time spent immobile by a blind observer. Mice were considered immobile when they ceased struggling and remained floating motionless in the water. To determine the long-term behavioral effect of tDCS, 2 experiments were performed. In the first experiment, forced-swim test was performed 3 days and 21 days after the last stimulation. In the second experiment, FST was performed 3 days and 60 days after the last stimulation. To study the effect of intensity, duration and polarity, FST was performed 3 days after the stimulation. To study the effect of the vigilance state, FST was performed 3 days and 21 days after the stimulation.

Immunohistochemistry

Mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) one hour after the last stimulation. According to the literature, the expression peak of c-fos appears within 1–2 h after a stimulus. This has been observed in case of acute drug exposure, food intake or direct current stimulation [20,23,24].

Brains were then removed, postfixed overnight in 4% paraformaldehyde and kept 48 h at 4 °C in 15% sucrose solution in order to cryoprotect tissue. Coronal sections of 30 μ m were cut. After rinsing in PBS-T, free-floating sections were exposed for 65 h (4 °C) to rabbit anti-c-fos primary antibody (1:10000; calbiochem) (adapted from Ref. [20]). After several washing, sections were exposed (24 h, 4 °C) to the biotinylated secondary horse anti-rabbit IgG (1:10000; Vector) followed by amplification with an avidin horseradish peroxidase complex (ABC Elite kit, vector laboratories) for 1 h at room temperature. The peroxidase complex was visualized by a 10 min exposure to a chromogen solution. Brain sections were then coverslipped with Canada balsam (Roth).

Images were acquired using a 10 \times or 20 \times objective of an Olympus microscope B \times 51 equipped with a Olympus DP50 camera. Pictures of the following regions were taken: motor cortex (M1 and M2); infralimbic (IL), prelimbic (PL) and anterior cingulate (Cg) prefrontal cortex; dorsal and ventral hippocampus (CA1 and CA3 area) and dentate gyrus (DG); paraventricular nucleus of thalamus and hypothalamus, Nucleus Accumbens (NAcc) and ventral tegmental area (VTA). M1 and M2, which are right above the stimulation electrode, were counted on both sides, as CA1 area of the dorsal hippocampus, to assess the laterality of the stimulation. As expected [25], there were no asymmetrical effects of tDCS in the pattern of c-fos induction between the two hemispheres. Therefore, counting of other structure was done on only one hemisphere on 2 or 3 sections depending of the structure. ImageJ software (Rasband, W.S., U.S. National Institute of Health) was used to count c-fos labeled nuclei over the defined area captured by the camera.

Statistical analysis

All results were expressed as means \pm standard errors of the mean (S.E.M). Two-way ANOVA [factor "treatment" (sham or tDCS) and factor "delay" (3,21 or 60 days)] were used to analyze the effects of tDCS on antidepressant-like behavior in the forced-swim test at different time point. Two-way ANOVA was also used to analyze the effects of tDCS in our mouse model of depression [factor "treatment" (sham or tDCS) and factor "corticosterone" (vehicle or CORT)] and on c-fos immunohistochemistry [factor "treatment" (sham or tDCS) and factor "number of stimulation" (1 or 10)]. One-way ANOVA were used to determine the effects of current intensity, duration on antidepressant-like behavior in the forced-swim test. One-way repeated ANOVA was used to identify the effect of tDCS when it was administrated in awaken mice. Unpaired Student's t-test was used to assess statistical differences between sham and cathodal stimulation. Any overall statistical differences were further analyzed using Fisher's post hoc test. Statistical differences were set at $p < 0.05$.

Results

tDCS induces long-lasting antidepressant-like effect in the FST

Results of experiments 1 and 2 were combined to identify long-lasting antidepressant-like behavior induced by a single session or ten sessions (200 μ A, 20 min) of tDCS in anaesthetized mice 3, 21 and 60 days after the last stimulation (Fig. 1A). Two-way ANOVA revealed significant main effects of a single session of tDCS ($F_{(1,70)} = 14.54$; $p < 0.001$) and delay ($F_{(2,70)} = 3.35$; $p = 0.0407$). As illustrated in Fig. 1B, only one session of tDCS is sufficient to induce a significant decreased of immobility duration 3 days after the stimulation compared to sham ($p < 0.001$). This antidepressant-like effect of tDCS is maintained at least 21 days after the stimulation ($p = 0.025$) but disappeared 60 days after the session of tDCS

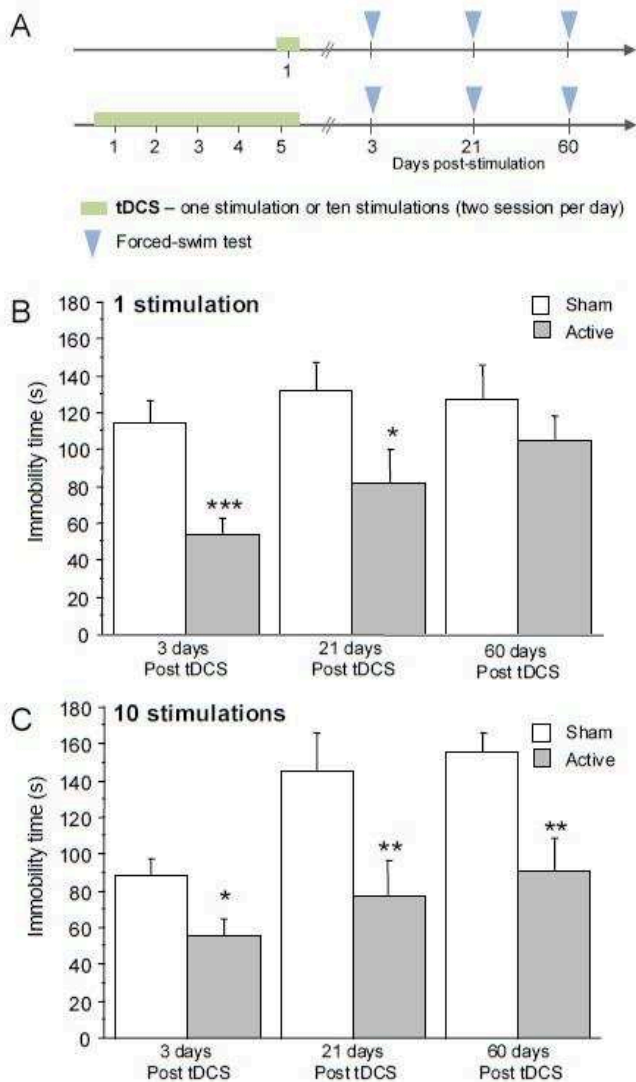


Fig. 1. Long-lasting antidepressant-like effects of 1 or 10 sessions of tDCS. (A) Experimental design. Histograms illustrate the immobility duration in the FST 3, 21 and 60 days after the last stimulation in sham animals and in animals submitted to a single session (B) or ten sessions (C) of active tDCS ($n = 9$ to 10 , see Table 1). Data represent mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to sham at each time point.

($p = 0.319$). A two-way ANOVA also revealed a significant main effect of 10 sessions of tDCS ($F_{(1,71)} = 21.48$; $p < 0.001$) and delay ($F_{(2,71)} = 8.32$; $p < 0.001$). A secondary analysis showed that 10 sessions of tDCS induce a significant and long-lasting decreased in the time of immobility 3 days ($p = 0.049$), 21 days ($p = 0.002$) and until 60 days ($p = 0.007$) after the last stimulation compared to sham animals (Fig. 1C).

Note that the immobility time of the sham group (10 stimulations) at 3 days is significantly different from those at 21 and 60 days ($p = 0.003$ and $p = 0.001$, respectively). This effect is not persistent, and probably due to mice handling during the week of stimulations.

Which parameter of stimulation for an optimal behavioral effect?

Considering that a single session of tDCS induced antidepressant-like behavior 3 days post-stimulation, we used this stimulation protocol to assess the influence of stimulation

parameters modulation (i.e. duration, intensity, polarity, contention or anesthesia) on this effect.

Concerning the intensity, one-way ANOVA revealed a significant main effect of treatment ($F_{(3,35)} = 2.89$; $p = 0.048$). As previously shown, one session (duration 20 min) of 200 μ A tDCS induced a significant decrease of the immobility time 3 days after the stimulation compared to sham ($p = 0.017$, Fig. 2A). However, 25 μ A ($p = 0.99$) and 100 μ A ($p = 0.27$) tDCS failed to induce antidepressant-like behavior in stimulated mice.

For the duration of stimulation, one-way ANOVA revealed a significant main effect of treatment ($F_{(3,34)} = 3.29$; $p = 0.032$). As previously shown, one session (200 μ A) of 20 min tDCS induced a significant decrease of the immobility time 3 days after the stimulation compared to sham ($p = 0.037$, Fig. 2B). If a session of 10 min of tDCS failed to induce antidepressant-like effect ($p = 0.52$), a session of 3 min induced a significant decrease of time immobility compared to sham ($p = 0.009$).

Concerning the polarity, a single cathodal stimulation over the left prefrontal cortex failed to induce behavioral response in the FST 3 days post-stimulation ($p = 0.34$, Fig. 2C).

Considering that a previous study in our team [8] reported an antidepressant-like effect of 10 sessions of tDCS in awoken mice 21 days after the last stimulation, the present study assessed the effect of a single tDCS session in awoken mice 3 days after the stimulation. Note that we have previously demonstrated (Fig. 1B) that a single tDCS session in anaesthetized mice was able to induce antidepressant-like behaviors in the FST 3 days after the stimulation. One-way repeated ANOVA revealed that tDCS had a trend toward a decreased immobility time in the FST in awoken mice ($F_{(1,17)} = 3.68$; $p = 0.071$). A secondary analysis confirmed that a single tDCS stimulation failed to induce antidepressant-like effect 3 days ($p = 0.18$) or 21 days ($p = 0.14$) after the stimulation in awoken mice (Fig. 2D).

tDCS reduces depressive-like behavior in a mouse model of depression

Our results highlighted that repeated anodal stimulation at 200 μ A during 20 min could produce robust and long-lasting behavioral effect in naive mice in the forced-swim test. To complete, we aimed to evaluate the antidepressant-like effect of tDCS in a mouse model of depression. Mice were exposed to chronic low dose of corticosterone before chronic tDCS sessions. A two-way ANOVA revealed a significant interaction between treatment (sham vs active) and chronic corticosterone exposure (vehicle vs CORT) ($F_{(1,31)} = 4.25$; $p = 0.047$). A secondary analysis showed that chronic corticosterone administration increased the time of immobility in the forced-swim test ($p = 0.022$), an effect which is reversed by repeated session of tDCS ($p < 0.001$) (Fig. 2E).

Note that there are strain differences concerning the behavioral effect of tDCS. Indeed, if one or ten sessions of tDCS decreased the time immobility in the FST for naive swiss mice (Fig. 1), repeated tDCS did not induce changes in time immobility for naive C57bl/6 mice ($p = 0.69$, Fig. 2E). This is not surprising since numerous studies described the large variability of emotionality among inbred mice [26,27] and in the response of different inbred mouse strains in various paradigms such as forced-swim test or UCMS [28–31].

tDCS antidepressant effect is associated with neuronal activation

c-fos immunostaining was used to assess early neuronal activation, 1 h after the last stimulation. Firstly, a two-way ANOVA showed that there was no significant difference in the number of c-fos labeling cells after a single stimulation within the two

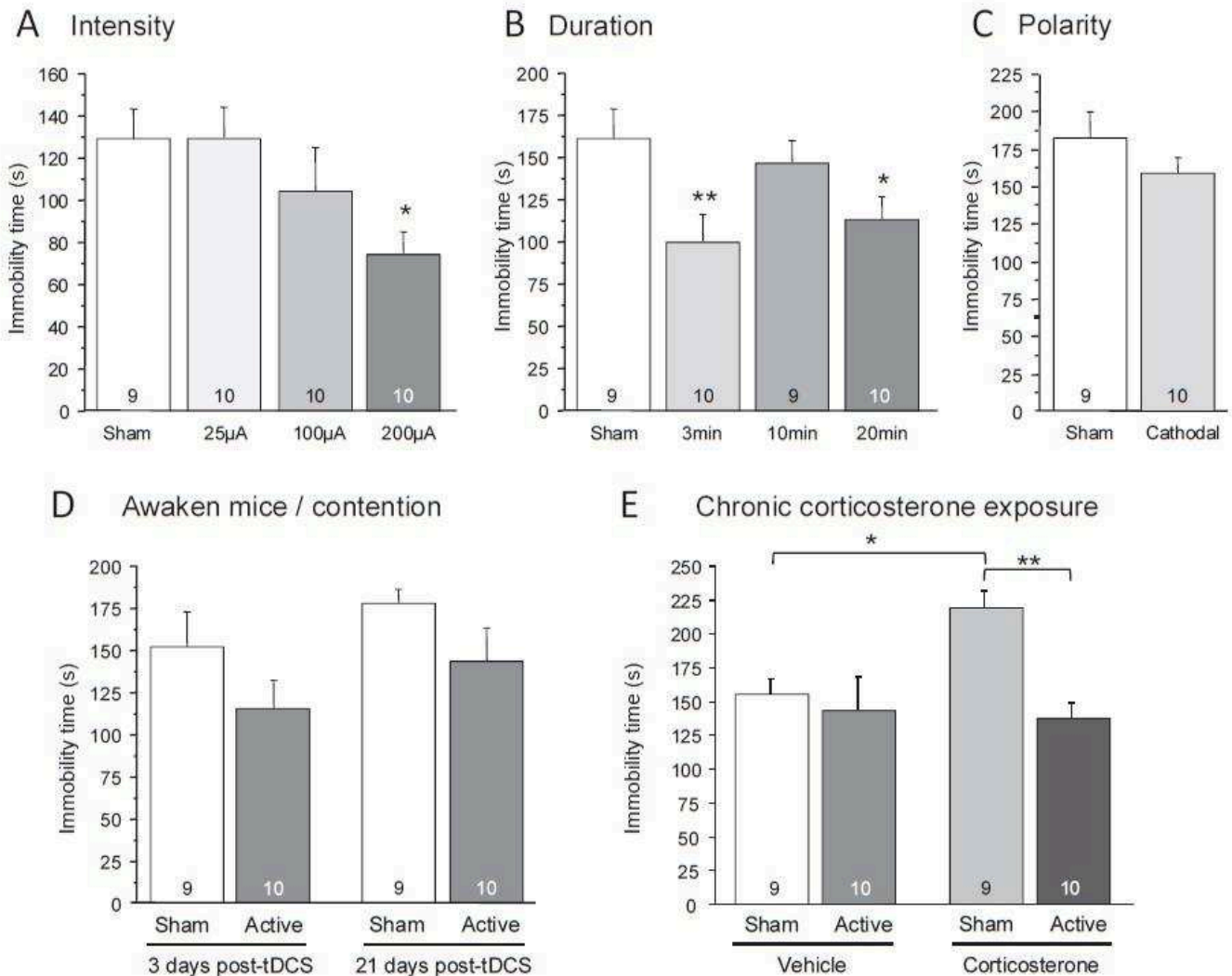


Fig. 2. Which parameters could modify the antidepressant-like effects of tDCS? Histograms illustrate immobility time in the FST in sham and in animals submitted to a single session of active tDCS with variation of current intensity (A), stimulation duration (B), polarity (C) and vigilance state (D). The antidepressant-like effect of repeated tDCS was also demonstrated in mice chronically exposed to corticosterone, a validated model of depression (E). Data represent mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to sham.

hemispheres of motor cortex M1 and M2 [for the factor hemisphere, $p = 0.91$ and $p = 0.99$ respectively, data not shown] or CA1 area of the dorsal hippocampus [for the factor hemisphere, $p = 0.67$, data not shown].

First, in the **prefrontal cortex**, two-way ANOVA showed a significant interaction between treatment (sham vs active) and number of stimulation (1 vs 10) in the infralimbic prefrontal cortex (IL, $F_{(1,15)} = 6.38$, $p = 0.023$) and the prelimbic prefrontal cortex (PL, $F_{(1,15)} = 7.59$, $p = 0.015$). A single active stimulation significantly increased the number of c-fos positive cells compared to sham in the IL ($p = 0.029$) and PL ($p = 0.022$) whereas 10 stimulations had no significant effect ($p = 0.27$ and $p = 0.24$ respectively; Fig. 3B). In the cingulate cortex, tDCS had a trend toward an increase in c-fos expression (number of stimulation*treatment interaction, $p = 0.081$, Fig. 3B). Secondary analysis revealed that single active stimulation significantly increased the number of c-fos positive cells compared to sham ($p = 0.049$) whereas 10 stimulations had no significant effect ($p = 0.70$).

In the **dorsal hippocampus**, a significant interaction between treatment and number of stimulation was also shown in the 3 zones tested: CA1 ($F_{(1,17)} = 9.79$, $p = 0.0065$), CA3 ($F_{(1,17)} = 13.24$, $p = 0.0022$) and the dentate gyrus (DG) ($F_{(1,17)} = 31.72$, $p < 0.0001$;

Fig. 3C). A single active stimulation significantly increased the number of c-fos positive cells compared to sham in CA1 ($p = 0.0077$), CA3 ($p = 0.0055$) and DG ($p < 0.0001$) whereas 10 stimulations had no significant effect (CA1, $p = 0.4995$; CA3, $p = 0.8704$; DG, $p = 0.2971$) (Fig. 3C).

Similarly, in the **NAcc Shell**, a two-way ANOVA revealed a significant interaction of both factors ($F_{(1,16)} = 6.34$, $p = 0.0228$). A secondary analysis showed that tDCS induced an overexpression of c-fos compared to sham after one stimulation ($p = 0.0169$; Fig. 3C) but not after 10 stimulations ($p = 0.593$).

A significant interaction between treatment and the number of stimulation was also found in the **paraventricular thalamic nucleus** ($F_{(1,15)} = 9.78$, $p = 0.0069$). The number of c-fos expressing neurons was especially increased after a single stimulation ($p = 0.0019$) but not after 10 stimulations ($p = 0.50$; Fig. 3C).

tDCS had a trend toward increasing c-fos expression in the **paraventricular hypothalamic nucleus** depending of the number of stimulations ($F_{(1,15)} = 3.43$, $p = 0.083$, data not shown). Secondary analysis revealed that single active stimulation significantly increased the number of c-fos positive cells compared to sham ($p = 0.045$) whereas 10 stimulations had no significant effect ($p = 0.68$, Fig. 3C).

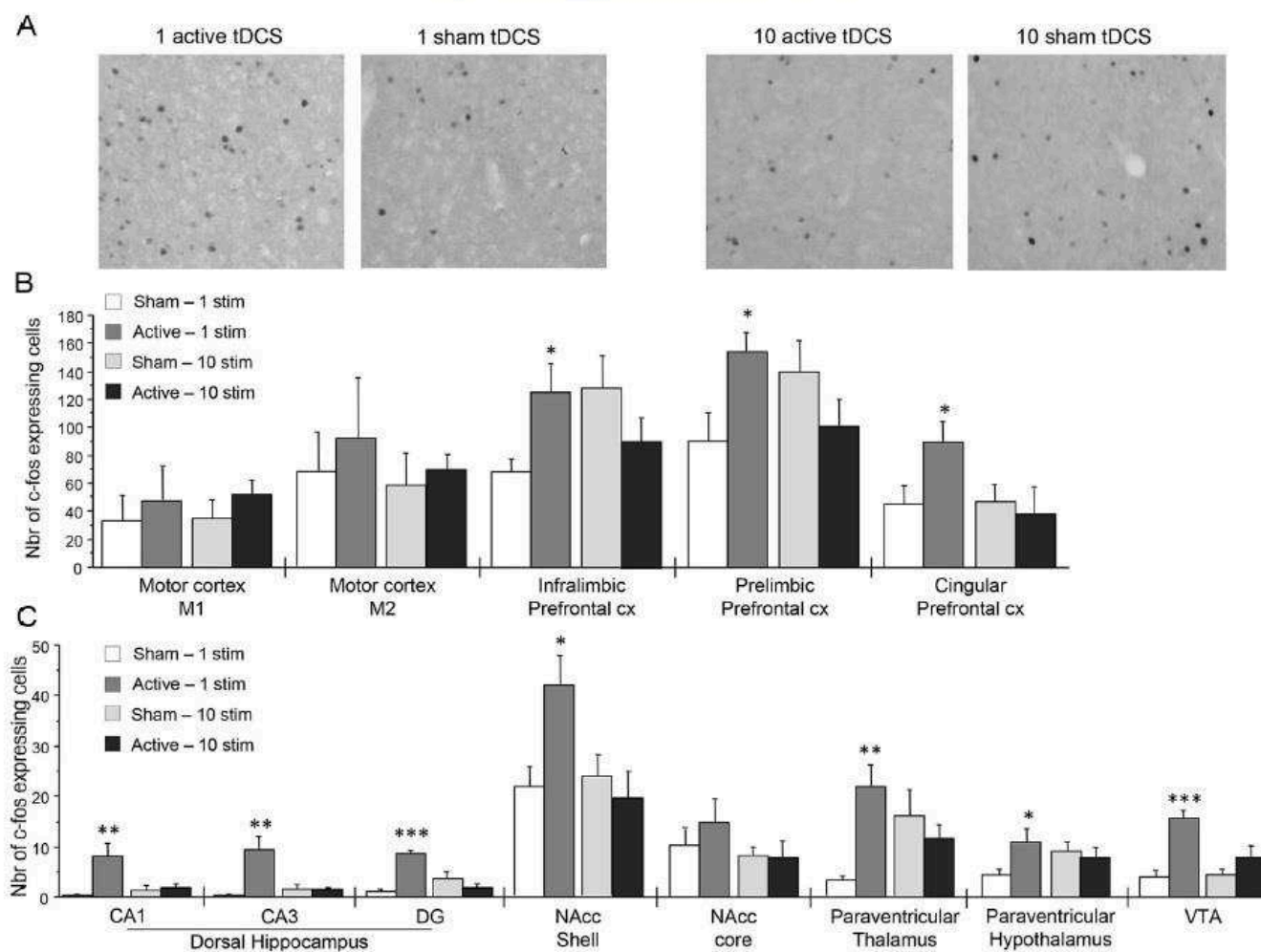


Fig. 3. A single session of tDCS increased c-fos expression whereas 10 sessions did not. (A) Representative photomicrographs of c-fos labeled nuclei in the NAcc shell. Histograms illustrate the number of c-fos labeling cells within cortical (B) and subcortical (C) structures of mice brain ($n = 5$ per group, see Table 1). Data represent mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to sham (one session of tDCS).

Finally, in the ventral tegmental area (VTA), a significant interaction of both factors was observed ($F_{(1,16)} = 6.83$, $p = 0.0188$). Post-hoc tests revealed that tDCS increased c-fos expression after one stimulation in comparison with sham ($p = 0.0005$) but not after 10 stimulations ($p = 0.165$; Fig. 3C).

Conversely, one or ten sessions of tDCS did not induce changes in the number of c-fos positive neurons in the ventral hippocampus, the NAcc Core and in the M1 and M2 motor cortex (Fig. 3B and C).

Discussion

The first goal of this study was to assess the modulation of the antidepressant effect of tDCS induced by the modification of stimulation parameters. Our results showed that the number of stimulations, the current intensity and polarity, the duration and the vigilance state during stimulation influenced the behavioral effect of tDCS, assessed here with the forced-swim test.

First, the number of stimulation, *i.e.* the repetition of stimulation sessions, plays an important role on the duration of the behavioral effect. Indeed, a single stimulation (20 min, 200 μ A) was able to decrease the immobility duration in the FST 3 and 21 days after the stimulation but not after 60 days. Ten stimulations equally induced an antidepressant effect which lasted at least 60 days. Numerous

studies reported that acute administration of pharmacological antidepressants decreased immobility time in the forced-swim test in healthy mice, interpreted as a decrease of behavioral despair [31–33]. However, if it was demonstrated that chronic pretreatment with antidepressant compounds has antidepressant-like effect in this test [34], to our knowledge, no study focused on the long-term effect of a single or repeated administration of antidepressant agents. Most clinical studies focusing on the treatment of depression used repeated tDCS sessions, with a various number of stimulations (5–20) (for review see Refs. [35,36]). Mostly, the depression severity is decreased by a repeated tDCS treatment and several treated patients reached remission even if some studies have yielded less encouraging results (for review see Ref. [36]). Our findings as well as clinical results [37,38] demonstrated that the repetition of stimulation was not necessary to obtain acute effect but is needed for a long-term antidepressant effect. In our study, the antidepressant-like effect of tDCS was maintained at least 60 days. In clinical studies, the tDCS effect could be observed until at least 1 month, but only few studies have a long term follow up. In their large clinical research, Brunoni et al. and Valiengo et al. [39,40] showed that the mean tDCS response duration was 11.7 weeks with maintenance sessions. This is of particular interest for the prevention of relapse, one of the major concerns in depression treatment, and raises questions about the need of maintenance

sessions of tDCS. A recent study performed on this topic [41] demonstrated that continuation tDCS given weekly in the first 3 months of the study led to a lower relapse rate (16.3%) than continuation tDCS given fortnightly (48.9%) in the 3 following months. Since no control group, without continuation tDCS, was included in this study, these results needed to be completed.

Concerning the intensity of stimulation, we demonstrated that a single tDCS stimulation had no effect at 25 μ A and 100 μ A whereas it elicited antidepressant-like outcomes at 200 μ A. The intensity of tDCS stimulation is a strong issue, particularly when comparing preclinical and clinical data. Indeed, rodents are usually stimulated at 200 μ A whereas 2 mA is the recommended intensity in humans [35]. Both are low intensities but the question of the exact current received by the brain tissue remains. In the literature, authors usually mention the current density as an important parameter. If we consider it, the mouse brain received a 100 time higher density of current than humans (57.1 vs 0.57 A/m² for clinical trials). The size of the stimulated area could then be strongly increased and, consequently, its cellular and behavioral effects modified. However, our results concerning c-fos labeling demonstrated that, even at this high density, tDCS activated only specific region within the brain and not the overall structure.

The duration of stimulation also influenced the antidepressant-like effect of tDCS. The immobility duration in the FST was significantly decreased by a 3 min and a 20 min tDCS stimulation whereas a 10 min did not produce any effect. According to researches that focused on the systematic assessment of the effect of tDCS on excitability [42], we expected a linear dose-effect response. However recent data demonstrated that the relationship between tDCS parameters and the measured effects was not as linear as we thought. Indeed, in 2013, Batsikadze et al. [43] showed a dose-response effect of intensity on motor evoked potential (MEP) amplitude following an anodal stimulation whereas various intensities inverted the effects of a cathodal stimulation. In the same way, Karuza et al. (2016) [44] highlighted opposite effects of either cathodal or anodal stimulation on cognitive performances according to intensity.

As might be presumed [14,16], we highlighted that cathodal stimulation had no antidepressant-like effect in the FST. We also demonstrated that a single session of tDCS failed to induce significant results in awaken and restraint mice. A single session of tDCS is probably not sufficient to induce robust antidepressant-like effect in stressed mice, as it was shown in a previous study [8] where several stimulations were needed to observe the behavioral effect of tDCS in restraint mice.

Moreover, in order to pursue our behavioral assessment of the effects of tDCS, investigations had to be done in a mouse model of depression. Here we confirmed that chronic tDCS stimulation alleviated depressive-like symptoms in the corticosterone model. If, a former research had already demonstrated that tDCS normalized depressive-like behaviors associated with chronic nicotine exposure [8], our research is the first one to show this ability in a mouse model of depression. This is of particular interest for further researches and their clinical impact.

Here we highlighted that different stimulation parameters were associated with different behavioral effects. It appeared that the stimulation protocol that was able to produce the most robust effect was the anodal stimulation at 200 μ A during 20 min. This protocol was then used in the second part of the present study which focused on c-fos expression in several mice brain structures to determine structures recruited by 1 or 10 tDCS sessions and possibly involved in its antidepressant effect. We demonstrated that a single tDCS stimulation over the frontal cortex of anaesthetized mice induced c-fos over expression, testifying a neuronal activation, in the prefrontal cortex, the dorsal hippocampus, the

VTA and the paraventricular thalamic nucleus. To our knowledge, only one *in vivo* study have analyzed c-fos expression after transcranial electric anodal stimulation over the sensori-motor cortex of rodents [24] and these authors equally showed a massive overexpression of c-fos immunoreactivity in the neocortex, the cingulate and piriform cortex, the hippocampus and the amygdala.

The important finding of our study is that a single tDCS stimulation of the mice frontal cortex enhanced the expression of c-fos in the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC, *i.e.* IL and PL PFC), its associated subcortical limbic circuitry and the reward circuitry. The vmPFC in rodent is considered as the equivalent of the human subgenual prefrontal cortex [45] which is thought to be implicated in emotional regulation and depression [46–48] and in the antidepressant response induced by several pharmacological and non-pharmacological therapies (*i.e.* ECT, rTMS) [49–52]. In rodent, the vmPFC has been shown to affect behaviors such as conditioned fear, anxiety and stress [53] and to be implicated in the behavioral response to antidepressants. For example, desipramine, fluoxetine and ketamine induced a significant overexpression of c-fos in the rat vmPFC and its related limbic circuitry [46,54,55]. Furthermore, some studies reported that vmPFC deep brain stimulation (DBS) induced antidepressant-like effect in stimulated-rats in the FST compared to sham [56,57] and that a neuronal or a glial lesion of the vmPFC prevented this antidepressant response [56].

Our results suggested that the reward circuitry may be involved in the antidepressant-like effect of tDCS. The best characterized reward pathway implicates VTA neurons which project to the nucleus accumbens (NAcc) [58] and connect several regions of the PFC, central and basolateral amygdala and hippocampus. In our study, VTA neurons, as well as neurons of the dorsal hippocampus and the NAcc shell, overexpressed c-fos in response to a single stimulation. If these brain structures are involved in the regulation of emotional and cognitive behaviors, their contribution to depression remains unclear. However, some studies have demonstrated metabolic and anatomical modifications of these structures in depressed patients as well as their role in the response to stress in rodents [58]. Interestingly, a recent study evaluated the effect of tDCS on the reward circuitry through assessing the impact of repeated stimulations on cocaine-induced behaviors and gene regulation in corticostriatal circuits implicated in psychostimulant addiction [25]. Authors showed that repeated tDCS over the frontal cortex of mice increased by itself expression of the transcription factor Zif268 in the striatum, and to a lesser degree in the cortex, three weeks after tDCS treatment.

Early *in vitro* studies and pharmacological studies in humans have demonstrated that after-effects of anodal stimulation on neuronal excitability are due to persistent changes of synaptic efficacy similar to those underlying long-term potentiation (LTP) process [16,24,59,60]. Interestingly, we reported that repeated tDCS (10 sessions) failed to induce changes in c-fos expression in the analyzed brain regions. Regarding behavioral overcomes of repeated tDCS, *i.e.* longer maintenance of antidepressant-like effect compared to a single tDCS session, we could hypothesized that the repetition of stimulation would act through maintaining an elevated expression of c-fos, *i.e.* neural activation, that should, in turn, maintain the activation of late response gene and induce long term cellular and behavioral effects [61,62]. However, the tenth stimulation did not induce the same effect on neuronal activity as the first one. This highlighted that neurons respond differently to the same stimulus if it is presented once or repeatedly. We hypothesized that this effect could be due to blunting of gene expression. Blunting refers to the finding that a challenge given after repeated exposition to the same stimulus produces attenuated (blunted) immediate early genes induction

compared with induction by the first exposition. This effect might be the result of epigenetic modifications [63] or other neuronal changes produced by the repeated treatment [64]. The functional consequences of blunted (transcription factor) gene inducibility remain unclear, but as the integrity of neurons depends on balanced regulation of gene expression to ensure that cellular components with limited half-lives are replenished and cellular plasticity is maintained, it can be assumed that gene blunting modifies cell homeostasis/function. Such gene blunting thus serves as a convenient marker to identify the brain areas/neurons altered by a repeated treatment. Altogether, these results strongly suggest that repeated tDCS induces long-term neuroplasticity in specific areas of the brain.

Conclusion

tDCS induced long-lasting modulation of depressive-like behavior in healthy mice and in a mouse model of depression. This behavioral response was dependent of stimulation parameters, both concerning the intensity and the duration of effects. Furthermore, the antidepressant-like effect of a single tDCS stimulation is associated to both cortical and subcortical neuronal activation in specific area, particularly in the vmPFC. The repetition of stimulations likely involved long term modulation of neuronal processes that must be further explored.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

The authors thank Christophe Houdayer and Sandrine Chometton for their excellent technical assistance for immunohistochemistry experiments. This work was supported by the FondaMental foundation, foundation of scientific cooperation.

References

- Mondino M, Bennabi D, Poulet E, Galvao F, Brunelin J, Haffen E. Can transcranial direct current stimulation (tDCS) alleviate symptoms and improve cognition in psychiatric disorders? *World J Biol Psychiatry* 2014;15:261–75. <http://dx.doi.org/10.3109/15622975.2013.876514>.
- Brunoni AR, Moffa AH, Fregni F, Palm U, Padberg F, Blumberger DM, et al. Transcranial direct current stimulation for acute major depressive episodes: meta-analysis of individual patient data. *Br J Psychiatry* 2016;208:522–31. <http://dx.doi.org/10.1192/bjp.bp.115.164715>.
- Fregni F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin MA, Rigonatti SP, Pascual-Leone A. Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disord* 2006;8:203–4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-5618.2006.00291.x>.
- Boggio PS, Rigonatti SP, Ribeiro RB, Myczkowski ML, Nitsche MA, Pascual-Leone A, et al. A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:249–54. <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145707007833>.
- Loo CK, Sachdev P, Martin D, Pigot M, Alonzo A, Malhi GS, et al. A double-blind, sham-controlled trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010;13:61–9. <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145709990411>.
- Loo CK, Alonzo A, Martin D, Mitchell PB, Galvez V, Sachdev P. Transcranial direct current stimulation for depression: 3-week, randomised, sham-controlled trial. *Br J Psychiatry* 2012;200:52–9. <http://dx.doi.org/10.1192/bjp.bp.111.097634>.
- Brunoni AR, Zanao TA, Vanderhasselt MA, Valiengo L, de Oliveira JF, Boggio PS, et al. Enhancement of affective processing induced by bifrontal transcranial direct current stimulation in patients with major depression. *Neuro-modulation* 2013;17:138–42. <http://dx.doi.org/10.1111/ner.12080>.
- Pedron S, Monnin J, Haffen E, Sechter D, Van Waes V. Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption. *Neuropsychopharmacology* 2014;39:981–8. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.298>.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 2009;62:479–93.
- Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, et al. Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol Psychiatry* 2008;63:353–9.
- Rainer Q, Xia L, Guilloux J-P, Gabriel C, Mocaer E, Hen R, et al. Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol* 2012;15:321–35. <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145711000356>.
- Gourley SL, Taylor JR. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci* 2009. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.n0932s49>. Chapter 9:Unit 9.32.
- Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW. The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *J Physiol* 1964;172:369–82.
- Purpura DP, McMurtry JG. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *J Neurophysiol* 1965;28:166–85.
- Brunoni AR, Fregni F, Pagano RL. Transcranial research in transcranial direct current stimulation (tDCS): a systematic review of studies in animals. *Rev Neurosci* 2011;22:471–81. <http://dx.doi.org/10.1515/RNS.2011.042>.
- Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J Physiol* 2003;553:293–301.
- Fritsch B, Reis J, Martinowich K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron* 2010;66:198–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.035>.
- Ranieri F, Podda MV, Riccardi E, Frisullo G, Dileone M, Profice P, et al. Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. *J Neurophysiol* 2012;107:1868–80. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00319.2011>.
- Kaczmarek L, Robertson HA. Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. *Handb Chem Neuroanat* 2002;19:370. Amsterdam: Elsevier.
- Chometton S, Pedron S, Peterschmitt Y, Van Waes V, Fellmann D, Risold P-Y. A preammylary lateral hypothalamic nuclear complex responds to hedonic but not aversive tastes in the male rat. *Brain Struct Funct* 2016;221:2183–208. <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-015-1038-3>.
- Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 1998;28:370–490.
- Paxinos G, Franklin F. The mouse brain in stereotaxic coordinate. second ed. Academic Press; 2001.
- Nestler EJ. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Delta-FosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363:3245–55. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2008.0067>.
- Islam N, Moriwaki A, Hori Y. Co-localization of c-fos protein and protein kinase C gamma in the rat brain following anodal polarization. *Indian J Physiol Pharmacol* 1995;39:209–15.
- Pedron, Joel Beverley, Haffen E, Andrieu P, Steiner H, Van Waes V. Transcranial direct current stimulation produces long-lasting attenuation of cocaine-induced behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits. *Addict Biol* 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/adb.12415>.
- Kopp C, Vogel E, Misslin R. Comparative study of emotional behaviour in three inbred strains of mice. *Behav Process* 1999;47:161–74.
- Vaugeois JM, Costentin J. Creation of a line of “depressed” mice from a selection of breeders exhibiting a behavioral helplessness. *C R Seances Soc Biol Fil* 1998;192:1149–61.
- Ibarguena-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:1357–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.07.010>.
- David DJP, Renard CE, Jolliet P, Hascoët M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacol Berl* 2003;166:373–82. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-002-1335-4>.
- Ducotter C, Belzung C. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res* 2005;156:153–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.018>.
- Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacol Berl* 2001;155:315–22.
- Sánchez C, Meier E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacol Berl* 1997;129:197–205.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:238–45. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02017-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02017-5).

- [34] Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2004;29:1321–30. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300433>.
- [35] Palm U, Hasan A, Strube W, Padberg F. tDCS for the treatment of depression: a comprehensive review. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00406-016-0674-9>.
- [36] Kekic M, Boysen E, Campbell IC, Schmidt U. A systematic review of the clinical efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 2016;74:70–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.12.018>.
- [37] Boggio PS, Bermanpohl F, Vergara AO, Muniz AL, Nahas FH, Leme PB, et al. Gono-go task performance improvement after anodal transcranial DC stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in major depression. *J Affect Disord* 2007;101:91–8.
- [38] Ferrucci R, Bortolomasi M, Vergari M, Tadini L, Salvo B, Giacomuzzi M, et al. Transcranial direct current stimulation in severe, drug-resistant major depression. *J Affect Disord* 2009;118:215–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2009.02.015>.
- [39] Brunoni AR, Valiengo L, Baccaro A, Zanao TA, de Oliveira JF, Goulart A, et al. The sertraline vs. electrical current therapy for treating depression clinical study: results from a factorial, randomized, controlled trial. *JAMA Psychiatry* 2013;70:383–91. <http://dx.doi.org/10.1001/2013.jamapsychiatry.32>.
- [40] Valiengo L, Bensenor IM, Goulart AC, de Oliveira JF, Zanao TA, Boggio PS, et al. The sertraline versus electrical current therapy for treating depression clinical study (select-TDCS): results of the crossover and follow-up phases. *Depress Anxiety* 2013;30:646–53. <http://dx.doi.org/10.1002/da.22079>.
- [41] Martin DM, Alonzo A, Ho KA, Player M, Mitchell PB, Sachdev P, et al. Continuation transcranial direct current stimulation for the prevention of relapse in major depression. *J Affect Disord* 2013;144:274–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2012.10.012>.
- [42] Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol* 2000;527(Pt 3):633–9.
- [43] Batsikadze G, Moliadze V, Paulus W, Kuo M-F, Nitsche MA. Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. *J Physiol* 2013;591:1987–2000. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2012.249730>.
- [44] Karuza EA, Balewski ZZ, Hamilton RH, Medaglia JD, Tardiff N, Thompson-Schill SL. Mapping the parameter space of tDCS and cognitive control via manipulation of current polarity and intensity. *Front Hum Neurosci* 2016;10:665. <http://dx.doi.org/10.3389/fnhum.2016.00665>.
- [45] Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 2005;492:145–77. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20738>.
- [46] Chang CH, Chen MC, Lu J. Effect of antidepressant drugs on the vmPFC-limbic circuitry. *Neuropharmacology* 2015;92:116–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.010>.
- [47] Mayberg HS. Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment. *Br Med Bull* 2003;65:193–207.
- [48] Seminowicz DA, Mayberg HS, McIntosh AR, Goldapple K, Kennedy S, Segal Z, et al. Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling meta-analysis. *Neuroimage* 2004;22:409–18.
- [49] Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, McGinnis S, et al. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry* 2000;48:830–43.
- [50] Nobler MS, Oquendo MA, Kegeles LS, Malone KM, Campbell CC, Sackeim HA, et al. Decreased regional brain metabolism after ect. *Am J Psychiatry* 2001;158:305–8.
- [51] Mottaghy FM, Keller CE, Gangitano M, Ly J, Thall M, Parker JA, et al. Correlation of cerebral blood flow and treatment effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in depressed patients. *Psychiatry Res* 2002;115:1–14.
- [52] Drevets WC, Bogers W, Raichle ME. Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12:527–44.
- [53] Vertes RP. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 2006;142:1–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.027>.
- [54] Miyata S, Hamamura T, Lee Y, Miki M, Habara T, Oka T, et al. Contrasting Fos expression induced by acute reboxetine and fluoxetine in the rat forebrain: neuroanatomical substrates for the antidepressant effect. *Psychopharmacol Berl* 2005;177:289–95. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-004-2072-7>.
- [55] Beck CH. Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci* 1995;20:25–32.
- [56] Etiévant A, Oosterhof CA, Bétré C, Abrial E, Novo-Perez M, Rovera R, et al. Astroglial control of the antidepressant-like effects of prefrontal cortex deep brain stimulation. *EBiomedicine* 2015;2:896–906.
- [57] Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandão ML, Shumake J, Gonzalez-Lima F, et al. Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol Psychiatry* 2010;67:117–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.025>.
- [58] Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:609–25. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3381>.
- [59] Gartside IB. Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurones in the rat cerebral cortex after polarization: role of protein synthesis. *Nature* 1968;220:383–4.
- [60] Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain* 2002;125:2238–47.
- [61] Hughes P, Dragunow M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 1995;47:133–78.
- [62] Martin, Magistretti PJ. Regulation of gene expression by neurotransmitters in the central nervous system. *Eur Neurol* 1998;39:129–34.
- [63] Renthall W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med* 2008;14:341–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.004>.
- [64] Steiner H, Van Waes V. Addiction-related gene regulation: risks of exposure to cognitive enhancers vs. other psychostimulants. *Prog Neurobiol* 2013;100:60–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.10.001>.

2 RESULTATS COMPLEMENTAIRES CONCERNANT L'EFFET DE LA TDCS SUR LES COMPORTEMENTS DE TYPE DEPRESSIFS INDUITS PAR L'ADMINISTRATION CHRONIQUE DE CORT

Les résultats présentés dans cette partie viennent en complément de ceux présentés précédemment sur les effets comportementaux de la tDCS dans le modèle CORT. Ces données ont été obtenues avec le même protocole que précédemment, cependant des tests comportementaux ont été ajoutés.

Le test de préférence au sucrose (SPT) et le Splash test (ST) sont réalisés chaque semaine afin de rendre compte de l'évolution de l'état émotionnel de la souris et l'apparition de comportements de type dépressifs pendant l'exposition à la CORT. Le test de nage forcée (FST) a été réalisé avant et après les 21 séances de tDCS.

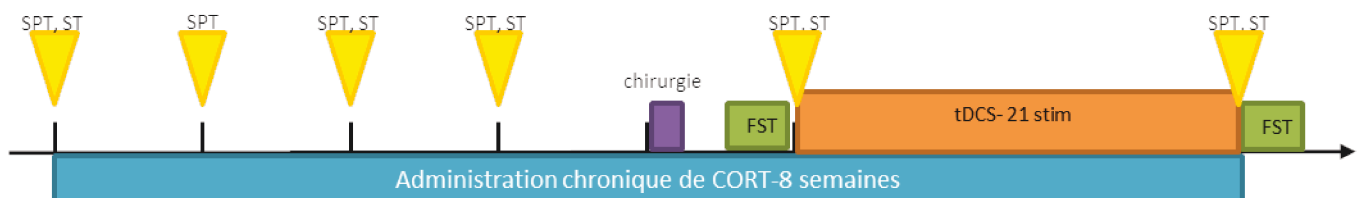


Figure 31 : protocole d'étude des effets comportementaux de la tDCS chez des souris exposées pendant 9 semaines à la corticostérone (CORT). Après 4 semaines d'exposition, une embase est positionnée sur le crâne des souris lors d'une chirurgie. Le test de préférence au sucrose (SPT) et le splash test (ST) sont réalisés chaque semaine, sauf pendant les stimulations. Après un premier FST, les souris reçoivent la tDCS à raison d'une session par jour pendant 21 jours. Deux tests comportementaux sont également réalisés après les sessions de tDCS (Splash test et test de la nage forcée) pour rendre compte de l'effet de la tDCS chez ces souris pseudo-dépressive.

2.1 Effets comportementaux de l'administration chronique de CORT

Pendant les 6 premières semaines d'administration de la CORT, le test de préférence au sucrose et le Splash test ont été réalisés pour évaluer les éventuels changements comportementaux pendant la phase d'induction de l'état pseudo-dépressif par la CORT. Le test de préférence au sucrose révèle une diminution du pourcentage de préférence au sucrose, donc un comportement anhédonique, dans les deux groupes (Véhicule et CORT) dès la 3^{ème} semaine d'induction. Malheureusement, dans cette phase précédant la tDCS, les animaux n'étant pas en cage individuelle, les biberons de sucrose ont été proposés à chaque cage de 5 animaux (n=4), nous n'avons donc que 4 données pour chaque temps de mesure, ce qui ne nous permet pas de réaliser de tests statistiques. (Figure 32).

L'ANOVA à mesures répétées avec les données obtenues avec le splash test montre un effet de l'administration de CORT [Véhicule vs CORT) ($F_{(1,36)}=11.90$; $p<0.01$)] et un effet du temps

($F(3,108)=33.30$; $p<0.001$) (Figure 33)]. Ce test révèle une diminution du temps passé à se toiletter après pulvérisation d'une solution visqueuse sur le pelage dorsal des souris du groupe de CORT dès la première semaine d'administration comparé au souris du groupe véhicule. Ce résultat suggère que les souris exposées à la CORT ont moins de motivation pour se toiletter et donc pour les comportements autocentrés.

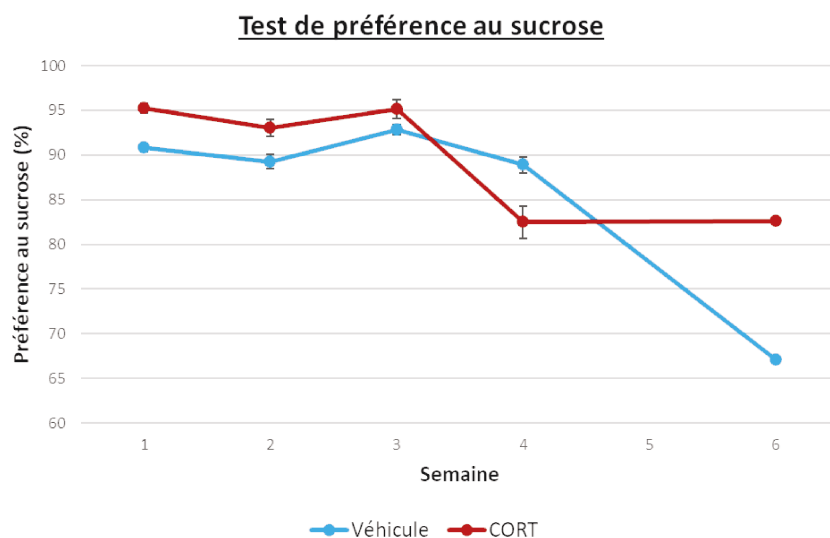


Figure 32 : préférence au sucre (exprimée en pourcentage de sucre consommé par rapport à la consommation totale de boisson) au cours des 6 premières semaines d'administration de corticostérone (CORT) ou de véhicule (eau de boisson). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm S.E.M.

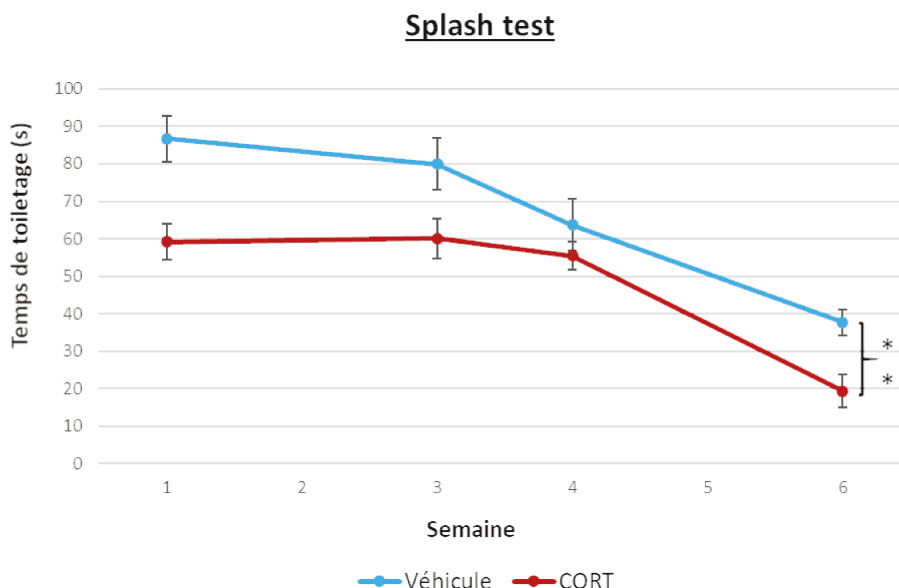


Figure 33 : temps de toiletage (sec.) dans le Splash test au cours des 6 premières semaines d'administration de corticostérone (CORT) ou de véhicule (eau de boisson). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm S.E.M. (** $p<0.01$)

On peut observer une importante diminution de la préférence au sucrose et du temps de toilettage après la 3^{ème} semaine. Ceci est sans doute dû à l'isolement des souris qui sont séparées après la chirurgie afin qu'elles ne s'arrachent pas mutuellement leurs embases.

L'état émotionnel des souris soumises à 6 semaines d'exposition à la CORT a ensuite été testé dans le test de nage forcée avant de recevoir les sessions de tDCS. Les souris du groupe CORT montrent les comportements pseudo-dépressifs dans le test de nage forcée. En effet, notre résultat révèle une augmentation de la durée d'immobilité dans le FST($t_{(36)}=-2.71$; $p<0.05$; Figure 34), suggérant une hausse des comportements de résignation.

Test de la nage forcée avant tDCS

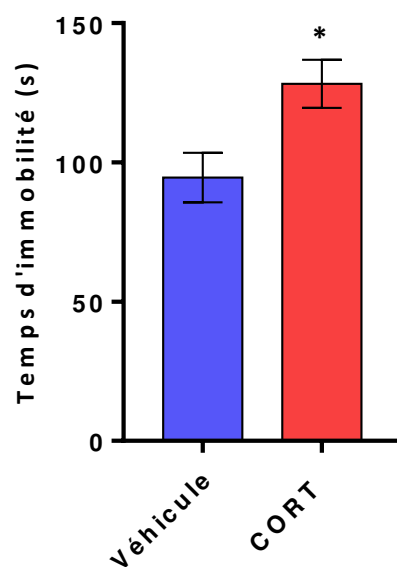


Figure 34 : Temps d'immobilité dans le test de nage forcée après 6 semaines d'administration de corticostérone (CORT) ou de véhicule (eau de boisson). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm S.E.M. (* $p<0.05$)

2.2 Effets comportementaux de la tDCS dans le modèle CORT.

Le résultat majeur est le résultat présent dans l'article présenté précédemment, à savoir une augmentation du temps d'immobilité dans le FST, donc un état pseudo-déprimé, chez les souris exposées de façon chronique à la CORT, altération comportementale normalisée par la tDCS.

Le splash test a également été réalisé pour caractériser les effets de la tDCS dans ce modèle de dépression. Une ANOVA à deux facteurs (facteur administration [Véhicule vs CORT] et facteur stimulation [Sham vs tDCS]) sur les données obtenues dans le Splash test révèle un effet du facteur « stimulation » ($F_{(1,32)}=7.02$; $p<0.05$). L'analyse secondaire indique que 21 séances de tDCS augmentent

le temps de toilette pour le groupe de Véhicule ($p < 0.05$; Figure 35) mais pas pour les souris exposées de façon chronique à la CORT.

Donc la tDCS augmente la motivation pour le toilettage et les comportements autocentrés chez les souris non déprimées.

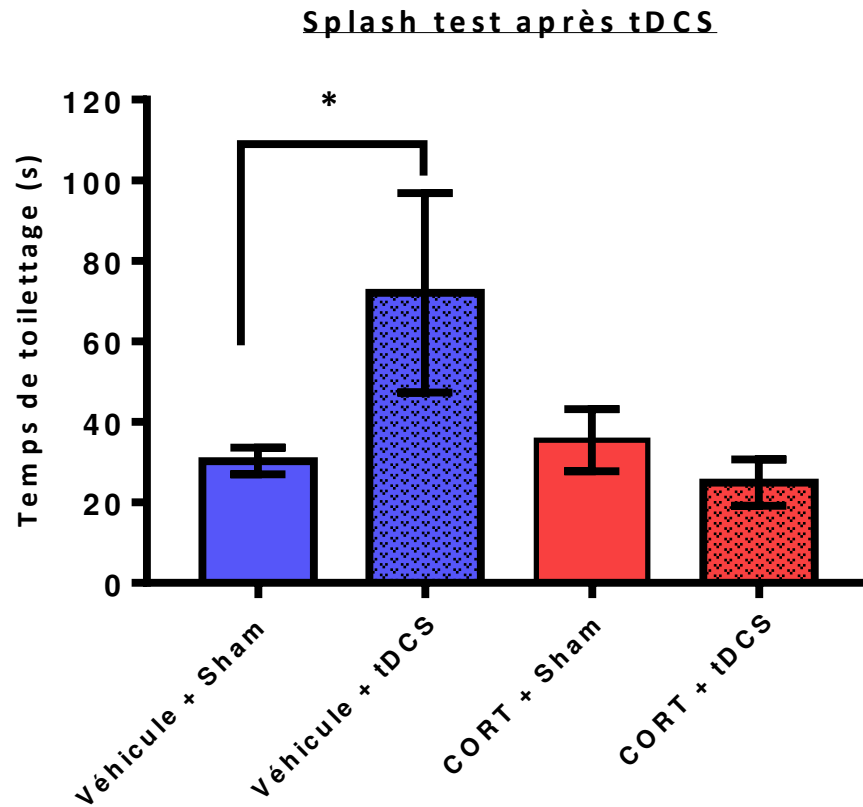


Figure 35 : Temps de toilette (sec.) dans le splash test après 21 séances de tDCS. CORT : souris exposées chroniquement à la corticostérone, véhicule : souris n'ayant pas reçu de corticostérone, tDCS : souris ayant été traité par tDCS, sham : souris non traitée par tDCS. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. (* $p < 0.05$)

3 EFFET DE LA TDCS SUR LES COMPORTEMENTS DE RESIGNATION INDUITS PAR L'INJECTION DE LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) ; PREMIERS PAS VERS L'IMPLICATION DES PROCESSUS INFLAMMATOIRES.

L'injection de lipopolysaccharides (LPS, endotoxine) provoque l'apparition de comportements maladifs (ralentissement moteur, anhédonie) induits par une forte réponse inflammatoire et donc la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires. La présence de certaines de ces cytokines va favoriser la production de kynurénine par rapport à la sérotonine, ce qui va conduire à l'apparition de comportements de type dépressif chez le rongeur. Le but de cette expérimentation est donc d'identifier les effets de la tDCS dans un modèle de dépression directement lié à l'inflammation.

Les souris ont reçu, 3 semaines après 10 sessions de stimulation par tDCS (2 par jour pendant 5 jours), une injection de LPS. Un test de locomotion (23h post-injection) et un test de nage forcée (26h post injection) ont été réalisés.

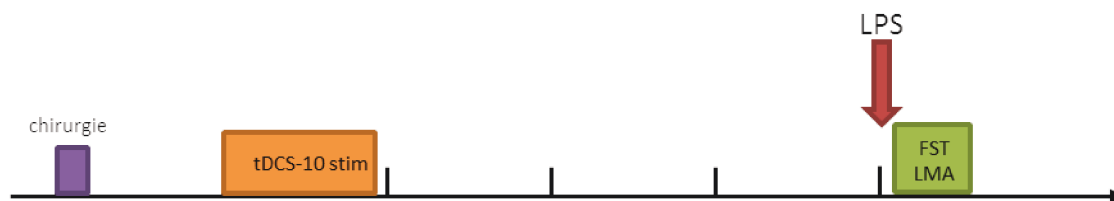


Figure 36 : Protocole d'étude des effets comportementaux de la tDCS dans le modèle LPS. Les souris sont stimulées par tDCS (2 stimulation/jour, 5 jours consécutifs) une semaine après la chirurgie. 3 semaines après la fin des stimulations, une injection de LPS est réalisée. L'activité locomotrice (LMA) et le temps d'immobilité dans le test de nage forcée sont mesurés respectivement 23h et 26h après l'injection de LPS.

Concernant la mesure de l'activité locomotrice de l'animal dans l'Open-field, une Anova à 2 facteurs révèle un effet de l'injection de LPS sur l'activité locomotrice globale ($F_{(1,35)} = 98.97$; $p < 0.001$). En effet, l'analyse *post hoc* montre une différence significative entre le groupe Véhicule + Sham vs LPS + Sham ($p < 0.001$) et Véhicule + tDCS vs LPS + tDCS ($p < 0.001$). Les souris ayant reçu une injection de LPS ont donc une activité locomotrice deux fois moindre que celles ayant eu l'injection du véhicule (voir Figure 37a).

L'Anova à 2 facteurs des comportements de type anxieux dans l'Open-field montre un effet d'interaction du facteur « stimulation » (Sham vs tDCS) et du facteur « administration » (Véhicule vs LPS) ($F_{(1,35)} = 4.64$; $p < 0.05$). L'analyse *post hoc* révèle une diminution significative du temps passé au

centre du dispositif par les souris du groupe LPS + Sham comparativement aux souris du groupe Véhicule + Sham ($p < 0.05$). Le LPS a donc un effet anxiogène. La tDCS peut reverser l'effet de LPS puisqu'on observe une augmentation du temps passé au centre par les souris du groupe LPS+tDCS comparé aux souris du groupe LPS+sham ($p < 0.05$; Figure 37b), donc un effet anxiolytique de la tDCS. Les résultats concernant l'évaluation des comportements de résignation dans le FST montrent que l'injection de LPS induit un comportement de type dépressif dans ce test. L'ANOVA à 2 facteurs (facteur administration [Véhicule vs LPS] et facteur stimulation [Sham vs tDCS]) montre un effet du facteur « administration » ($F_{(1,35)}=11.7$; $p < 0.01$). L'analyse en post-hoc de Fisher montre une augmentation le temps d'immobilité dans le groupe LPS + Sham par rapport au groupe Véhicule + tDCS ($p < 0.05$), suggérant un effet dépressif de l'injection de LPS. Par ailleurs, la tDCS montre une tendance à diminuer le temps d'immobilité dans le groupe de LPS ($p=0.08$), donc un potentiel effet antidépresseur (Figure 37c).

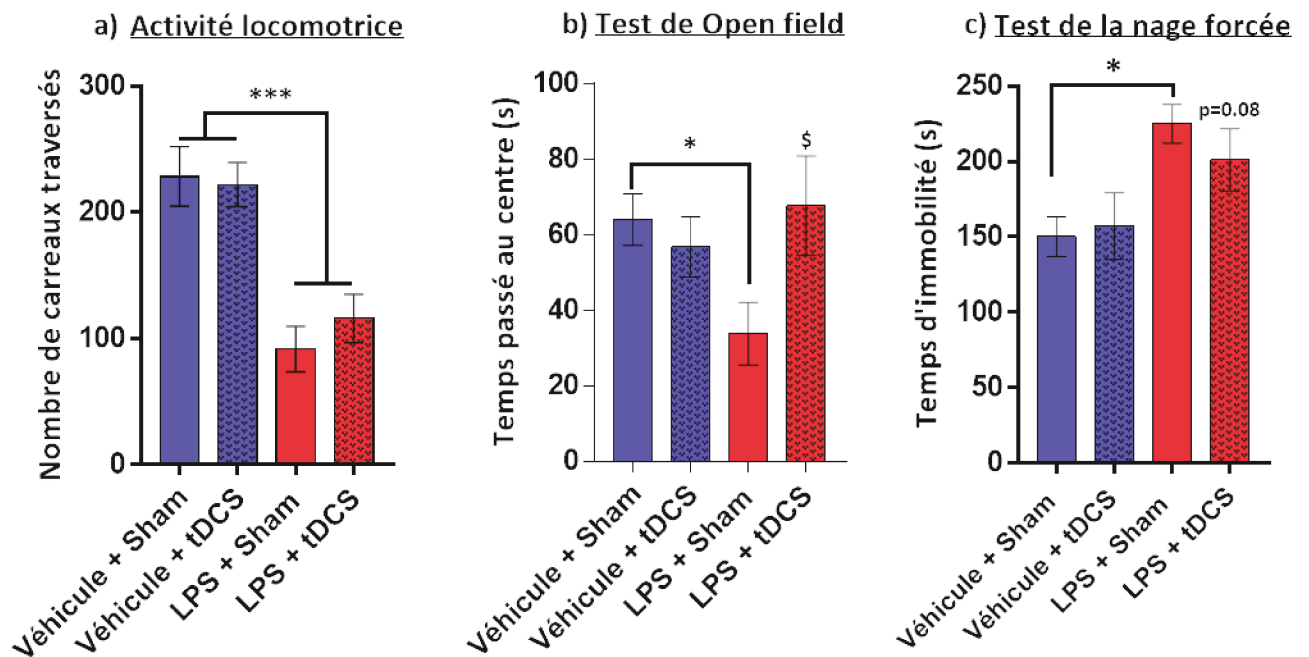


Figure 37 : Effet de la tDCS sur les comportements de type anxio-dépressif dans le modèle LPS. (a) activité locomotrice mesurée par le nombre de zones de l'open field traversées, (b) comportement de type anxieux mesuré par le temps passé au centre de l'open field et (c) le temps d'immobilité dans le FST. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM (*) $p < 0.001$, \$ et*) $p < 0.05$.**

En résumé, une injection de LPS induit des comportements associés à la dépression dans le test de la nage forcée. De plus, la tDCS permet de reverser l'effet dépressif du LPS, indiquant une possible modulation des processus inflammatoires par la tDCS.

4 PUBLICATION 2: TDCS NORMALIZED DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIORS AND INFLAMMATORY MODULATIONS INDUCED BY UNPREDICTABLE CHRONIC MILD STRESS IN MICE.

Afin de mieux comprendre les effets de la tDCS et d'identifier les potentielles modulations de la réponse inflammatoire par la tDCS, nous avons mis en place le modèle de stress chroniques imprédictibles (UCMS) au laboratoire. Les souris sont exposées à différents stress de faible intensité (Tableau 3) de façon imprédictible et aléatoire pendant 9 semaines. Les souris, parallèlement à la poursuite des stress, reçoivent 1 stimulation tDCS par jour pendant 10 jours (du lundi au vendredi pendant 2 semaines). L'état de la fourrure est évalué chaque semaine, comme le poids, afin de rendre compte de l'évolution de l'état émotionnel de la souris. Des tests comportementaux additionnels (Splash test, préférence au sucrose, NSF, FST) sont réalisés 3 semaines après la dernière stimulation. Parallèlement à cette évaluation de l'état anxio-dépressif de la souris, des prélèvements sanguins sont réalisés en début d'expérimentation, avant le début des stimulations, immédiatement et après 3 semaines de stimulation. De même, les rates et cerveaux de chaque souris sont prélevés à la fin de l'expérimentation afin d'explorer l'impact de la procédure de stress chronique puis de la tDCS sur les marqueurs de l'inflammation.

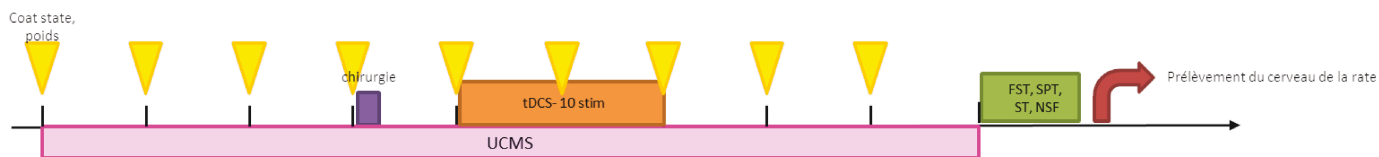


Figure 38 : Protocole d'étude des effets comportementaux de la tDCS chez le modèle murin de stress chronique imprédictible (UCMS). Les stress chroniques sont réalisés pendant 9 semaines. Les animaux sont stimulés après 4 semaines à raison de 10 séances de stimulation de 20 min à 200 μ A. Un test de l'état du pelage et une pesée de l'animal (flèche jaune) sont réalisés chaque semaine. L'évaluation des comportements de type anxio-dépressif se fait 3 semaines après la fin des stimulations par le test de l'état du pelage (CT-coat state), test de préférence au sucrose (SPT), splash test (ST), test d'hypophagie induit par la nouveauté (NSF) et test de nage forcée (FST). A la fin de la manipulation les rates et les cerveaux des souris sont prélevées pour analyse des marqueurs pro-inflammatoire.

Résultats :

- *Altération comportementales et physiologiques des souris soumises à la procédure d'UCMS*

Les souris soumises à la procédure d'UCMS montrent une altération significative des scores obtenus aux test du coat state, au NSF et au FST. L'état du pelage se dégrade significativement chez ces animaux à partir de la 3^{ème} semaine, cette dégradation persiste jusqu'à la fin de l'expérimentation. L'UCMS augmente significativement la latence de première ingestion dans le test NSF, caractéristique d'un comportement de type anxieux. Enfin le temps d'immobilité est significativement augmenté

après 9 semaines d'UCMS. Le score d'émotivité, construit par la méthode du z-score en combinant les données issues du FST, du NSF et du splash test, est également significativement augmenté chez les souris stressées.

D'un point de vue inflammatoire, les souris soumises à la procédure d'UCMS présentent une augmentation significative du nombre de cellules dans la rate, de lymphocytes T régulateurs et de lymphocytes Th1, ainsi que les pourcentages de cellules dendritiques plasmacytoïdes, de cellules dendritiques conventionnelles et de macrophages.

- *Effet de la tDCS sur les altérations induites par l'UCMS*

Les altérations induites par l'UCMS dans le NSF et le coat state ne sont pas réversées par la tDCS. En revanche, la tDCS induit une augmentation significative du temps de léchage dans le splash test comparativement aux autres groupes. De plus, le temps d'immobilité dans le FST est significativement diminué dans le groupe UCMS-tDCS comparativement au groupe UCMS, il est alors comparable au temps d'immobilité observé dans les groupes non stressés. Ces deux résultats vont dans le sens d'un effet antidépresseur de la tDCS chez les animaux soumis à l'UCMS, effet confirmé par la diminution significative du z-score dans le groupe UCMS-tDCS par rapport au groupe UCMS non stimulé.

Toutes les modifications immunitaires induites par la procédure d'UCMS décrites précédemment sont normalisées par la tDCS, à l'exception du pourcentage de cellules dendritiques conventionnelles.

Conclusion:

Le premier résultat majeur de ce travail est la démonstration de l'effet antidépresseur de la tDCS dans le modèle UCMS. Le modèle UCMS est un modèle de dépression présentant l'une des plus grandes validités et il a été largement utilisé pour montrer l'effet thérapeutique des antidépresseurs. Nos résultats nous permettent donc d'argumenter à nouveau en faveur du potentiel thérapeutique de la tDCS. Ce résultat nous permet également de « valider » le dispositif tDCS que nous utilisons chez l'animal puisqu'il semble induire des modifications comportementales assez constantes dans les différents modèles.

Le second résultat majeur réside dans la démonstration que l'effet comportemental de la tDCS est accompagné d'une modification des processus inflammatoires. En effet l'effet pro-inflammatoire de la procédure d'UCMS est réversé, en partie, par le traitement par tDCS. Cette observation met en évidence un nouveau mécanisme d'action de la tDCS, peu connu jusqu'alors, et démontre toute la complexité de cette technique mais également toute l'étendue de son champ d'action.

tDCS normalized depressive-like behaviors and inflammatory modulations induced by unpredictable chronic mild stress in mice

Peanlikhit T¹, Bonnefoy F³, Perruche S³, Haffen E^{1,2}, Monnin J^{1,2*}, Etiévant A^{1*}

1. Laboratoire de Neurosciences Intégratives et cliniques, EA481, Université Bourgogne Franche-Comté, Université de Franche-Comté, F-25000 Besançon, France
2. CHU Besançon, INSERM, CIC 1431, Centre d'Investigation Clinique, Besançon, France.
3. Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

ABSTRACT

There is an urgent need for new hypotheses concerning the pathophysiology of depression and alternative strategies such as transcranial stimulations. Here we propose to further investigate the effects of tDCS and to identify the possible inflammatory processes induced by this nervous modulation technique in the UCMS model of depression in mice.

Balb/c mice were submitted to the UCMS procedure or the enriched environment during 9 weeks, and were treated by 10 sessions of active or sham tDCS. Depressive-like and anxiety-like behaviors were assessed during and after the procedures. Additionally, mice spleens were removed at the end of the experiment to quantify the expression and activation of the different inflammatory cell types.

Our results showed that (i) the UCMS procedure induced behavioral alterations in the coat state test, the novelty suppressed feeding and the forced swim test, as well as inflammatory modifications (i.e. upregulation of dendritic cells and T cells (Treg and th1)); (ii) tDCS was able to reverse both these behavioral and inflammatory modifications.

These data support the inflammatory hypothesis of depression and bring new insight in the physiological modulations induced by tDCS.

INTRODUCTION

Available pharmacological treatments for major depression remain unsatisfactory because of their delayed onset of action and their partial therapeutic efficacy. Therefore, there is an urgent need for new hypothesis concerning the pathophysiology of depression and alternative therapeutic strategies for treatment-resistant patients. An increasing number of studies suggest that depression is associated with the activation of the inflammatory immune system (1,2). More precisely, clinical studies reported that many depressed patients were found to have increased C-reactive protein (CRP) and elevated levels of several pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF α), interleukin-6 (IL-6), IL-10 and IL-1 β in their peripheral blood and cerebrospinal fluid (3–7). A recent study demonstrated that old depressed patients displayed a higher plasma concentration of several immune markers using multiplex assay (8). Furthermore, antidepressant treatments have been found to have anti-inflammatory effects in depressed patients (9) by promoting anti-inflammatory cytokine IL-10 (10,11). Peripheral administration of inflammatory cytokines to non-depressed patients (e.g. immunotherapy) induces depressive symptoms (12–14) as well as anti-inflammatory drugs have been shown to reduce depressive symptoms in patients with medical illness (e.g. cancer) or depressive disorder (15–17). Finally, inflammatory markers have been recently associated with antidepressant treatment non-responsiveness since a large part of patients suffering from resistant depression exhibited high CRP levels (18–21).

The relation between inflammation and depression suggested by these findings has also been supported by studies in rodents. Mice submitted to social stress exhibited an increase in cytokines and corticosterone levels in peripheral blood (22–24). Moreover, in the lipopolysaccharide model of depression, antidepressant treatments have been found to have anti-inflammatory effects characterized by a decrease in TNF α and IL-1 β blood levels (25,26). Few studies have shown that chronic mild stress (CMS) procedure, a well validated rodent model of depression which mimic physical, behavioral, biochemical and physiological aspect of depressive-like symptoms in mice (27,28), enhanced pro-inflammatory cytokines levels (e.g. TNF α , IL1 β) in blood plasma and CSF and activated NLRP3 inflammasome (29–33). Interestingly, authors also reported antidepressant efficacy of several anti-inflammatory compounds in this rodent model of depression (29,30,34). Finally, the blockade of NLRP3 inflammasome reversed stress-induced increase of IL-1B in the brain and peripheral blood, and suppress depressive-like behavior in mice (32).

To enhance the therapeutic care of depression, new hypothesis are essential but had to be completed by novel approaches. In this context, several researches focused on alternative therapeutic strategies for treatment-resistant depressed patients such as transcranial direct current stimulation (tDCS). This non-invasive brain neuromodulation modality seems to be effective in major

depression (35,36). However, if tDCS could alleviate symptoms in depressed patients through anodal stimulation over the left dorsolateral prefrontal cortex (37–41), several data reported a modest clinical efficacy (for review, (42)) and this could be explained by the lack of information concerning tDCS mechanisms of action. tDCS is known to induce non-synaptic and synaptic modulations (43) but more animal studies are needed. We have already shown that tDCS was able to induce long-lasting antidepressant-like effects in naive and CORT (chronic administration of corticosterone) mice (44,45). Here, we aimed to (i) confirm the antidepressant-like effect of tDCS in another depression model, the UCMS (unpredictable chronic mild stress), (ii) assess inflammatory modulations in this model of depression to test the inflammatory hypothesis and (iii) determine if tDCS-induced behavioral modulation were supported by inflammatory modifications.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

1. Animals

Forty male BALB/c mice weighting 25-30 g at their arrival (Janvier, Laval, France) were kept under standard laboratory conditions (12:12 hour light/dark cycle) with food and water available *ad libitum*. Because of the surgery (jack's fixation), stimulated and control mice were housed individually. All procedures met the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the University of Franche-Comté Animal Care and Use Committee.

2. UCMS

Our procedure, adapted from Belzung et al (33,46) (Nollet et al. 2013; Farooq et al. 2012a), is a variation of chronic stress procedure described in rats by Willner et al (27) as a naturalistic rodent model of depression. This protocol consisted in the chronic exposure of mice to various randomly scheduled, low-intensity social and environmental stressors (e.g. tilting cage, wet sawdust, predator sounds and restrain stress). The application of different stressors was randomized each week to maximize the degree of unpredictability. Twenty mice were subjected to UCMS (UCMS group) and twenty other mice were kept under control conditions (control group - no stressors, one mouse per cage).

3. Surgery and stimulation

A tubular plastic jack (internal diameter: 2.1 mm) was surgically fixed onto the skull one week before the stimulation protocol. Animals were anesthetized with ketamine hydrochloride/xylazine (80mg/kg and 12mg/kg respectively; i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. The center of the plastic jack was positioned over the left frontal cortex [+1 mm antero-posterior and 1 mm left to the bregma,

according to Paxinos and Watson (47)] and fixed with glass ionomer cement (GC Corporation). The jack was filled with saline solution (NaCl 0.9%) before the stimulation to establish a contact area of 3.5 mm² toward the skull. The stimulation electrode (anode, DIXI Microtechniques, Besançon, France) was screwed into the tubular jack. A larger conventional rubberplate electrode (cathode, 4 cm²; Physiomed Elektromedizin AG, Schnaittach, Germany) served as the counter electrode and was placed onto the ventral thorax using a jacket. Animals were under light anesthesia with isoflurane during the tDCS protocol. Mice received 10 stimulations (1 stimulation per day for ten days). An anodal 20 min constant current of 0.2 mA was applied transcranially over the frontal cortex (adapted from (44,45) using a DC-stimulator Plus (NeuroConn, Ilmenau, Germany). Sham animals were subjected to the same procedures (surgery, anesthesia), but current was not delivered. Experimental groups were then constituted as follow: UCMS/sham (n=10), UCMS/tDCS (n=10), control/sham (n=9), control/tDCS (n=10).

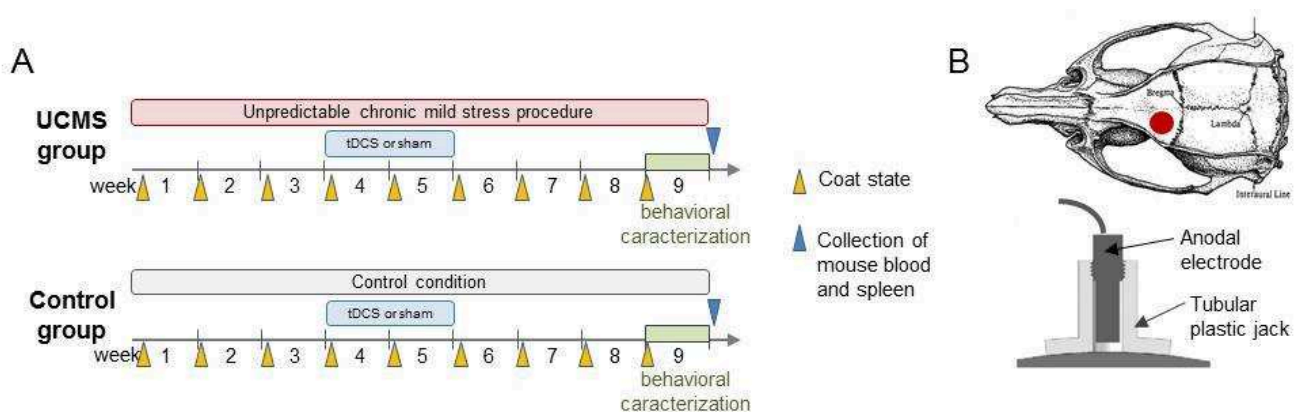


Figure 1. (A) A 9-week UCMS procedure was conducted. Transcranial direct current stimulation (tDCS) was done the fourth and fifth week (1 stim/day for 10 days) on half of UCMS and control mice. Experimental groups were constituted as follow: UCMS/sham, UCMS/tDCS, control/sham, control/tDCS. Each group consisted of 9–10 mice. Fur state was assessed every week and several behavioral tests (splash test, NSF, FST) were conducted during the last week of UCMS procedure. At the end of the protocol, blood and spleen collection was performed **(B)** A tubular plastic jack is surgically fixed onto the skull over the left frontal cortex and filled with saline solution before the stimulation. The stimulation electrode (anode) is screwed into the tubular plastic jack and dip in the saline solution (45).

4. Behavioral tests

Coat state

The coat state is a function of grooming and was used as a weekly measure of the animal's motivation toward self-directed behaviors. The total score given for coat state was obtained by attributing a score of 0 (smooth and shiny fur) to 1 (dirty fur) from six body part (neck, back, abdomen, tail forepaws and hind paws). Intermediate scores are possible. The coat state of each mouse was evaluated every Monday morning during 9 weeks.

To determine the behavioral effect of UCMS procedure and tDCS, three behavioral tests were performed during the 9th week of UCMS, 3 weeks after the last stimulation: the splash test, the novelty-suppressed feeding test and the forced-swim test.

Splash test

The splash test is a quantitative measure of spontaneous grooming behavior. A high viscosity 10% sucrose solution was sprayed on the back of the mouse. Mouse returned in its homecage and the latency to initiate the first grooming behavior as well as the duration of grooming over 5 min period was quantified.

Novelty-suppressed feeding test

The latency to begin eating a pellet of food in a frightening environment is considered as a measure of anxio/depressive-like behavior. Animals were food-deprived for 24h prior to behavioral testing. Mice were individually placed in a brightly illuminated plastic box (50 cm ×40 cm × 20 cm) covered with wooden bedding. A single food pellet (regular chow) was placed on a white paper platform positioned in the center of the arena. The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet with the use of forepaws) was timed. The NSF test was carried out during a 5 min period.

Forced-swimming test

The forced-swim test (FST) (48) is a well validated test which is interpreted as a measure of behavioral despair. Each mouse was placed into a glass cylinder (height 26 cm, diameter 18 cm) containing water at a temperature of 32 +/- 2 °C and a depth of 15 cm. Each test lasted 6 min and was video recorded for subsequent scoring of the total time spent immobile by a blind observer. Mice were considered immobile when they ceased struggling and remained floating motionless in the water.

Behavioral Emotionality Measurement

Three behavioral tests (i.e., FST, NSF, and Splash Test) were used to measure components of animal behavioral emotionality as elegantly published (49–51). These authors clearly explain what is the 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 investigate the treatment effects in the UCMS model. 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).

$$Z = (X - \mu) / \sigma$$

Z scores for behavioral measures were first averaged within the test and then across the test for equal weighting of the three tests comprising the final emotionality score. The increased behavioral emotionality was defined as increased immobility in the FST, increased NSF latency and decreased grooming in the splash test compared with control group means. 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 anxiety/depression-like phenotype."

Cell analysis and cytometry

Spleens were harvested, dissociated, and erythrocytes were removed by osmotic shock. After washing with PBS, spleen cells were suspended in DMEM culture medium [DMEM + Glutamax-I (Life Technologies, Gaithersburg, MD)] supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES buffer (Sigma Aldrich), 10 mM nonessential amino acids (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma Aldrich). After plating, cells are stimulated during 4 h with 50 ng/mL of phorbol myristate acetate and 1 µg/mL of ionomycin and brefeldin A (1 µL/mL/10e6 cells; BD Pharmingen). Expression of Foxp3, IL-17 and IFN γ were evaluated by cytometry in CD4 T-cell population.

Percentage of antigen-presenting cells (APC): conventional DC (CD11c+), Plasmacytoid DC (mPDCA+ Siglec-H+) and macrophages (CD11b+) and the expression of co-stimulatory molecule CD80, CD86, CD40 and MHC class II IA/IE were evaluated directly on the fresh cells of the spleen by flow cytometry.

Statistical analysis

All results were expressed as means \pm standard errors of the mean (S.E.M). A repeated two way ANOVA [factor "stress" (sham or UCMS) and factor "treatment" (sham or tDCS)] was used to analyze the effects of UCMS and tDCS on coat state during the 9th weeks of the experiment. Two way ANOVA [factor "stress" (sham or UCMS) and factor "treatment" (sham or tDCS)] were used to analyze the effects of UCMS and tDCS on immobility time in the forced-swim test, total grooming in the splash test, latency to feed in the novelty suppressed feeding test and on the emotionality score. Significant main effects were followed by Fisher's Post hoc test. With regards to the NSF test, we used the

Kaplan–Meier survival analysis. Mantel–Cox log rank test was used to evaluate differences between experimental groups. One-way ANOVA was used to analyze the effects of UCMS and tDCS on the number of cells in the spleen and on several markers of inflammation. Tukey's Multiple Comparison test was used for post-hoc analysis. Statistical differences were set at $p < 0.05$.

RESULTS

1- Behavioral effect of tDCS on UCMS-induced anxio/depressive-like phenotype.

A repeated two way ANOVA revealed a significant main effect of UCMS ($F_{(1,35)} = 245$; $p < 0.0001$) on the fur coat state of mice. In the same way, two way ANOVAs revealed a significant main effect of UCMS in the NSF test ($F_{(1,35)} = 11.01$; $p = 0.002$), a significant interaction between UCMS and tDCS ($F_{(1,35)} = 6.66$; $p = 0.014$) and a significant main effect of tDCS ($F_{(1,35)} = 5.49$; $p = 0.024$) in the FST and a significant interaction between UCMS and tDCS ($F_{(1,35)} = 4.34$; $p = 0.044$) and a significant main effect of UCMS ($F_{(1,35)} = 6.29$; $p = 0.016$) in the splash test.

Secondary analysis demonstrated that UCMS induced depressive-like phenotype in mice, as demonstrated by significantly higher coat state scores in stressed group compared to control group, starting from the second week of stress exposure until week 9 (Fig 2A, $F_{(8,280)} = 23.02$; $p < 0.001$). In the same way, mice submitted to UCMS for 9 weeks developed anxio/depressive-like behaviors in the FST and NSF (Fig. 2B and 2C). Indeed, an increase of immobility duration in the FST ($p = 0.040$) and an increase in the latency to feed ($p = 0.034$, $p = 0.047$ for the insert bart chart) is observed in UCMS/sham group compared to control/sham group. No difference of grooming frequency was observed in the splash test in our conditions between UCMS and control groups (Fig. 2D).

If tDCS failed to improve coat state ($F_{(8,280)} = 0.79$; $p = 0.60$) or latency to feed in the NSF of stressed mice ($p = 0.40$, $p = 0.86$ for the insert bart chart) in UCMS/tDCS group compared to UCMS/sham group, it reversed the UCMS-induced increase of time immobility in the FST ($p = 0.0407$). Interestingly, tDCS enhanced grooming duration of UCMS mice in the splash test ($p = 0.0142$ UCMS/tDCS group vs UCMS/sham group) suggesting that tDCS promote self-care and grooming (and thus, have antidepressant-like effect).

Using z-score methodology, we combined results obtained in these complementary tests (FST, NSF, Splash test) to have a better estimation of mouse behavioral emotionality. A two way ANOVA on data obtained applying z-normalization across tests revealed a significant interaction between UCMS and tDCS ($F_{(2,35)} = 4.69$; $p = 0.037$). Secondary analysis demonstrated that UCMS induced an increase in emotionality score highlighting the anxio-depressive-like phenotype of mice (Fig. 2E, $p = 0.0059$

control/sham group vs UCMS/sham group). Interestingly, tDCS decreased UCMS-induced anxiodepressive-like behaviors in mice, as measured by a decrease in emotionality score ($p=0.0017$ UCMS/sham group vs UCMS/tDCS group).

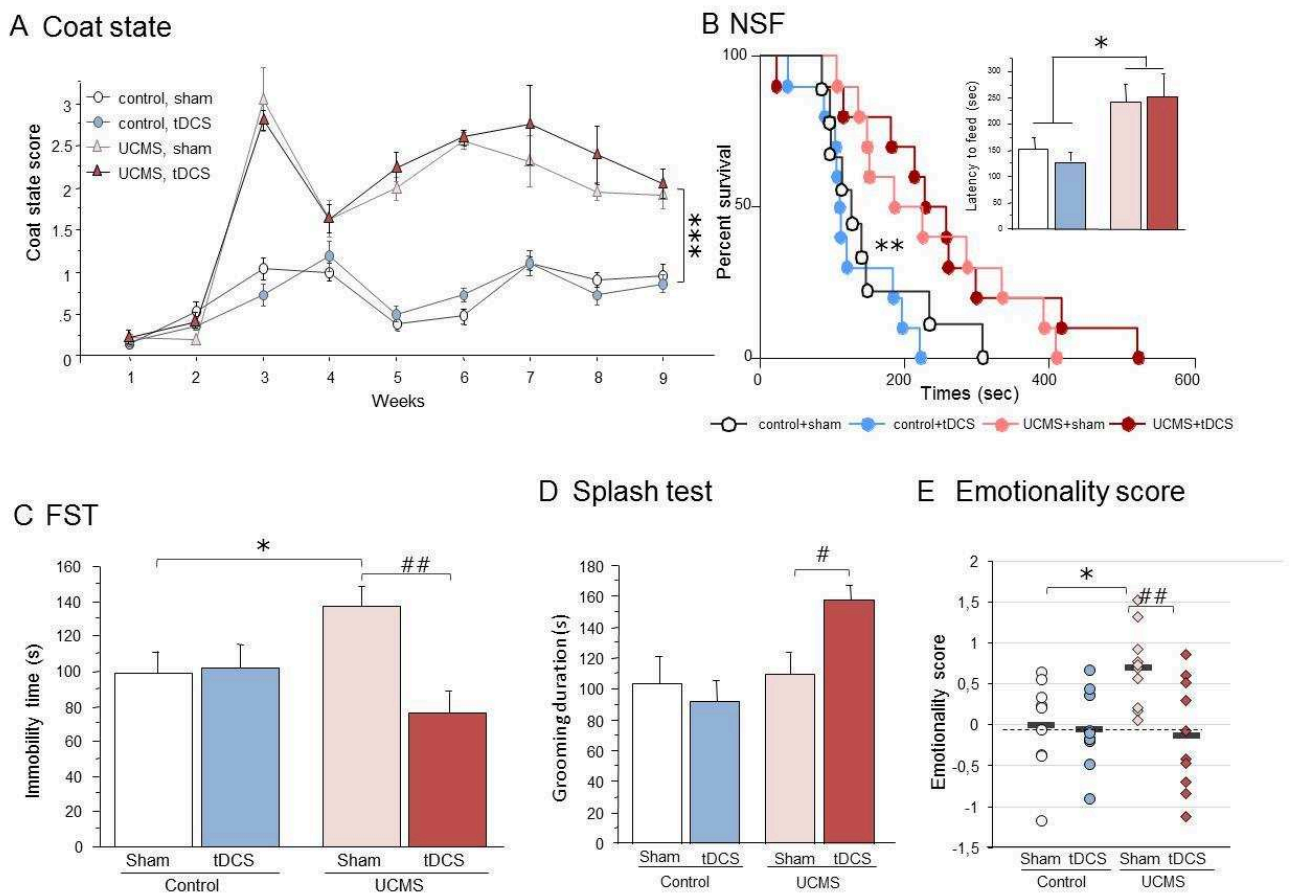


Figure 2. 9 weeks of UCMS procedure induced anxiodepressive-like behaviors, some of which are normalized 3 weeks after tDCS treatment. **(A)** Effect of UCMS and tDCS on the coat state scores over 9 weeks. Results are expressed as mean±SEM of coat state score. *** $p<0.0001$ **(B)** Effect of UCMS and tDCS on anxiety and depression related behaviors in the Novelty Suppressed Feeding test. Results are expressed as cumulative survival with percentage of animals that have not eaten over 10 min or mean±SEM of latency to feed in seconds (insert). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. **(C)** Effect of UCMS and tDCS on depressive-like behaviors in the Forced Swimming Test. Results are expressed as mean±SEM of immobility duration. * $p<0.05$ and ### $p<0.01$ **(D)** Effect of UCMS and tDCS on depression related behaviors in the splash test. Results are expressed as mean±SEM of grooming duration (in seconds). # $p<0.05$ **(E)** tDCS normalized UCMS-induced increase in emotionality z-score.* $p<0.05$ and ### $p<0.01$. $n=9, 10, 10, 10$ for the 4 different groups; control/sham, control/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS.

2- UCMS induced inflammatory processes that are normalized by tDCS.

Spleen of mice were removed at the end of the experiment to analyze the expression rates of the different inflammatory cell types and their activation markers. The spleen is a secondary lymphoid organ that plays a major role in the implementation of the inflammatory response.

As highlighted in figure 3A, UCMS increased the total number of spleen cells 9 weeks after the beginning of experiments, suggesting that UCMS triggered pro-inflammatory and anti-inflammatory processes. This cellular augmentation was normalized in mice exposed to 10 sessions of tDCS. Considering the T cell polarization, we observed an increase of pro-inflammatory Th1 and regulatory T cells (Treg, Fig. 3B and 3C). The numbers of Treg and Th1 returned to the basal level in the spleen of mice submitted to tDCS. The percentage of different T cell population did not vary in the spleen (data not shown). The flow cytometry analysis reported a strong increase in the percentage of the different populations of antigen presenting cells (plasmacytoid DC, conventional DC and macrophage) after UCMS (Fig. 3D, 3E and 3F). The tDCS treatment reduced this percentage to a normal state for macrophages and plasmacytoid DC. The expression of maturation marker was not modulating by UCMS or tDCS in this experiment (data not shown).

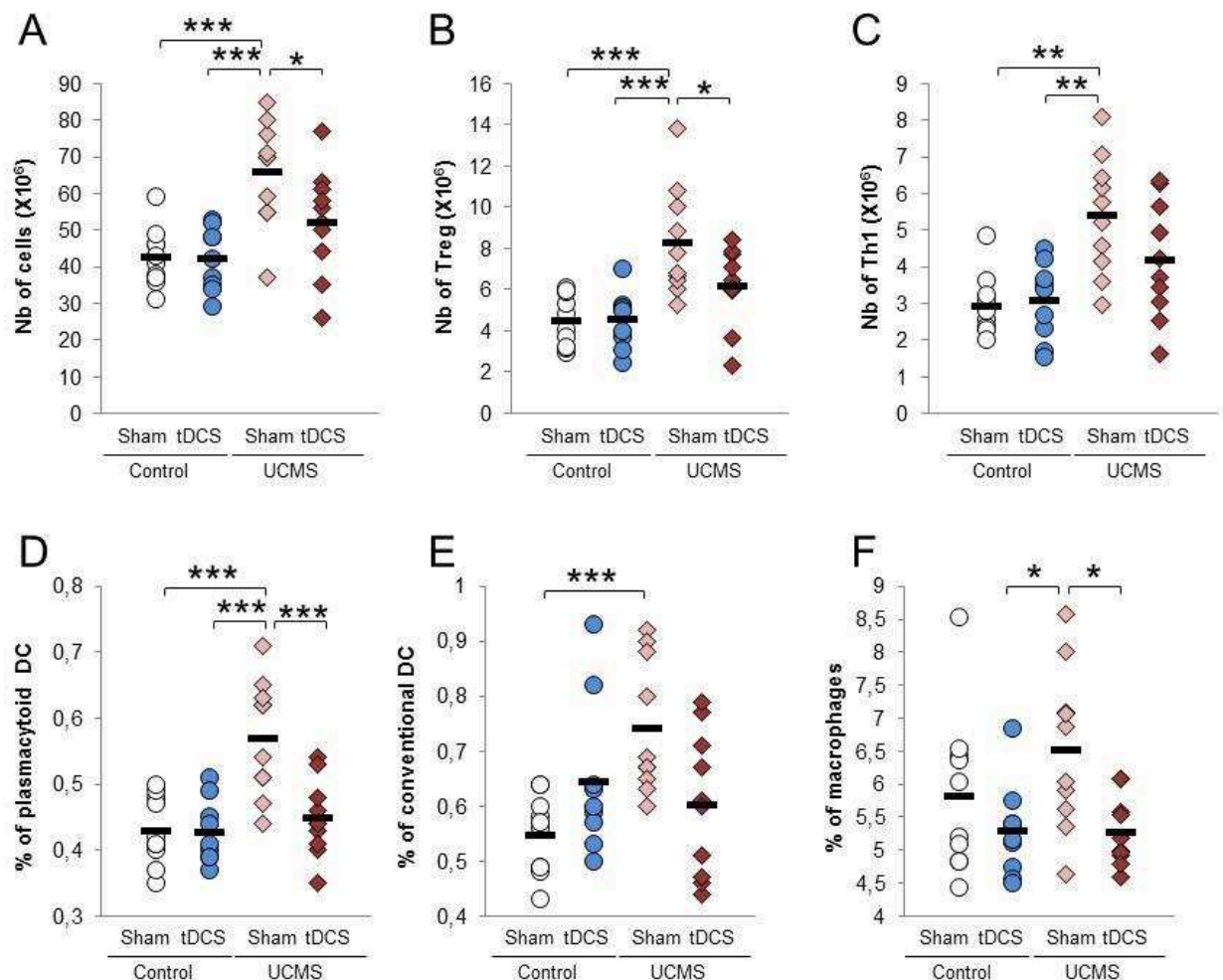


Figure 3. 9 weeks of UCMS procedure trigger inflammatory response that is normalized 3 weeks after tDCS treatment. Effect of UCMS and tDCS on the total number of spleen cells (A), the number of regulatory T cells Th1 (B) and Treg (C), and the percentage of plasmacytoid DC (D), conventional DC (E) and macrophage (F). Results are expressed as mean±SEM. n=9, 10, 10, 10 for the 4 different groups; control/sham, control/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.0001.

3- Correlation between emotionality score and number of splenic cells in UCMS model; prediction of the depressive-like phenotype by alteration of the inflammatory response

To determine the relationship between depressive-like behaviors and the development of inflammatory response, we tested the correlation between the emotionality score and the total number of cells in the spleen in stressed and non-stressed mice that did not received tDCS. As highlighted in figure 4, emotionality score is positively correlated with the number of splenic cells ($R=0.440$; $p=0.04$). The severity of behavioral alterations increased with the number of splenic cells, thus with the inflammatory response.

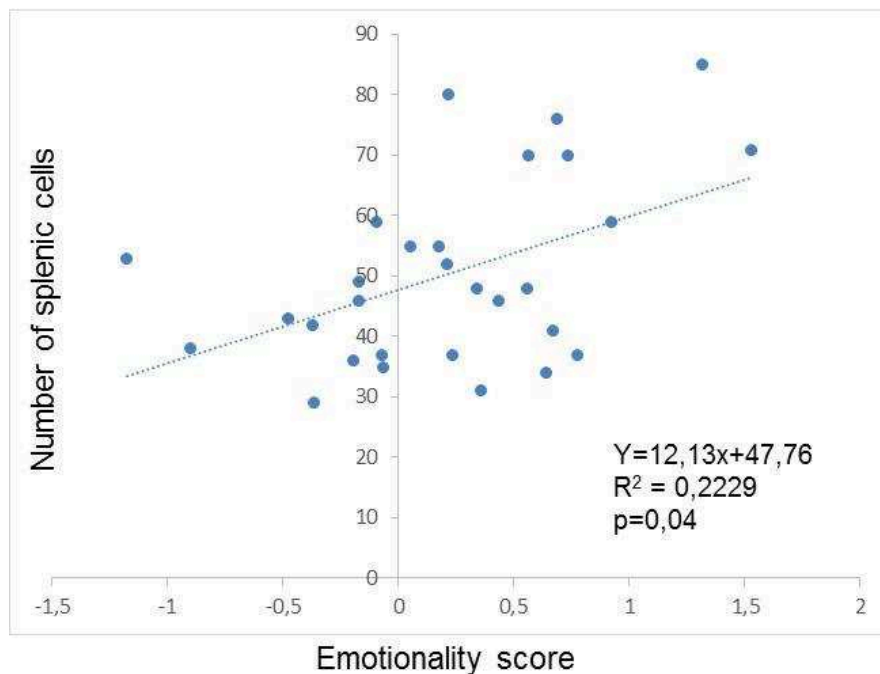


Figure 4. Correlation between depressive-like behaviors (emotionality score) and the total number of spleen cells in mice of control/sham and UCMS/sham. $R^2 = 0.2229$ and $p=0.04$ using Pearson correlation.

DISCUSSION

The aims of this study were to determine if tDCS had behavioral antidepressant-like effects in UCMS mice and if it was associated with inflammatory modulations.

The first noticeable finding was that tDCS was able to reverse the behavioral alterations induced by the UCMS procedure, and it was particularly relevant when combining results of the forced swim test, the novelty suppressed feeding and the splash test using the z-score method. To our knowledge, it is the first time that the antidepressant-like effect of tDCS is shown in this very popular model of

depression. We have already demonstrated that tDCS was able to decrease the immobility time in the FST in healthy mice 3 days and 3 weeks after the end of the stimulation (44,45). This modification of the depressive-like behavior has also been observed in mice submitted to an abstinence period after chronic nicotine consumption (45). Furthermore, in our last publication, we stimulated mice during a chronic exposure to corticosterone (CORT) and tDCS was able to alleviate the increase of the immobility time in the FST induced by the CORT exposure (52). Finally, Monai *et al.* observed the same effect of tDCS in mice submitted to chronic restraint stress in the tail suspension test, and a single session was sufficient to induce this effect (53). The interest of such findings is, first, to argue in favor of the therapeutic potential of tDCS in the treatment of depression. We are aware that many clinical trials are and, have been, performed in depressed patients, with better clinical relevance than animal studies, but given the heterogeneity of the conclusions, a positive finding could be welcome. However, in our opinion, the most important impact of the observation of the antidepressant-like effect of tDCS in UCMS as well as healthy, CORT and restrained mice, is that the transposition of the technique to animal is reliable and that it could be used in several pathological models, using many methods to deeply investigate its therapeutic potential and physiological effects.

That is in line with the second and most noticeable finding of this paper: tDCS was able to reverse the inflammatory modifications induced by the UCMS procedure. Indeed, UCMS mice exhibited a significant elevation of the number of splenic cells in comparison with control mice whereas stimulated UCMS mice had a number of splenic cells similar to control animals. The increase of the number of cells in the spleen corresponds to an active inflammatory status in UCMS mice. Our results did not allow for a detailed description of the ongoing inflammatory processes and further investigations are needed, but these data suggested that UCMS induced pro-inflammatory and anti-inflammatory processes. The inflammatory modifications induced by the UCMS procedure have already been described in the literature, corroborating the inflammatory hypothesis of depression : the UCMS procedure induced overexpression of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β , IL-6 and NLRP3 receptor as well as the activation of cerebral microglia and NF κ B pathway (54–57). More interestingly, UCMS rodents exhibit alterations of the kynurenine pathway, one of the putative mechanisms linking inflammation and depression. Tryptophane is metabolized through two different pathways, the first one leads to its degradation in serotonin and the second one leads to the production of kynurenines after activation of different enzymes, including indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO1). It is hypothesized that the overexpression of pro-inflammatory cytokines leads to the activation of IDO1 that have multiple consequences: (1) decrease of the serotonin production, (2) overexpression of the kynurenine metabolites such as kynurenic acid (KA), 3-hydroxykynurenine (3HK) and quinolinic acid (QA). KA is neuroprotective whereas 3HK and QA have neurotoxic

properties and the balance between these two types of metabolites seems to be particularly involved in the pathophysiology of depression (58). Concerning UCMS, it has been shown that the UCMS procedure was associated with an increase of IDO1 expression (56,59,60) and QA levels. The excitotoxicity risk evaluated with the QA/KA ration was also augmented in UCMS rats (59).

tDCS stimulations were responsible for the normalization of the UCMS induced inflammation, and that means that aside from activating neurons, this transcranial stimulation technique also acted on the immune systems. In vitro studies have highlighted that when cultured immune cells were submitted to electric current fields, they exhibited an accelerated and polarized migration. This has been observed in cultures of lymphocytes, monocytes, neutrophils, macrophages and polynuclear cells (61). Furthermore, high intensity electric currents are able to induce an inflammatory response in quiescent glial cells, characterized by an overexpression of cyclooxygenase 2 (cox2) (62). In animal studies, few data are in line with the modulation of the immune pathway by tDCS. In healthy rats, a 5 to 10 days anodal or cathodal stimulation at 500 μ A during 15 min enhanced the expression of Iba1 in microglial cells in the ipsilateral cortex, characteristic of an augmented innate immune response. The most significant results were obtained in chronic pain models. Two studies have shown that tDCS was able to alleviate the chronic pain induced overexpression of pro-inflammatory cytokines, concomitantly to the reversal of nociceptive behaviors (63,64) and this is in accordance with our observation in the UCMS depression model. We could expect that clinical data would be in line with these results, unfortunately, only two studies have focused on inflammatory markers on tDCS treated depressed patients and they failed to demonstrate any significant effect of the stimulation on the expression of cytokines or cytokines receptors (65–67).

The UCMS model is a well validated animal model of depression with good face, predictive and construct validity (68). We had already tested tDCS in the CORT model (52) but we thought it would be important to assess its effects in a more naturalistic model, such as UCMS. We could observe specific behavioral alterations due to the UCMS procedure, in the coat state, the FST and the NSF but we did not see any modification in the splash test. The UCMS procedure is a long experiment, several weeks of experimentation and several perturbations could occur in that period of time that could modify the reaction of rodents in the behavioral tests. Given this variability, we chose to use the z-score (69) in order to combine behavioral alterations and to have a measure of a multidimensional “emotional” state of the animal. We thought this emotional score to be more reliable and robust than a single measure of behavior.

Concerning the inflammatory markers assessed in this study, they are quite different as the ones usually used. Indeed, most researches focused on the peripheral or central cytokines concentrations whereas we focused on the splenic cells. Blood samples were performed during the experiments to

assess the expression levels of pro-inflammatory cytokines before and after UCMS procedure and tDCS stimulations but the results were not satisfying. First, it seemed that cytokines expression is very sensitive to the environment modifications and the underlying inflammatory processes are not easily identifiable. Furthermore, the samples were constituted of a very small number of cells and the observed differences (unpublished data) were considered to have no sufficient physiological significance ; data obtained after spleen removal, even if they are less common and need the euthanasia of the animal, appeared to have more physiological sense.

Conclusion

Here we demonstrated for the first time, that tDCS was able to reverse the depression-like state induced by the UCMS procedure in mice. Moreover, this behavioral effect was associated with a modulation of the immune system. These findings highlighted the therapeutic potential of this transcranial stimulation as well as its huge panel of mechanisms of action and physiological targets.

REFERENCES

1. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol.* janv 2016;16(1):22-34.
2. Liu CS, Adibfar A, Herrmann N, Gallagher D, Lanctôt KL. Evidence for Inflammation-Associated Depression. *Curr Top Behav Neurosci.* 2017;31:3-30.
3. Zhang H-X, Xu Y-Q, Li Y-Y, Lu M-F, Shi S-X, Ji J-L, et al. Difference in proinflammatory cytokines produced by monocytes between patients with major depressive disorder and healthy controls. *J Affect Disord.* 2018;234:305-10.
4. Zou W, Feng R, Yang Y. Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. *PloS One.* 2018;13(6):e0197267.
5. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 2010;67(5):446-57.
6. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med.* févr 2009;71(2):171-86.
7. Köhler CA, Freitas TH, Maes M, de Andrade NQ, Liu CS, Fernandes BS, et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatr Scand.* mai 2017;135(5):373-87.
8. Gaarden TL, Engedal K, Benth JŠ, Larsen M, Lorentzen B, Mollnes TE, et al. Exploration of 27 plasma immune markers: a cross-sectional comparison of 64 old psychiatric inpatients having unipolar major depression and 18 non-depressed old persons. *BMC Geriatr*
9. Hannestad J, Dellagioia N, Bloch M. The Effect of Antidepressant Medication Treatment on Serum Levels of Inflammatory Cytokines: A Meta-Analysis. *Neuropsychopharmacology [Internet].* 2011; Disponible sur:
10. O'Brien SM, Scott LV, Dinan TG. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol.* août 2004;19(6):397-403.
11. Dantzer R, Wollman E, Vitkovic L, Yirmiya R. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry.* juill 1999;4(4):328-32.
12. Bonaccorso S, Marino V, Biondi M, Grimaldi F, Ippoliti F, Maes M. Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *J Affect Disord.* déc 2002;72(3):237-41.
13. Capuron L, Gumnick JF, Musselman DL, Lawson DH, Reemsnyder A, Nemeroff CB, et al. Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of

- symptom dimensions. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. mai 2002;26(5):643-52.
14. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*. mai 2001;58(5):445-52.
 15. Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Ceroveckí A, Goldstein-Müller B, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry*. juill 2006;11(7):680-4.
 16. Abbott R, Whear R, Nikolaou V, Bethel A, Coon JT, Stein K, et al. Tumour necrosis factor- α inhibitor therapy in chronic physical illness: A systematic review and meta-analysis of the effect on depression and anxiety. *J Psychosom Res*. sept 2015;79(3):175-84.
 17. Köhler O, Benros ME, Nordentoft M, Farkouh ME, Iyengar RL, Mors O, et al. Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Psychiatry*. 1 déc 2014;71(12):1381-91.
 18. Huang M-H, Chen M-H, Tu P-C, Bai YM, Su T-P, Yang B-H, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha receptor subtype 1 and the association with abnormal brain function in treatment-resistant depression. *J Affect Disord*. 1 août 2018;235:250-6.
 19. Haroon E, Daguanno AW, Woolwine BJ, Goldsmith DR, Baer WM, Wommack EC, et al. Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 19 mai 2018;95:43-9.
 20. Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF, et al. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry*. janv 2013;70(1):31-41.
 21. Eurelings LSM, Richard E, Eikelenboom P, van Gool WA, Moll van Charante EP. Low-grade inflammation differentiates between symptoms of apathy and depression in community-dwelling older individuals. *Int Psychogeriatr*. avr 2015;27(4):639-47.
 22. Savignac HM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF. The effects of repeated social interaction stress on behavioural and physiological parameters in a stress-sensitive mouse strain. *Behav Brain Res*. 20 janv 2011;216(2):576-84.
 23. Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res*. 20 nov 2013;1539:73-86.
 24. Audet M-C, Jacobson-Pick S, Wann BP, Anisman H. Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain Behav Immun*. août 2011;25(6):1197-205.
 25. Ohgi Y, Futamura T, Kikuchi T, Hashimoto K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Pharmacol Biochem Behav*. févr 2013;103(4):853-9.
 26. Liu R-P, Zou M, Wang J-Y, Zhu J-J, Lai J-M, Zhou L-L, et al. Paroxetine ameliorates lipopolysaccharide-induced microglia activation via differential regulation of MAPK signaling. *J Neuroinflammation*. 12 mars 2014;11:47.
 27. Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16(4):525-34.
 28. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacol Berl*. 1984;83(1):1-16.
 29. Liu Y-N, Peng Y-L, -Liu L, Wu T-Y, Zhang Y, Lian Y-J, et al. TNF α mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw*. mars 2015;26(1):15-25.
 30. Xue J, Li H, Deng X, Ma Z, Fu Q, Ma S. L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav*. juill 2015;134:42-8.
 31. Pan Y, Chen X-Y, Zhang Q-Y, Kong L-D. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun*. oct 2014;41:90-100.
 32. Zhang Y, Liu L, Liu Y-Z, Shen X-L, Wu T-Y, Zhang T, et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 20 janv 2015;18(8).

33. Farooq RK, Isingrini E, Tanti A, Le Guisquet A-M, Arlicot N, Minier F, et al. Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res.* 16 mai 2012;231(1):130-7.
34. Karson A, Demirtaş T, Bayramgürler D, Balci F, Utkan T. Chronic Administration of Infliximab (TNF- α Inhibitor) Decreases Depression and Anxiety-like Behaviour in Rat Model of Chronic Mild Stress. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 1 mai 2013;112(5):335-40.
35. Mondino M, Bennabi D, Poulet E, Galvao F, Brunelin J, Haffen E. Can transcranial direct current stimulation (tDCS) alleviate symptoms and improve cognition in psychiatric disorders? *World J Biol Psychiatry.* 2014;15(4):261-75.
36. Brunoni AR, Moffa AH, Fregni F, Palm U, Padberg F, Blumberger DM, et al. Transcranial direct current stimulation for acute major depressive episodes: meta-analysis of individual patient data. *Br J Psychiatry J Ment Sci.* juin 2016;208(6):522-31.
37. Fregni F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin MA, Rigonatti SP, Pascual-Leone A. Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disord.* 2006;8(2):203-4.
38. Boggio PS, Rigonatti SP, Ribeiro RB, Myczkowski ML, Nitsche MA, Pascual-Leone A, et al. A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11(2):249-54.
39. Loo CK, Sachdev P, Martin D, Pigot M, Alonzo A, Malhi GS, et al. A double-blind, sham-controlled trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010;13(1):61-9.
40. Loo CK, Alonzo A, Martin D, Mitchell PB, Galvez V, Sachdev P. Transcranial direct current stimulation for depression: 3-week, randomised, sham-controlled trial. *Br J Psychiatry.* 2012;200(1):52-9.
41. Brunoni AR, Zanao TA, Vanderhasselt MA, Valiengo L, de Oliveira JF, Boggio PS, et al. Enhancement of affective processing induced by bifrontal transcranial direct current stimulation in patients with major depression. *Neuromodulation.* 2013;17(2):138-42.
42. Lefaucheur J-P, Antal A, Ayache SS, Benninger DH, Brunelin J, Cogiamanian F, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS). *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol.* janv 2017;128(1):56-92.
43. Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist.* 2011;17(1):37-53.
44. Peanlikhit T, Van Waes V, Pedron S, Risold P-Y, Haffen E, Etiévant A, et al. The antidepressant-like effect of tDCS in mice: A behavioral and neurobiological characterization. *Brain Stimulat.* août 2017;10(4):748-56.
45. Pedron S, Monnin J, Haffen E, Sechter D, Van Waes V. Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(4):981-8.
46. Nollet M, Le Guisquet A-M, Belzung C. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. *Curr Protoc Pharmacol.* juin 2013;Chapter 5:Unit 5.65.
47. Paxinos G, Franklin F. The mouse brain in stereotaxic coordinate. second edition. Academic Press; 2001.
48. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266(5604):730-2.
49. Mekiri M, Gardier AM, David DJ, Guilloux J-P. Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female c57bl6 mice. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2017;25(2):94-104.
50. Mendez-David I, Boursier C, Domergue V, Colle R, Falissard B, Corruble E, et al. Differential Peripheral Proteomic Biosignature of Fluoxetine Response in a Mouse Model of Anxiety/Depression. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:237.
51. Guilloux J-P, Seney M, Edgar N, Sibille E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods.* 15 avr 2011;197(1):21-31.
52. Peanlikhit T, Van Waes V, Pedron S, Risold P-Y, Haffen E, Etiévant A, et al. The antidepressant-like effect of tDCS in mice: A behavioral and neurobiological characterization. *Brain Stimulat.* août 2017;10(4):748-56.
53. Monai H, Hirase H. Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression. *Neurosci Res.* janv 2018;126:15-21.

54. Pan Y, Chen X-Y, Zhang Q-Y, Kong L-D. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun.* oct 2014;41:90-100.
55. Zhang Y, Liu L, Liu Y-Z, Shen X-L, Wu T-Y, Zhang T, et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 20 janv 2015;18(8).
56. Liu Y-N, Peng Y-L, Lei-Liu, Wu T-Y, Zhang Y, Lian Y-J, et al. TNF α mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw.* 2015;26(1):15-25.
57. López-López AL, Jaime HB, Escobar Villanueva MDC, Padilla MB, Palacios GV, Aguilar FJA. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiol Behav.* 01 2016;161:15-23.
58. Myint AM, Kim YK. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses.* déc 2003;61(5-6):519-25.
59. Martín-Hernández D, Tendilla-Beltrán H, Madrigal JLM, García-Bueno B, Leza JC, Caso JR. Chronic Mild Stress Alters Kynurenine Pathways Changing the Glutamate Neurotransmission in Frontal Cortex of Rats. *Mol Neurobiol.* 3 mai 2018;
60. Zhao X, Cao F, Liu Q, Li X, Xu G, Liu G, et al. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. *Behav Brain Res.* 29 mai 2017;
61. Pelletier SJ, Cicchetti F. Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: evidence from in vitro and in vivo models. *Int J Neuropsychopharmacol.* 31 oct 2014;18(2).
62. Pelletier SJ, Lagacé M, St-Amour I, Arsenault D, Cisbani G, Chabrat A, et al. The morphological and molecular changes of brain cells exposed to direct current electric field stimulation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7 déc 2014;18(5).
63. Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res [Internet].* 2012; Disponible sur:
64. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* 13 déc 2012;1489:17-26.
65. Brunoni AR, Padberg F, Vieira ELM, Teixeira AL, Carvalho AF, Lotufo PA, et al. Plasma biomarkers in a placebo-controlled trial comparing tDCS and escitalopram efficacy in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30 août 2018;86:211-7.
66. Brunoni AR, Machado-Vieira R, Sampaio-Junior B, Vieira ELM, Valiengo L, Benseñor IM, et al. Plasma levels of soluble TNF receptors 1 and 2 after tDCS and sertraline treatment in major depression: Results from the SELECT-TDCS trial. *J Affect Disord.* 1 oct 2015;185:209-13.
67. Brunoni AR, Machado-Vieira R, Zarate CA, Valiengo L, Vieira EL, Benseñor IM, et al. Cytokines plasma levels during antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation (tDCS): results from a factorial, randomized, controlled trial. *Psychopharmacology (Berl).* avr 2014;231(7):1315-23.
68. Farooq RK, Isingrini E, Tanti A, Le Guisquet A-M, Arlicot N, Minier F, et al. Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res.* 16 mai 2012;231(1):130-7.
69. Mendez-David I, Boursier C, Domergue V, Colle R, Falissard B, Corruble E, et al. Differential Peripheral Proteomic Biosignature of Fluoxetine Response in a Mouse Model of Anxiety/Depression. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:237.

5 RESULTATS COMPLEMENTAIRES CONCERNANT L'EFFET DE LA TDCS SUR LES COMPORTEMENTS DE TYPE DEPRESSIF ET LA REPONSE INFLAMMATOIRE INDUITS PAR LA PROCEDURE D'UCMS.

L'expérimentation présentée précédemment a été reproduites une fois. Nous présentons ici les résultats obtenus dans cette expérimentation. En effet, certains résultats comportementaux qui ne montraient pas de différence significative dans la première expérimentation, due à la procédure d'UCMS ou au traitement par tDCS, sont différents dans cette autre cohorte. Il nous est paru intéressant de présenter également ces différences. A l'inverse cependant, d'autres tests comportementaux ne montrent pas de différences significatives dans cette nouvelle expérimentation et notamment dans le FST. Les mesures des marqueurs de l'inflammation semblent quant à elles beaucoup plus robustes dans les différentes expérimentations.

5.1 Effet de la tDCS sur le poids et l'état du pelage dans le modèle UCMS

5.1.1 Etat du pelage :

Au cours des quatre premières semaines du protocole de stress, la répétition des stress induit la dégradation de l'état du pelage. L'ANOVA à un facteur à mesures répétées (Facteur « Stress » [Témoin vs UCMS]) révèle une interaction des facteurs "Stress" et "Temps" ($F_{(2,76)}=19,16$; $p<0.001$). L'analyse post hoc montre une différence significative entre les groupes Témoin et UCMS à partir de la semaine 2 ($p<0.001$) et jusqu'à la semaine 4 ($p<0.01$).

L'ANOVA à deux facteurs (facteur « Stress » [Témoin vs UCMS] et facteur stimulation [Sham vs tDCS]) et à mesures répétées montre un effet du facteur "UCMS" ($F_{(1,32)}=121.04$; $p<0.001$) et un effet du facteur "temps" ($F_{(3,96)}=10.44$; $p<0.001$) **entre la 4^{ème} et 8^{ème} semaine du protocole** sur l'état du pelage. Il n'y a pas d'effet significatif du facteur stimulation. L'analyse post hoc montre une augmentation du score, donc une dégradation de l'état du pelage des souris, chez les souris exposées aux stress, qu'elles reçoivent 10 sessions de stimulation par tDCS ou non. ($p<0.001$; Figure 39).

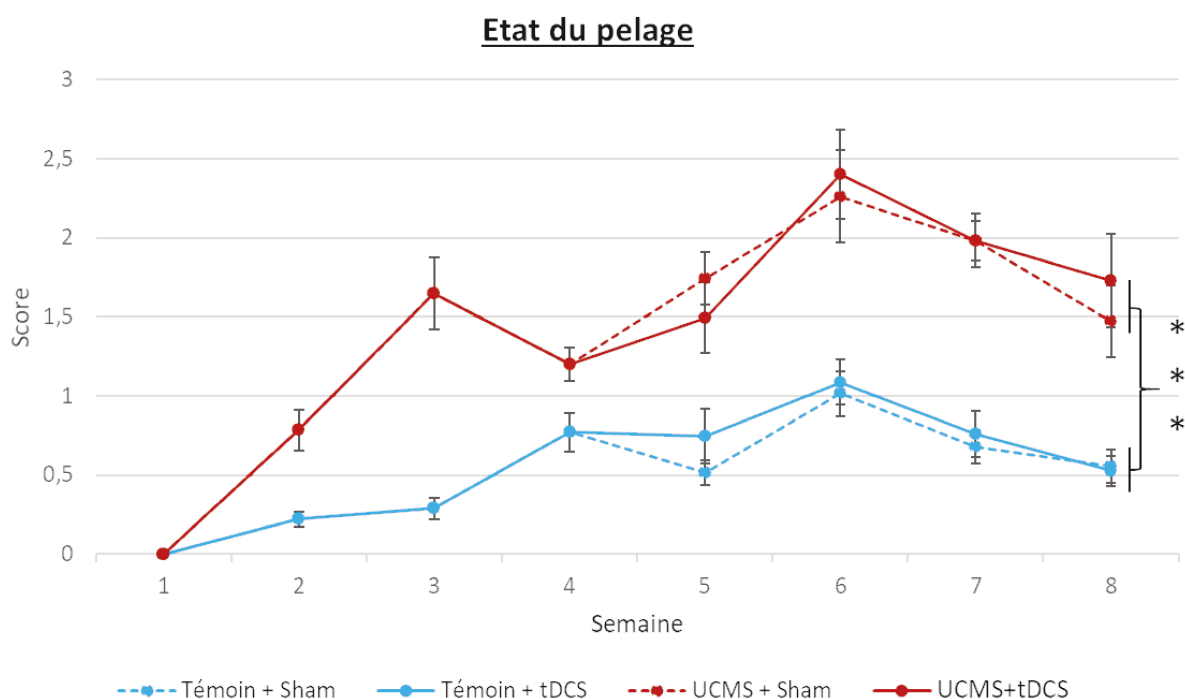


Figure 39 : évaluation de l'état du pelage pendant 8 semaines chez des animaux soumis au protocole d'UCMS comparés à des souris témoin (environnement enrichi), traité ou non par tDCS. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM (*) $p < 0.001$**

5.1.2 Poids

L'exposition à des stress répétés induit une diminution de la prise de poids chez les souris stressées lors de la phase d'induction, plus précisément au cours des semaines 2 et 3. L'ANOVA à un facteur à mesures répétées (Facteur « Stress » [Témoin vs UCMS]) révèle une interaction des facteurs "Stress" et "Temps". L'ANOVA à un facteur à mesures répétées (Facteur « Stress » [Témoin vs UCMS]) révèle une interaction des facteurs "Stress" et "Temps" entre les semaines 1 et 4 ($F_{(2,76)}=25.21$; $p < 0.001$). L'analyse post hoc montre une différence significative entre les groupes Témoin et UCMS à partir de la semaine 2 ($p < 0.001$) et jusqu'à la semaine 3 ($p < 0.05$).

L'ANOVA à deux facteurs (facteur « Stress » [Témoin vs UCMS] et facteur stimulation [Sham vs tDCS]) et à mesures répétées montre une interaction des facteurs "Stress" et "Temps" ($F_{(3,99)}=13.02$; $p < 0.001$) **entre la 4^{ème} et 8^{ème} semaine du protocole** sur la prise de poids. Il n'y a pas d'effet significatif du facteur stimulation. L'analyse post hoc montre une diminution du poids, donc une diminution du poids des souris, chez les souris exposées aux stress, qu'elles reçoivent 10 sessions de stimulation par tDCS ou non pendant la semaine 5 ($p < 0.001$) et la semaine 8 ($p < 0.05$) (Figure 40).

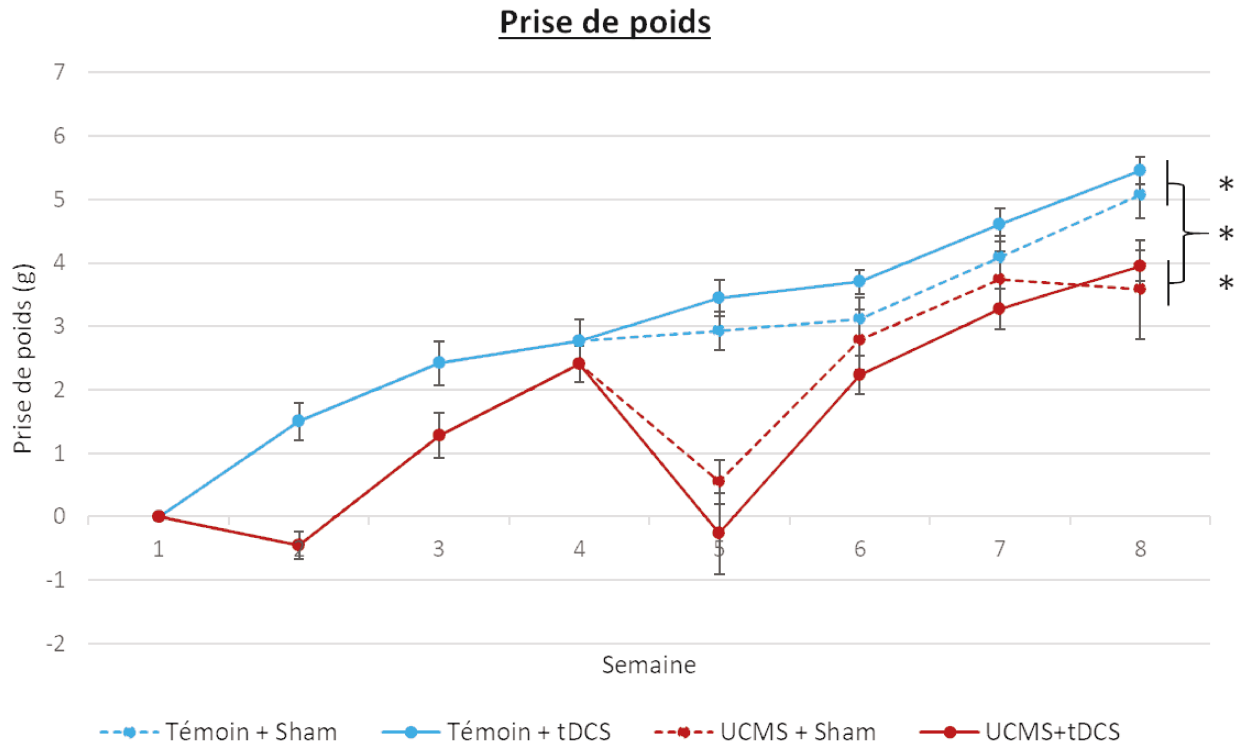


Figure 40 : évaluation du poids pendant 8 semaines chez des animaux soumis au protocole d'UCMS comparés à des souris témoin (environnement enrichi), traité ou non par tDCS. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. n=10, 10, 9, 7 pour les 4 différents groupes; témoin/sham, témoin/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS (p<0.001)**

La répétition de la procédure d'UCMS nous permet de reproduire les résultats précédemment obtenus concernant la dégradation de l'état de la fourrure des souris stressées. Cette expérimentation révèle également que cette procédure peut réduire la prise des poids chez la souris UCMS par rapport que les souris témoin. La soudaine perte de poids visible chez les souris stressées lors de la semaine 5 est sans doute due au fait que la pesée ait eu lieu après une privation d'eau de 12h.

5.2 Evaluation des effets comportementaux de la tDCS chez des souris soumises à la procédure d'UCMS

Différents tests comportementaux sont réalisés 3 semaines après la fin des 10 sessions de stimulation par la tDCS : le test de préférence au sucrose, le Splash test et le test de nage forcée.

Nos résultats indiquent que les souris soumises aux stress préfèrent toujours consommer une solution sucrée par rapport à de l'eau mais que cette préférence est diminuée d'environ 20% par rapport aux souris contrôles, n'ayant pas été exposées aux stress (Figure 41). Cependant nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence une modification de ce comportement par la

tDCS. En effet, une ANOVA à 2 facteurs (facteur "Stress" [Témoin vs UCMS] et facteur "stimulation" [Sham vs tDCS]) montre un effet du facteur "Stress" ($F_{(1,32)}=10.12$; $p<0.01$) mais pas du facteur stimulation. L'analyse post hoc montre une diminution significative de la consommation de sucre par le groupe UCMS + Sham comparé au groupe Témoin + Sham ($p<0.01$); Figure 41).

Contrairement à l'expérimentation précédente, l'ANOVA 2 facteurs ne montre pas d'effet du stress ou de la tDCS dans le Splash test ($F_{(1,32)}=0.36$, $p=0.55$; Figure 41) ou dans le test de la nage forcée ($F_{(1,31)}=0.00$, $p=1$; Figure 41).

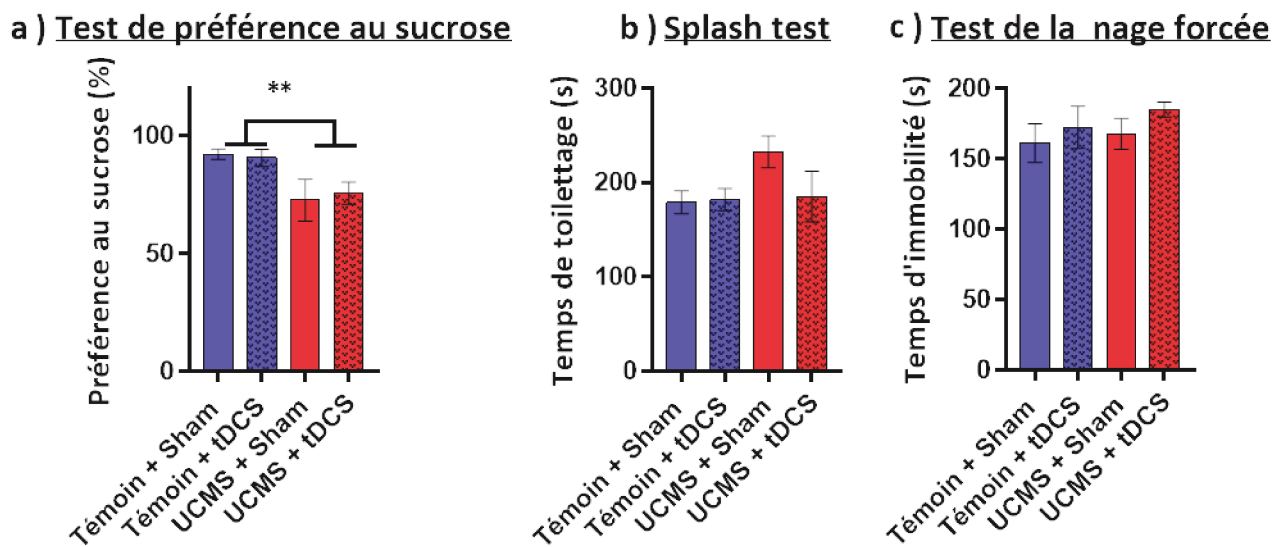


Figure 41 : Effets comportementaux de la tDCS chez des souris soumises au protocole d'UCMS. Les tests réalisés 3 semaines après la fin de la tDCS sont (a) le test de préférence au sucre, (b) le splash test et (c) le test de la nage forcée. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM, $n=10, 10, 9, 7$ pour les 4 différents groupes; témoin/sham, témoin/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS ($p<0.01$).**

En résumé, bien que nos résultats confirment la dégradation de l'état du pelage et donc la baisse de l'intérêt pour les activités autocentrées, et permette de révéler un comportement de type anhédonique, ils ne permettent pas de reproduire les données précédemment obtenues dans le test de nage forcée et le Splash test.

Ceci peut être expliqué par certaines modifications de protocole, parfois peu concluantes, effectuées dans les différents tests comportementaux. Concernant le test de consommation de sucre, nous avons introduit une séance d'habituation au sucre 3 heures pendant la phase nocturne le jour avant le test, ce qui nous permet d'observer une baisse de la préférence au sucre par les souris soumises aux stress (Pothion et al. 2004). Concernant le test de nage forcée, nous avons essayé d'abaisser la température de l'eau afin de se rapprocher de ce qui est couramment publié (28°C au

lieu de 32°C). Par ailleurs la durée des stress a été fortement augmentée entre la première et la deuxième expérimentation. Ce point sera discuté ensuite.

L'analyse du score d'émotivité, calculé à partir des résultats obtenus dans 3 tests comportementaux (le test de préférence au sucrose, le Splash test et le test de la nage forcée) montre que la procédure d'UCMS induit une augmentation du score émotionnel, témoignant de l'état pseudo-dépressif dans lequel se trouve les souris dans les groupes UCMS. L'Anova à 2 facteurs (facteur "Stress" [Témoin vs UCMS] et facteur "Stimulation" [Sham vs tDCS]) montre un effet du stress ($F(1,32)=16.75$; $p<0.01$; Figure 42) mais pas du facteur stimulation.

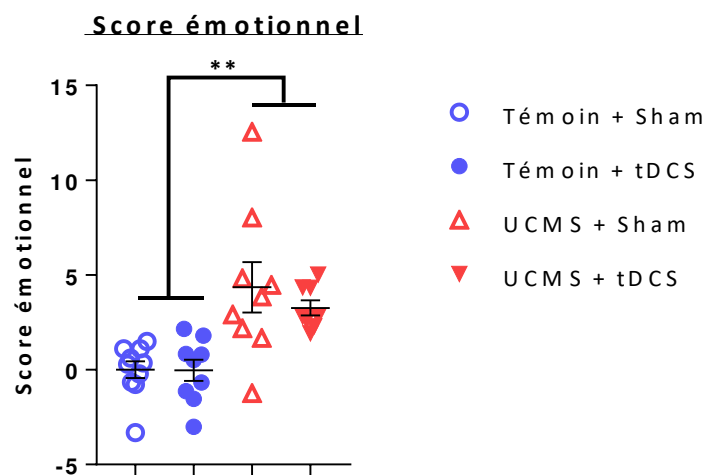


Figure 42 : Score d'émotivité chez des animaux soumis au protocole d'UCMS vs animaux témoin (environnement enrichi) traités ou non par tDCS. Le score émotionnel est calculé en utilisant les scores obtenus aux tests de préférence au sucrose, au splash test et au test de la nage forcée. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM, $n=10, 10, 9, 7$ pour les 4 différents groupes; témoin/sham, témoin/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS ($p<0.01$).**

On peut constater qu'il existe des variabilités entre les résultats comportementaux obtenus au cours de la première et de la deuxième expérimentation: si les données obtenues dans les différents tests soulignent le phénotype anxio-dépressif des souris soumises à l'UCMS, l'effet antidépresseur de la tDCS est plus ou moins identifiable dépendamment du test utilisé. L'utilisation du score d'émotivité permet d'avoir une meilleure estimation de l'état émotionnel des souris soumises à la procédure d'UCMS et/ou aux stimulations par tDCS mais il existe tout de même des différences entre les deux expérimentations. Ces différences peuvent être dues à certaines modifications des protocoles expérimentaux (allongement de la durée de certains stress par exemple).

5.3 Evaluation des effets biologiques de la tDCS chez des souris soumises à la procédure d'UCMS: implication de la réponse inflammatoire.

S'il n'est pas évident d'obtenir une parfaite reproduction des effets comportementaux de l'UCMS et/ou de la tDCS dans les différents tests réalisés, les mesures biologiques suivent exactement la même tendance dans nos deux cohortes. En effet, nous avons mis en évidence lors de notre première expérimentation (publication 2) que la procédure d'UCMS induit une augmentation du nombre de cellules dans la rate, de lymphocytes T régulateurs et de lymphocytes Th1, ainsi qu'une élévation des pourcentages de cellules dendritiques plasmacytoïdes, de cellules dendritiques conventionnelles et de macrophages. Ces données suggèrent la mise en route d'une réponse inflammatoire. Des résultats similaires sont retrouvés dans cette deuxième cohorte (Figure 43). En effet, des ANOVA à deux facteurs révèlent un effet de l'UCMS sur le nombre de cellule dans la rate ($F_{(1, 32)}=17.86$, $p<0.001$), le nombre de lymphocytes CD8 ($F_{(1, 32)}=32.54$, $p<0.0001$), de lymphocytes TC1 ($F_{(1, 32)}=32.54$, $p<0.001$), de lymphocytes CD4 ($F_{(1, 32)}=32.54$, $p<0.0001$), de lymphocytes Th1 ($F_{(1, 32)}=18,61$, $p<0.001$) et de lymphocytes Treg ($F_{(1, 32)}=18,60$, $p<0.0001$). L'exposition à des stress chroniques entraîne donc une élévation de la réponse inflammatoire et plus précisément de la population de lymphocytes dans la rate. Si les résultats concernant le pourcentage de cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes et macrophage) est différent du précédent puisqu'il n'y a pas de modification par le stress ici (Figure 44), les données concernant l'état de maturation des cellules dendritiques plasmacytoïdes sont intéressantes (figure 44c). En effet, l'exposition à des stress chroniques augmente la maturation à la surface de ces cellules (CD80= marqueur tardif de maturation) témoignant de la mise en route de la réponse inflammatoire. Cette élévation est normalisée chez les souris ayant reçu 10 sessions de stimulation par tDCS (interaction UCMS*tDCS; $F_{(1, 32)}=5,82$, $p=0,02$). De même, des ANOVA à deux facteurs révèlent un effet de la tDCS sur le nombre de cellule dans la rate ($F_{(1, 32)}=6,76$, $p=0,01$), le nombre de lymphocytes CD8 ($F_{(1, 32)}=8,40$, $p<0,001$), de lymphocytes CD4 ($F_{(1, 32)}=11,41$, $p=0,001$), de lymphocytes Th1 ($F_{(1, 32)}=8,58$, $p=0,006$) et de lymphocytes Treg ($F_{(1, 32)}=6,03$, $p=0,019$). La tDCS tend donc à normaliser l'élévation de la réponse inflammatoire induite par la procédure d'UCMS.

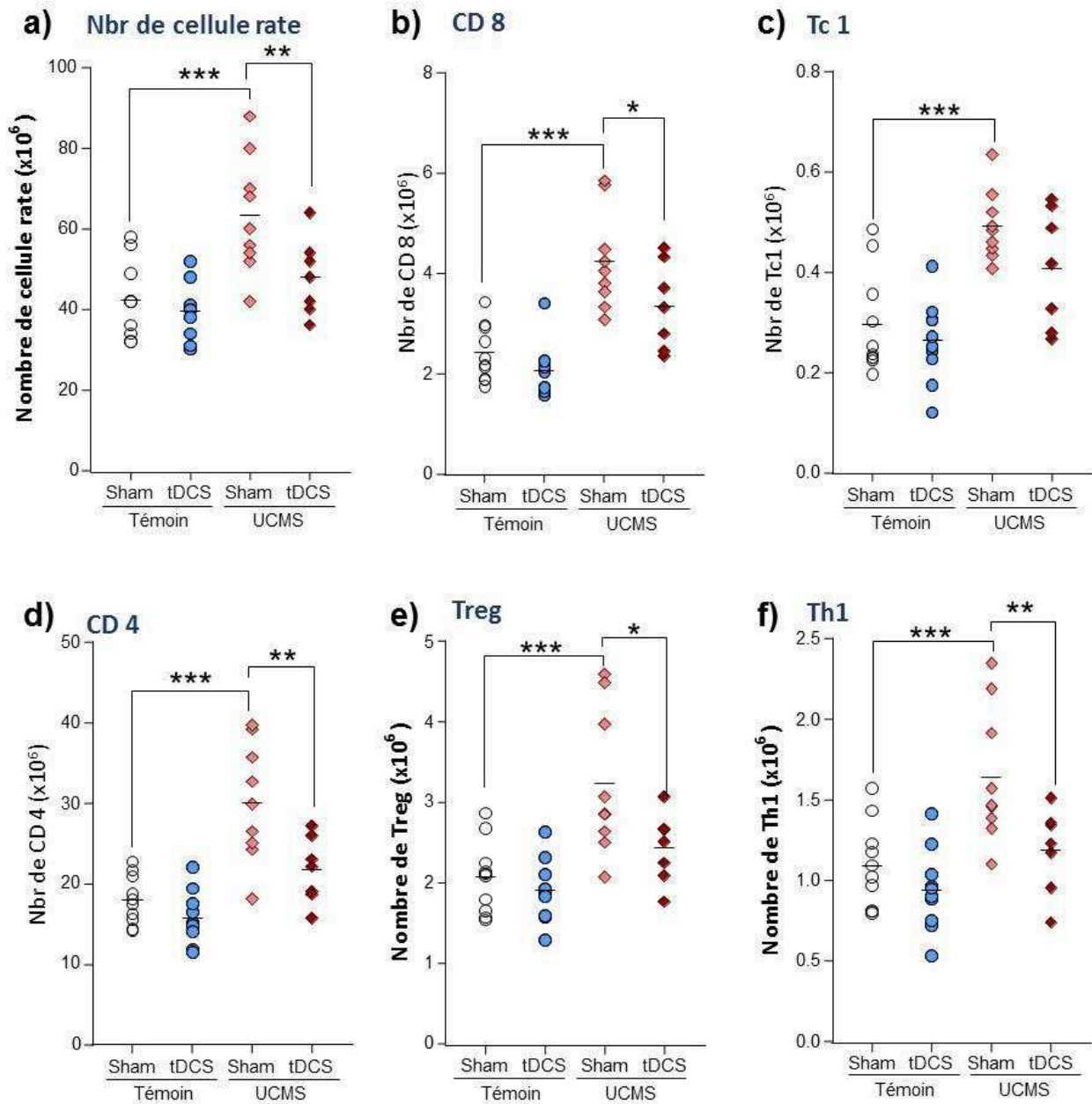


Figure 43 : Effet de la procédure d'UCMS et de la tDCS sur le nombre total de cellules de la rate (a), le nombre lymphocytes CD8 (b), Th1 (c), CD4 (d), Treg (e) et Th1 (f). n=10, 10, 9, 7 pour les 4 différents groupes; témoin/sham, témoin/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS (*p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001).

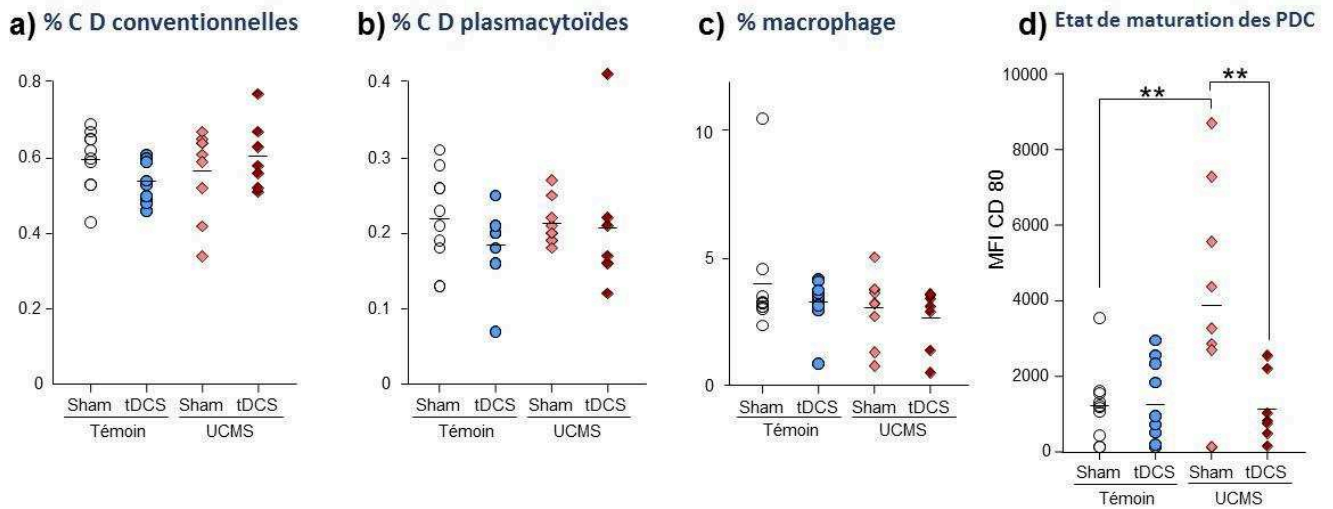


Figure 44 : Effet de la procédure d'UCMS et de la tDCS sur le pourcentage de cellules présentatrices d'antigènes [cellules dendritiques conventionnelle (a) et plasmacytoïdes (b) et macrophage (c)]. La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) permet de quantifier la quantité de fluorochrome, et donc du marqueur de maturation CD80, présent à la surface de la cellule. Cette information permet de connaître l'état de maturation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC). n=10, 10, 9, 7 pour les 4 différents groupes; témoin/sham, témoin/tDCS, UCMS/sham and UCMS/tDCS (p<0.01).**

DISCUSSION

1 RESUME DES RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

Ce travail de thèse avait deux objectifs principaux, le premier était d'approfondir les connaissances sur la tDCS et son utilisation chez l'animal, le second était de rechercher les mécanismes d'action de la tDCS en y associant une recherche de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la dépression.

Revenons sur le premier objectif. La transposition de la technique de stimulation par tDCS chez l'animal est indispensable si l'on veut étudier en profondeur ses modes d'action et les mécanismes physiologiques qui sous-tendent son action comportementale. Ce travail de transposition avait été initié dans le laboratoire avant que ce projet de thèse ne débute (Pedron et al. 2014) mais il nécessitait d'être poursuivi pour mieux maîtriser notre outil. Nous avons, dans un premier temps, cherché à déterminer les paramètres de stimulation qui nous permettaient d'obtenir une réponse comportementale adéquate, c'est-à-dire la diminution significative du temps d'immobilité dans le test de nage forcée, et robuste. Pour cela, nous avons fait varier au cours de plusieurs expérimentations, les paramètres de stimulation de la tDCS : le nombre de stimulations, l'intensité, la durée et la polarité. Nous ne reviendrons pas ici sur les détails des résultats, mais nous avons pu déterminer que l'effet antidépresseur le plus significatif et robuste était obtenu pour une stimulation anodique de 20 min à 200 μ A. Si les effets comportementaux sont observés avec une seule stimulation, la répétition des stimulations allonge la durée de l'effet, jusqu'à 60 jours dans notre étude (Peanlikhit et al. 2017). Ces données ont été obtenues chez la souris saine de souche Swiss mais nous avons réalisé des expérimentations similaires avec des souris C57bl6J (résultats non présentés) sans obtenir d'effets comportementaux satisfaisants, ce qui souligne l'importance du choix de la souche dans les expérimentations, notamment comportementales (Ibarguen-Vargas et al. 2008).

L'effet antidépresseur obtenu chez les souris saines n'était, à notre sens, pas suffisant pour « valider » notre dispositif et l'utiliser pour étudier les mécanismes d'action de la tDCS. Nous avons donc souhaité tester son efficacité dans différents modèles animaux de dépression, de constructions différentes. Ainsi, nous avons pu démontrer l'effet de type antidépresseur de la tDCS dans le modèle CORT, le modèle LPS et le modèle UCMS. Ces résultats, les premiers de ce type dans la littérature sur la tDCS, nous ont conforté dans notre projet et nous ont permis de poursuivre plus sereinement les expérimentations sur les mécanismes d'action de la tDCS.

Malgré cela, nous restons vigilants quant à la transposition de nos résultats à l'Homme. En effet, nous sommes bien conscients que le dispositif utilisé chez l'animal reste éloigné de celui qui est utilisé chez l'Homme et que toutes les différences entre ces deux dispositifs peuvent engendrer des biais dans les résultats obtenus. Premièrement, les électrodes utilisées ne sont pas les mêmes, tant au niveau de leur composition que de leur disposition. Chez l'Homme, les deux électrodes sont identiques, en silicone, et placées sans chirurgie ni anesthésie sur la peau du crâne du patient alors que les contraintes liées à l'utilisation des animaux nous ont obligé à fixer chirurgicalement l'embase de l'électrode, qui se trouve ainsi directement en contact avec l'os du crâne, donc plus près du cerveau. De plus, alors que l'anode est en acier et placée au niveau du crâne, la cathode est en silicone et placée sur le thorax au contact du pelage de l'animal. Toutes ces différences ainsi que la taille de l'électrode comparativement à la taille du crâne du sujet posent la question de la quantité de courant reçue par le cerveau. Certains auteurs ont soulevé l'importance de la densité de courant reçue dans les effets de la tDCS (Mendonca et al. 2011). Cette densité est obtenue en divisant l'intensité de la stimulation par la surface de l'électrode, ainsi nous obtenons une densité de stimulation 100 fois supérieure chez l'animal (57 A/m^2) par rapport à l'Homme (0.57 A/m^2). La modulation cérébrale qui en résulte est sans doute beaucoup plus forte. La taille de l'électrode pose également question quant à la « surface » de cerveau qui reçoit directement le courant, et donc la quantité de neurones directement soumis à la dépolarisation. Enfin, les effets neurophysiologiques de la tDCS dépendent également de l'orientation du courant par rapport aux neurones et leurs axones (Rahman et al. 2013; Radman et al. 2009; Kabakov et al. 2012), cette variable est difficilement maîtrisable et induit inévitablement un biais.

De même, les résultats obtenus avec les modèles animaux de dépression doivent être considérés avec précaution. En effet, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce travail, il n'existe pas de modèle parfait de la dépression tant sa physiopathologie est complexe et ses symptômes difficiles à évaluer chez l'animal. Le fait d'obtenir un effet antidépresseur de la tDCS dans trois modèles différents, deux pharmacologiques (CORT et LPS) avec des molécules et donc des altérations différentes, et un comportemental (UCMS) nous rassure cependant quant à la robustesse de notre dispositif. De plus, ces modèles ont été largement utilisés dans l'étude des effets des antidépresseurs, ce qui donne un poids certain aux résultats que nous avons obtenus.

Concentrons-nous maintenant sur le second objectif de ce travail de thèse. Nous avons tout d'abord voulu déterminer l'effet de la tDCS sur l'activation neuronale, caractérisée par l'expression de c-fos, en nous focalisant sur les zones cérébrales potentiellement impliquées dans la dépression, à savoir

les circuits des émotions et de la récompense (Nestler et al. 2002). Ces expérimentations faisaient suite à celles réalisées en faisant varier les paramètres de stimulations. Compte tenu des données intéressantes obtenues en faisant varier le nombre de stimulation, à savoir l'impact différentiel sur la durée de l'effet comportemental observé, nous avons comparé l'activation neuronale induite par une ou dix stimulations par tDCS chez la souris saine. Innocemment, nous nous attendions à un effet-dose, c'est-à-dire une expression accrue de c-fos après dix stimulations comparativement à une seule stimulation. Contre toute attente, la surexpression de c-fos a été observée uniquement après une stimulation, les résultats pour les animaux soumis à 10 stimulations n'étant pas différents de ceux des animaux témoins.

La première conclusion que nous avons pu tirer de ces résultats est que la tDCS induit en premier lieu une activation neuronale caractérisée par l'expression de c-fos mais que celle-ci fait place, suite à la répétition des stimulations, à d'autres phénomènes neurobiologiques. Ceux-ci expliquant sûrement que la répétition des stimulations induise une durée plus importante des effets. Nous n'avons pas encore étudié ces phénomènes, mais la littérature nous laisse penser qu'ils sont probablement liés aux différents processus de plasticité : synaptique (Fritsch et al. 2010; Podda et al. 2016; Nitsche et al. 2003), structurelle (Pelletier et al. 2014) et cellulaire (neurogenèse) (Braun et al. 2016; Pikhovych et al. 2016). Il est également possible que la répétition des stimulations module à long terme la neurotransmission notamment sérotoninergique et dopaminergique (Kuo et al. 2016; Nitsche et al. 2009). Dans ce sens, nous avons réalisé une petite étude complémentaire en parallèle de ce travail qui visait à étudier l'impact de la PCPA (antagoniste de la sérotonine) sur la réponse comportementale à la tDCS chez des souris saines. La PCPA est un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase, enzyme permettant la synthèse de la sérotonine, qui provoque une diminution de 80 à 90% du taux cérébral de sérotonine (Miczek et al. 1975). Ce composé est ainsi classiquement utilisé pour diminuer les concentrations de 5-HT dans différents protocoles précliniques pour étudier les fonctions neurophysiologiques de la sérotonine. Les animaux, traités ou non à la PCPA (300mg/kg, 2 fois par jour pendant 3 jours), ont été soumis à 1 séance de tDCS de 20 min à 200 μ A avant d'être soumis, 3 jours après la stimulation, au test de nage forcée. Nos résultats (Figure 45) suggèrent que l'effet comportemental de la tDCS dans le FST n'est pas modifié en présence de PCPA et donc que la sérotonine ne serait pas impliquée dans l'effet comportemental aigu de la tDCS. Nous n'avons pas encore testé cette hypothèse dans le cas de stimulations répétées.

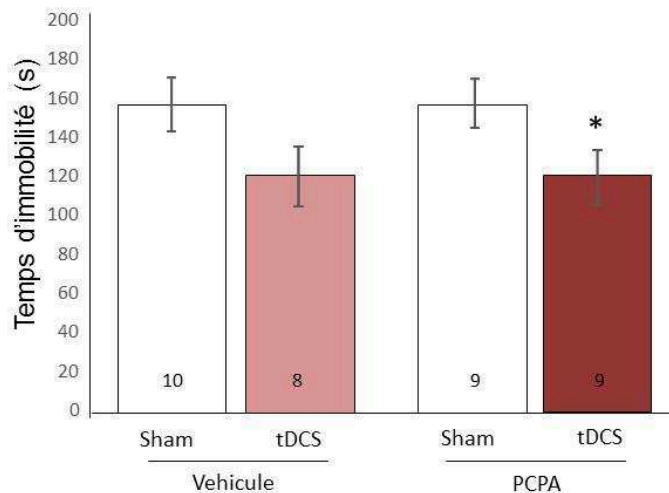


Figure 45 : Temps d'immobilité dans le test de nage forcée chez des souris traitées par tDCS active ou sham en présence ou non de PCPA (antagoniste de la sérotonine). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM, n=10, 8, 9, 9 pour les 4 différents groupes; vehicule/sham, vehicule/tDCS, PCPA/sham and PCPA/tDCS (*p<0.05).

Il est également envisageable que la répétition des stimulations module des processus inflammatoires et gliaux qui peuvent être impliqués dans les effets à long terme de la tDCS (Monai et al. 2016; Rueger et al. 2012a).

Une seconde conclusion intéressante a pu être tirée de cette étude. Concernant les zones cérébrales dans lesquelles nous avons pu observer une surexpression de c-fos, nous avons pu constater qu'elles étaient, pour certaines, éloignées de la zone de stimulation. A l'inverse, le cortex moteur, situé à proximité de l'électrode ne montre pas de modification significative de l'expression de c-fos suite à la stimulation. Ainsi, la stimulation par tDCS induit une activation cérébrale spécifique capable de se propager rapidement, au niveau cortical et sous-cortical.

Nous avons également observé que la surexpression de c-fos était significative dans les zones impliquées dans la pathologie dépressive. Comme tout ce qui concerne la physiopathologie de la dépression, les circuits neuronaux qui sont impliqués dans cette pathologie ne sont connus que partiellement, cependant les études en IRMf réalisées chez l'Homme ont permis d'identifier certaines zones cérébrales dont le métabolisme et l'anatomie sont modifiés en cas de pathologie dépressive, ces mêmes zones ont également été identifiées chez le rongeur comme étant impliquées dans les comportements de peur et d'anxiété et dans la réponse au stress. Parmi elles, les principales sont : les cortex préfrontal et cingulaire, l'hippocampe, le striatum, l'amygdale et le thalamus (Nestler et al. 2002; Russo and Nestler 2013; Savitz and Drevets 2009). Il n'est pas surprenant, compte tenu de la diversité des symptômes de la dépression, de retrouver des altérations dans des zones cérébrales ayant des fonctions diverses. Il est supposé que, par exemple, l'hippocampe et le néocortex soient

impliqués dans les symptômes cognitifs de la dépression alors que le striatum (striatum ventral et noyau accumbens) serait plutôt impliqué dans les symptômes émotionnels de la dépression tels que l'anhédonie ou l'anxiété. Bien sûr, ces aires cérébrales connues pour participer à la régulation des émotions et aux processus de récompense, ne fonctionnent pas de manière isolée, mais interagissent étroitement via des circuits complexes. Ces interconnexions sont d'ailleurs probablement responsables de la propagation de l'effet de la stimulation dans les différentes zones interconnectées. Les nouveaux outils d'analyse tels que la génétique, l'utilisation des virus et l'optogénétique ouvrent la voie à des recherches plus poussées concernant les mécanismes moléculaires participant aux altérations fonctionnelles et structurales de ces zones cérébrales. Les données récentes montrent par exemple l'implication des systèmes dopaminergiques et glutamatergiques, ainsi que de la voie de signalisation BDNF-TrkB et également de l'inflammation via le facteur de transcription NFκB [pour revue voir (Russo and Nestler 2013)] .

Ce dernier élément fait le lien avec les derniers résultats obtenus dans ce travail concernant le lien entre l'inflammation et la dépression, et le possible impact de la tDCS sur celui-ci. Nous faisons ici référence aux données issues des stimulations tDCS réalisées chez les animaux soumis au protocole d'UCMS et pour lesquels des prélèvements de rate ont été réalisés à la fin du protocole. Le premier résultat marquant est que l'on observe chez les animaux soumis à la procédure d'UCMS, une augmentation significative de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires tels que les CD4 (Th1) et les CD8 (Tc1) ainsi que les cellules dendritiques, et notamment le marqueur CD80 synonyme de maturation de ces cellules présentatrices d'antigènes. Ces observations sont en rapport avec les données de la littérature qui sont en faveur d'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le modèle UCMS (Pan et al. 2014; Y. Zhang et al. 2015b; Liu et al. 2015; López-López et al. 2016) et chez l'Homme souffrant de dépression (Huang et al. 2018; Zhang et al. 2018; Zou, Feng, and Yang 2018; Danner et al. 2003; Dowlati et al. 2010). On observe également dans notre expérimentation, la surexpression de lymphocytes T régulateurs (Treg) chez les souris soumises à la procédure d'UCMS. Ces Treg ont, eux, une action anti-inflammatoire puisqu'ils régulent l'action des Th1 et des Tc1, ces données sont en faveur d'une résolution « naturelle » de l'inflammation qui serait en train de se mettre en place, il est probable que si les prélèvements avaient été faits plus précocement, cette résolution n'aurait pas encore été mise en place. L'activation des cellules présentatrices d'antigène soulève une question rarement soulevée dans la littérature mais qui nous semble particulièrement intéressante : quel antigène est reconnu par ces cellules ? Quel est le médiateur de cette activation inflammatoire ? En effet, nous ne sommes pas ici en présence d'un agent pathogène externe, virus ou bactérie, qui déclencherait une réponse immunitaire innée puis acquise. Il est probable qu'il n'y

ait pas un mais plusieurs antigènes détectés par l'organisme et responsables du déclenchement de la réponse immunitaire. En effet, nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, stress et inflammation sont étroitement liés, via l'action directe des GCs sur les GCRs situés sur les cellules immunitaires et via la multitude de molécules dont l'expression est modifiée par le stress. A ce sujet, une large analyse protéomique a été réalisée chez des animaux soumis à l'UCMS et montre une modulation importante de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, dans le stress cellulaire, la protection cellulaire et l'anti-oxydation ainsi que la structure cellulaire et la motilité (Y. Liu et al. 2011). L'expression des métabolites de la kynurénines, voie privilégiée, liant dépression et inflammation, est également modifiée par la procédure d'UCMS puisqu'une augmentation des taux d'IDO1 et de QA est observée dans ce cas (Y.-N. Liu et al. 2015; Martín-Hernández et al. 2018; Zhao et al. 2017). Il est possible que toutes ces molécules, et d'autres non identifiées à ce jour, soient reconnues par les cellules immunitaires et considérées comme des antigènes capables de déclencher une réponse immunitaire.

Finalement, le dernier résultat de ce travail, et à notre sens l'un des plus marquants, est que, conjointement à ses effets comportementaux antidépresseurs, la tDCS agisse sur les modifications inflammatoires induites par le protocole UCMS. En effet, nous assistons ici à une normalisation de l'expression des marqueurs pro- ou anti-inflammatoire précités chez les animaux soumis à la procédure d'UCMS et ayant reçu un traitement de 10 stimulations de tDCS. Ces résultats font écho aux quelques données de la littérature montrant une action positive de la tDCS sur l'activation et la polarisation des cellules immunitaires en culture (Pelletier et al. 2014) et chez le rat sain (Rueger et al. 2012b), ainsi que son effet anti-inflammatoire dans divers modèles de douleurs chroniques et d'ischémie (Peruzzotti-Jametti et al. 2013; Cioato et al. 2016; Laste et al. 2012b; Spezia Adachi et al. 2012). L'originalité de ce travail, outre le fait de présenter pour la première fois cette modulation de l'inflammation dans un modèle de dépression, réside dans la démonstration d'une action anti-inflammatoire de la tDCS au niveau systémique et non uniquement au niveau central. Ainsi l'effet de la tDCS ne se cantonne pas aux limites du cerveau mais est plus global sur le maintien de l'homéostasie de l'organisme, sa portée thérapeutique en est d'autant plus élargie.

Le choix de ces marqueurs inflammatoires périphériques, et non centraux, n'a pas été fait par hasard. En effet, cette étude a été menée en collaboration avec les Dr. Francis Bonnefoy et Sylvain Perruche de l'unité Inserm 1098 « Interaction hôte-greffon-tumeur et ingénierie cellulaire et génique », qui ont apporté leur expertise sur ces questions d'évaluation de l'inflammation. Comme dans la littérature, des dosages sérologiques de cytokines ont été réalisés tout au long de l'expérience UCMS/tDCS, cependant les taux sériques de cytokines sont très sensibles aux différents événements environnementaux ou biologiques et aucune information intéressante n'a pu être tirée de ces

données. Les prélèvements de rate nécessitent certes l'euthanasie de l'animal, et ne peuvent donc pas être répétés, mais ils semblent plus robustes et moins sensibles aux petites modifications environnementales que les dosages de cytokines. De plus, ils permettent certainement d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes inflammatoires mis en jeu puisqu'ils donnent une vision globale des différents types cellulaires exprimés et activés dans les différentes conditions.

Tous ces résultats sont riches d'enseignement et apportent leur pierre à l'édifice gigantesque que constitue la connaissance des modes d'action des nouveaux outils thérapeutiques de la dépression, tels que la tDCS. Plus largement, ces connaissances nous permettent également d'explorer plus profondément les hypothèses physiopathologiques de cette pathologie, comme l'hypothèse inflammatoire. Nous sommes conscients, cependant, que de nombreuses interrogations persistent pour que ces données puissent avoir une application clinique concrète. Nous poursuivons donc nos recherches dans ce sens, avec de nombreuses perspectives que nous vous présentons dans le paragraphe suivant.

2 PERSPECTIVES ET LEURS RESULTATS PRELIMINAIRES

2.1 Effets de la tDCS dans le modèle du FST répété.

La mise en place du protocole d'UCMS au sein du laboratoire nous a permis de mettre en évidence l'effet antidépresseur de la tDCS dans le modèle de dépression le plus écologique. Cependant ce modèle est très lourd et nécessite beaucoup de temps; il faut plusieurs semaines pour obtenir des animaux présentant un phénotype de type dépressif et le maintien des stress pendant la phase de traitement et d'analyse comportementale ne laisse pas beaucoup de possibilité pour tester d'autres paramètres de traitement. Par exemple, quel est le déroulement temporel des effets comportementaux et physiologiques de la tDCS? Est-ce que la co-administration d'un antidépresseur pharmacologique amplifierait les effets de la tDCS? Quels sont les bénéfices de séances d'entretien? Des réponses à ces interrogations permettraient d'apporter des éléments concrets à la recherche clinique et d'aboutir à un consensus quant à l'utilisation de la tDCS chez les patients dépressifs.

Nous sommes donc en train de mettre en place un autre modèle de dépression basé sur une version modifiée du FST. Les souris sont forcées à nager 10 minutes par jour pendant 5 jours consécutifs, puis 1 fois par semaine (le vendredi), dans une eau à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (Sun et al. 2011). Les FST sont réalisés 4 heures après le début de la phase nocturne. Le cycle 12h/12h des animaux est donc un peu modifié (lumière éteinte à 13h). Plusieurs tests comportementaux sont réalisés afin d'évaluer l'état

émotionnel des souris (NSF, Splash test, FST) 2 semaines après le dernier FST. Une semaine après la pose de l'embase par chirurgie, certaines souris sont exposées à 10 séances de tDCS (2 sessions par jours pendant 5 jours) puis à une batterie de tests afin d'évaluer l'effet comportemental de la tDCS dans ce modèle (Figure 46).

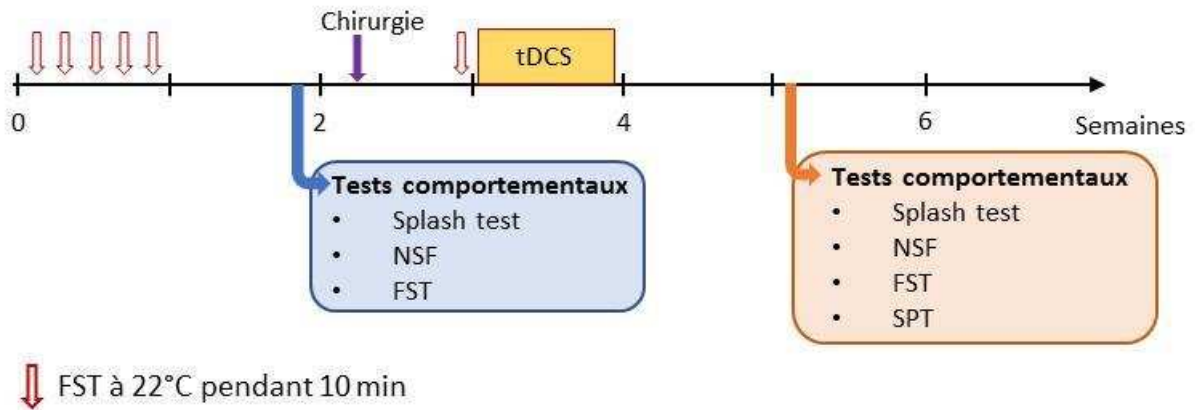


Figure 46 : Protocole d'étude des effets comportementaux de la tDCS chez le modèle murin de FST répétés. Un FST (flèche rouge) est réalisé 1 fois par jour pendant 5 jours. Les animaux sont stimulés à raison de 2 séances de stimulation par jour pendant 5 jours (10 sessions) de 20 min à 200 μ A. L'évaluation des comportements de type anxio-dépressif est réalisée 1 semaine après le dernier FST et 1 semaine après la fin des stimulations par le splash test (ST), test d'hypophagie induit par la nouveauté (NSF), le test de nage forcée (FST) et le test de préférence au sucre (SPT).

L'exposition des souris à des FST répétés induit une augmentation du score d'émotivité ($t(18)=-2.481$; $p<0.05$) suite à l'élévation du temps de latence dans le test d'hypophagie induite par la nouveauté (NSF, $t(14)=-2,39$; $p=0.059$) et du temps d'immobilité dans le test de nage forcée (FST, $t(18)=-2.703$; $p<0.05$) témoignant de l'apparition d'un phénotype dépressif (Figure 47).

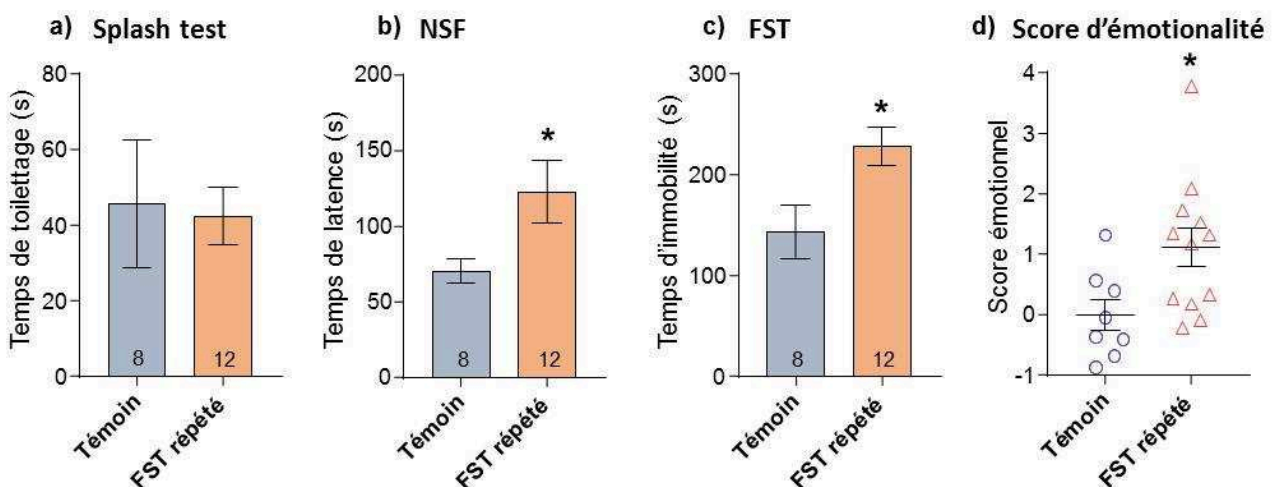
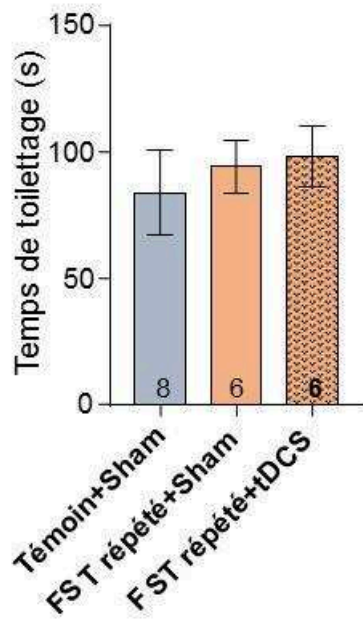


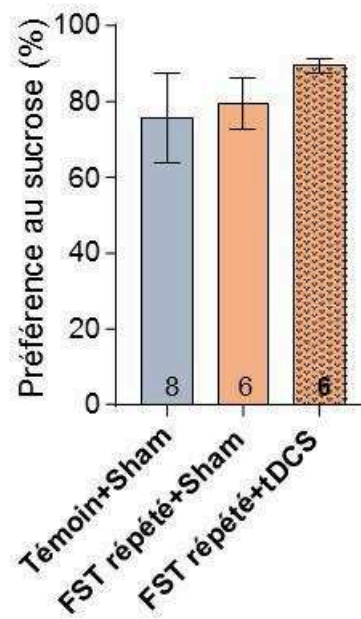
Figure 47: Effets comportementaux de la répétition du FST. Les tests réalisés une semaine le dernier FST sont (a) le Splash test, (b) le test d'hypophagie induite par nouveauté et (c) le test de la nage forcée. Les données obtenues dans ces différents tests sont utilisées pour calculer le score d'émotionalité de chaque souris (d). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

Concernant l'effet de la tDCS chez ces souris, nos résultats sont encore préliminaires et nécessitent d'être complétés mais 10 sessions de stimulation ont tendance à diminuer les comportements de type dépressifs dans certains des tests effectués (Figure 48); la tDCS semble normaliser l'augmentation du temps d'immobilité induite par la répétition du FST ($F_{(2,17)}=3.521$; $p=0.053$) et tend à augmenter la préférence au sucrose chez les souris de type dépressives. Si le splash test ne permet pas de mettre en évidence les variations comportementales entre les différents groupes testés, la tDCS semble capable de normaliser l'élévation du score d'émotionalité induite par la répétition du FST ($F_{(2,17)}=2.227$; $p=0.138$). Une expérimentation est actuellement en cours pour compléter ces résultats et arriver à un nombre d'animal par groupe suffisant pour conclure ou non sur l'effet antidépresseur de la tDCS dans ce modèle.

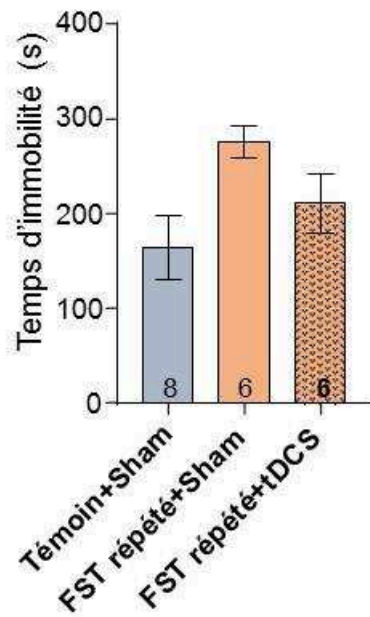
a) Splash test



b) Préférence au sucrose



c) FST



d) Score d'émotionnalité

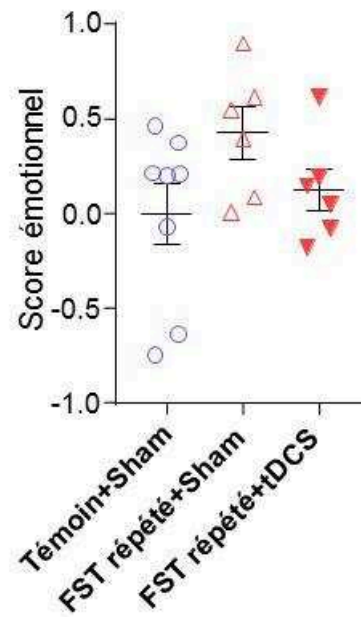


Figure 48: Effets comportementaux de la tDCS sur les comportements de type dépressifs induit par la répétition du FST. Les tests réalisés une semaine après la dernière stimulation sont (a) le Splash test, (b) le test de préférence au sucrose et (c) le test de la nage forcée. Les données obtenues dans ces différents tests sont utilisées pour calculer le score d'émotionnalité de chaque souris (d). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

2.2 Mise en évidence d'un lien entre dépression et inflammation

Ce travail de thèse, en accord avec la littérature, est en faveur d'un lien entre dépression et inflammation. Nous avons donc essayé, en collaboration avec l'unité de recherche UMR 1098 travaillant sur les processus inflammatoires, de mettre en évidence un lien direct entre un état de type dépressif et le développement d'une maladie inflammatoire chronique : l'arthrite rhumatoïde. L'idée était de déterminer si un phénotype de type dépressif (induit par la répétition du FST) précipitait l'apparition des symptômes et/ou accélérait la progression de l'arthrite rhumatoïde chez un modèle murin d'arthrite (modèle CIA pour « collagen-induced-arthritis »). Ce modèle consiste à immuniser (injection i.p.) les souris de souche DBA/1 (Janvier labs) avec du collagène de type II afin d'induire une polyarthrite auto-immune sévère (Brand et al. 2007).

Afin d'identifier si l'état émotionnel des souris modifie la cinétique de cette maladie inflammatoire, les souris DBA/1, hébergées en cycle lumineux 22h/12h, sont placées dans le test de nage forcée (FST) 10 minutes par jours pendant 5 jours, 4 heures après le début de la phase nocturne. L'administration de collagène de type 2 est réalisée 2 jours après le dernier FST (appelé J0). Les souris sont de nouveau placées dans le FST le vendredi de chaque semaine dans le but de contrôler leur immobilité et de maintenir le phénotype dépressif (Sun et al. 2011)(Figure 49). A ce groupe "CIA +FST" sont associés deux autres groupes; 1 groupe "CIA" dans lequel les souris sont immuniser (à J0) sans être exposé au FST répété et un groupe "CIA + environnement enrichi" dans lequel les souris immunisées à J0 sont placées dans une cage enrichie pour le reste de l'expérimentation (Figure 49). L'observation des premiers symptômes de l'arthrite rhumatoïde, visible au niveau des pattes, se fait tout au long de l'expérience. Dès les premiers signes pathologiques, un score est attribué en fonction du nombre de membres touchés chez l'ensemble des souris pour rendre compte de l'évolution de la pathologie dans les trois groupes.

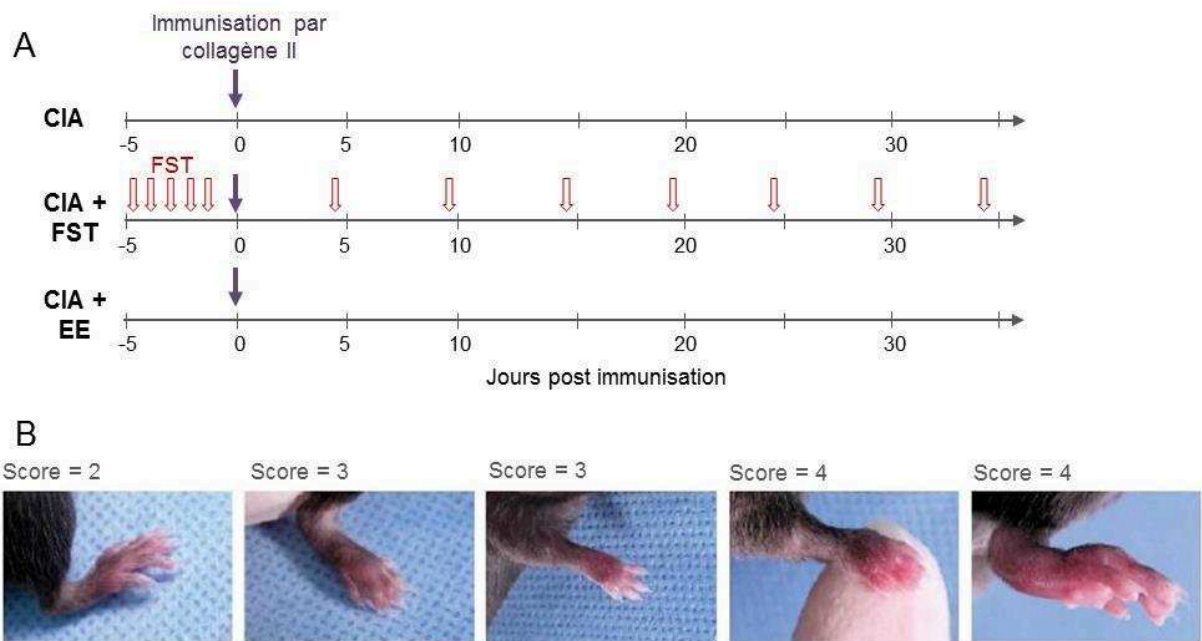


Figure 49: A) Protocole d'étude de l'apparition des symptômes arthritiques en fonction de l'état émotionnel des souris. L'immunisation par injection (i.p.) de collagène II provoque l'apparition des symptômes arthritiques environ 3 semaines après. Un FST (flèche rouge) est réalisé 1 fois par jour pendant 5 jours pour le groupe (CIA+FST). B) Exemples de symptômes arthritiques au niveau des membres postérieurs et antérieurs avec des scores de sévérité différente chez des souris immunisées par CIA.

Comme attendu, les premiers signes d'arthrite rhumatoïde apparaissent 20 jours après l'immunisation pour le groupe n'ayant pas été soumis au modèle de FST répété ("CIA", Figure 50). Une ANOVA à mesure répétée révèle une interaction entre le facteur traitement et le facteur temps ($F_{(16,176)} = 5,10$; $p < 0,0001$), suggérant que l'évolution du score arthritique au cours du temps est dépendant des groupes et donc de l'état émotionnel des souris. L'analyse secondaire des résultats montre que l'état de type dépressif induit par la répétition du test de nage forcée précipite l'apparition des symptômes de l'arthrite et accélère la progression de cette maladie. En effet, l'apparition de ces symptômes est plus précoce chez les souris soumises au FST, puisqu'ils apparaissent 17 jours après l'immunisation. Par exemple, une ANOVA réalisée à J21 révèle un effet significatif du traitement ($F_{(1,22)} = 4,99$; $p = 0,16$), l'analyse post-hoc montrant une nette élévation du score arthritique des souris de type-dépressive comparées aux souris "CIA" ($p = 0,024$). De plus, on note clairement que l'évolution de l'arthrite rhumatoïde est plus rapide chez les souris de type-dépressives (Figure 50). Par ailleurs, le score arthritique des souris immunisées par le collagène puis placées dans un environnement enrichi ("CIA+ environnement enrichi") reste stable jusqu'au 26^{ème} jour post immunisation, avec un score inférieur à celui des souris du groupe CIA (Figure 49). Une ANOVA réalisée à J26 révèle un effet significatif du traitement ($F_{(1,22)} = 9,55$; $p = 0,001$), l'analyse post-hoc témoignant respectivement de l'élévation et de la diminution du score arthritique des souris "CIA+FST" ($p = 0,028$) et "CIA+ environnement enrichi" ($p < 0,0001$) comparées aux souris "CIA".

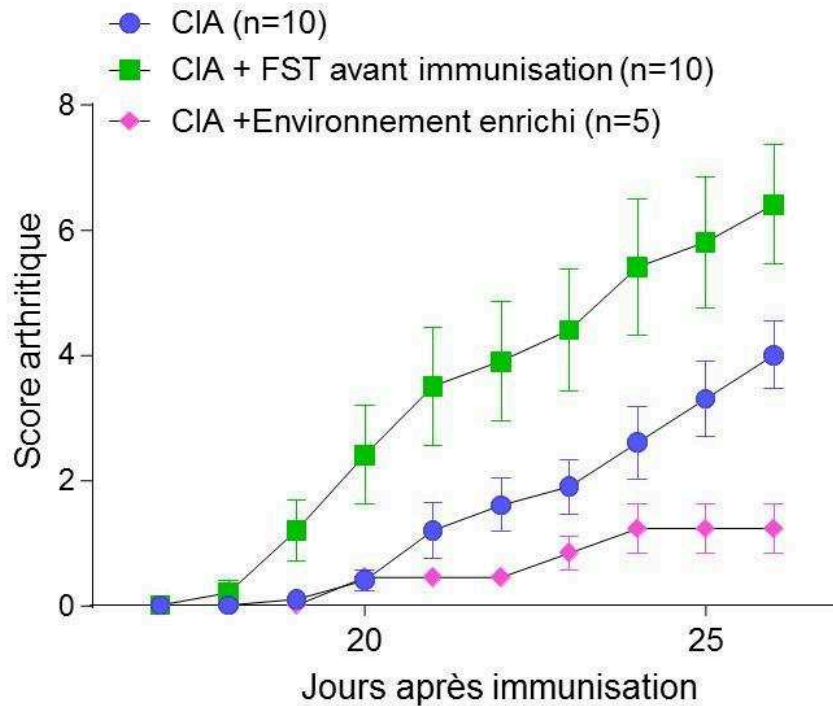


Figure 50: Evolution du score arthritique en fonction des jours après immunisation pour chaque groupe expérimental.

Si la Figure 50 présente les scores arthritiques des différents groupes jusqu'au 26^{ème} jour post immunisation, il est important de noter que la sévérité des symptômes est identique et égal à 10 pour les trois groupes de souris au terme de l'expérimentation, soit 35 jours post-immunisation; le groupe "CIA" rattrape le groupe "CIA+FST" et le groupe "CIA + environnement enrichi", stable jusqu'au 30^{ème} jours, voit son score arthritique exploser entre J30 et J35 pour arriver à 10.

Pour résumer, il semble qu'un état pseudo-dépressif puisse accentuer les processus inflammatoires impliqués dans l'arthrite rhumatoïde. A l'inverse, l'amélioration des conditions d'hébergement et le placement des souris dans un environnement enrichi, procédé qui a un effet positif sur l'état émotionnel de la souris, retarde l'apparition de ces mêmes symptômes. Cette expérimentation, avec la précédente, apporte des arguments en faveur de la modulation des processus inflammatoire par l'état émotionnel des souris et donc de l'hypothèse inflammatoire de la dépression.

3 CONCLUSION

Ce travail de thèse prend son origine dans les constats cliniques concernant les difficultés de traitement et de prise en charge des patients souffrant de dépression. Afin d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques, la recherche scientifique et médicale se doit de trouver des techniques innovantes mais également de rechercher d'autres cibles thérapeutiques. Dans cet objectif, nous

avons souhaité rechercher les effets comportementaux de la stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) ainsi que les modifications neurobiologiques et inflammatoires qui y sont associées. Ainsi nos résultats ont montré un effet robuste de la tDCS chez la souris saine ou « déprimée » qui tend à diminuer les comportements de type dépressif ou anxieux. Ces effets comportementaux sont associés à des modifications d'activation neuronale à proximité et à distance du site de stimulation, dans les aires cérébrales particulièrement impliquées dans la dépression. De manière intéressante, les modifications comportementales induites par la tDCS apparaissent également conjointement à une modification des processus inflammatoires. Ces données, tout en apportant de nouveaux éléments sur les mécanismes d'action de la tDCS, ouvrent également la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Nos recherches futures s'attèleront d'ailleurs à approfondir cette question et à mieux comprendre les intrications existant entre la pathologie dépressive et les processus inflammatoires, les liens de cause à effet et les voies de signalisation possibles.

REFERENCES

- Abdallah, Chadi G., Jonas Hannestad, Graeme F. Mason, Sophie E. Holmes, Nicole DellaGioia, Gerard Sanacora, Lihong Jiang, et al. 2017. 'Metabotropic Glutamate Receptor 5 and Glutamate Involvement in Major Depressive Disorder: A Multimodal Imaging Study'. *Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 2 (5): 449–56.
- Ago, Yukio, Shinsuke Arikawa, Miyuki Yata, Koji Yano, Michikazu Abe, Kazuhiro Takuma, and Toshio 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): 1355–63.
- Altinay, Murat, Emad Estemalik, and Donald A. Malone. 2015. 'A Comprehensive Review of the Use of Deep Brain Stimulation (DBS) in Treatment of Psychiatric and Headache Disorders'. *Headache* 55 (2): 345–50.
- Ananth, Mala R., Christine DeLorenzo, Jie Yang, J. John Mann, and Ramin V. Parsey. 2018. 'Decreased Pretreatment Amygdalae Serotonin Transporter Binding in Unipolar Depression Remitters: A Prospective PET Study'. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 59 (4): 665–70.
- Angelucci, F., S. Brenè, and A. A. Mathé. 2005. 'BDNF in Schizophrenia, Depression and Corresponding Animal Models'. *Molecular Psychiatry* 10 (4): 345–52.
- Antonenko, Daria, Florian Schubert, Florian Bohm, Bernd Ittermann, Semiha Aydin, Dayana Hayek, Ulrike Grittner, and Agnes Flöel. 2017. 'TDCS-Induced Modulation of GABA Levels and Resting-State Functional Connectivity in Older Adults'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (15): 4065–73.
- Arakawa, Ryosuke, Masaki Okumura, Hiroshi Ito, Chie Seki, Hidehiko Takahashi, Harumasa Takano, Ryuji Nakao, et al. 2008. 'Quantitative Analysis of Norepinephrine Transporter in the Human Brain Using PET with (S,S)-18F-FMeNER-D2'. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 49 (8): 1270–76.
- Arakawa, Ryosuke, Amane Tateno, WooChan Kim, Takeshi Sakayori, Kohei Ogawa, and Yoshiro Okubo. 2016. 'Time-Course of Serotonin Transporter Occupancy by Single Dose of Three SSRIs in Human Brain: A Positron Emission Tomography Study with [(11)C]DASB'. *Psychiatry Research. Neuroimaging* 251: 1–6.
- Ardayfio, Paul, and Kwang-Soo Kim. 2006. 'Anxiogenic-like Effect of Chronic Corticosterone in the Light-Dark Emergence Task in Mice'. *Behavioral Neuroscience* 120 (2): 249–56.
- Audet, Marie-Claude, Shlomit Jacobson-Pick, Boubacar Pasto Wann, and Hymie Anisman. 2011. 'Social Defeat Promotes Specific Cytokine Variations within the Prefrontal Cortex upon Subsequent Aggressive or Endotoxin Challenges'. *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (6): 1197–1205.
- Baranyi, Andreas, Andreas Meinitzer, Robert J. Breitenecker, Omid Amouzadeh-Ghadikolai, Rudolf Stauber, and Hans-Bernd Rothenhäusler. 2015. 'Quinolinic Acid Responses during Interferon- α -Induced Depressive Symptomatology in Patients with Chronic Hepatitis C Infection - A Novel Aspect for Depression and Inflammatory Hypothesis'. *PloS One* 10 (9): e0137022.
- Bartolomucci, A., P. Palanza, P. Sacerdote, G. Ceresini, A. Chirieleison, A. E. Panerai, and S. Parmigiani. 2003. 'Individual Housing Induces Altered Immuno-Endocrine Responses to Psychological Stress in Male Mice'. *Psychoneuroendocrinology* 28 (4): 540–58.
- Bauer, Moisés E., and Antonio L. Teixeira. 2018a. 'Inflammation in Psychiatric Disorders: What Comes First?' *Annals of the New York Academy of Sciences*, May.
- Belzung, C., and M. Lemoine. 2011. 'Criteria of Validity for Animal Models of Psychiatric Disorders: Focus on Anxiety Disorders and Depression'. *Biol Mood Anxiety Disord* 1 (1): 9.

- Bennabi, D., M. Nicolier, J. Monnin, G. Tio, L. Pazart, P. Vandell, and E. Haffen. 2014. 'Pilot Study of Feasibility of the Effect of Treatment with TDCS in Patients Suffering from Treatment-Resistant Depression Treated with Escitalopram'. *Clinical Neurophysiology*.
- Bennabi, Djamila, and Emmanuel Haffen. 2018. 'Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS): A Promising Treatment for Major Depressive Disorder?' *Brain Sciences* 8 (5).
- Bennett, M. R. 2000. 'The Concept of Long Term Potentiation of Transmission at Synapses'. *Progress in Neurobiology* 60 (2): 109–37.
- Berlim, M. T., F. van den Eynde, S. Tovar-Perdomo, and Z. J. Daskalakis. 2014. 'Response, Remission and Drop-out Rates Following High-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (RTMS) for Treating Major Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind and Sham-Controlled Trials'. *Psychological Medicine* 44 (2): 225–39.
- Berlim, Marcelo T., Frederique Van den Eynde, and Z. Jeff Daskalakis. 2013. 'Clinical Utility of Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) for Treating Major Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind and Sham-Controlled Trials'. *Journal of Psychiatric Research* 47 (1): 1–7.
- Bernardino, Liliana, Sara Xapelli, Ana P. Silva, Birthe Jakobsen, Frantz R. Poulsen, Catarina R. Oliveira, Annamaria Vezzani, João O. Malva, and Jens Zimmer. 2005. 'Modulator Effects of Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha on AMPA-Induced Excitotoxicity in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (29): 6734–44.
- Bielas, H., A. Jud, U. Lips, J. Reichenbach, and M. A. Landolt. 2012. 'Increased Number of Activated T Cells in Lymphocyte Subsets of Maltreated Children: Data from a Pilot Study'. *Journal of Psychosomatic Research* 73 (4): 313–18.
- Bikson, M., Abhishek Datta, Asif Rahman, and Jen Scaturro. 2010. 'Electrode Montages for TDCS and Weak Transcranial Electrical Stimulation: Role of "Return" Electrode's Position and Size'. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 121 (12): 1976–78.
- Bikson, Marom, Masashi Inoue, Hiroki Akiyama, Jackie K. Deans, John E. Fox, Hiroyoshi Miyakawa, and John G. R. Jefferys. 2004. 'Effects of Uniform Extracellular DC Electric Fields on Excitability in Rat Hippocampal Slices in Vitro'. *The Journal of Physiology* 557 (Pt 1): 175–90.
- Bindman, L. J., O. C. Lippold, and J. W. Redfearn. 1964. 'The Action of Brief Polarizing Currents on the Cerebral Cortex of the Rat (1) during Current Flow and (2) in the Production of Long-Lasting after-Effects'. *J Physiol* 172: 369–82.
- Birch, P. J., C. J. Grossman, and A. G. Hayes. 1988. 'Kynurenic Acid Antagonises Responses to NMDA via an Action at the Strychnine-Insensitive Glycine Receptor'. *European Journal of Pharmacology* 154 (1): 85–87.
- Bliss, T. V., and T. Lomo. 1973. 'Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path'. *J Physiol* 232 (2): 331–56.
- Blumberger, D. M., L. C. Tran, P. B. Fitzgerald, K. E. Hoy, and Z. J. Daskalakis. 2013. 'A Randomized Double-Blind Sham-Controlled Study of Transcranial Direct Current Stimulation for Treatment-Resistant Major Depression'. *Front Psychiatry* 3: 74.
- Boggio, P. S., F. Berman, A. O. Vergara, A. L. Muniz, F. H. Nahas, P. B. Leme, S. P. Rigonatti, and F. Fregni. 2007. 'Go-No-Go Task Performance Improvement after Anodal Transcranial DC Stimulation of the Left Dorsolateral Prefrontal Cortex in Major Depression'. *J Affect Disord* 101 (1–3): 91–98.
- Boggio, P. S., S. P. Rigonatti, R. B. Ribeiro, M. L. Myczkowski, M. A. Nitsche, A. Pascual-Leone, and F. Fregni. 2008. 'A Randomized, Double-Blind Clinical Trial on the Efficacy of Cortical Direct Current Stimulation for the Treatment of Major Depression'. *Int J Neuropsychopharmacol* 11 (2): 249–54.

- Bradley, Kailyn A. L., Julia A. C. Case, Omar Khan, Thomas Ricart, Amira Hanna, Carmen M. Alonso, and Vilma Gabbay. 2015. 'The Role of the Kynurenine Pathway in Suicidality in Adolescent Major Depressive Disorder'. *Psychiatry Research* 227 (2–3): 206–12..
- Bramham, C. R., and E. Messaoudi. 2005. 'BDNF Function in Adult Synaptic Plasticity: The Synaptic Consolidation Hypothesis'. *Prog Neurobiol* 76 (2): 99–125.
- Brand, David D., Kary A. Latham, and Edward F. Rosloniec. 2007. 'Collagen-Induced Arthritis'. *Nature Protocols* 2 (5): 1269–75.
- Braun, Ramona, Rebecca Klein, Helene Luise Walter, Maurice Ohren, Lars Freudenmacher, Kaleab Getachew, Anne Ladwig, et al. 2016. 'Transcranial Direct Current Stimulation Accelerates Recovery of Function, Induces Neurogenesis and Recruits Oligodendrocyte Precursors in a Rat Model of Stroke'. *Experimental Neurology* 279 (May): 127–36.
- Brunoni, A. R., P. S. Boggio, R. De Raedt, I. M. Bensenor, P. A. Lotufo, V. Namur, L. C. Valiengo, and M. A. Vanderhasselt. 2014. 'Cognitive Control Therapy and Transcranial Direct Current Stimulation for Depression: A Randomized, Double-Blinded, Controlled Trial'. *J Affect Disord* 162: 43–49.
- Brunoni, A. R., R. Ferrucci, M. Bortolomasi, E. Scelzo, P. S. Boggio, F. Fregni, B. Dell'Osso, M. Giacomuzzi, A. C. Altamura, and A. Priori. 2013. 'Interactions between Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) and Pharmacological Interventions in the Major Depressive Episode: Findings from a Naturalistic Study'. *Eur Psychiatry* 28 (6): 356–61.
- Brunoni, A. R., R. Ferrucci, M. Bortolomasi, M. Vergari, L. Tadini, P. S. Boggio, M. Giacomuzzi, S. Barbieri, and A. Priori. 2011. 'Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) in Unipolar vs. Bipolar Depressive Disorder'. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (1): 96–101.
- Brunoni, A. R., L. Valiengo, A. Baccaro, T. A. Zanao, J. F. de Oliveira, A. Goulart, P. S. Boggio, P. A. Lotufo, I. M. Bensenor, and F. Fregni. 2013. 'The Sertraline vs. Electrical Current Therapy for Treating Depression Clinical Study: Results from a Factorial, Randomized, Controlled Trial'. *JAMA Psychiatry* 70 (4): 383–91.
- Brunoni, André R., Rodrigo Machado-Vieira, Bernardo Sampaio-Junior, Erica L. M. Vieira, Leandro Valiengo, Isabela M. Benseñor, Paulo A. Lotufo, et al. 2015. 'Plasma Levels of Soluble TNF Receptors 1 and 2 after TDCS and Sertraline Treatment in Major Depression: Results from the SELECT-TDCS Trial'. *Journal of Affective Disorders* 185 (October): 209–13.
- Brunoni, André R., Rodrigo Machado-Vieira, Carlos A. Zarate, Leandro Valiengo, Erica Lm Vieira, Isabela M. Benseñor, Paulo A. Lotufo, Wagner F. Gattaz, and Antonio L. Teixeira. 2014. 'Cytokines Plasma Levels during Antidepressant Treatment with Sertraline and Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS): Results from a Factorial, Randomized, Controlled Trial'. *Psychopharmacology* 231 (7): 1315–23.
- Brunoni, André R., Frank Padberg, Erica Leandro Marciano Vieira, Antônio Lucio Teixeira, André F. Carvalho, Paulo Andrade Lotufo, Wagner F. Gattaz, and Isabela Martins Benseñor. 2018. 'Plasma Biomarkers in a Placebo-Controlled Trial Comparing TDCS and Escitalopram Efficacy in Major Depression'. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 86 (August): 211–17.
- Bullitt, E. 1990. 'Expression of C-Fos-like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat'. *The Journal of Comparative Neurology* 296 (4): 517–30.
- Buwalda, Bauke, Maarten H. P. Kole, Alexa H. Veenema, Mark Huininga, Sietse F. de Boer, S. Mechiel Korte, and Jaap M. Koolhaas. 2005. 'Long-Term Effects of Social Stress on Brain and Behavior: A Focus on Hippocampal Functioning'. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 (1): 83–97.
- Cambiaghi, M., L. Teneud, S. Velikova, J. J. Gonzalez-Rosa, M. Cursi, G. Comi, and L. Leocani. 2011. 'Flash Visual Evoked Potentials in Mice Can Be Modulated by Transcranial Direct Current Stimulation'. *Neuroscience* 185 (June): 161–65.

- Cambiaghi, M., S. Velikova, J. J. Gonzalez-Rosa, M. Corsi, G. Comi, and L. Leocani. 2010. 'Brain Transcranial Direct Current Stimulation Modulates Motor Excitability in Mice'. *Eur J Neurosci* 31 (4): 704–9.
- Capuron, Lucile, and Andrew H. Miller. 2011. 'Immune System to Brain Signaling: Neuropsychopharmacological Implications'. *Pharmacology & Therapeutics* 130 (2): 226–38.
- Carpenter, Linda L., Cyrena E. Gawuga, Audrey R. Tyrka, Janet K. Lee, George M. Anderson, and Lawrence H. Price. 2010. 'Association between Plasma IL-6 Response to Acute Stress and Early-Life Adversity in Healthy Adults'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (13): 2617–23.
- Caspi, Avshalom, Karen Sugden, Terrie E. Moffitt, Alan Taylor, Ian W. Craig, HonaLee Harrington, Joseph McClay, et al. 2003. 'Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene'. *Science (New York, N.Y.)* 301 (5631): 386–89.
- Chen, B., D. Dowlatsahi, G. M. MacQueen, J. F. Wang, and L. T. Young. 2001. 'Increased Hippocampal BDNF Immunoreactivity in Subjects Treated with Antidepressant Medication'. *Biological Psychiatry* 50 (4): 260–65.
- Chen, Mu-Hong, Cheng-Ta Li, Wei-Chen Lin, Chen-Jee Hong, Pei-Chi Tu, Ya-Mei Bai, Chih-Ming Cheng, and Tung-Ping Su. 2018. 'Persistent Antidepressant Effect of Low-Dose Ketamine and Activation in the Supplementary Motor Area and Anterior Cingulate Cortex in Treatment-Resistant Depression: A Randomized Control Study'. *Journal of Affective Disorders* 225: 709–14.
- 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 Research. Brain Research Protocols* 16 (1–3): 70–78.
- Chourbaji, Sabine, Alexandre Urani, Ioana Inta, Carles Sanchis-Segura, Christiane Brandwein, Mathias Zink, Markus Schwaninger, and Peter Gass. 2006. 'IL-6 Knockout Mice Exhibit Resistance to Stress-Induced Development of Depression-like Behaviors'. *Neurobiology of Disease* 23 (3): 587–94.
- Cioato, Stefania Giotti, Liciane Fernandes Medeiros, Paulo Ricardo Marques Filho, Rafael Vercelino, Andressa de Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Carla de Oliveira, et al. 2016. 'Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model'. *Brain Stimulation* 9 (2): 209–17.
- Cocco, G., and C. Agué. 1977. 'Interactions between Cardioactive Drugs and Antidepressants'. *European Journal of Clinical Pharmacology* 11 (5): 389–93.
- Cocco, Sara, Maria V. Podda, and Claudio Grassi. 2018. 'Role of BDNF Signaling in Memory Enhancement Induced by Transcranial Direct Current Stimulation'. *Frontiers in Neuroscience* 12 (June).
- Costain, R., J. W. Redfearn, and O. C. Lippold. 1964. 'A CONTROLLED TRIAL OF THE THERAPEUTIC EFFECT OF POLARIZATION OF THE BRAIN IN DEPRESSIVE ILLNESS'. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 110 (November): 786–99.
- Coull, M. A., S. Lowther, C. L. Katona, and R. W. Horton. 2000. 'Altered Brain Protein Kinase C in Depression: A Post-Mortem Study'. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 10 (4): 283–88.
- Creutzfeldt, O. D., G. H. Fromm, and H. Kapp. 1962. 'Influence of Transcortical D-c Currents on Cortical Neuronal Activity'. *Exp Neurol* 5: 436–52.
- Danese, Andrea, and Bruce S. McEwen. 2012. 'Adverse Childhood Experiences, Allostasis, Allostatic Load, and Age-Related Disease'. *Physiology & Behavior* 106 (1): 29–39.
- Danese, Andrea, Terrie E. Moffitt, HonaLee Harrington, Barry J. Milne, Guilherme Polanczyk, Carmine M. Pariante, Richie Poulton, and Avshalom Caspi. 2009. 'Adverse Childhood Experiences and Adult Risk Factors for Age-Related Disease: Depression, Inflammation, and Clustering of Metabolic Risk Markers'. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 163 (12): 1135–43.

- Danner, Marion, Stanislav V. Kasl, Jerome L. Abramson, and Viola Vaccarino. 2003. 'Association between Depression and Elevated C-Reactive Protein'. *Psychosomatic Medicine* 65 (3): 347–56.
- Dantzer, R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, and K. W. Kelley. 2008. 'From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain'. *Nat Rev Neurosci* 9 (1): 46–56.
- Dantzer, Robert. 2017. 'Role of the Kinurenin Metabolism Pathway in Inflammation Induced Depression: Preclinical Approaches'. In *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*, Springer international publishing, 117–38.
- David, Denis J., Benjamin Adam Samuels, Quentin Rainer, Jing-Wen Wang, Douglas Marsteller, Indira Mendez, Michael Drew, et al. 2009. 'Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression'. *Neuron* 62 (4): 479–93.
- Dell'Osso, B., S. Zanoni, R. Ferrucci, M. Vergari, F. Castellano, N. D'Urso, C. Dobra, et al. 2012. 'Transcranial Direct Current Stimulation for the Outpatient Treatment of Poor-Responder Depressed Patients'. *Eur Psychiatry* 27 (7): 513–17.
- Dent, G. W., D. K. Okimoto, M. A. Smith, and S. Levine. 2000. 'Stress-Induced Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopressin Gene Expression in the Paraventricular Nucleus during Ontogeny'. *Neuroendocrinology* 71 (6): 333–42.
- Dockery, C. A., D. Liebetanz, N. Birbaumer, M. Malinowska, and M. J. Wesierska. 2011. 'Cumulative Benefits of Frontal Transcranial Direct Current Stimulation on Visuospatial Working Memory Training and Skill Learning in Rats'. *Neurobiol Learn Mem* 96 (3): 452–60.
- Domínguez-López, Sergio, Rebecca Howell, and Gabriella Gobbi. 2012. 'Characterization of Serotonin Neurotransmission in Knockout Mice: Implications for Major Depression'. *Reviews in the Neurosciences* 23 (4): 429–43.
- Dowlati, Yekta, Nathan Herrmann, Walter Swardfager, Helena Liu, Lauren Sham, Elyse K. Reim, and Krista L. Lanctôt. 2010. 'A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression'. *Biological Psychiatry* 67 (5): 446–57.
- Ducottet, Cecile, Guy Griebel, and Catherine Belzung. 2003. 'Effects of the Selective Nonpeptide Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 Antagonist Antalarmin in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Mice'. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (4): 625–31.
- Ebmeier, Klaus P., Claire Donaghey, and J. Douglas Steele. 2006. 'Recent Developments and Current Controversies in Depression'. *Lancet (London, England)* 367 (9505): 153–67.
- Esterlis, I., N. DellaGioia, R. H. Pietrzak, D. Matuskey, N. Nabulsi, C. G. Abdallah, J. Yang, et al. 2018. 'Ketamine-Induced Reduction in MGLuR5 Availability Is Associated with an Antidepressant Response: An [11C]ABP688 and PET Imaging Study in Depression'. *Molecular Psychiatry* 23 (4): 824–32.
- Faraji, J., A. Gomez-Palacio-Schjetnan, A. Luczak, and G. A. Metz. 2013. 'Beyond the Silence: Bilateral Somatosensory Stimulation Enhances Skilled Movement Quality and Neural Density in Intact Behaving Rats'. *Behav Brain Res* 253: 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.022>.
- Farooq, Rai Khalid, Elsa Isingrini, Arnaud Tanti, Anne-Marie Le Guisquet, Nicolas Arlicot, Frederic Minier, Samuel Leman, Sylvie Chalon, Catherine Belzung, and Vincent Camus. 2012. 'Is Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) a Reliable Model to Study Depression-Induced Neuroinflammation?' *Behavioural Brain Research* 231 (1): 130–37.
- Feighner, J. P. 1999. 'Mechanism of Action of Antidepressant Medications'. *The Journal of Clinical Psychiatry* 60 Suppl 4: 4-11; discussion 12-13.
- Ferrucci, R., M. Bortolomasi, Andre R. Brunoni, M. Vergari, L. Tadini, M. Giacomuzzi, and A. Priori. 2009. 'COMPARATIVE BENEFITS OF TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT STIMULATION (TDCS) TREATMENT IN PATIENTS WITH MILD/MODERATE VS. SEVERE DEPRESSION'. *Clinical Neuropsychiatry*, 2009, sec. 6 (6).

- Ferrucci, R., M. Bortolomasi, M. Vergari, L. Tadini, B. Salvaro, M. Giacomuzzi, S. Barbieri, and A. Priori. 2009. 'Transcranial Direct Current Stimulation in Severe, Drug-Resistant Major Depression'. *J Affect Disord* 118 (1–3): 215–19.
- Finberg, J. P., and M. B. Youdim. 1983. 'Selective MAO A and B Inhibitors: Their Mechanism of Action and Pharmacology'. *Neuropharmacology* 22 (3 Spec No): 441–46.
- Fleshner, Monika, Matthew Frank, and Steven F. Maier. 2017. 'Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 42 (1): 36–45.
- Francis, D. D., F. A. Champagne, D. Liu, and M. J. Meaney. 1999. 'Maternal Care, Gene Expression, and the Development of Individual Differences in Stress Reactivity'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 896: 66–84.
- Fregni, F., P. S. Boggio, M. A. Nitsche, M. A. Marcolin, S. P. Rigonatti, and A. Pascual-Leone. 2006. 'Treatment of Major Depression with Transcranial Direct Current Stimulation'. *Bipolar Disord* 8 (2): 203–4.
- Fregni, F., D. Liebetanz, K. K. Monte-Silva, M. B. Oliveira, A. A. Santos, M. A. Nitsche, A. Pascual-Leone, and R. C. Guedes. 2007. 'Effects of Transcranial Direct Current Stimulation Coupled with Repetitive Electrical Stimulation on Cortical Spreading Depression'. *Exp Neurol* 204 (1): 462–66.
- Freis, E. D. 1954. 'Mental Depression in Hypertensive Patients Treated for Long Periods with Large Doses of Reserpine'. *The New England Journal of Medicine* 251 (25): 1006–8.
- Fritsch, B., J. Reis, K. Martinowich, H. M. Schambra, Y. Ji, L. G. Cohen, and B. Lu. 2010. 'Direct Current Stimulation Promotes BDNF-Dependent Synaptic Plasticity: Potential Implications for Motor Learning'. *Neuron* 66 (2): 198–204.
- Fuchs, Eberhard. 2005. 'Social Stress in Tree Shrews as an Animal Model of Depression: An Example of a Behavioral Model of a CNS Disorder'. *CNS Spectrums* 10 (3): 182–90.
- Gaarden, Torfinn Løddøen, Knut Engedal, Jūratė Šaltytė Benth, Marianne Larsen, Bernhard Lorentzen, Tom Eirik Mollnes, Tor Magne Bjølseth, and Albert Castellheim. 2018. 'Exploration of 27 Plasma Immune Markers: A Cross-Sectional Comparison of 64 Old Psychiatric Inpatients Having Unipolar Major Depression and 18 Non-Depressed Old Persons'. *BMC Geriatrics* 18 (1): 149.
- Gartside, I. B. 1968. 'Mechanisms of Sustained Increases of Firing Rate of Neurones in the Rat Cerebral Cortex after Polarization: Role of Protein Synthesis'. *Nature* 220 (5165): 383–84.
- Gómez-Lázaro, Eneritz, Amaia Arregi, Garikoitz Beitia, Oscar Vegas, Arantza Azpiroz, and Larraitz Garmendia. 2011. 'Individual Differences in Chronically Defeated Male Mice: Behavioral, Endocrine, Immune, and Neurotrophic Changes as Markers of Vulnerability to the Effects of Stress'. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 14 (5): 537–48.
- Gonda, Xenia, Peter Petschner, Nora Eszlari, Daniel Baksa, Andrea Edes, Peter Antal, Gabriella Juhasz, and Gyorgy Bagdy. 2018. 'Genetic Variants in Major Depressive Disorder: From Pathophysiology to Therapy'. *Pharmacology & Therapeutics*, September.
- Goshen, I., T. Kreisel, O. Ben-Menachem-Zidon, T. Licht, J. Weidenfeld, T. Ben-Hur, and R. Yirmiya. 2008. 'Brain Interleukin-1 Mediates Chronic Stress-Induced Depression in Mice via Adrenocortical Activation and Hippocampal Neurogenesis Suppression'. *Molecular Psychiatry* 13 (7): 717–28.
- Gourley, Shannon L., Drew D. Kiraly, Jessica L. Howell, Peter Olausson, and Jane R. Taylor. 2008. 'Acute Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Restores Motivational and Forced Swim Performance After Corticosterone'. *Biological Psychiatry, Neurodegeneration in Dementia and Depression*, 64 (10): 884–90.
- Gourley, Shannon L., Florence J. Wu, Drew D. Kiraly, Jonathan E. Ploski, Alexia T. Kedves, Ronald S. Duman, and Jane R. Taylor. 2008. 'Regionally Specific Regulation of ERK MAP Kinase in a Model of Antidepressant-Sensitive Chronic Depression'. *Biological Psychiatry* 63 (4): 353–59.

- Gray, J.A., and N. McNaughton. 2000. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of Septo-Hippocampal System*. 2nd edition. Oxford: Oxford Univ.Press.
- Green, Ben. 2011. 'Focus on Agomelatine'. *Current Medical Research and Opinion* 27 (4): 745–49.
- Grimonprez, Annelies, Robrecht Raedt, Jeanelle Portelli, Ine Dauwe, Lars Emil Larsen, Charlotte Bouckaert, Jean Delbeke, et al. 2015. 'The Antidepressant-like Effect of Vagus Nerve Stimulation Is Mediated through the Locus Coeruleus'. *Journal of Psychiatric Research* 68 (September): 1–7.
- Grippe, Angela J., Nicole R. Sullivan, Katerina J. Damjanoska, James W. Crane, Gonzalo A. Carrasco, Ju Shi, Zhuo Chen, Francisca Garcia, Nancy A. Muma, and Louis 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* 179 (4): 769–80.
- Gu, Q. 2002. 'Neuromodulatory Transmitter Systems in the Cortex and Their Role in Cortical Plasticity'. *Neuroscience* 111 (4): 815–35.
- Guilloux, Jean-Philippe, Marianne Seney, Nicole Edgar, and Etienne Sibille. 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.
- Halaris, A. 2017. 'Inflammation-Associated Co-Morbidity between Depression and Cardiovascular Disease'. In *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*, Springer Publishing International, 45–70.
- Halassa, M. M., and P. G. Haydon. 2010. 'Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior'. *Annu Rev Physiol* 72: 335–55.
- Hannestad, Jonas, Nicole DellaGioia, and Michael Bloch. 2011. 'The Effect of Antidepressant Medication Treatment on Serum Levels of Inflammatory Cytokines: A Meta-Analysis'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36 (12): 2452–59.
- Hardingham, Neil R., Neil J. Bannister, Jenny C. A. Read, Kevin D. Fox, Giles E. Hardingham, and J. Julian B. Jack. 2006. 'Extracellular Calcium Regulates Postsynaptic Efficacy through Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (23): 6337–45.
- Haroon, Ebrahim, Alexander W. Daguanno, Bobbi J. Woolwine, David R. Goldsmith, Wendy M. Baer, Evanthia C. Wommack, Jennifer C. Felger, and Andrew H. Miller. 2018. 'Antidepressant Treatment Resistance Is Associated with Increased Inflammatory Markers in Patients with Major Depressive Disorder'. *Psychoneuroendocrinology* 95 (May): 43–49.
- Hattori, Y., A. Moriwaki, and Y. Hori. 1990. 'Biphasic Effects of Polarizing Current on Adenosine-Sensitive Generation of Cyclic AMP in Rat Cerebral Cortex'. *Neurosci Lett* 116 (3): 320–24.
- Heils, A., A. Teufel, S. Petri, G. Stöber, P. Riederer, D. Bengel, and K. P. Lesch. 1996. 'Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression'. *Journal of Neurochemistry* 66 (6): 2621–24.
- Herbert, J., I. M. Goodyer, A. B. Grossman, M. H. Hastings, E. R. de Kloet, S. L. Lightman, S. J. Lupien, B. Roozendaal, and J. R. Seckl. 2006. 'Do Corticosteroids Damage the Brain?' *Journal of Neuroendocrinology* 18 (6): 393–411.
- Holderbach, R., K. Clark, J. L. Moreau, J. Bischofberger, and C. Normann. 2007. 'Enhanced Long-Term Synaptic Depression in an Animal Model of Depression'. *Biol Psychiatry* 62 (1): 92–100.
- Holm, K. J., and A. Markham. 1999. 'Mirtazapine: A Review of Its Use in Major Depression'. *Drugs* 57 (4): 607–31.
- Holmans, Peter, Myrna M. Weissman, George S. Zubenko, William A. Scheftner, Raymond R. Crowe, J. Raymond Depaulo, James A. Knowles, et al. 2007. 'Genetics of Recurrent Early-Onset Major Depression (GenRED): Final Genome Scan Report'. *The American Journal of Psychiatry* 164 (2): 248–58.
- Holtzheimer, Paul E., and Helen S. Mayberg. 2011. 'Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disorders'. *Annual Review of Neuroscience* 34: 289–307.

- Hrdina, P. D., D. Bakish, A. Ravindran, J. Chudzik, P. Cavazzoni, and Y. D. Lapierre. 1997. 'Platelet Serotonergic Indices in Major Depression: Up-Regulation of 5-HT_{2A} Receptors Unchanged by Antidepressant Treatment'. *Psychiatry Research* 66 (2–3): 73–85.
- Hu, S., W. S. Sheng, L. C. Ehrlich, P. K. Peterson, and C. C. Chao. 2000. 'Cytokine Effects on Glutamate Uptake by Human Astrocytes'. *Neuroimmunomodulation* 7 (3): 153–59.
- Huang, Mao-Hsuan, Mu-Hong Chen, Pei-Chi Tu, Ya Mei Bai, Tung-Ping Su, Bang-Hung Yang, Ren-Shyan Liu, and Cheng-Ta Li. 2018. 'Elevated Tumor Necrosis Factor-Alpha Receptor Subtype 1 and the Association with Abnormal Brain Function in Treatment-Resistant Depression'. *Journal of Affective Disorders* 235 (August): 250–56.
- Ibarguen-Vargas, Yadira, Alexandre Surget, Chadi Touma, Rupert Palme, and Catherine Belzung. 2008. 'Multifaceted Strain-Specific Effects in a Mouse Model of Depression and of Antidepressant Reversal'. *Psychoneuroendocrinology* 33 (10): 1357–68.
- Iñiguez, Sergio D., Brandon L. Warren, Eric M. Parise, Lyonna F. Alcantara, Brittney Schuh, Melissa L. Maffeo, Zarko Manojlovic, and Carlos A. Bolaños-Guzmán. 2009. 'Nicotine Exposure during Adolescence Induces a Depression-like State in Adulthood'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34 (6): 1609–24.
- Irwin, M., M. Daniels, T. L. Smith, E. Bloom, and H. Weiner. 1987. 'Impaired Natural Killer Cell Activity during Bereavement'. *Brain, Behavior, and Immunity* 1 (1): 98–104.
- Irwin, Michael R., and Andrew H. Miller. 2007. 'Depressive Disorders and Immunity: 20 Years of Progress and Discovery'. *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (4): 374–83.
- Iscan, Zafer, Gopalkumar Rakesh, Samantha Rossano, Jie Yang, Mengru Zhang, Jeffrey Miller, Gregory M. Sullivan, et al. 2017. 'A Positron Emission Tomography Study of the Serotonergic System in Relation to Anxiety in Depression'. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 27 (10): 1011–21.
- Islam, N., M. Aftabuddin, A. Moriwaki, Y. Hattori, and Y. Hori. 1995. 'Increase in the Calcium Level Following Anodal Polarization in the Rat Brain'. *Brain Res* 684 (2): 206–8.
- Islam, N., M. Aftabuddin, A. Moriwaki, and Y. Hori. 1997. 'Effects of Anodal Polarization on Protein Kinase Cgamma (PKCgamma) in the Rat Brain'. *Indian J Physiol Pharmacol* 41 (3): 204–10.
- Islam, N., A. Moriwaki, and Y. Hori. 1995. 'Co-Localization of c-Fos Protein and Protein Kinase C Gamma in the Rat Brain Following Anodal Polarization'. *Indian J Physiol Pharmacol* 39 (3): 209–15.
- Itoh, Y., R. Oishi, M. Nishibori, and K. Saeki. 1990. 'In Vivo Measurement of Noradrenaline and 3,4-Dihydroxyphenylethyleneglycol in the Rat Hypothalamus by Microdialysis: Effects of Various Drugs Affecting Noradrenaline Metabolism'. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 255 (3): 1090–97.
- Iwata, Masaaki, Kristie T. Ota, and Ronald S. Duman. 2013. 'The Inflammasome: Pathways Linking Psychological Stress, Depression, and Systemic Illnesses'. *Brain, Behavior, and Immunity* 31 (July): 105–14.
- Jaffe, L. F. 1977. 'Electrophoresis along Cell Membranes'. *Nature* 265 (5595): 600–602.
- Jesulola, Emmanuel, Peter Micalos, and Ian J. Baguley. 2018. 'Understanding the Pathophysiology of Depression: From Monoamines to the Neurogenesis Hypothesis Model - Are We There Yet?' *Behavioural Brain Research* 341: 79–90.
- Jiang, T., R. X. Xu, A. W. Zhang, W. Di, Z. J. Xiao, J. Y. Miao, N. Luo, and Y. N. Fang. 2012. 'Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Hemichannel Pannexin-1 and Neural Plasticity in Rat Model of Cerebral Infarction'. *Neuroscience* 226: 421–26.
- Johnson, Sarah A., Neil M. Fournier, and Lisa E. Kalynchuk. 2006. 'Effect of Different Doses of Corticosterone on Depression-like Behavior and HPA Axis Responses to a Novel Stressor'. *Behavioural Brain Research* 168 (2): 280–88.
- Kabakov, Anatoli Y., Paul A. Muller, Alvaro Pascual-Leone, Frances E. Jensen, and Alexander Rotenberg. 2012. 'Contribution of Axonal Orientation to Pathway-Dependent Modulation of

- Excitatory Transmission by Direct Current Stimulation in Isolated Rat Hippocampus'. *Journal of Neurophysiology* 107 (7): 1881–89.
- Kalu, U. G., C. E. Sexton, C. K. Loo, and K. P. Ebmeier. 2012. 'Transcranial Direct Current Stimulation in the Treatment of Major Depression: A Meta-Analysis'. *Psychological Medicine* 42 (9): 1791–1800.
- Kalueff, Allan V., and Pentti Tuohimaa. 2004. 'Grooming Analysis Algorithm for Neurobehavioural Stress Research'. *Brain Research. Brain Research Protocols* 13 (3): 151–58.
- Kamida, T., S. Kong, N. Eshima, T. Abe, M. Fujiki, and H. Kobayashi. 2010. 'Transcranial Direct Current Stimulation Decreases Convulsions and Spatial Memory Deficits Following Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Immature Rats'. *Behav Brain Res* 217 (1): 99–103.
- Karege, F., G. Perret, G. Bondolfi, M. Schwald, G. Bertschy, and J. M. Aubry. 2002. 'Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Major Depressed Patients'. *Psychiatry Res* 109 (2): 143–48.
- Karg, Katja, Margit Burmeister, Kerby Shedden, and Srijan Sen. 2011. 'The Serotonin Transporter Promoter Variant (5-HTTLPR), Stress, and Depression Meta-Analysis Revisited: Evidence of Genetic Moderation'. *Archives of General Psychiatry* 68 (5): 444–54.
- Kaster, Manuella P., Vinícius M. Gadotti, João B. Calixto, Adair R. S. Santos, and Ana Lúcia S. Rodrigues. 2012. 'Depressive-like Behavior Induced by Tumor Necrosis Factor- α in Mice'. *Neuropharmacology* 62 (1): 419–26.
- Katz, R. J. 1981. 'Animal Model of Depression: Effects of Electroconvulsive Shock Therapy'. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 5 (2): 273–77.
- Katz, R. J., K. A. Roth, and B. J. Carroll. 1981. 'Acute and Chronic Stress Effects on Open Field Activity in the Rat: Implications for a Model of Depression'. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 5 (2): 247–51.
- Katz, R. J., and M. Sibel. 1982. 'Animal Model of Depression: Tests of Three Structurally and Pharmacologically Novel Antidepressant Compounds'. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 16 (6): 973–77.
- Kaufman, Joshua, Christine DeLorenzo, Sunia Choudhury, and Ramin V. Parsey. 2016. 'The 5-HT1A Receptor in Major Depressive Disorder'. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26 (3): 397–410.
- Keltner, Norman L., and Deborah J. Boschini. 2009. 'Electroconvulsive Therapy'. *Perspectives in Psychiatric Care* 45 (1): 66–70.
- Kim, Min Sun, Ho Koo, Sang Who Han, Walter Paulus, Michael A. Nitsche, Yun-Hee Kim, Jin A. Yoon, and Yong-Il Shin. 2017. 'Repeated Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Induces Neural Plasticity-Associated Gene Expression in the Rat Cortex and Hippocampus'. *Restorative Neurology and Neuroscience* 35 (2): 137–46.
- Kim, S. J., B. K. Kim, Y. J. Ko, M. S. Bang, M. H. Kim, and T. R. Han. 2010. 'Functional and Histologic Changes after Repeated Transcranial Direct Current Stimulation in Rat Stroke Model'. *J Korean Med Sci* 25 (10): 1499–1505.
- Kim, Soyoung, Mary C. Stephenson, Peter G. Morris, and Stephen R. Jackson. 2014. 'TDCS-Induced Alterations in GABA Concentration within Primary Motor Cortex Predict Motor Learning and Motor Memory: A 7 T Magnetic Resonance Spectroscopy Study'. *NeuroImage* 99 (October): 237–43..
- Köhler, Ole, Michael E. Benros, Merete Nordentoft, Michael E. Farkouh, Rupa L. Iyengar, Ole Mors, and Jesper Krogh. 2014. 'Effect of Anti-Inflammatory Treatment on Depression, Depressive Symptoms, and Adverse Effects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials'. *JAMA Psychiatry* 71 (12): 1381–91.
- Krause, Beatrix, Javier Márquez-Ruiz, and Roi Cohen Kadosh. 2013. 'The Effect of Transcranial Direct Current Stimulation: A Role for Cortical Excitation/Inhibition Balance?' *Frontiers in Human Neuroscience* 7 (September)..

- Krishnadas, Rajeev, and Jonathan Cavanagh. 2012. 'Depression: An Inflammatory Illness?' *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 83 (5): 495–502.
- Krishnan, Vaishnav, Ming-Hu Han, Danielle L. Graham, Olivier Berton, William Renthal, Scott J. Russo, Quincey Laplant, et al. 2007. 'Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions'. *Cell* 131 (2): 391–404.
- Kronberg, Greg, Morgan Bridi, Ted Abel, Marom Bikson, and Lucas C. Parra. 2017. 'Direct Current Stimulation Modulates LTP and LTD: Activity Dependence and Dendritic Effects'. *Brain Stimulation* 10 (1): 51–58.
- Kubera, M., A. Basta-Kaim, V. Holan, A. Simbirtsev, A. Roman, N. Pigareva, E. Prokopieva, and J. Sham. 1998. 'Effect of Mild Chronic Stress, as a Model of Depression, on the Immunoreactivity of C57BL/6 Mice'. *International Journal of Immunopharmacology* 20 (12): 781–89.
- Kuo, Hsiao-I., Walter Paulus, Giorgi Batsikadze, Asif Jamil, Min-Fang Kuo, and Michael A. Nitsche. 2016. 'Chronic Enhancement of Serotonin Facilitates Excitatory Transcranial Direct Current Stimulation-Induced Neuroplasticity'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41 (5): 1223–30.
- Kuo, Min-Fang, Walter Paulus, and Michael A. Nitsche. 2008. 'Boosting Focally-Induced Brain Plasticity by Dopamine'. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 18 (3): 648–51.
- Laste, G., W. Caumo, L. N. Adachi, J. R. Rozisky, I. C. de Macedo, P. R. Filho, W. A. Partata, F. Fregni, and I. L. Torres. 2012a. 'After-Effects of Consecutive Sessions of Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) in a Rat Model of Chronic Inflammation'. *Exp Brain Res.*
- Lawson, Marcus A., Jennifer M. Parrott, Robert H. McCusker, Robert Dantzer, Keith W. Kelley, and Jason C. O'Connor. 2013. 'Intracerebroventricular Administration of Lipopolysaccharide Induces Indoleamine-2,3-Dioxygenase-Dependent Depression-like Behaviors'. *Journal of Neuroinflammation* 10 (July): 87.
- Lee, Minkyung, Young Hoon Ryu, Won Gil Cho, Tae Joo Jeon, Chul Hyoung Lyoo, Yeo Wool Kang, Soo Jin Lee, et al. 2014. 'Dopaminergic Neuron Destruction Reduces Hippocampal Serotonin 1A Receptor Uptake of Trans-[(18)F]Mefway'. *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine* 94 (December): 30–34.
- Lee, Minkyung, Young Hoon Ryu, Won Gil Cho, Yeo Wool Kang, Soo Jin Lee, Tae Joo Jeon, Chul Hyoung Lyoo, et al. 2015. 'Relationship between Dopamine Deficit and the Expression of Depressive Behavior Resulted from Alteration of Serotonin System'. *Synapse (New York, N.Y.)* 69 (9): 453–60.
- Lefaucheur, J. P. 2009. 'Methods of Therapeutic Cortical Stimulation'. *Neurophysiol Clin* 39 (1): 1–14.
- Lefaucheur, Jean-Pascal, Nathalie André-Obadia, Andrea Antal, Samar S. Ayache, Chris Baeken, David H. Benninger, Roberto M. Cantello, et al. 2014. 'Evidence-Based Guidelines on the Therapeutic Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (RTMS)'. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 125 (11): 2150–2206.
- Leffa, Douglas Teixeira, Bruna Bellaver, Artur Alban Salvi, Carla de Oliveira, Wolnei Caumo, Eugenio Horacio Grevet, Felipe Fregni, André Quincozes-Santos, Luis Augusto Rohde, and Iraci L. S. Torres. 2018. 'Transcranial Direct Current Stimulation Improves Long-Term Memory Deficits in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Modulates Oxidative and Inflammatory Parameters'. *Brain Stimulation* 11 (4): 743–51.
- Leffa, Douglas Teixeira, Andressa de Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Eugenio Horacio Grevet, Wolnei Caumo, Diogo Onofre de Souza, Luis Augusto Paim Rohde, and Iraci L. S. Torres. 2016. 'Transcranial Direct Current Stimulation Improves Short-Term Memory in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder'. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26 (2): 368–77.

- Lepping, P., C. Schönfeldt-Lecuona, R. S. Sambhi, S. V. N. Lanka, S. Lane, R. Whittington, S. Leucht, and R. Poole. 2014. 'A Systematic Review of the Clinical Relevance of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation'. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 130 (5): 326–41.
- Lesch, K. P., U. Balling, J. Gross, K. Strauss, B. L. Wolozin, D. L. Murphy, and P. Riederer. 1994. 'Organization of the Human Serotonin Transporter Gene'. *Journal of Neural Transmission. General Section* 95 (2): 157–62.
- Lesch, K. P., D. Bengel, A. Heils, S. Z. Sabol, B. D. Greenberg, S. Petri, J. Benjamin, C. R. Müller, D. H. Hamer, and D. L. Murphy. 1996. 'Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region'. *Science (New York, N.Y.)* 274 (5292): 1527–31.
- Lestage, J., D. Verrier, K. Palin, and R. Dantzer. 2002. 'The Enzyme Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Induced in the Mouse Brain in Response to Peripheral Administration of Lipopolysaccharide and Superantigen'. *Brain, Behavior, and Immunity* 16 (5): 596–601.
- Li, Cheng-Ta, Mu-Hong Chen, Wei-Chen Lin, Chen-Jee Hong, Bang-Hung Yang, Ren-Shyan Liu, Pei-Chi Tu, and Tung-Ping Su. 2016. 'The Effects of Low-Dose Ketamine on the Prefrontal Cortex and Amygdala in Treatment-Resistant Depression: A Randomized Controlled Study'. *Human Brain Mapping* 37 (3): 1080–90.
- Li, Song, Che Wang, Wei Wang, Huiping Dong, Peng Hou, and Yiyuan Tang. 2008. 'Chronic Mild Stress Impairs Cognition in Mice: From Brain Homeostasis to Behavior'. *Life Sciences* 82 (17–18): 934–42.
- Li, Yan, Amanda R. Eskelund, Hua Zhou, David P. Budac, Connie Sánchez, and Maria Gulinello. 2015. 'Behavioral Deficits Are Accompanied by Immunological and Neurochemical Changes in a Mouse Model for Neuropsychiatric Lupus (NP-SLE)'. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 15150–71.
- Liebetanz, D., F. Klinker, D. Hering, R. Koch, M. A. Nitsche, H. Potschka, W. Loscher, W. Paulus, and F. Tergau. 2006. 'Anticonvulsant Effects of Transcranial Direct-Current Stimulation (TDCS) in the Rat Cortical Ramp Model of Focal Epilepsy'. *Epilepsia* 47 (7): 1216–24.
- Liebetanz, D., R. Koch, S. Mayenfels, F. König, W. Paulus, and M. A. Nitsche. 2009. 'Safety Limits of Cathodal Transcranial Direct Current Stimulation in Rats'. *Clin Neurophysiol* 120 (6): 1161–67.
- Liebetanz, D., M. A. Nitsche, F. Tergau, and W. Paulus. 2002. 'Pharmacological Approach to the Mechanisms of Transcranial DC-Stimulation-Induced after-Effects of Human Motor Cortex Excitability'. *Brain* 125 (Pt 10): 2238–47.
- Liu, Bangshan, Jin Liu, Mi Wang, Yan Zhang, and Lingjiang Li. 2017. 'From Serotonin to Neuroplasticity: Evolvement of Theories for Major Depressive Disorder'. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 305.
- Liu, Celina S., Alexander Adibfar, Nathan Herrmann, Damien Gallagher, and Krista L. Lanctôt. 2017. 'Evidence for Inflammation-Associated Depression'. In *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*, Springer International Publishing, 3–30.
- Liu, Rong-Pei, Ming Zou, Jian-Yong Wang, Juan-Juan Zhu, Jun-Mei Lai, Li-Li Zhou, Song-Fang Chen, Xiong Zhang, and Jian-Hong Zhu. 2014. 'Paroxetine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Microglia Activation via Differential Regulation of MAPK Signaling'. *Journal of Neuroinflammation* 11 (March): 47.
- Liu, Weina, Hui Sheng, Yongjun Xu, Yu Liu, Jianqiang Lu, and Xin Ni. 2013. 'Swimming Exercise Ameliorates Depression-like Behavior in Chronically Stressed Rats: Relevant to Proinflammatory Cytokines andIDO Activation'. *Behavioural Brain Research* 242 (April): 110–16.
- Liu, Yanyong, Nan Yang, Wenyu Hao, Qing Zhao, Tianyi Ying, Shangyi Liu, Qing Li, et al. 2011. 'Dynamic Proteomic Analysis of Protein Expression Profiles in Whole Brain of Balb/C Mice Subjected to Unpredictable Chronic Mild Stress: Implications for Depressive Disorders and Future Therapies'. *Neurochemistry International* 58 (8): 904–13.

- Liu, Yu-Ning, Yun-Li Peng, Lei-Liu, Teng-Yun Wu, Yi Zhang, Yong-Jie Lian, Yuan-Yuan Yang, Keith W Kelley, Chun-Lei Jiang, and Yun-Xia Wang. 2015. 'TNF α Mediates Stress-Induced Depression by Upregulating Indoleamine 2,3-Dioxygenase in a Mouse Model of Unpredictable Chronic Mild Stress'. *European Cytokine Network* 26 (1): 15–25.
- Livingston, M. G., and H. M. Livingston. 1996. 'Monoamine Oxidase Inhibitors. An Update on Drug Interactions'. *Drug Safety* 14 (4): 219–27.
- Loo, C. K., A. Alonzo, D. Martin, P. B. Mitchell, V. Galvez, and P. Sachdev. 2012. 'Transcranial Direct Current Stimulation for Depression: 3-Week, Randomised, Sham-Controlled Trial'. *Br J Psychiatry* 200 (1): 52–59.
- Loo, Colleen K., Perminder Sachdev, Donel Martin, Melissa Pigot, Angelo Alonzo, Gin S. Malhi, Jim Lagopoulos, and Philip Mitchell. 2010. 'A Double-Blind, Sham-Controlled Trial of Transcranial Direct Current Stimulation for the Treatment of Depression'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13 (1): 61–69.
- López-López, Ana Laura, Herlinda Bonilla Jaime, María Del Carmen Escobar Villanueva, Malinalli Brianza Padilla, Gonzalo Vázquez Palacios, and Francisco Javier Alarcón Aguilar. 2016. 'Chronic Unpredictable Mild Stress Generates Oxidative Stress and Systemic Inflammation in Rats'. *Physiology & Behavior* 161: 15–23.
- Lu, Yuan, Kimberly Christian, and Bai Lu. 2008. 'BDNF: A Key Regulator for Protein Synthesis-Dependent LTP and Long-Term Memory?' *Neurobiology of Learning and Memory* 89 (3): 312–23.
- 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'. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (3): 702–21.
- Maes, Michael. 2008. 'The Cytokine Hypothesis of Depression: Inflammation, Oxidative & Nitrosative Stress (IO&NS) and Leaky Gut as New Targets for Adjunctive Treatments in Depression'. *Neuro Endocrinology Letters* 29 (3): 287–91.
- Magistretti, P. J. 2006. 'Neuron-Glia Metabolic Coupling and Plasticity'. *J Exp Biol* 209 (Pt 12): 2304–11.
- Malenka, R. C., and M. F. Bear. 2004. 'LTP and LTD: An Embarrassment of Riches'. *Neuron* 44 (1): 5–21.
- Manikowska, Katarzyna, Monika Mikołajczyk, Przemysław Ł. Mikołajczak, and Teresa Bobkiewicz-Kozłowska. 2014. 'The Influence of Mianserin on TNF- α , IL-6 and IL-10 Serum Levels in Rats under Chronic Mild Stress'. *Pharmacological Reports: PR* 66 (1): 22–27.
- Manta, Stella, Mostafa El Mansari, Guy Debonnel, and Pierre Blier. 2013. 'Electrophysiological and Neurochemical Effects of Long-Term Vagus Nerve Stimulation on the Rat Monoaminergic Systems'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16 (2): 459–70.
- Martin, D. M., A. Alonzo, K. A. Ho, M. Player, P. B. Mitchell, P. Sachdev, and C. K. Loo. 2013. 'Continuation Transcranial Direct Current Stimulation for the Prevention of Relapse in Major Depression'. *J Affect Disord* 144 (3): 274–78.
- Martin, D. M., A. Alonzo, P. B. Mitchell, P. Sachdev, V. Galvez, and C. K. Loo. 2011. 'Fronto-Extracerebral Transcranial Direct Current Stimulation as a Treatment for Major Depression: An Open-Label Pilot Study'. *J Affect Disord* 134 (1–3): 459–63.
- Martín-Hernández, David, Hiram Tendilla-Beltrán, José L. M. Madrigal, Borja García-Bueno, Juan C. Leza, and Javier R. Caso. 2018. 'Chronic Mild Stress Alters Kynurenine Pathways Changing the Glutamate Neurotransmission in Frontal Cortex of Rats'. *Molecular Neurobiology*, May.
- Massimini, M., and F. Amzica. 2001. 'Extracellular Calcium Fluctuations and Intracellular Potentials in the Cortex during the Slow Sleep Oscillation'. *Journal of Neurophysiology* 85 (3): 1346–50.
- McClintock, Shawn M., Irving M. Reti, Linda L. Carpenter, William M. McDonald, Marc Dubin, Stephan F. Taylor, Ian A. Cook, et al. 2018. 'Consensus Recommendations for the Clinical Application

- of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (RTMS) in the Treatment of Depression'. *The Journal of Clinical Psychiatry* 79 (1).
- Mekiri, Maryam, Alain M. Gardier, Denis J. David, and Jean-Philippe Guilloux. 2017. 'Chronic Corticosterone Administration Effects on Behavioral Emotionality in Female C57bl6 Mice'. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 25 (2): 94–104.
- Mendonca, M. E., M. B. Santana, A. F. Baptista, A. Datta, M. Bikson, F. Fregni, and C. P. Araujo. 2011. 'Transcranial DC Stimulation in Fibromyalgia: Optimized Cortical Target Supported by High-Resolution Computational Models'. *J Pain* 12 (5): 610–17.
- Meyer, Jeffrey H., Alan A. Wilson, Sandra Sagrati, Doug Hussey, Anna Carella, William Z. Potter, Nathalie Ginovart, Edgar P. Spencer, Andy Cheok, and Sylvain Houle. 2004. 'Serotonin Transporter Occupancy of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors at Different Doses: An [11C]DASB Positron Emission Tomography Study'. *The American Journal of Psychiatry* 161 (5): 826–35.
- Miczek, K. A., J. L. Altman, J. B. Appel, and W. O. Boggan. 1975. 'Para-Chlorophenylalanine, Serotonin and Killing Behavior'. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 3 (3): 355–61.
- Miller, Gregory E., and Steve W. Cole. 2012. 'Clustering of Depression and Inflammation in Adolescents Previously Exposed to Childhood Adversity'. *Biological Psychiatry* 72 (1): 34–40.
- Mirescu, Christian, Jennifer D. Peters, and Elizabeth Gould. 2004. 'Early Life Experience Alters Response of Adult Neurogenesis to Stress'. *Nature Neuroscience* 7 (8): 841–46.
- Molaei-Ardekani, B., J. Marquez-Ruiz, I. Merlet, R. Leal-Campanario, A. Gruart, R. Sanchez-Campusano, G. Birot, G. Ruffini, J. M. Delgado-Garcia, and F. Wendling. 2013. 'Effects of Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) on Cortical Activity: A Computational Modeling Study'. *Brain Stimul* 6 (1): 25–39.
- Möller, Marisa, Jan L. Du Preez, Francois P. Viljoen, Michael Berk, Robin Emsley, and Brian H. Harvey. 2013. 'Social Isolation Rearing Induces Mitochondrial, Immunological, Neurochemical and Behavioural Deficits in Rats, and Is Reversed by Clozapine or N-Acetyl Cysteine'. *Brain, Behavior, and Immunity* 30 (May): 156–67..
- Monai, Hiromu, and Hajime Hirase. 2018. 'Astrocytes as a Target of Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) to Treat Depression'. *Neuroscience Research* 126 (January): 15–21.
- Monai, Hiromu, Masamichi Ohkura, Mika Tanaka, Yuki Oe, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Katsuhiko Mikoshiba, et al. 2016. 'Calcium Imaging Reveals Glial Involvement in Transcranial Direct Current Stimulation-Induced Plasticity in Mouse Brain'. *Nature Communications* 7 (March): 11100.
- Moreau, Maïté, Caroline André, Jason C. O'Connor, Sara A. Dumich, Jeffrey A. Woods, Keith W. Kelley, Robert Dantzer, Jacques Lestage, and Nathalie Castanon. 2008. 'Inoculation of Bacillus Calmette-Guérin to Mice Induces an Acute Episode of Sickness Behavior Followed by Chronic Depressive-like Behavior'. *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (7): 1087–95.
- Moreau, Maïté, Jacques Lestage, Daniele Verrier, Cecile Mormede, Keith W. Kelley, Robert Dantzer, and Nathalie Castanon. 2005. 'Bacille Calmette-Guérin Inoculation Induces Chronic Activation of Peripheral and Brain Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Mice'. *The Journal of Infectious Diseases* 192 (3): 537–44.
- Moriguchi, Sho, Harumasa Takano, Yasuyuki Kimura, Tomohisa Nagashima, Keisuke Takahata, Manabu Kubota, Soichiro Kitamura, et al. 2017. 'Occupancy of Norepinephrine Transporter by Duloxetine in Human Brains Measured by Positron Emission Tomography with (S,S)-[18F]FMeNER-D2'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 20 (12): 957–62.
- Moriguchi, Sho, Makiko Yamada, Harumasa Takano, Tomohisa Nagashima, Keisuke Takahata, Keita Yokokawa, Takehito Ito, et al. 2017. 'Norepinephrine Transporter in Major Depressive Disorder: A PET Study'. *The American Journal of Psychiatry* 174 (1): 36–41.
- Moriwaki, A. 1991. 'Polarizing Currents Increase Noradrenaline-Elicited Accumulation of Cyclic AMP in Rat Cerebral Cortex'. *Brain Research* 544 (2): 248–52.

- Moriwaki, A., N. Islam, Y. Hattori, and Y. Hori. 1995. 'Induction of Fos Expression Following Anodal Polarization in Rat Brain'. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 49 (5–6): 295–98.
- Morrell, F. 1961. 'Effect of Anodal Polarization on the Firing Pattern of Single Cortical Cells'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 92 (July): 860–76.
- Muellbacher, Wolf, Ulf Ziemann, Joerg Wissel, Nguyet Dang, Markus Kofler, Stefano Facchini, Babak Boroojerdi, Werner Poewe, and Mark Hallett. 2002. 'Early Consolidation in Human Primary Motor Cortex'. *Nature* 415 (6872): 640–44.
- Murray, Fraser, David W. Smith, and Peter H. Hutson. 2008a. 'Chronic Low Dose Corticosterone Exposure Decreased Hippocampal Cell Proliferation, Volume and Induced Anxiety and Depression like Behaviours in Mice'. *European Journal of Pharmacology* 583 (1): 115–27.
- Muscat, R., M. Papp, and P. Willner. 1992. 'Reversal of Stress-Induced Anhedonia by the Atypical Antidepressants, Fluoxetine and Maprotiline'. *Psychopharmacology (Berl)* 109 (4): 433–38.
- Mutz, Julian, Daniel R. Edgcumbe, Andre R. BrunoniMD, and Cynthia H. Y. FuMD. 2018. 'Efficacy and Acceptability of Non-Invasive Brain Stimulation for the Treatment of Adult Unipolar and Bipolar Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Sham-Controlled Trials'. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, May.
- Myint, A. M., and Y. K. Kim. 2003. 'Cytokine-Serotonin Interaction through IDO: A Neurodegeneration Hypothesis of Depression'. *Medical Hypotheses* 61 (5–6): 519–25.
- Myint, Aye-Mu, Yong Ku Kim, Robert Verkerk, Simon Scharpé, Harry Steinbusch, and Brian Leonard. 2007. 'Kynurenine Pathway in Major Depression: Evidence of Impaired Neuroprotection'. *Journal of Affective Disorders* 98 (1–2): 143–51.
- Nemeroff, Charles B., Helen S. Mayberg, Scott E. Krahl, James McNamara, Alan Frazer, Thomas R. Henry, Mark S. George, Dennis S. Charney, and Stephen K. Brannan. 2006. 'VNS Therapy in Treatment-Resistant Depression: Clinical Evidence and Putative Neurobiological Mechanisms'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31 (7): 1345–55.
- Nemeroff, Charles B., and Wylie W. Vale. 2005. 'The Neurobiology of Depression: Inroads to Treatment and New Drug Discovery'. *The Journal of Clinical Psychiatry* 66 Suppl 7: 5–13.
- Nestler, E. J., and S. E. Hyman. 2010. 'Animal Models of Neuropsychiatric Disorders'. *Nat Neurosci* 13.
- Nestler, Eric J., Michel Barrot, Ralph J. DiLeone, Amelia J. Eisch, Stephen J. Gold, and Lisa M. Monteggia. 2002. 'Neurobiology of Depression'. *Neuron* 34 (1): 13–25.
- Nestler, Eric J., Elizabeth Gould, Hussein Manji, Maja Bunčan, Ronald S. Duman, Howard K. Greshenfeld, Ren Hen, et al. 2002. 'Preclinical Models: Status of Basic Research in Depression'. *Biological Psychiatry* 52 (6): 503–28.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, and R. S. Duman. 1996. 'Chronic Antidepressant Administration Increases the Expression of CAMP Response Element Binding Protein (CREB) in Rat Hippocampus'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (7): 2365–72.
- Nicolaides, Nicolas C., Elli Kyratzi, Agaristi Lamprokostopoulou, George P. Chrousos, and Evangelia Charmandari. 2015. 'Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids'. *Neuroimmunomodulation* 22 (1–2): 6–19.
- Nicoll, R. A. 2003. 'Expression Mechanisms Underlying Long-Term Potentiation: A Postsynaptic View'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 (1432): 721–26.
- Nitsche, M. A., K. Fricke, U. Henschke, A. Schlitterlau, D. Liebetanz, N. Lang, S. Henning, F. Tergau, and W. Paulus. 2003. 'Pharmacological Modulation of Cortical Excitability Shifts Induced by Transcranial Direct Current Stimulation in Humans'. *J Physiol* 553 (Pt 1): 293–301.
- Nitsche, M. A., W. Jaussi, D. Liebetanz, N. Lang, F. Tergau, and W. Paulus. 2004. 'Consolidation of Human Motor Cortical Neuroplasticity by D-Cycloserine'. *Neuropsychopharmacology* 29 (8): 1573–78.
- Nitsche, M. A., and W. Paulus. 2000. 'Excitability Changes Induced in the Human Motor Cortex by Weak Transcranial Direct Current Stimulation'. *The Journal of Physiology* 527 Pt 3 (September): 633–39.

- Nitsche, M.A., and Paulus, W. 2001. 'Sustained Excitability Elevations Induced by Transcranial DC Motor Cortex Stimulation in Humans'. *Neurology* 57 (10): 1899–1901.
- Nitsche, Michael A., Leonardo G. Cohen, Eric M. Wassermann, Alberto Priori, Nicolas Lang, Andrea Antal, Walter Paulus, et al. 2008. 'Transcranial Direct Current Stimulation: State of the Art 2008'. *Brain Stimulation* 1 (3): 206–23. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>.
- Nitsche, Michael A., Min-Fang Kuo, Ralf Karrasch, Bettina Wächter, David Liebetanz, and Walter Paulus. 2009. 'Serotonin Affects Transcranial Direct Current-Induced Neuroplasticity in Humans'. *Biological Psychiatry* 66 (5): 503–8.
- Nitsche, Michael A., Christian Lampe, Andrea Antal, David Liebetanz, Nicolas Lang, Frithjof Tergau, and Walter Paulus. 2006. 'Dopaminergic Modulation of Long-Lasting Direct Current-Induced Cortical Excitability Changes in the Human Motor Cortex'. *The European Journal of Neuroscience* 23 (6): 1651–57.
- Nitsche, Michael A., David Liebetanz, Anett Schlitterlau, Undine Henschke, Kristina Fricke, Kai Frommann, Nicolas Lang, Stefan Henning, Walter Paulus, and Frithjof Tergau. 2004. 'GABAergic Modulation of DC Stimulation-Induced Motor Cortex Excitability Shifts in Humans'. *The European Journal of Neuroscience* 19 (10): 2720–26.
- Nollet, Mathieu, Anne-Marie Le Guisquet, and Catherine Belzung. 2013. 'Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice'. *Current Protocols in Pharmacology* Chapter 5 (June): Unit 5.65.
- Obuchowicz, Ewa, Anna M. Bielecka, Monika Paul-Samojedny, Anna Pudełko, and Jan Kowalski. 2014. 'Imipramine and Fluoxetine Inhibit LPS-Induced Activation and Affect Morphology of Microglial Cells in the Rat Glial Culture'. *Pharmacological Reports: PR* 66 (1): 34–43.
- O'Connor, J. C., M. A. Lawson, C. André, M. Moreau, J. Lestage, N. Castanon, K. W. Kelley, and R. Dantzer. 2009. 'Lipopolysaccharide-Induced Depressive-like Behavior Is Mediated by Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activation in Mice'. *Molecular Psychiatry* 14 (5): 511–22.
- Ogilvie, A. D., S. Battersby, V. J. Bubb, G. Fink, A. J. Harmar, G. M. Goodwin, and C. A. Smith. 1996. 'Polymorphism in Serotonin Transporter Gene Associated with Susceptibility to Major Depression'. *Lancet (London, England)* 347 (9003): 731–33.
- Olié, J.P., and M.C. Mouren. 2014. 'Rapport Les Antidépresseurs'. Académie de Médecine. 2014. <http://www.academie-medecine.fr>
- Owens, M. J., and C. B. Nemeroff. 1994. 'Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter'. *Clinical Chemistry* 40 (2): 288–95.
- Palm, U., C. Schiller, Z. Fintescu, M. Obermeier, D. Keeser, E. Reisinger, O. Pogarell, M. A. Nitsche, H. J. Moller, and F. Padberg. 2012. 'Transcranial Direct Current Stimulation in Treatment Resistant Depression: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Study'. *Brain Stimul* 5 (3): 242–51.
- Pan, Ying, Xu-Yang Chen, Qing-Yu Zhang, and Ling-Dong Kong. 2014. 'Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Mediates IL-1 β -Related Inflammation in Prefrontal Cortex of Depressive Rats'. *Brain, Behavior, and Immunity* 41 (October): 90–100.
- Pan, Ying, Wei-Yun Zhang, Xing Xia, and Ling-Dong Kong. 2006. 'Effects of Icaritin on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Action and Cytokine Levels in Stressed Sprague-Dawley Rats'. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29 (12): 2399–2403.
- Paneri, Bhaskar, Devin Adair, Chris Thomas, Niranjana Khadka, Vaishali Patel, William J. Tyler, Lucas Parra, and Marom Bikson. 2016. 'Tolerability of Repeated Application of Transcranial Electrical Stimulation with Limited Outputs to Healthy Subjects'. *Brain Stimulation* 9 (5): 740–54.
- Pariante, Carmine M., and Stafford L. Lightman. 2008. 'The HPA Axis in Major Depression: Classical Theories and New Developments'. *Trends in Neurosciences* 31 (9): 464–68.
- Parsey, Ramin V., Justine M. Kent, Maria A. Oquendo, Misty C. Richards, Mali Pratap, Thomas B. Cooper, Victoria Arango, and J. John Mann. 2006. 'Acute Occupancy of Brain Serotonin

- Transporter by Sertraline as Measured by [11C]DASB and Positron Emission Tomography'. *Biological Psychiatry* 59 (9): 821–28. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.08.010>.
- Parsey, Ramin V., Maria A. Oquendo, R. Todd Ogden, Doreen M. Olvet, Norman Simpson, Yung-Yu Huang, Ronald L. Van Heertum, Victoria Arango, and J. John Mann. 2006. 'Altered Serotonin 1A Binding in Major Depression: A [Carbonyl-C-11]WAY100635 Positron Emission Tomography Study'. *Biological Psychiatry* 59 (2): 106–13.
- Patki, Gaurav, Naimesh Solanki, Fatin Atrooz, Farida Allam, and Samina Salim. 2013. 'Depression, Anxiety-like Behavior and Memory Impairment Are Associated with Increased Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Social Stress'. *Brain Research* 1539 (November): 73–86.
- Peanlikhit, Tanat, Vincent Van Waes, Solène Pedron, Pierre-Yves Risold, Emmanuel Haffen, Adeline Etiévant, and Julie Monnin. 2017. 'The Antidepressant-like Effect of TDCS in Mice: A Behavioral and Neurobiological Characterization'. *Brain Stimulation* 10 (4): 748–56.
- Pedron, S., J. Monnin, E. Haffen, D. Sechter, and V. Van Waes. 2014. 'Repeated Transcranial Direct Current Stimulation Prevents Abnormal Behaviors Associated with Abstinence from Chronic Nicotine Consumption'. *Neuropsychopharmacology* 39 (4): 981–88.
- Pedron, Solène, Julie Monnin, Emmanuel Haffen, Daniel Sechter, and Vincent Van Waes. 2014. 'Repeated Transcranial Direct Current Stimulation Prevents Abnormal Behaviors Associated with Abstinence from Chronic Nicotine Consumption'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (4): 981–88.
- Pelletier, S. J., and F. Cicchetti. 2015. 'Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence from In Vitro and In Vivo Models'. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (2): pyu047-pyu047.
- Pelletier, S. J., M. Lagace, I. St-Amour, D. Arsenault, G. Cisbani, A. Chabrat, S. Fecteau, M. Levesque, and F. Cicchetti. 2015. 'The Morphological and Molecular Changes of Brain Cells Exposed to Direct Current Electric Field Stimulation'. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (5): pyu090-pyu090.
- Pelletier, Simon J., Marie Lagacé, Isabelle St-Amour, Dany Arsenault, Giulia Cisbani, Audrey Chabrat, Shirley Fecteau, Martin Lévesque, and Francesca Cicchetti. 2014. 'The Morphological and Molecular Changes of Brain Cells Exposed to Direct Current Electric Field Stimulation'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (5).
- Persoons, J. H., K. Schornagel, J. Brevé, F. Berkenbosch, and G. Kraal. 1995. 'Acute Stress Affects Cytokines and Nitric Oxide Production by Alveolar Macrophages Differently'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152 (2): 619–24.
- Peruzzotti-Jametti, Luca, Marco Cambiaghi, Marco Bacigaluppi, Mattia Gallizioli, Edoardo Gaude, Silvia Mari, Stefano Sandrone, et al. 2013. 'Safety and Efficacy of Transcranial Direct Current Stimulation in Acute Experimental Ischemic Stroke'. *Stroke* 44 (11): 3166–74.
- Pezawas, Lukas, Andreas Meyer-Lindenberg, Emily M. Drabant, Beth A. Verchinski, Karen E. Munoz, Bhaskar S. Kolachana, Michael F. Egan, Venkata S. Mattay, Ahmad R. Hariri, and Daniel R. Weinberger. 2005. '5-HTTLPR Polymorphism Impacts Human Cingulate-Amygdala Interactions: A Genetic Susceptibility Mechanism for Depression'. *Nature Neuroscience* 8 (6): 828–34.
- Pikhovych, Anton, Nina Paloma Stolberg, Lea Jessica Flitsch, Helene Luise Walter, Rudolf Graf, Gereon Rudolf Fink, Michael Schroeter, and Maria Adele Rueger. 2016. 'Transcranial Direct Current Stimulation Modulates Neurogenesis and Microglia Activation in the Mouse Brain'. *Stem Cells International* 2016: 2715196.
- Podda, Maria Vittoria, Sara Cocco, Alessia Mastrodonato, Salvatore Fusco, Lucia Leone, Saviana Antonella Barbati, Claudia Colussi, Cristian Ripoli, and Claudio Grassi. 2016. 'Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Boosts Synaptic Plasticity and Memory in Mice via Epigenetic Regulation of Bdnf Expression'. *Scientific Reports* 6 (February): 22180.

- Poreisz, Csaba, Klára Boros, Andrea Antal, and Walter Paulus. 2007. 'Safety Aspects of Transcranial Direct Current Stimulation Concerning Healthy Subjects and Patients'. *Brain Research Bulletin* 72 (4–6): 208–14.
- Porsolt, R. D., M. Le Pichon, and M. Jalfre. 1977. 'Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments'. *Nature* 266 (5604): 730–32.
- Pothion, Stéphanie, Jean-Charles Bizot, Fabrice Trovero, and Catherine Belzung. 2004. 'Strain Differences in Sucrose Preference and in the Consequences of Unpredictable Chronic Mild Stress'. *Behavioural Brain Research* 155 (1): 135–46.
- Preux, P., M. Druet-Cabanac, F. Dalmay, and A. Vergnenègre. 2003. 'Qu'est-Ce Qu'un Test Paramétrique?' *Revue Des Maladies Respiratoires* 20: 952–54.
- Pryce, Christopher R., Damiano Azzinnari, Simona Spinelli, Erich Seifritz, Marion Tegethoff, and Gunther Meinlschmidt. 2011. 'Helplessness: A Systematic Translational Review of Theory and Evidence for Its Relevance to Understanding and Treating Depression'. *Pharmacology & Therapeutics* 132 (3): 242–67.
- pryce, Chruistopher R, and Adriano Fontana. 2017. 'Depression in Auto-Immune Diseases'. In *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*, Springer Publishing International, 139–54.
- Purpura, D. P., and J. G. McMurtry. 1965. 'Intracellular Activities and Evoked Potential Changes during Polarization of Motor Cortex'. *J Neurophysiol* 28: 166–85.
- Purves, D, GJ Augustine, D Fitzpatrick, WC Hall, A LaMantia, JO McNamara, and LE White. 2008. *Neuroscience: Fourth Edition Sinauer Associates. Inc* Sunderland. Massachusetts, USA.
- Quan, Ning, and William A. Banks. 2007. 'Brain-Immune Communication Pathways'. *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (6): 727–35.
- Raab, A., R. Dantzer, B. Michaud, P. Mormede, K. Taghzouti, H. Simon, and M. Le Moal. 1986. 'Behavioural, Physiological and Immunological Consequences of Social Status and Aggression in Chronically Coexisting Resident-Intruder Dyads of Male Rats'. *Physiology & Behavior* 36 (2): 223–28.
- Radman, Thomas, Raddy L. Ramos, Joshua C. Brumberg, and Marom Bikson. 2009. 'Role of Cortical Cell Type and Morphology in Subthreshold and Suprathreshold Uniform Electric Field Stimulation in Vitro'. *Brain Stimulation* 2 (4): 215–28, 228.e1-3.
- Rahman, A., D. Reato, M. Arlotti, F. Gasca, A. Datta, L. C. Parra, and M. Bikson. 2013. 'Cellular Effects of Acute Direct Current Stimulation: Somatic and Synaptic Terminal Effects'. *J Physiol* 591 (Pt 10): 2563–78.
- Raison, Charles L. 2017. 'The Promise and Limitations of Anti-Inflammatory Agents for the Treatment of Major Depressive Disorder'. In *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*, Springer International Publishing, 287–302.
- Raison, Charles L., Robin E. Rutherford, Bobbi J. Woolwine, Chen Shuo, Pamela Schettler, Daniel F. Drake, Ebrahim Haroon, and Andrew 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.
- Ranck, J. B. 1975. 'Which Elements Are Excited in Electrical Stimulation of Mammalian Central Nervous System: A Review'. *Brain Research* 98 (3): 417–40.
- Ranieri, F., M. V. Podda, E. Riccardi, G. Frisullo, M. Dileone, P. Profice, F. Pilato, V. Di Lazzaro, and C. Grassi. 2012. 'Modulation of LTP at Rat Hippocampal CA3-CA1 Synapses by Direct Current Stimulation'. *J Neurophysiol* 107 (7): 1868–80.
- Redfearn, J. W., O. C. Lippold, and R. Costain. 1964. 'A PRELIMINARY ACCOUNT OF THE CLINICAL EFFECTS OF POLARIZING THE BRAIN IN CERTAIN PSYCHIATRIC DISORDERS'. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 110 (November): 773–85.
- Rigonatti, S. P., P. S. Boggio, M. L. Myczkowski, E. Otta, J. T. Fiquer, R. B. Ribeiro, M. A. Nitsche, A. Pascual-Leone, and F. Fregni. 2008. 'Transcranial Direct Stimulation and Fluoxetine for the Treatment of Depression'. *Eur Psychiatry* 23 (1): 74–76.

- Rinwa, Puneet, Anil Kumar, and Sukant Garg. 2013. 'Suppression of Neuroinflammatory and Apoptotic Signaling Cascade by Curcumin Alone and in Combination with Piperine in Rat Model of Olfactory Bulbectomy Induced Depression'. *PloS One* 8 (4): e61052.
- Riout-Pedotti, M. S., D. Friedman, and J. P. Donoghue. 2000. 'Learning-Induced LTP in Neocortex'. *Science (New York, N.Y.)* 290 (5491): 533–36.
- Roth, Bradley J. 2009. 'What Does the Ratio of Injected Current to Electrode Area Not Tell Us about TDCS?' *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 120 (6): 1037–38.
- Rueger, Maria Adele, Meike Hedwig Keuters, Maureen Walberer, Ramona Braun, Rebecca Klein, Roland Sparing, Gereon Rudolf Fink, Rudolf Graf, and Michael Schroeter. 2012a. 'Multi-Session Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Elicits Inflammatory and Regenerative Processes in the Rat Brain'. *PloS One* 7 (8): e43776.
- Ruohonen, J., and J. Karhu. 2012. 'TDCS Possibly Stimulates Glial Cells'. *Clin Neurophysiol* 123 (10): 2006–9.
- Russo, Scott J., and Eric J. Nestler. 2013. 'The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders'. *Nature Reviews. Neuroscience* 14 (9): 609–25.
- Rygula, R., N. Abumaria, E. Domenici, C. Hiemke, and E. Fuchs. 2006. 'Effects of Fluoxetine on Behavioral Deficits Evoked by Chronic Social Stress in Rats'. *Behav Brain Res* 174 (1): 188–92.
- Samuels, B. A., and R. Hen. 2011. 'Novelty-Suppressed Feeding in the Mouse'. In *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, Humana Press, 63:107–21. Neuromethods. Springer Protocols.
- Savitz, Jonathan, Robert Dantzer, Brent E. Wurfel, Teresa A. Victor, Bart N. Ford, Jerzy Bodurka, P. S. F. Bellgowan, T. Kent Teague, and Wayne C. Drevets. 2015. 'Neuroprotective Kynurenine Metabolite Indices Are Abnormally Reduced and Positively Associated with Hippocampal and Amygdalar Volume in Bipolar Disorder'. *Psychoneuroendocrinology* 52 (February): 200–211.
- Savitz, Jonathan, and Wayne C. Drevets. 2009. 'Bipolar and Major Depressive Disorder: Neuroimaging the Developmental-Degenerative Divide'. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33 (5): 699–771.
- Savitz, Jonathan, Wayne C. Drevets, Chelsey M. Smith, Teresa A. Victor, Brent E. Wurfel, Patrick S. F. Bellgowan, Jerzy Bodurka, T. Kent Teague, and Robert Dantzer. 2015. 'Putative Neuroprotective and Neurotoxic Kynurenine Pathway Metabolites Are Associated with Hippocampal and Amygdalar Volumes in Subjects with Major Depressive Disorder'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 40 (2): 463–71.
- Schmidt, Frank M., Kenneth C. Kirkby, and Nicole Lichtblau. 2016. 'Inflammation and Immune Regulation as Potential Drug Targets in Antidepressant Treatment'. *Current Neuropharmacology* 14 (7): 674–87.
- Segrave, R. A., S. Arnold, K. Hoy, and P. B. Fitzgerald. 2014. 'Concurrent Cognitive Control Training Augments the Antidepressant Efficacy of TDCS: A Pilot Study'. *Brain Stimul* 7 (2): 325–31.
- Sekine, Mizuho, Ryosuke Arakawa, Hiroshi Ito, Masaki Okumura, Takeshi Sasaki, Hidehiko Takahashi, Harumasa Takano, Yoshiro Okubo, Christer Halldin, and Tetsuya Suhara. 2010. 'Norepinephrine Transporter Occupancy by Antidepressant in Human Brain Using Positron Emission Tomography with (S,S)-[18F]FMENR-D2'. *Psychopharmacology* 210 (3): 331–36.
- Seligman, M. E., and S. F. Maier. 1967. 'Failure to Escape Traumatic Shock'. *Journal of Experimental Psychology* 74 (1): 1–9.
- Serra, M., M. G. Pisu, I. Floris, and G. Biggio. 2005. 'Social Isolation-Induced Changes in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Rat'. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 8 (4): 259–64.
- Seth, R., A. L. Jennings, J. Bindman, J. Phillips, and K. Bergmann. 1992. 'Combination Treatment with Noradrenalin and Serotonin Reuptake Inhibitors in Resistant Depression'. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 161 (October): 562–65.

- Shiozawa, Pedro, Felipe Fregni, Isabela M. Benseñor, Paulo A. Lotufo, Marcelo T. Berlim, Jeff Z. Daskalakis, Quirino Cordeiro, and André R. Brunoni. 2014. 'Transcranial Direct Current Stimulation for Major Depression: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 17 (9): 1443–52.
- Slavich, George M., and Michael R. Irwin. 2014. 'From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression'. *Psychological Bulletin* 140 (3): 774–815.
- Smith, M. A. 1996. 'Hippocampal Vulnerability to Stress and Aging: Possible Role of Neurotrophic Factors'. *Behavioural Brain Research* 78 (1): 25–36.
- Song, Cai, Xiang Yang Zhang, and Mehar Manku. 2009. 'Increased Phospholipase A2 Activity and Inflammatory Response but Decreased Nerve Growth Factor Expression in the Olfactory Bulbectomized Rat Model of Depression: Effects of Chronic Ethyl-Eicosapentaenoate Treatment'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (1): 14–22.
- Spezia Adachi, Lauren Naomi, Wolnei Caumo, Gabriela Laste, Liciane Fernandes Medeiros, Joanna Ripoll Rozisky, Andressa de Souza, Felipe Fregni, and Iraci L. S. Torres. 2012. 'Reversal of Chronic Stress-Induced Pain by Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) in an Animal Model'. *Brain Research* 1489 (December): 17–26.
- Stagg, C. J., and M. A. Nitsche. 2011. 'Physiological Basis of Transcranial Direct Current Stimulation'. *Neuroscientist* 17 (1): 37–53.
- Stagg, Charlotte J., Jonathan G. Best, Mary C. Stephenson, Jacinta O'Shea, Marzena Wylezinska, Z. Tamas Kincses, Peter G. Morris, Paul M. Matthews, and Heidi Johansen-Berg. 2009. 'Polarity-Sensitive Modulation of Cortical Neurotransmitters by Transcranial Stimulation'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (16): 5202–6.
- Stahl, S. M. 1998. 'Mechanism of Action of Serotonin Selective Reuptake Inhibitors. Serotonin Receptors and Pathways Mediate Therapeutic Effects and Side Effects'. *Journal of Affective Disorders* 51 (3): 215–35.
- Stahl, S.M. 2000. 'Blue Genes and the Monoamine Hypothesis of Depression'. *The Journal of Clinical Psychiatry* 61 (2): 77–78.
- Stellwagen, David, Eric C. Beattie, Jae Y. Seo, and Robert C. Malenka. 2005. 'Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor-Alpha'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (12): 3219–28.
- Steptoe, A., G. Willemsen, N. Owen, L. Flower, and V. Mohamed-Ali. 2001. 'Acute Mental Stress Elicits Delayed Increases in Circulating Inflammatory Cytokine Levels'. *Clinical Science (London, England: 1979)* 101 (2): 185–92.
- Sterner, Erin Y., and Lisa E. Kalynchuk. 2010. 'Behavioral and Neurobiological Consequences of Prolonged Glucocorticoid Exposure in Rats: Relevance to Depression'. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, Behavioral and Neurobiological Consequences of Stress*, 34 (5): 777–90.
- Stollberg, J., and S. E. Fraser. 1988. 'Acetylcholine Receptors and Concanavalin A-Binding Sites on Cultured Xenopus Muscle Cells: Electrophoresis, Diffusion, and Aggregation'. *J Cell Biol* 107 (4): 1397–1408.
- Strawbridge, R., D. Arnone, A. Danese, A. Papadopoulos, A. Herane Vives, and A. J. Cleare. 2015. 'Inflammation and Clinical Response to Treatment in Depression: A Meta-Analysis'. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25 (10): 1532–43.
- 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'. *Translational Psychiatry* 2 (December): e199.
- Sullivan, Gregory M., Maria A. Oquendo, Matthew Milak, Jeffrey M. Miller, Ainsley Burke, R. Todd Ogden, Ramin V. Parsey, and J. John Mann. 2015. 'Positron Emission Tomography

- Quantification of Serotonin(1A) Receptor Binding in Suicide Attempters with Major Depressive Disorder'. *JAMA Psychiatry* 72 (2): 169–78.
- Sullivan, P. F., M. C. Neale, and K. S. Kendler. 2000. 'Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis'. *The American Journal of Psychiatry* 157 (10): 1552–62.
- Sun, Peng, Furong Wang, Li Wang, Yu Zhang, Ryo Yamamoto, Tokio Sugai, Qing Zhang, Zhengda Wang, and Nobuo Kato. 2011. 'Increase in Cortical Pyramidal Cell Excitability Accompanies Depression-Like Behavior in Mice: A Transcranial Magnetic Stimulation Study'. *Journal of Neuroscience* 31 (45): 16464–72.
- Tanaka, T., Y. Takano, S. Tanaka, N. Hironaka, K. Kobayashi, T. Hanakawa, K. Watanabe, and M. Honda. 2013. 'Transcranial Direct-Current Stimulation Increases Extracellular Dopamine Levels in the Rat Striatum'. *Front Syst Neurosci* 7: 6.
- Teicher, Martin H., and Jacqueline A. Samson. 2013. 'Childhood Maltreatment and Psychopathology: A Case for Ecophenotypic Variants as Clinically and Neurobiologically Distinct Subtypes'. *The American Journal of Psychiatry* 170 (10): 1114–33.
- Tiger, Mikael, Lars Farde, Christian Rück, Andrea Varrone, Anton Forsberg, Nils Lindefors, Christer Halldin, and Johan Lundberg. 2016. 'Low Serotonin1B Receptor Binding Potential in the Anterior Cingulate Cortex in Drug-Free Patients with Recurrent Major Depressive Disorder'. *Psychiatry Research. Neuroimaging* 253: 36–42.
- Tynan, Ross J., Sundresan Naicker, Madeleine Hinwood, Eugene Nalivaiko, Kathryn M. Buller, David V. Pow, Trevor A. Day, and Frederick R. Walker. 2010. 'Chronic Stress Alters the Density and Morphology of Microglia in a Subset of Stress-Responsive Brain Regions'. *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (7): 1058–68.
- Ungerleider, L. G. 1995. 'Functional Brain Imaging Studies of Cortical Mechanisms for Memory'. *Science (New York, N.Y.)* 270 (5237): 769–75.
- Valzelli, L. 1973. 'The "Isolation Syndrome" in Mice'. *Psychopharmacologia* 31 (4): 305–20.
- Vismari, Luciana, Glauclie J. Alves, Marcelo N. Muscará, and João Palermo-Neto. 2012. 'A Possible Role to Nitric Oxide in the Anti-Inflammatory Effects of Amitriptyline'. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 34 (4): 578–85.
- Viviani, B., S. Bartesaghi, F. Gardoni, A. Vezzani, M. M. Behrens, T. Bartfai, M. Binaglia, et al. 2003. 'Interleukin-1beta Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (25): 8692–8700.
- Voineskos, Aristotle N., Alan A. Wilson, Anahita Boovariwala, Sandra Sagrati, Sylvain Houle, Pablo Rusjan, Stephen Sokolov, Edgar P. Spencer, Nathalie Ginovart, and Jeffrey H. Meyer. 2007. 'Serotonin Transporter Occupancy of High-Dose Selective Serotonin Reuptake Inhibitors during Major Depressive Disorder Measured with [11C]DASB Positron Emission Tomography'. *Psychopharmacology* 193 (4): 539–45.
- Von Frijtag, J. C., L. G. Reijmers, J. E. Van der Harst, I. E. Leus, R. Van den Bos, and B. M. Spruijt. 2000. 'Defeat Followed by Individual Housing Results in Long-Term Impaired Reward- and Cognition-Related Behaviours in Rats'. *Behavioural Brain Research* 117 (1–2): 137–46.
- Vonck, Kristl, Robrecht Raedt, Joke Naulaerts, Frederick De Vogelaere, Evert Thiery, Dirk Van Roost, Bert Aldenkamp, Marijke Miatton, and Paul Boon. 2014. 'Vagus Nerve Stimulation...25 Years Later! What Do We Know about the Effects on Cognition?' *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 45 (September): 63–71.
- Wagner, T., A. Valero-Cabre, and A. Pascual-Leone. 2007. 'Noninvasive Human Brain Stimulation'. *Annu Rev Biomed Eng* 9: 527–65.
- Wang, Huaning, Ruiguo Zhang, Yuting Qiao, Fen Xue, Huang Nie, Zhangjin Zhang, Ying Wang, Zhengwu Peng, and Qingrong Tan. 2014. 'Gastrodin Ameliorates Depression-like Behaviors and up-Regulates Proliferation of Hippocampal-Derived Neural Stem Cells in Rats: Involvement of Its Anti-Inflammatory Action'. *Behavioural Brain Research* 266 (June): 153–60.

- Wang, Ling, Chanjuan Zhou, Dan Zhu, Xinfu Wang, Liang Fang, Jiaju Zhong, Qiang Mao, et al. 2016. 'Serotonin-1A Receptor Alterations in Depression: A Meta-Analysis of Molecular Imaging Studies'. *BMC Psychiatry* 16 (1): 319.
- Wichers, M. C., G. H. Koek, G. Robaey, R. Verkerk, S. Scharpé, and M. Maes. 2005. 'IDO and Interferon-Alpha-Induced Depressive Symptoms: A Shift in Hypothesis from Tryptophan Depletion to Neurotoxicity'. *Molecular Psychiatry* 10 (6): 538–44.
- Widner, Bernhard, Andreas Laich, Barbara Sperner-Unterweger, Maximilian Ledochowski, and Dietmar Fuchs. 2002. 'Neopterin Production, Tryptophan Degradation, and Mental Depression--What Is the Link?' *Brain, Behavior, and Immunity* 16 (5): 590–95.
- Willner, P. 1984. 'The Validity of Animal Models of Depression'. *Psychopharmacology (Berl)* 83 (1): 1–16.
- Willner, P., R. Muscat, and M. Papp. 1992. 'Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression'. *Neurosci Biobehav Rev* 16 (4): 525–34.
- Willner, P., A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, and R. Muscat. 1987. 'Reduction of Sucrose Preference by Chronic Unpredictable Mild Stress, and Its Restoration by a Tricyclic Antidepressant'. *Psychopharmacology* 93 (3): 358–64.
- Willner, Paul. 2005. 'Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS'. *Neuropsychobiology* 52 (2): 90–110.
- Wohleb, Eric S., Tina Franklin, Masaaki Iwata, and Ronald S. Duman. 2016. 'Integrating Neuroimmune Systems in the Neurobiology of Depression'. *Nature Reviews. Neuroscience* 17 (8): 497–511.
- Yatham, Lakshmi N., Vesna Sossi, Yu-Shin Ding, Nasim Vafai, Shyam Sundar Arumugham, Taj Dhanoa, Raymond W. Lam, David J. Bond, and Joseph H. Puyat. 2018. 'A Positron Emission Tomography Study of Norepinephrine Transporter Occupancy and Its Correlation with Symptom Response in Depressed Patients Treated with Quetiapine XR'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 21 (2): 108–13.
- Yohn, Christine N., Mark M. Gergues, and Benjamin Adam Samuels. 2017. 'The Role of 5-HT Receptors in Depression'. *Molecular Brain* 10 (1): 28.
- Yoon, K. J., B. M. Oh, and D. Y. Kim. 2012. 'Functional Improvement and Neuroplastic Effects of Anodal Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Delivered 1 Day vs. 1 Week after Cerebral Ischemia in Rats'. *Brain Res* 1452: 61–72.
- Yoon, Kyung Jae, Yong-Taek Lee, Seoung Wan Chae, Chae Ri Park, and Dae Yul Kim. 2016. 'Effects of Anodal Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) on Behavioral and Spatial Memory during the Early Stage of Traumatic Brain Injury in the Rats'. *Journal of the Neurological Sciences* 362 (March): 314–20.
- You, Zili, Chunmei Luo, Wenzheng Zhang, Yubo Chen, Jiajia He, Qiuying Zhao, Rui Zuo, and Yanghua Wu. 2011. 'Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Expression in Rat's Brain and Spleen Exposed to Chronic Mild Stress: Involvement in Depression'. *Behavioural Brain Research* 225 (1): 135–41.
- Zajacka, John M., and Dominick Albano. 2004. 'SNRIs in the Management of Acute Major Depressive Disorder'. *The Journal of Clinical Psychiatry* 65 Suppl 17: 11–18.
- Zhang, Hong-Xia, Ye-Qing Xu, Yuan-Yuan Li, Ming-Fang Lu, Shen-Xun Shi, Jian-Lin Ji, and Li-Wei Wang. 2018. 'Difference in Proinflammatory Cytokines Produced by Monocytes between Patients with Major Depressive Disorder and Healthy Controls'. *Journal of Affective Disorders* 234: 305–10.
- Zhang, Yi, Lei Liu, Yun-Zi Liu, Xiao-Liang Shen, Teng-Yun Wu, Ting Zhang, Wei Wang, Yun-Xia Wang, and Chun-Lei Jiang. 2015a. 'NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation'. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (8).
- Zhao, Xinnan, Fengrui Cao, Qing Liu, Xinsheng Li, Guoyang Xu, Gang Liu, Yanli Zhang, et al. 2017. 'Behavioral, Inflammatory and Neurochemical Disturbances in LPS and UCMS-Induced Mouse Models of Depression'. *Behavioural Brain Research, May*.

- Zorrilla, E. P., L. Luborsky, J. R. McKay, R. Rosenthal, A. Houldin, A. Tax, R. McCorkle, D. A. Seligman, and K. Schmidt. 2001. 'The Relationship of Depression and Stressors to Immunological Assays: A Meta-Analytic Review'. *Brain, Behavior, and Immunity* 15 (3): 199–226.
- Zou, Wei, Renjie Feng, and Yuan Yang. 2018. 'Changes in the Serum Levels of Inflammatory Cytokines in Antidepressant Drug-Naïve Patients with Major Depression'. *PloS One* 13 (6): e0197267.
- Zunszain, Patricia A., Nilay Heggul, and Carmine M. Pariante. 2013. 'Inflammation and Depression'. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 14: 135–51.